INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin Sybille Mayer

aus Wiesbaden

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Thema

Biochemische und genetische Analyse von Chinolin-Resistenzen in *Plasmodium falciparum*

Gutachter: Prof. Dr. Michael Lanzer
Prof. Dr. Christine Clayton

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Die vorliegende Arbeit wurde am Hygieneinstitut, Abteilung Parasitologie der Universität Heidelberg in der Zeit von Februar 2006 bis Oktober 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Lanzer durchgeführt.

Datum:

--- ---

Sybille Mayer

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Lanzer für die Möglichkeit, dass ich in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anfertigen durfte. Auch möchte ich ihm für die gute Betreuung und Unterstützung ein Dank aussprechen. Zudem bot er mir zahlreiche Möglichkeit, an Kursen und Konferenzen teilzunehmen.

Herrn Prof. Wilfred Stein aus Jerusalem möchte ich danken, der bei seinen zahlreichen Deutschlandaufenthalten immer eine unterstützende Rolle während meiner gesamten Doktorandenzeit innehatte, immer offen für neue Ideen war und stets gute Tips parat hatte.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. Christine Clayton für die Übernahme des Zweitgutachtens und auch für die gute Beratung und Betreuung während der „TAC-Meetings“.

Ein besonderer Dank geht an meine Laborpartnerin Astuti Nurhasanah, nicht nur für unsere kooperative Zusammenarbeit, sondern auch für ihre Freundschaft und für drei schöne gemeinsame Laborjahre.

Vielen Dank auch an meine Kollegen aus dem Lanzerlabor, Doro (nicht nur für das Korrekturlesen), Marina, Elisabeth, Alex, Sebastiano, Anurag, Yvonne, Philipp, Theodora, Gabe, Cecilia, Petra, Tim, Nicole, Stephan und an alle, die ich nicht aufgezählt habe. Ihr wart immer eine tolle Unterstützung und habt für eine gute Atmosphäre gesorgt.

Ich möchte auch allen anderen Gruppen der Parasitologie für den Austausch in den Doktorandenseminaren und auch für private Treffen danken.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an meine Eltern für ihre seelische und auch finanzielle Unterstützung während meines gesamten Lebensweges, ohne die ein solcher Weg nicht möglich gewesen wäre. Auch möchte ich dem Rest meiner Familie Danke sagen und auch meinen Freunden, für ihr Verständnis, dass sie mich nicht mehr ganz so oft sehen konnten.

Ein ganz dickes Dankeschön geht an meinen Freund Henning, der mich immer und besonders auch während der schwersten Zeit liebevoll unterstützt hat. Auch danke ich seiner Familie.

Meinen Eltern,

meiner Familie

und meinem Freund

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS ..... **I**

DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG 1

ENGLISH SUMMARY 2

1. EINLEITUNG **3**

1.1 ALLGEMEINER ÜBERBLICK 3

1.2. DAS KRANKHEITSBILD DER MALARIA 5

1.3. LEBENSZYKLUS UND BIOLOGIE VON *P. FALCIPARUM* 7

1.4. GENETISCHE MUTATIONEN ZUM SCHUTZ VOR MALARIA 9

1.5. CHEMOTHERAPIE 12

1.5.1. Allgemeiner Überblick *12*

1.5.2. Wirkungsmechanismus der Chinoline *16*

1.5.2.1. Abbau von Hämoglobin 16

1.5.2.2. Chloroquins Wirkungsmechanismus 18

1.5.2.3. Chinins Wirkungsmechanismus 18

1.5.3. Mechanismus der Resistenzausbildung von Chloroquin und Chinin *19*

1.6. „QUANTITATIVE TRAIT LOCI"-ANALYSE (QTL-ANALYSE) 23

1.6.1. Prinzipien der QTL-Analyse *23*

1.6.2. QTL-Analysen in P. falciparum – Voraussetzungen und Möglichkeiten *25*

1.7. ZIELSETZUNG DER ARBEIT 26

2. MATERIAL UND METHODEN **28**

2.1. MATERIAL 28

2.1.1. Laborausstattung *28*

2.1.2. Verbrauchsmaterialien *29*

2.1.3 Chemikalien *30*

2.1.4 Biologische Materialien *31*

2.1.4.1. Parasitenstämme 31

2.1.4.2 Enzyme und DNA-Marker 32

2.1.4.3 Oligonukleotide 33

2.2. METHODEN 35
2.2.1. Zellkultur 35
2.2.1.1. Aufbereitung von humanen Erythrozyten 35
2.2.1.2. Aufbereitung von humanem Serum 35
2.2.1.3. Kultivierung von P. falciparum 35
2.2.1.4. Mikroskopische Darstellung von P. falciparum mittels Giemsa-Färbung 36
2.2.1.5. Bestimmung der Parasitämie 37
2.2.1.6. Auftauen von Parasiten 37
2.2.1.7. Einfrieren von Parasiten 38
2.2.1.8. Synchronisieren von P. falciparum infizierten Blutkulturen mit Sorbitol 38
2.2.1.9. Aufreinigung von Trophozoiten durch magnetische Separation 40
2.2.1.10. Benutzung der Thoma-Zählkammer zur Bestimmung der Erythrozytenkonzentration 42
2.2.2. Überprüfung der Stämme 43
2.2.2.1. Isolierung von genomischer DNA aus P. falciparum 43
2.2.2.2. Bestimmung von Längenpolymorphismen zur Charakterisierung der P. falciparum Stämme 45
2.2.2.3. Verschachtelte PCR zur Detektion der K76T Mutation in PfCRT 46
2.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese 48
2.2.3. Chloroquin- Chinidin- und Chinin-Akkumulationsexperimente in P. falciparum 50
2.2.3.1. Vorbereitung der Plasmodien-Kultur 50
2.2.3.2. Akkumulationsexperiment 50
2.2.3.3. QTL-Analyse 53
2.2.3.4. Mathematische Analyse der Lokus-Interaktionen 55
2.2.3.5. Bioinformatische Analyse 56
2.2.3.6. Auffinden und Charakterisierung neuer Marker 57

3. ERGEBNISSE 59

3.1. ÜBERPRÜFUNG DER IM AKKUMULATIONSEXPERIMENT EINGESETZTEN STÄMME 59
3.2. AKKUMULATIONSEXPERIMENTE 61
3.2.1. Messung der Zeitreihe der Parentalstämme HB3 und Dd2 61
3.2.2. Messung der Akkumulation in den F1-Nachkommen 62
3.3. QTL-ANALYSE 66
3.3.1. „Primary Scans“ 67
3.3.2. „Secondary Scans“ 70

3.4. MATHEMATISCHE ANALYSE DER EINZELNEN MAXIMA 75
3.4.1. Synergistischer Effekt von B5M12 und pfcrt bei der Chinidin-Akkumulation 76
3.4.2. POLY3 und Pf12 verringern die Akkumulation nur, wenn sie von Dd2 stammen . 78
3.4.3. Gegenläufige Beiträge von MDR1 und MEF_1 zur Chinidin-Akkumulation 79
3.4.4. Effekt von C5M2, C9M43 und TPI auf die Akkumulation..... 80
3.5. BIOINFORMATISCHE ANALYSE DES B5M12-LOKUS 82
3.6. LOKUSEINSCHRÄNKUNG DURCH IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG NEUER MARKER..... 87
3.6.1. Eingrenzung der „Crossing-over“-Bereiche zwischen B5M141 und LT103 sowie zwischen BM2 und PE14D..... 87
3.6.2. Suche nach einem unbekannten Doppel-„Crossing-over“ zwischen den Markern B5M2 und B5M12 88
3.7. EINFLUSS VON *PFNHE* AUF DIE CHLOROQUIN-, CHINIDIN- UND CHININ-AKKUMULATION 90
3.8. ERNEUTE QTL-ANALYSE MIT 15 NEUEN MARKERN..... 93

4. DISKUSSION 95

4.1. AKKUMULATIONSSTUDIEN, QTL-ANALYSEN UND MATHEMATISCHE UNTERSUCHUNGEN DER QTL 95
4.2. BIOINFORMATISCHE UNTERSUCHUNG UND EINSCHRÄNKUNG DES B5M12-LOKUS..... 103
4.3. EINFLUSS VON PFNHE AUF DIE AKKUMULATION..... 104
4.4. AUSBLICK..... 105

5. LITERATURVERZEICHNIS 106

6. ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN 119

7. ANHANG 123

Deutsche Zusammenfassung

Zur Bekämpfung der Malaria, an der jährlich weltweit eine Millionen Menschen sterben, kommen auch zwei Unterklassen der Chinolin-Antimalariamittel zum Einsatz. Chloroquin, was zu den 4-Aminochinolinen gehört und die Diastereomere Chinin und Chinidin, die zu den Arylaminoalkoholen gezählt werden.

Eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Chloroquin-Resistenz hat PfCRT (*P. falciparum* „chloroquine resistance transporter“). Die Chinin- und Chinidin-Resistenz scheinen jedoch weit komplexer zu sein und es wird vermutet, dass mehrere Faktoren hieran beteiligt sind. Diskutiert werden PfCRT, PfMDR1 (*P. falciparum* „multi drug resistance 1“) und PfNHE (Natrium-Protonen-Austauscher).

In dieser Arbeit wurde die initiale [^{3}H]-Chloroquin- und [^{3}H]-Chinidin-Akkumulation in den Stämmen der genetischen Kreuzung aus HB3 und Dd2 und ihren F1-Nachkommen gemessen und anschließend eine QTL-Analyse („Quantitative Trait Locus”) durchgeführt. Mit der Bestimmung der initialen Akkumulationen wurden lediglich Transport- und Partitionierungsprozesse über die Membran bestimmt.

Während die Chloroquin-Akkumulation hauptsächlich von PfCRT beeinflusst war, wurde die Chinidin-Akkumulation zwar auch von PfCRT, aber auch von einem zweiten Faktor auf Chromosom 7, dem B5M12-Lokus kontrolliert. Dieser wurde auch schon bei der Chinin-Akkumulation beschrieben. B5M12 und PfCRT interagierten dabei synergistisch. Zwei weitere Faktoren auf Chromosom 6 und 13 verändern ebenfalls die Chinidin-Akkumulation. Der Lokus auf Chromosom 13 entsprach nicht PfNHE. Um dennoch den Einfluss von PfNHE auf die Chinin- und Chinidin-Akkumulation zu bestimmen, wurden Akkumulationsexperimente mit drei Austauschmutanten mit verminderter PfNHE-Expression durchgeführt. Ein Einfluss von PfNHE auf die Akkumulation konnte mit diesen Experimenten ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte der B5M12-Lokus von 36 auf 25 Kandidatengene eingeschränkt werden. Dabei konnten Gene ohne Sequenzunterschiede zwischen HB3 und Dd2 ausgeschlossen und der genaue Lokusbereich durch Bestimmung der „Crossing-over“-Region eingeschränkt werden.

Eine Regression der Chinin- und der Chinidin-Akkumulation zeigte, dass die Akkumulationen beider Medikamente positiv linear korreliert sind. Die Hauptfaktoren der Akkumulation beider Medikamente scheinen somit übereinzustimmen.

English summary

Annually, one million people are dying from Malaria. For the treatment of this disease two subclasses of the quinoline antimalarials are widely used. Chloroquine belongs to the subclass of the 4-aminoquinolines, whereas the diastereomers quinine and quinidine are members of the arylamino alcohols.

PfCRT (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter) has an important role in mediating chloroquine resistance. However, the mechanisms underlying quinine and quinidine resistance are not so easily explained. A multifactorial mechanismus is proposed. Considered are PfCRT, PfMDR1 (*P. falciparum* multidrug resistance 1) and PfNHE (putative sodium/hydrogen exchanger).

In this study, the initial accumulation levels of [^{3}H]-chloroquine and [^{3}H]-quinidine in the progeny of the HB3 x Dd2 genetic cross were investigated and a QTL-analysis (quantitative trait locus) was performed. The rationale behind these experiments is that only facilitating, transporting and partitioning processes are being taken into account.

Whereas chloroquine accumulation was mainly under control of PfCRT, quinidine accumulation was affected by PFCRT and a second factor on Chromosome 7, the B5M12 locus. B5M12 and PfCRT interacted synergistically. Two minor factors on chromosomes 6 and 13 played also a role in the quinidine accumulation. The locus on chromosome 13 did not correspond to PfNHE. This was shown by measuring the direct contribution of PfNHE to quinidine and quinine accumulation in experiments with PfNHE allelic exchange mutants. A correlation between PfNHE and quinidine and quinine accumulation could not be detected.

In this study the 36 candidate genes found in the B5M12 locus could be reduced to 25 genes by excluding genes having no polymorphisms between HB3 and Dd2 and by narrowing the crossing over regions.

A regression between quinine and quinidine accumulation showed that both drugs are positively correlated which means that quinine and quinidine accumulation share the same main factors.

1. Einleitung

1.1 Allgemeiner Überblick

Malaria ist die wichtigste durch Parasiten hervorgerufene Infektionskrankheit weltweit. Etwa 40 % der Weltbevölkerung lebt in Malariaendemiegebieten. 109 Länder in Afrika, Asien, Zentral- und Südamerika, Hispaniola, Ozeanien und im Mittleren Osten waren 2006 von Malaria betroffen. Nach Schätzungen der World Health Organisation (WHO) traten ca. 247 Millionen (189-327) Malariafälle unter 3,3 Milliarden gefährdeter Menschen im Jahr 2007 auf (Abb. 1.1.). Dabei haben ca. eine Millionen Menschen ihr Leben verloren, die meisten davon waren Kinder unter 5 Jahren oder schwangere Frauen. 91 % aller Todesfälle ereigneten sich in Afrika (World Health Organisation, 2008).

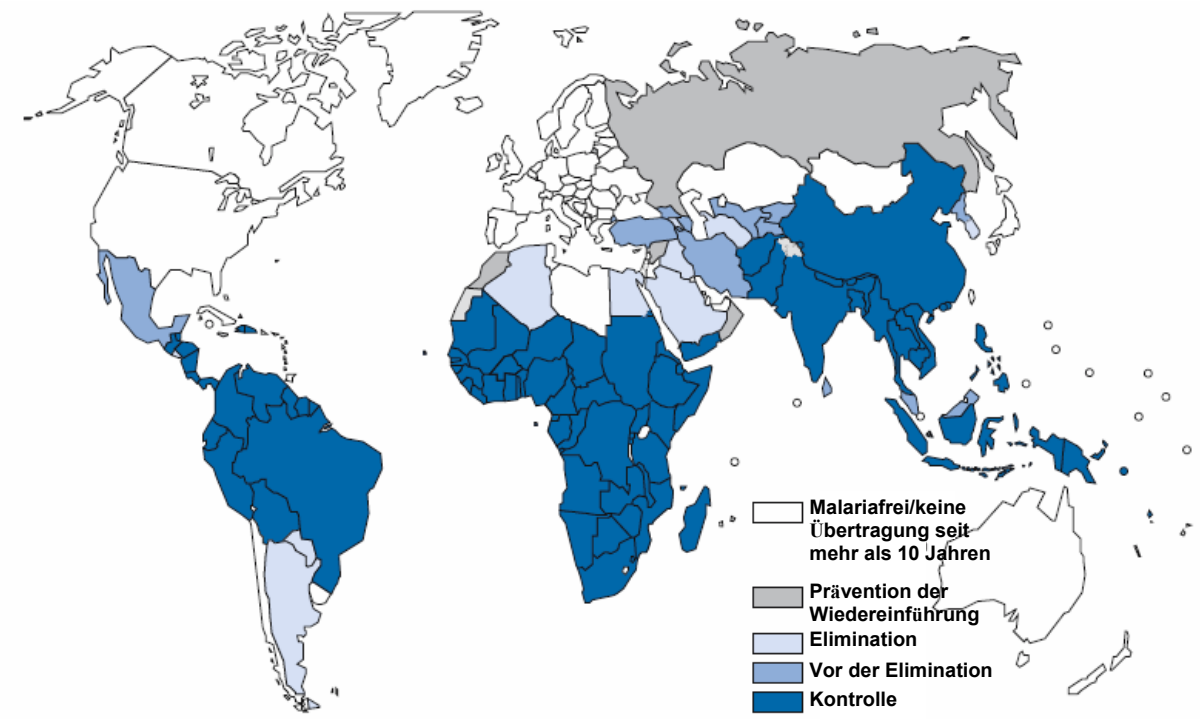

Abb. 1.1.: Weltweite Verbreitung der Malaria Ende 2007 (World Health Organisation 2008)
Die Weltkarte zeigt malariafreie Länder und Malariaendemiegebiete, die in verschiedene Bereiche unterteilt werden (malariafreie Gebiete, Prävention der Wiedereinführung, Elimination, vor der Elimination und Kontrolle).

Der Begriff Malaria leitet sich aus dem italienischen *mal'aria* ab und bedeutet „schlechte Luft", da man lange Zeit glaubte, üble Gerüche von Sumpfgebieten seien die Ursache dieser Krankheit, weshalb sie auch Sumpffieber heißt. Heute ist allerdings bekannt, dass Malaria durch den einzelligen Parasiten der Gattung *Plasmodium* (Stamm *Apicomplexa*, Klasse *Sporozoa*, Ordnung *Coccidida*, Unterordnung *Haemosporidiae*, Familie *Plasmodiidae*) hervorgerufen wird. Bisher sind 199 Plasmodien-Arten bekannt, die in Säugetieren, Vögeln und Reptilien parasitieren. Sie werden von Mosquitos oder Sandfliegen durch Blutsaugen auf den Wirt übertragen (Martinsen *et al.*, 2008). Die humanpathogene Malaria wird durch die weibliche Mücke der Gattung *Anopheles* übertragen (Stamm *Arthropoda*, Klasse *Insecta*, Ordnung *Diptera*, Unterordnung *Nematocera*, Familie *Culicidae*) und kann durch Mosquito-Netze, Insektenschutzmittel oder durch die reduzierte Vermehrung der Mosquitos, indem Insektizide versprüht oder stehende Gewässer trockengelegt werden, eingedämmt werden.

Lange waren nur vier humanpathogene Malariaerreger bekannt, *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* die Erreger der Malaria tertiana sowie *Plasmodium malariae*, der die Malaria quartana verursacht (Warrell *et al.*, 2002). Ein fünfter, *Plasmodium knowlesi*, wird nun ebenfalls zu den humanpathogenen Malariaerregern hinzugezählt (Pain *et al.*, 2008). Zuvor wurde dieser Parasit zu den Malariaerregern, die Affen infizieren, gerechnet, aber immer mehr Fälle bestätigten Infektionen des Menschen. *Plasmodium falciparum* ist der klinisch bedeutsamste und gefährlichste Erreger, da er die schwerste Verlaufsform hat.

Im Jahr 1880 entdeckte Charles Louis Alphonse Laveran, ein französischer Armeearzt, den Parasiten in den roten Blutzellen von Patienten, die an Malaria litten. Für diese Entdeckung bekam er 1907 den Nobelpreis verliehen. Im Jahr 1886 gelang es Golgi einen Zusammenhang zwischen dem Malaria-Fieber und den Malariaparasiten herzustellen. Dr. Ronald Ross, ein brittischer Offizier in Indien, entdeckte dann 1897, dass Malaria durch Mosquitos übertragen wird und bekam ebenfalls den medizinischen Nobelpreis, allerdings schon 1902. Die komplette Sporogonie (sexuelle Phase in der Mücke) von *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. malariae* wurde von Giovanni Batista Grassi und einem Team italienischer Forscher, denen Amico Bignami und Giuseppe Bastianelli angehörten, gezeigt (Shortt, 1951). Der Protozoe wurde von den beiden Italienern Ettore und Angelo Celli *Plasmodium* genannt (Marchiafava *et al.*, 1885; Ferdig *et al.*, 2004).

1.2. Das Krankheitsbild der Malaria

Die anfänglichen Symptome der Malaria, die 10-15 Tage nach der Infektion auftreten, sind hohes, wiederkehrendes bis periodisches Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen, Beschwerden des Margen-Darm-Trakts und Krämpfe. Im schlimmsten Fall kann diese Krankheit zu Koma und zum Tod führen, was besonders häufig bei Kindern eintritt.
Die klassischen Fieberanfälle bestehen aus drei Phasen, die vier bis sechs Stunden andauern. Sie beginnen mit Schüttelfrost, worauf ein Hitzestadium mit Kopfschmerzen, Erbrechen und Körpertemperaturen von 40–41 °C folgt. Schließlich tritt ein erneuter Fieberschub unter starken Schweißausbrüchen auf (Piekarski, 1987). Bei der Malaria tertiana (*P. ovale* und *P. vivax*) treten diese Fieberanfälle nach 48 Stunden erneut auf, während sie bei der Malaria quartana (*P. malariae*) alle 72 Stunden auftreten. Die Fieberschübe der Malaria tropica (*P. falciparum*) sind unregelmäßig und treten alle 36 bis 48 Stunden auf, können aber auch kontinuierlich anhalten. Ähnliche, unregelmäßige Fieber kommen aber auch bei Mischinfektionen mit verschiedenen *Plasmodien*-Arten vor, was die Diagnose erschwert. Die schwere Verlaufsform der Malaria tritt dann auf, wenn es durch eine *P. falciparum* Infektion zu Organschäden, Abnormalitäten im Blut und im Stoffwechsel kommt.
Die Fieberanfälle werden durch lösliche Malariatoxine ausgelöst, die beim Zerbersten des mit dem Schizonten infizierten Erythrozyten freigesetzt werden. Die Toxine induzieren die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, z.B. TNFα oder Interleukin, durch Makrophagen (Playfair *et al.*, 1990; Kwiatkowski *et al.*, 1989). Die Zytokine führen dann auch zu einer Laktatazidose, verbunden mit einem Abfall des Zuckerspiegels (Hypoglykämie), was aber auch durch den Stoffwechsel des Parasiten mit verursacht wird. Die Hypoglykämie kann Koma zur Folge haben. Sowohl die Erythrozytenlyse, als auch der Abbau der infizierten roten Blutzellen in der Milz und die verminderte Erythropoese im Knochenmark durch die Zytokinfreisetzung führen zum Auftreten einer Anämie (Kayser, 2001; Clark *et al.*, 1988). Dabei korreliert die Intensität des Parasitenbefalls mit der Schwere der Anämie. Eine weitere Folge einer schweren Malariaerkrankung kann Hämoglobinurie (Schwarzwasser) sein, die durch den ansteigenden Hämoglobinspiegel im Blut nach der Erythrozytenlyse entsteht. Dies kann auch zu Nierenversagen führen. Oft ist auch eine Vergrößerung der Milz (Splenomegalie) zu beobachten, da die Trümmer der lysierten Erythrozyten dort abgebaut werden müssen. Weiterhin können Lungenödeme auftreten und Durchblutungsstörungen der Nieren kann Nierenversagen als Folge haben. Bei der zerebralen Malaria treten oft Seh-, Koordinations- und Bewusstseinsstörungen auf, die bis hin zu Koma führen können, aber

auch Lähmungen und Krampfanfälle sind nicht ausgeschlossen. Diese From der Malaria tritt auf, wenn infizierte Erythrozyten an kleine Blutgefäße des Hirns adhärieren und diese verstopfen. Fast 20 % der schweren Malariafälle enden selbst mit intensiver ärztlicher Betreuung und medikamentöser Behandlung tötlich (Kain *et al.*, 1998). Eine weitere schwerwiegende Form der komplizierten Malaria ist die maternale Malaria. Obwohl Erwachsene, die in Malariaendemiegebieten leben, eine schützende Immunität durch die zahlreichen Infektionen entwickeln, ist die Immunität bei einer Schwangerschaft, vor allem in der ersten, verändert und die Frauen entwickeln höhere Parasitämien (McGregor *et al.*, 1983). Die Sterblichkeitsrate der Mütter liegt zwischen 20-30 %. Eine Sequestrierung infizierter Erythrozyten an die Plazenta verursacht diese Form der Malaria. Die Hauptsymptome hierbei sind Anämie der Mutter, innerhalb der Gebärmutter erfolgende Wachstumsretardation und ein erhöhtes Risiko für Fehl- und Frühgeburten (Shulman *et al.*, 2003). Hierbei gilt das oft sehr niedrige Geburtsgewicht als wesentlicher Mortalitätsfaktor der Neugeborenen.

Die molekularen Grundlagen des schweren Verlaufs einer *P. falciparum*-Infektion sind zum einen die Zytoadhärenz der infizierten Erythrozyten, zum anderen die Maskierung des Parasiten vor dem Immunsystem durch Antigenvarianz. Durch das Adhärieren der infizierten Erythrozyten an das Endothel der Blutgefäße entgeht der Parasit einer Elimination in der Milz, die abnormale Erythrozyten erkennt. Infizierte Erythrozyten können aber auch an nicht infizierte Erythrozyten binden, was als „rosetting“ bezeichnet wird (Wahlgren *et al.*, 1992). Selbst kleinste Blutgefäße werden verstopft und rufen so die Symptome der zerebralen und maternalen Malaria hervor. Die Adhärenz wird durch das *P. falciparum* Erythrozyten Membranprotein 1 (PfEMP1) hervorgerufen, das von reifern, parasitierten Erythrozyten an der Oberfläche in sogenannten „knobs“ akkumuliert und präsentiert wird (Baruch, 1999; Berendt *et al.*, 1994; Baruch *et al.*, 1996). PfEMP1 bindet an spezifische Wirtsoberflächenmoleküle, z.B. an CD36, Thrombospondin (TSP), ICAM-1 oder Chondroitinsufat A (CSA), die sich auf den Endothelzellen der Blutgefäße oder verschiedenen Organen befinden (Springer *et al.*, 2004; Baruch *et al.*, 1996; Sherman *et al.*, 2003).

PfEMP1 wird von der *var*-Multigenfamilie kodiert, deren Gene hauptsächlich in subtelomeren Regionen aller 14 Chromosomen liegen (Hernandez-Rivas *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 1997; Sherman *et al.*, 2003). Pro haploidem Genom gibt es ca 40-50 verschiedene *var*-Gene (Sherman *et al.*, 2003), von denen mehrere in den frühen Ringstadien transkribiert werden, aber nur eine vorherrschende mRNA in den späteren Stadien zu PfEMP1 translatiert wird. So wird von einem einzelnen Parasit nur ein PfEMP1 gebildet, aber in der Parasitenpopulation

treten dann ganz unterschiedliche PFEMP1s auf. Die hohe Vielfalt von PfEMP1 verhindert einen guten Angriffspunkt für die humorale Immunantwort des Wirtes (Roberts *et al.*, 1992).
Chronische Malaria wurde zum ersten Mal von Pel 1886 beschrieben (Pel, 1886) und tritt bei *P. vivax* und *P. ovale* auf, da sich Dauerstadien, sogenannte Hypnozoiten, in der Leber bilden und nach Monaten, sogar erst nach Jahren zu Fieberattacken führen können. Nach einiger Zeit im Ruhezustand bilden diese dann Merozoiten, die ins Blut freigesetzt werden, womit der intraerythrozytäre Kreislauf beginnt. *P. falciparum* und *P. malariae* bilden diese Dauerstadien nicht. Hypnozoiten sind somit für lange Inkubationen und späte Rückfälle bei *P. vivax* und *P. ovale* verantwortlich (Cogswell, 1992).

1.3. Lebenszyklus und Biologie von *P. falciparum*

Der Lebenszyklus von *P. falciparum* durchläuft drei Phasen, wovon eine Phase in der *Anopheles*-Mücke und zwei Phasen im Menschen stattfinden. Im Menschen erfolgt zunächst eine ungeschlechtliche Vermehrung in den Hepatozyten der Leber (exoerythrozytäre Phase) und anschließend eine weitere ungeschlechtliche Vermehrung in den Erythrozyten (intraerythrozytäre Phase). Beide, im Menschen ablaufende Phasen, werden zur asexuellen Phase oder auch Schizogonie zusammengefasst (Abb. 1.2.a). Die dritte Phase ist eine geschlechtliche Fortpflanzung (Gamogonie) und Vermehrung in der Mücke. Sie wird auch als sexuelle Phase oder Sporogonie bezeichnet (Abb. 1.2.b).
Der Entwicklungszyklus ist streng wirtsspezifisch und kann nur bei Temperaturen zwischen 15 und 33 °C stattfinden, da sonst die Entwicklung in der Mücke nicht gewährleistet ist. Diese dauert, je nach Außentemperatur, acht bis 16 Tage. Nur weibliche Anopheles-Mücken saugen Blut, weshalb auch nur sie Malaria übertragen können.

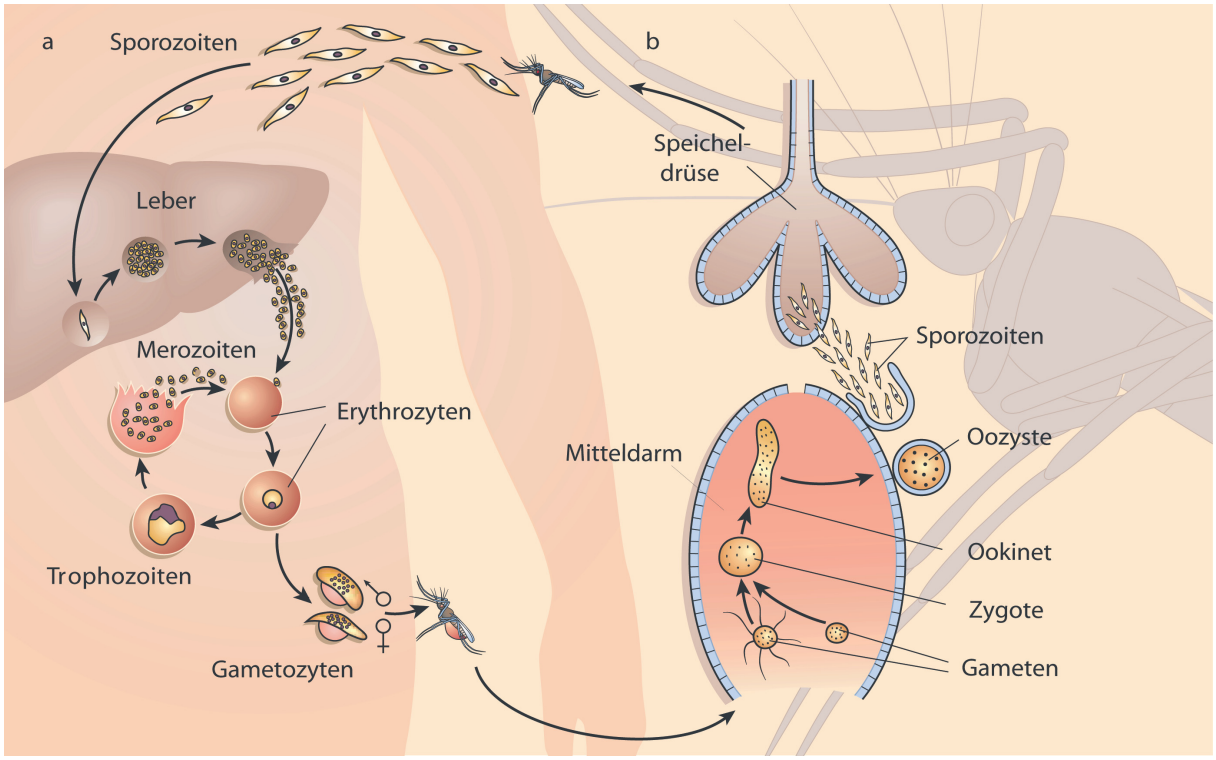

Abb. 1.2.: Lebenszyklus von *P. falciparum*
Die Übertragung von *P. falciparum* auf einen Menschen erfolgt durch den Stich einer *Anopheles*-Mücke. Dabei werden verschiedene Differenzierungsschritte im Wirt (a) und im Vektor (b) durchlaufen. Im Wirt erfolgen zwei Phasen der ungeschlechtlichen Vermehrung. Die erste findet in den Hepatozyten der Leber statt (exoerythrozytäre Phase), während die zweite Phase in den Erythrozyten erfolgt (intraerythrozytäre Phase). Zusammengefasst bilden sie die Phase der Schizogonie. In der *Anopheles*-Mücke erfolgt eine geschlechtliche Entwicklung (Gamogonie) und Vermehrung. Diese Phase wird auch als Sporogonie bezeichnet. Grafik modifiziert nach (Wirth, 2002)

Mit dem Blutmahl einer *Anopheles*-Mücke werden ca. 100 Sporozoiten in die Haut des Menschen injiziert (Medica *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2007). Zuvor wurde angenommen, dass sie dort nur kurze Zeit (etwa 30 min) verbleiben. Es konnte allerdings mit *P. yoelii* gezeigt werden, dass sie erst nach ein bis drei Stunden auf ein Blutgefäß treffen, es durchdringen und in den Blutstrom gelangen, von wo aus sie dann die Leber erreichen (Amino *et al.*, 2006; Yamauchi *et al.*, 2007; Vanderberg *et al.*, 2004). Sporozoiten können durch Zellen wandern, ohne sie zu invadieren, allerdings werden die dabei durchdrungenen Zellen verletzt (Mota *et al.*, 2001). So wandern sie durch die sinusoidale Barriere der Leber (Endothelzellen und Kupfferzellen) und dringen schließlich in Hepatozyten ein, wo dann die exoerythrozytäre Schizogonie stattfindet (Ejigiri *et al.*, 2009). Diese beinhaltet die Reifung/Teilung zu einem Leberschizonten, der bis zu 30000 Merozoiten enthalten kann. Wenn der Schizont aufplatzt, gelangen die Merozoiten in die Blutbahn. Dort invasieren sie Erythrozyten und die intraerythrozytäre Schizogonie beginnt. Zunächst entwickeln sie sich innerhalb einer parasitophoren Vakuole zu sogenannten Ringformen, die dann weiter zu Trophozoiten reifen. Durch Teilung entstehen Schizonten, der beim Zerbersten ca. acht bis zwölf, teilweise sogar

bis zu 32 Merozoiten in das Blut freisetzen. Die Merozoiten dringen großteils erneut in Erythrozyten ein, einige differenzieren aber auch zu Geschlechtsformen, den Gametozyten. Es gibt weibliche Gametozyten, die Makrogametozyten genannt werden und männliche, die Mikrogametozyten heißen. Die Gametozyten werden mit dem Blutmahl einer *Anopheles*-Mücke aufgenommen. Im Mitteldarm der Mücke entwickeln sich aus den Mikrogametozyten durch Exflagellation innerhalb weniger Minuten nach dem Blutmahl vier bis acht begeißelte haploide Mikrogameten, während eine Makrogametozyte zu einer kugelförmigen Makrogamte differenziert (Ghosh *et al.*, 2000). Durch Verschmelzung eines Mikrogamten mit einem Makrogameten ensteht eine bewegliche Zygote. Sie differenziert sich und dringt als Ookinet durch das Darmepithel. In dem Raum zwischen der Basallamina und dem Darmepithel reift sie zur Oozyste, die nach einigen Tagen zerplatzt und tausende Sporozoiten in die Hämolymphe der Mücke freisetzt. Diese wandern dann in die Speicheldrüse der Mücke, die sie aktiv über Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen erkennen (Rosenberg, 1985; Ghosh *et al.*, 2009). Beim nächsten Blutmahl werden die Sporozoiten auf den Menschen übertragen und ein neuer Zyklus beginnt.

1.4. Genetische Mutationen zum Schutz vor Malaria

In jüngster Vergangenheit hat Malaria den größten genetischen Druck auf die Menschheitsentwicklung ausgeübt, da die Erkrankungsziffer und die Sterblichkeitsrate, vor allem durch *P. falciparum* Infektionen, sehr groß ist (Kwiatkowski, 2005). So existierten Malariaparasiten zwar schon lange vor der Menschheit, darunter einige Spezies die andere Säugetiere, Vögel und Reptilien infizieren und auch einige wenige *P. falciparum* Arten. Analysen von 100, aus aller Welt stammenden mitochondrialen DNAs der Parasiten ergaben allerdings, dass die afrikanische Parasitenpopulation vor etwa 10000 Jahren enorm zugenommen und sich dann auch in anderen Regionen verbreitet hat (Joy *et al.*, 2003). In dieser Zeit begann der Ackerbau, die Menschen wohnten in kleinen Ansiedlungen zusammen und bildeten so das nötige Reservoir für Infektionen, womit der genetische Druck zunahm.
Allein *P. falciparum* verursacht heutzutage eine halbe Milliarde Malariavorfälle jedes Jahr (Snow *et al.*, 2005), dazu kommen noch viele Hundertmillionen Erkrankungen durch andere *Plasmodium*-Spezies wie *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi*. Aus diesem Grund haben sich beim Menschen Mutationen zum Schutz vor der schweren Verlaufsform der Malaria entwickelt (Tabelle 1.4.1.). Hierbei handelt es sich um Mutationen, welche die

Erythrozyten betreffen, da in diesen die intraerythrozytäre Phase des Malarialebenszyklus erfolgt. Hauptsächlich sorgen Mutationen in Hämoglobingenen (Hämoglobinopathien) für eine gewisse Resistenz gegenüber Malaria, aber auch Enzyme des Erythrozytenstoffwechsels können betroffen sein. Es werden aber auch Veränderungen in inflammatorischen Genen, Genen des Immunsystems und auch in der Zelladhäsion mit einem Schutz vor Malaria in Verbindung gebracht.

Tabelle 1.4.1.: Erythrozytenvarianten, die Resistenz gegen Malaria vermitteln
P. v.: *P. vivax; P. f.*: *P. falciparum*; Verändert nach (Williams, 2006; Kwiatkowski, 2005)

Gen	Protein	Funktion	Genetische Assoziation mit Malaria
FY	Duffy Antigen	Chemokin-Rezeptor	FY*O-Allel schützt komplett vor *P. v.*
G6PD	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase	Enzym schützt vor oxidativem Stress	G6PD-Defizienz schützt vor Malaria mit schweren Komplikationen
PK	Pyruvatkinase	Katalyse von Phospho-enolat zu Pyruvat	PK-Defizienz schützt eventuell vor Malaria
GYPA	Glykophorin A	Sialoglykoprotein	GYPA-defiziente Erythrozyten sind vor *P. f.* Invasion geschützt
GYPB	Glykophorin B	Sialoglykoprotein	GYPB-defiziente Erythrozyten sind vor *P. f.* Invasion geschützt
GYPC	Glykophorin C	Sialoglykoprotein	GYPC-defiziente Erythrozyten sind vor *P. f.* Invasion geschützt
HBA	α-Globin	Hämoglobinkomponente	α^+-Thalassämie schützt vor komplizierter Malaria
HBB	β-Globin	Hämoglobinkomponente	HbS- und HbC-Allel schützt vor komplizierter Malaria. HbE-Allel mindert Parasiteninvasion
HP	Haptoglobin	Hämoglobinbindeprotein im Plasma	Haptoglobin 1-1 Genotyp ist mit veränderter Suszeptibilität von komplizierter Malaria im Sudan und in Ghana assoziiert
SCL4A1	CD233, Erythrozyt-Bande-3-Protein	Chlorid/Bikarbonat-Austauscher	Deletion verursacht Ovalozytose, schützt vor zerebraler Malaria

Die Sichelzellanämie wird durch eine Mutation (Glu6Val) in der β-Untereinheit (β-Globin) des Hämoglobins im *HBB*-Gen verursacht. Betroffene bilden ein verändertes Hämoglobin, das Sichelzell-Hämoglobin oder auch kurz HbS genannt. Diese Variation ist das

Paradebeispiel für einen ausgeglichenen Polymorphismus in der menschlichen Bevölkerung (Feng *et al.*, 2004; Hedrick, 2004) und wurde erstmals von Allison beschrieben (Allison, 1954).

Homozygote Träger leiden unter Sichelzellanämie. Hierbei aggregiert das abnormale Hämoglobin bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck, der unter normalen physiologischen Bedingungen schon in den Kapillaren herrscht und verformt so die Erythrozyten zu einer Sichelform. Diese sind weniger elastisch und verstopfen kleine Blutgefäße. Darüber hinaus werden diese deformierten Blutzellen in der Milz schneller abgebaut, was in einer schweren hämolytischen Anämie resultiert.

Heterozygote Träger bilden neben HbS auch normales Hämoglobin, so dass nur etwa 1 % der Erythrozyten deformiert ist. Symtome zeigen sich erst, wenn der Sauerstoffpartialdruck stark vermindert ist wie z.B. bei großen Anstrengungen oder in der Höhe.

In Malariaendemiegebieten tritt das Sichelzellallel mit einer zehnprozentigen Häufigkeit auf. Die Mutation hat sich in verschiedenen Regionen unabhängig voneinander ausgebildet (Flint *et al.*, 1998). Heterozygote Träger haben ein zehnfach reduziertes Risiko Malaria mit kompliziertem Verlauf zu bekommen (Ackerman *et al.*, 2005). Die damit verbundenen möglichen Mechanismen sind zum einen vermindertes Wachstum der Parasiten in den Erythrozyten (Pasvol *et al.*, 1978), zum anderen ein gesteigerter Abbau der befallenen Erythrozyten in der Milz (Shear *et al.*, 1993).

Neben der HbS Variante in der β-Globin-Kette gibt es auch die HbC (Glu6Lys) und die HbE (Glu26Lys) Variante (Tabelle 1.4.1.), die unabhängig voneinander auf Grund des Selektionsdrucks enstanden sind und vor Malaria schützen (Chotivanich *et al.*, 2002; Modiano *et al.*, 2001).

Die verschiedenen Formen der Thalassämie sind auf Deletionen oder Punktmutationen im *HBA*-Gen (α^+-Thalassämie) oder im *HBB*-Gen (β-Thalassämie) zurückzuführen, was eine reduzierte Synthese der α-Globin- bzw. der β-Globin-Kette zur Folge hat. Meist ist die homozygote Thalassämie letal. Falls nur eines der beiden *HBA*-Gene betroffen ist, haben homozygote Träger nur eine milde Anämie. Heterozygote aller Varianten sind ebenfalls nur mild anämisch.

Charakteristisch für eine α^+-Thalassämie sind abnorm kleine Erythrozyten (Mikrozytose) und erhöhte Erythrozytenwerte. Der genaue Mechanismus, wie die Thalassämie vor komplizierter Malaria schütz, ist noch nicht verstanden, aber eine Studie von Fowkes zeigte, dass die erhöhten Erythrozytenwerte in der homozygoten α^+-Thalassämie zu einem Schutz vor einer durch Malaria verursachten Anämie führen (Fowkes *et al.*, 2008; Danquah *et al.*, 2008).

Ausgereifte Erythrozyten haben keine Mitochondrien und keinen oxidativen Metabolismus, weshalb sie Glukose anaerob abbauen. Um stets ein reduzierendes Millieu und damit einen Elektronendonor zu haben, muss $NADP^+$ zu NADPH umgewandelt werden. Diese Aufgabe hat das Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD), dass die Reaktion Glukose-6-Phosphat unter Reduktion von $NADP^+$ zu D-Glucono-1,5-Lakton-6-Phosphat (6-Phosphoglucono-δ-lakton) und NADPH im Pentose-Phosphatweg katalysiert. NADPH ist wichtig bei der Bekämpfung von oxidativem Stress, bei der es ebenfalls als Elektronendonor dient.

Eine fehlerhafte G6PD führt zu einer vermehrten Hämolyse und damit zu Anämie, allerdings verleiht diese Stoffwechselstörung einen Schutz vor schwerer Malaria (Gilles *et al.*, 1967; Ruwende *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass die Replikation der Parasiten in den Erythrozyten vermindert ist (Luzzatto *et al.*, 1969).

Weitere humane Resistenzen gegen Malaria sind in Tabelle 1.4.1. zusammengefasst.

1.5. Chemotherapie

1.5.1. Allgemeiner Überblick

Bis heute gibt es keinen Impfstoff, der vor Malaria schützt, weshalb weiter an neuen Antimalariamitteln, der Weiterentwicklung bestehender Medikamente oder Kombinationstherapien, die präventiv eingenommen oder zur Behandlung eingesetzt werden, geforscht wird.

Eine medikamentöse Behandlung von Malaria geht auf den Beginn des siebzehnten Jahrhunderts zurück, als Malariakranke mit der pulverisierten Rinde, des in den Anden beheimateten Cinchona-Baums (*Cinchona pubescens*), behandelt wurden. Die dort ansässigen peruanischen Quechua Indianer entdeckten die fiebersenkende Wirkung. Die Gräfin von Cinchona, die Gattin des Vizekönigs der spanischen Kolonien, konnte 1638 durch den Arzt de Vega mit einem Sud aus gemahlener Rinde von Malaria kuriert werden (BayerAG, 1988) und gab dieser Pflanze dadurch wahrscheinlich ihren Namen. Die Jesuiten brachten die Pflanze dann nach Europa.

Die Rinde enthält die beiden Chinolinalkaloide Chinin und Chinidin, die zu den Arylaminoalkoholen gehören. 1817 konnten Pelletier und Caventou zum ersten Mal Chinin durch Extraktion mit Alkohol aus der Rinde isolieren. Erst 1944 gelang es Woodward und von Doering Chinin zu synthetisieren (Woodward *et al.*, 1944; Woodward *et al.*, 1945).

Seitdem sind viele unterschiedliche und effizientere Totalsynthesen entwickelt worden (Kaufman *et al.*, 2005), allerdings hat es keine dieser Synthesen zu einem industriellen Maßstab gebracht, da sie alle weniger wirtschaftlich sind, als die Extraktion von Chinin aus Cinchona Bäumen.

Chinin wird trotz seiner vielen Nebenwirkungen noch immer zur Behandlung unkomplizierter Malaria eingesetzt. Es wird auch zur Therapie von schwerer Malaria verwendet, da es intravenös verabreicht werden kann (Suh *et al.*, 2004). Chinidin, das Diastereomer von Chinin, ist zwar effektiver als Chinin, allerdings ist hier auch das Risiko für Herzrhythmusstörungen größer.

Der erste synthetische Wirkstoff, der bei Malariapatienten eingesetzt wurde, war der Farbstoff Methylenblau. Paul Ehrlich entdeckte im Mikroskop, dass sich dieser Farbstoff in Parasiten anreichert und konnte dann erstmals 1891 zusammen mit Paul Guttmann zwei Malariapatienten erfolgreich behandeln (Guttmann *et al.*, 1891). Heute weiß man, dass Methylenblau ein Gluthation-Reduktase-Inhibitor ist, der in den Redoxhaushalt des Parasiten eingreift (Farber *et al.*, 1998).

Chloroquin (früher Resorchin) ist das wichtigste und einstmals effektivste Antimalariamittel und wurde erstmals 1934 von der Firma Bayer in Deutschland synthetisiert. Anfängliche Bedenken gegenüber seiner Toxizität in Menschen ließen erst 1946 eine Anwendung zu. Da es gut verträglich und billig in der Herstellung ist, wurde es von der WHO im Programm zur globalen Ausrottung der Malaria eingesetzt. Der vielfache Gebrauch führte Ende der fünfziger Jahre zum Auftreten der ersten Chloroquin-Resistenzen, die bald überall auf der Welt zu finden waren.

Nur wenige neue Antimalariamittel werden für den Gebrauch zugelassen, da sie oft zu große Nebenwirkungen haben. Auch bei diesen neuen Mitteln treten jedoch Resistenzen auf (Hyde, 2007).

Antimalariamittel werden kategorisiert, je nachdem, auf welchen Teil des Malariazykluses sie einen Effekt haben. Die Blutschizontizide wirken auf die intraerythrozytären, asexuellen Parasitenstadien, während die Gewebeschizontizide hepatische Schizonten abtöten und damit einen Ausbruch der Malaria verhindern. Hypnozoitizide zerstören die Dauerformen von *P. vivax* und *P. ovale* und unterbindet damit einen Malariarückfall. Die letzte Gruppe ist die der Gametozytozoide, die auf die sexuellen Formen der Blutstadien wirken, womit eine Übertragung vom Menschen auf den Mücken-Vektor verhindert wird (Schlitzer, 2007).

Die 4-Aminochinoline und die Arylaminoalkohol-Derivate sind chemisch verwandt mit Chinin. Zu der ersten Gruppe gehört auch Chloroquin. Die Arylaminoalkohol-Derivate

Mefloquin und Halofantrin haben große strukturelle Ähnlichkeit zu Chinin. Mefloquin (Lariam®) wird hauptsächlich zur Bekämpfung von Chloroquin-resistenter (CQR) Malaria eingesetzt, trotz der neuropsychiatrischen Nebenwirkungen und des hohen Preises (Kain *et al.*, 2001). Allerdings treten in Asien Chloroquin- und Mefloquin-Resistenzen auf. Halofantrin ist zwar hochwirksam, es kann allerdings zu Herzrhythmusstörungen führen, weshalb es nur eingeschränkt eingesetzt wird (Newton *et al.*, 1999).

Eine weitere wichtige Wirkstoffgruppe bilden die Antifolate, die Enzyme des Folat-Stoffwechselweges inhibieren. Die Produkte dieses Stoffwechselweges sind essentiell für die Synthese von Purinen und Pyrimidinen, die bei der DNA-Replikation gebraucht werden und in der Biosynthese bestimmter Aminosäuren (Met, Gly, Ser, Glu und His). Folsäure ist für den Menschen essentiell und muss mit der Nahrung aufgenommen werden. Pathogene Mikroorganismen, Plasmodien eingeschlossen, können Folat-Derivate synthetisieren oder aus dem Plasma aufnehmen (Hyde, 2005).

Die Antifolat-Kombination Sulfadoxin-Pyrimethamin unter dem Handelsnamen Fansidar® ist das neben Chloroquin am häufigsten verwendete Antimalariamittel (Newton *et al.*, 1999). Pyrimethamin inhibiert die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), während Sulfadoxin auf die Dihydropteroat-Synthase (DHPS) wirkt. Es gibt keine homologe DHPS im Menschen. Die DHFR des Parasiten unterscheidet sich sehr von der menschlichen, weshalb beide Enzyme ideale Antimalariamittel-Angriffspunkte sind. Jedoch haben sich auch hier schnell Resistenzen ausgebildet.

Eine weitere häufige Anwendung findet Proguanil, das über eine Cytochrom-P450-abhängige Reaktion in Cycloguanil umgewandelt wird, das ebenfalls ein DHFR-Inhibitor ist, allerdings mit weniger Nebenwirkungen. Da es als Monotherapeutikum wenig effektiv ist, wird es oft in Kombination mit Chloroquin angewendet (Kain *et al.*, 2001).

Die Artemisinin-Derivate gehören ebenfalls zu der Gruppe etablierter Antimalariawirkstoffe und dienen zur Behandlung multiresistenter Malaria (Hien *et al.*, 1993). Artemisinin (Qinghaosu) wird seit mindestens 2000 Jahren als Heilpflanze in der traditionellen chinesischen Medizin angewendet und wird aus dem Einjährigen Beifuss *Artemisia annua* gewonnen. 1971 wurde Artemisinin erstmals isoliert und seine Wirkung als Antimalariamittel gezeigt (Klayman, 1985; Qinghaosu *et al.*, 1979). Seitdem wurden einige semisynthetische Artemisinin-Derivate entwickelt, die schon bei geringen Dosen sehr effektiv sind und auch eine schnelle Wirkung zeigen (Woodrow *et al.*, 2005). Zu ihnen zählen Artemether und Artesunat, die oft in Kombination mit anderen Antimalariawirkstoffen verabreicht werden. Artemisinine wirken hauptsächlich im späten Ringstadium, sie zeigen aber auch Wirkung in

sehr jungen Ringen und in sexuellen Blutstadien. Patienten sind schon meist nach 32 Stunden parasiten- und fieberfrei (Schlitzer, 2007). Eckstein-Ludwig *et al.* zeigten 2003, dass die Endoperoxidbrücke der Artemisininderivate im Zytoplasma durch Eisen(II) gespalten wird. Die dadurch aktivierten Artemisinine inhibieren spezifisch PfATP6, eine Sarco-Endoplasmatisches-Retikulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA), was dann zum Tod des Parasiten führt (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003).

Da die *Apikomplexa* über ein besonderes Plastiden-ähnliches Organell ohne photosynthetische Funktion verfügen, dem Apikoplasten, können auch verschiedene Antibiotika in der Malariatherapie eingesetzt werden (Fichera *et al.*, 1997; Kohler *et al.*, 1997). Die Synthese von Isoprenoiden, Fettsäuren und möglicherweise von Häm finden im Apikoplasten statt (Wilson, 2002). Dieser besitzt ein verkümmertes 35 kb umfassendes Genom, das Gene für tRNAs, rRNAs, RNA-Polymerasen und ribosomale Proteine trägt. Enzyme, die am Metabolismus beteiligt sind, werden vom Genom des Zellkerns kodiert und in den Apikoplasten importiert. Rifampizin inhibiert die RNA-Synthese, während Tetrazyklin die Protein-Synthese unterdrückt (Wiesner *et al.*, 2003). Doxyzyklin hemmt die Expression der Apikoplasten-Gene, was zu funktionsunfähigen Apikoplasten in den Tochtermerozoiten führt (Dahl *et al.*, 2006).

Das Präparat Malarone® beinhaltet die Kombination Atovaquon und Proguanil, die einen starken synergistischen Effekt zueinander zeigen. Atovaquon ist ein Analogon von Ubichinon (Coenzym Q) und inhibiert den Elektronenfluss über den Cytochrom-c-Reduktase-Komplex der mitochondrialen Atmungskette (Fry *et al.*, 1992). Proguanil unterstützt dabei in seiner nicht-metabolisierten Form die Wirkung von Atovaquon auf die Atmungskette in den Mitochondrien. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch unklar. Um eine Verbreitung von aufkommenden Resistenzen zu vermeiden, wird dieses Präparat mit Artesunat kombiniert und bei der Behandlung von unkomplizierter Malaria eingesetzt. Malarone® allein wird auch als Prophylaxemittel eingesetzt, da es auch gewebeschizontizide Eigenschaften hat.

Mittlerweile sind viele Kombinationspräparate im klinischen Gebrauch. Das soll zum einen die Ausbildung von Resistenzen verhindern, zum anderen auf verschiedene Stadien des Malariazykluses wirken.

1.5.2. Wirkungsmechanismus der Chinoline

Der Wirkungsort der Chinoline liegt in der Nahrungsvakuole des Parasiten im erythrozytären Stadium. Die Chinoline passieren vier Membranen (Erythrozyten-, parasitophore Vakuolen-, Plasma- und Nahrungsvakuolenmembran) durch passive Diffusion bis sie schließlich in die Nahrungsvakuole des Parasiten gelangen. Da die Nahrungsvakuole ein saures Kompartiment mit einem pH-Wert von ca. 5,2 ist (Kuhn *et al.*, 2007) und Chinoline schwache Basen sind, werden sie dort protoniert. Im geladenen Zustand können sie die Membran nicht mehr passieren und interferieren mit dem Hämoglobinabbau bzw. mit der Hämbiomineralisierung (Sanchez *et al.*, 2007b).

1.5.2.1. Abbau von Hämoglobin

Hämoglobin ist eine wichtige Nährstoffquelle für den parasitären Stoffwechsel. Der Parasit braucht die beim Abbau frei werdenden Aminosäuren, um eigene Proteine zu synthetisieren. Es wird angenommen, dass 75 % des Hämoglobins im Erythrozyten von *P. falciparum* konsumiert wird (Morrison *et al.*, 1948; Ball *et al.*, 1948; Loria *et al.*, 1999). Zwei weitere Faktoren spielen ebenso für den massiven Hämoglobinabbau eine Rolle. Zum einen braucht der Parasit Platz für seine Entwicklung (Krugliak *et al.*, 2002), zum anderen muss er die osmotische Stabilität des Erythrozyten wahren (Lew *et al.*, 2003).

Plasmodium nimmt Hämoglobin über Pinozytose auf. Dabei wird die parasitophore Vakuolen- und die Plasmamembran des Parasiten im sogenannten Cytostom eingestülpt. Hämoglobin und andere Bestandteile des Erythrozytenplasma werden dann in Transportvesikeln zur Nahrungsvakuole transportiert, um abgebaut zu werden (Goldberg, 2005). Im Ringstadium und ab dem Stadium alter Trophozoiten > 30 h scheinen aber auch andere, Aktin-unabhängige, Hämoglobinaufnahmeprozesse eine Rolle zu spielen (Elliott *et al.*, 2008).

Es wird angenommen, dass der Hämoglobinabbau schon in den Vesikeln beginnt (Hempelmann *et al.*, 2003), aber der Hauptabbau in der Nahrungsvakuole stattfindet. Verschiedene Proteasen wirken beim Hämoglobinabbau mit. Hierzu gehören die Aspartat-Proteasen Plasmepsin I, II, IV und eine Histo-Aspartat-Protease (HAP), die Cystein-Proteasen Falcipain-1, -2, -2' und -3, Falcilysin (Metalloprotease) und schließlich Dipeptidyl-aminopeptidase I (DRAP1). DRAP1 ist erst kürzlich als Peptidase identifiziert worden, die

Oligopeptide in Dipeptide spaltet. Die Dipeptide werden in das Zytoplasma des Parasiten transportiert, wo weitere Aminopeptidasen diese in einzelne Aminosäuren zerlegen. Die Degradation scheint nach einem geordneten Prozess zu verlaufen, der genaue zeitliche Ablauf ist aber noch immer unklar, insbesondere ob Plasmepsine oder Falcipaine den ersten Schritt einleiten. Der angenommene Verlauf ist in Abb. 1.5.1. dargestellt (Ersmark *et al.*, 2006).

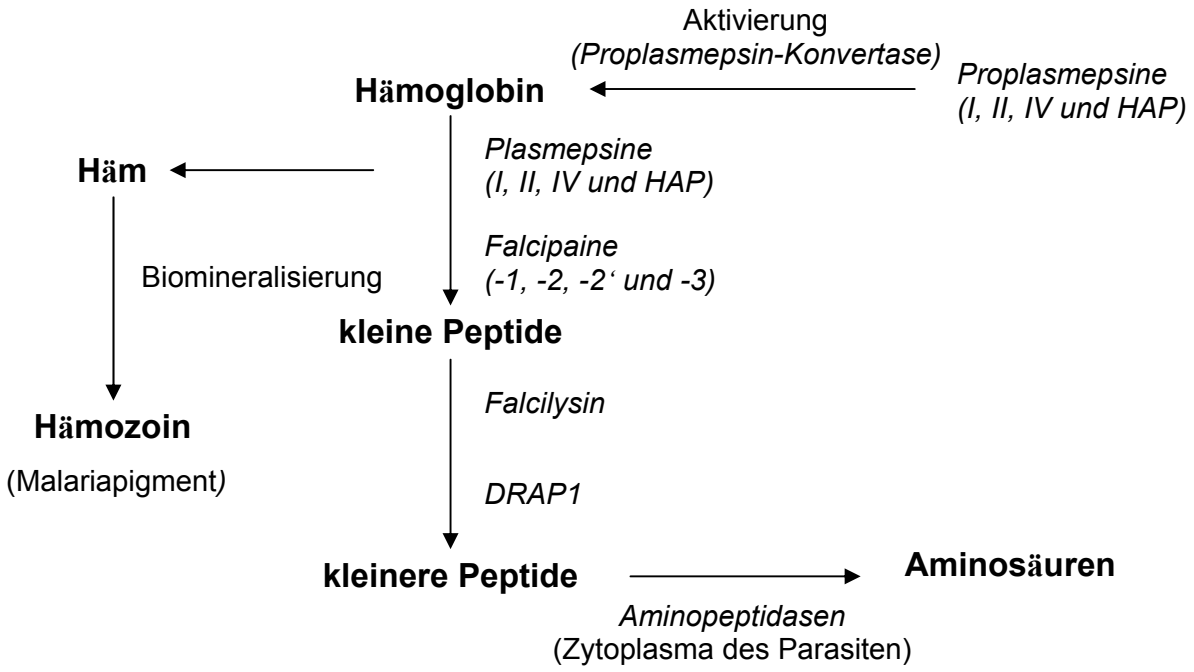

Abb. 1.5.1.: Angenommener Verlauf des Hämoglobinmetabolismus; Verändert nach (Ersmark *et al.*, 2006)

Das bei der Degradation freigesetzte Häm (Ferriprotoporphyrin IX) ist sehr toxisch für den Parasiten und muss zu inertem Hämozoin biomineralisiert werden (Egan *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2007b), da dem Parasiten die Hämoxygenase zum Abbau fehlt (Pagola *et al.*, 2000). Hämozoin ist auch bekannt als Malariapigment, da es im Lichtmikroskop als dunkelbraunes Aggregat in der Nahrungsvakuole erkennbar ist. Hämozoin besteht aus dimerisierten Ferriprotoporphyrin IX Einheiten, dem β-Hämatin (Pagola *et al.*, 2000) und benötigt für die Kristallisation zum einen ein saures Millieu, wie es in der Nahrungsvakuole vorzufinden ist und zum anderen die Interaktion mit Lipiden, insbesondere mit Linoleat (Fitch *et al.*, 1999). In einer Studie von Jani *et al.* wird allerdings ein neues Häm-detoxifizierendes Protein (HDP) beschrieben, das Häm zu Hämozoin umwandeln kann. Dieses Protein wird im frühen Ringstadium der Infektion in das Zytosol der Wirtszelle sekretiert. Erst im späteren Entwicklungsstadium des Parasiten gelangt es zusammen mit Hämoglobin über den Cytostom-Transportweg in die Nahrungsvakuole, wo es Hämozoin bilden kann (Jani *et al.*, 2008).

1.5.2.2. Chloroquins Wirkungsmechanismus

Der genaue Wirkungsmechanismus von Chloroquin ist noch nicht bekannt. Der wichtigste Schritt ist die Bindung von Chloroquin an Ferriprotoporphyrin IX (Gligorijevic *et al.*, 2006). Eine Dimerisierung von Ferriprotoporphyrin IX und damit eine Mineralisierung zu Hämozoin ist damit nicht mehr möglich. Die toxischen Chloroquin-Ferriprotoporphyrin IX-Komplexe inhibieren womöglich auch die Reifung der endozytischen Vesikel, die mit Hämoglobin beladen sind (Fitch *et al.*, 2003a). Diese bestehen zunächst aus einer Doppelmembran, die ursprünglich aus der Vakuolen- und Plasmamembran aufgebaut ist. Im Laufe der Reifung der Endosomen wird das Vesikel angesäuert und eine Membran abgebaut. Die freiwerdenden Lipide interagieren mit Ferriprotoporphyrin IX und bewirken dessen Dimerisierung und damit Detoxifizierung. Chloroquin verursacht eine Anhäufung der mit Hämoglobin beladenen Vesikel mit Doppelmembran. Diese aggregieren und bilden eine autophagische Vakuole (Fitch *et al.*, 2003a). Außerdem verhindert Chloroquin die Interaktion von Ferriprotoporphyrin IX mit Lipiden (vor allem mit Linoleat), die für die Mineralisierung notwendig sind, da diese aus der Membran nicht freigesetzt werden können. Toxisches Ferriprotoporphyrin IX sammelt sich an (Fitch *et al.*, 2000).
Eine Schädigung von Membranen in Gegenwart von Chloroquin ist der toxische Haupteffekt von freiem Ferriprotoporphyrin IX (Dutta *et al.*, 1983). Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt. Es wird allerdings vermutet, dass der Chloroquin-Ferriprotoporphyrin IX-Komplex mit einem bisher unbekannten Membranbestandteil wechselwirkt und damit entwerder direkt die Membranfunktion zerstört oder die Freisetzung von Ca^{2+}-Ionen veranlasst, die die Vesikelmemban zu früh mit der Membran der Nahrungsvakuole fusionieren lässt. Hämoglobin kann dadurch vermutlich nicht mehr richtig abgebaut werden und freies, toxisches nicht-dimerisiertes Ferriprotoporphyrin IX führt die Schädigungen herbei (Fitch, 2004). Die Kaskade schaukelt sich auf bis schließlich der schnelle Tod des Parasiten eintritt.

1.5.2.3. Chinins Wirkungsmechanismus

Es gibt einige Hinweise darauf, dass Chinin und das eng verwandte Mefloquin neben Ferriprotoporphyrin IX noch ein zusätzlichen Angriffspunkt haben. Der Parasit scheint die Unterklassen der Chinolin-Medikamente somit zu unterscheiden.
Chinin und Mefloquin behandelte infizierte Erythrozyten sind morphologisch unterschiedlich zu Chloroquin behandelten Zellen. Sie zeigen keine Akkumulation und Aggregation der mit Hämoglobin beladenen Transportvesikel wie es bei Chloroquin zu sehen ist (Olliaro *et al.*,

1989). Auch die Interaktion von Ferriprotoporphyrin IX mit Lipiden, die bei Behandlung von Chloroquin gestört ist, scheint bei Chinin und Mefloquin nicht gehindert zu sein (Fitch *et al.*, 1997). Chinin und Mefloquin können die durch Chloroquin eingetretenen Abnormalitäten umkehren (Fitch *et al.*, 2003b; Fitch *et al.*, 2003a). Während der Chloroquin-Ferriprotoporphyrin IX-Komplex das „Docking" der Transportvesikel fördert, scheinen Chinin und Mefloquin diesen Prozess zu inhibieren, indem sie an Phospholipide binden (Fitch, 2004). So konnte für Mefloquin gezeigt werden, dass es direkt an Membrane und aufgereinigte Phospholipide binden kann, während Chloroquin alleine keine hohe Bindeaffinität zeigt (Chevli *et al.*, 1982). In einer Studie von de Villiers *et. al.* wurde gezeigt, dass Chinin und Chinidin eine Salzbrücke zu Häm bilden und so die Hämozoinmineralisierung stören (de Villiers *et al.*, 2008). Zwei unterschiedliche Angriffspunkte sind somit der Wirkung von Arylaminoalkoholen zuzuschreiben.

1.5.3. Mechanismus der Resistenzausbildung von Chloroquin und Chinin

Der übermäßige Gebrauch von Chloroquin hat auf der ganzen Welt zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber *P. falciparum* geführt, die sich in mindestens vier Regionen unabhängig voneinander entwickelt haben (Wellems *et al.*, 2001). Auch die Effizienz von Chinin, das hauptsächlich zur Behandlung von schwerer und komplizierter Malaria eingesetzt wird, nimmt ab (World Health Organisation, 2008). Vor allem in der Grenzregion zwischen Thailand und Kambodscha ist die Empfindlichkeit gegenüber Chinin deutlich gesunken, während Afrika noch weitestgehend frei von Chinin-resistenter Malaria ist (World Health Organisation, 2008).

Es wird angenommen, dass Chloroquin und Chinin teilweise gemeinsame Faktoren bezüglich der Resistenzausbildung haben. Der Hauptfaktor, der Chloroquin-Resistenz verleiht, ist PfCRT (*P. falciparum* „chloroquine resistance transporter"). Dieser kann auch Mutationen haben, die mit sterospezifischen Reaktionsänderungen von Chinin und Chinidin in Zusammenhang gebracht werden (Fidock *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 2007) sowie mit einer veränderten Empfindlichkeit gegenüber anderen Antimalariamedikamenten wie z.B. Amodiaquin und Halofantrin (Johnson *et al.*, 2004), die ebenfalls zu den Chinolinen gehören.

Da aber Chinin weiterhin zur Behandlung gegen CQR-Stämme von *P. falciparum* eingesetzt wird und auch CQR-Stämme unterschiedliche Wirkungen auf Chinin zeigen, wird angenommen, dass der Mechanismus der Chinin-Resistenz komplexer ist und von mehreren Genen beeinflusst wird (Mu *et al.*, 2003). Auch eine von Ferdig *et al.* durchgeführte QTL-Analyse („Quantitative Trait Loci" Analyse; siehe Abschnitt 1.6. zu QTL-Analysen) basierend auf IC_{90}-Daten konnte zeigen, dass Chinin- und Chloroquin-Resistenz mindestens einen Faktor teilen, nämlich PfCRT (Ferdig *et al.*, 2004), was durch eine QTL-Analyse auf Chinin-Akkumulationsdaten von Nurhasanah bestätigt werden konnte (Nurhasanah, 2009).
PfCRT wird in die Familie der „drug/metabolite" Transporter eingeordnet (Bray *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2004). Das zugehörige Gen liegt auf Chromosom 7 und kodiert das 49 kDa Protein mit 424 Aminosäuren und zehn Transmembrandomänen (TMDs) (Fidock *et al.*, 2000), dessen Strukturvorhersage in Abb. 1.5.2. wiedergegeben ist. Es ist bisher nicht klar, ob PfCRT zu den Transportern oder Kanälen gehört (Sanchez *et al.*, 2007b).

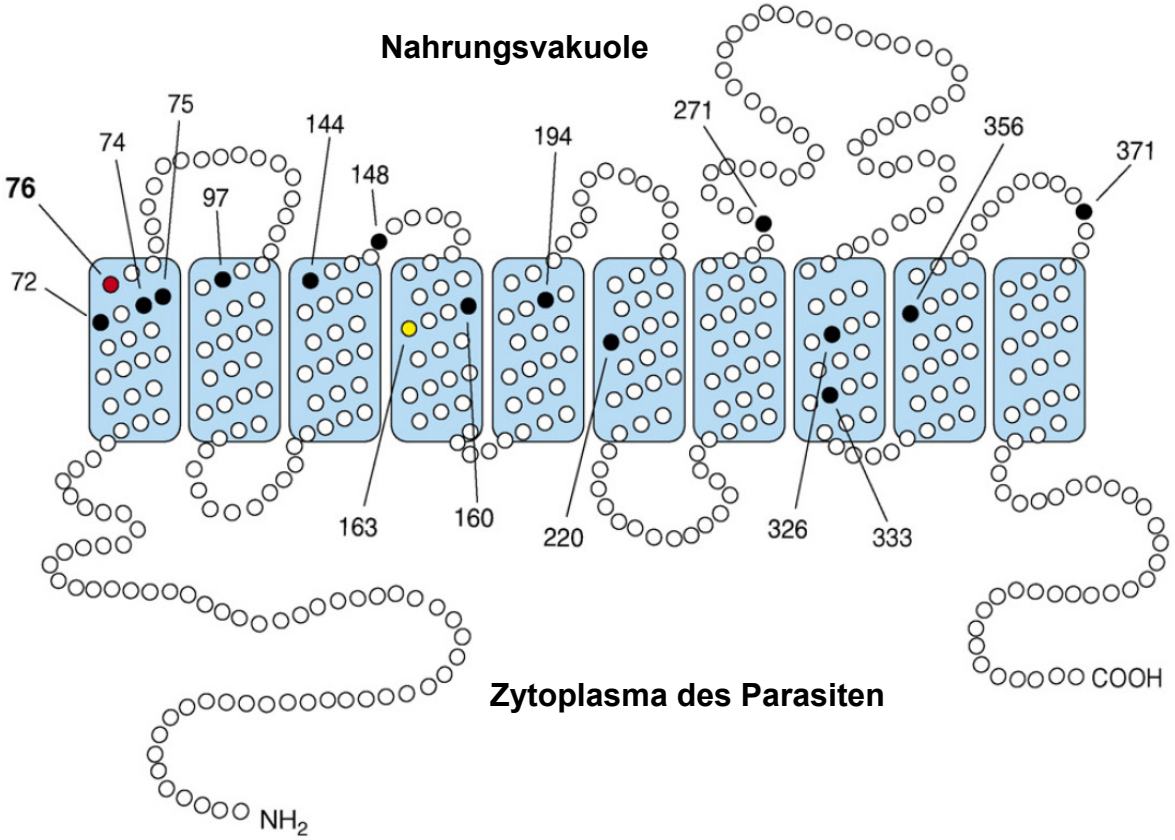

Abb. 1.5.2.: Strukturvorhersage von PfCRT; verändert nach (Valderramos *et al.*, 2006)
PfCRT hat zehn vorhergesagte TMDs. N- und C-Terminus liegen im Zytoplasma des Parasiten. Die für die Chloroquin-Resistenz kritische Mutation K76T ist in rot eingezeichnet und befindet sich in TMD1. Weitere, die Chloroquin-Resistenz begleitende Mutationen sind in schwarz gekennzeichnet, die gelbe Mutation S163R wird mit Amantadin- und Halofantrin-Resistenz in Verbindung gebracht.

PfCRT wurde in einer genetischen Analyse der Kreuzung aus HB3 und Dd2 entdeckt. HB3 ist Chloroquin-sensitiv (CQS) und stammt aus Honduras, während Dd2 CQR ist und aus Indochina kommt. Zunächst wurde der Chloroquin-Resistenz vermittelnde Faktor auf einem 400 kb großen Abschnitt auf Chromosom 7 lokalisiert (Wellems et al., 1991), der dann von Su et al. auf ein 36 kb großes Segment weiter eingeschränkt werden konnte (Su et al., 1997). Erst im Jahr 2000 entdeckten Fidock et al., dass PfCRT die eigentliche Determinante der Chloroquin-Resistenz ist und lokalisierten das Protein in der Membran der Nahrungsvakuole. In selbiger Studie wurde gezeigt, dass verschiedene Mutationen in 40 Laborstämmen eine Verbindung mit dem CQR-Phänotyp über die K76T Mutation herstellen konnten (Fidock et al., 2000). Generell wird die Mutation K76T in allen CQR-Stämmen gefunden, auch wenn sie immer von anderen Mutationen begleitet wird (Cooper et al., 2005; Bray et al., 2005). Diese dienen wahrscheinlich der Kompensation der K76T Mutation, um die eigentliche Funktion des Proteins zu erhalten (Hyde, 2007). Im CQS-Stamm hat PfCRT an der Aminosäureposition 76 in der TMD1 einen positiv geladenen Lysinrest. Chloroquin, das auf Grund des sauren pHs in der Nahrungsvakuole zweifach positiv geladen ist, wird vor dem Austritt aus diesem Organell durch die positive Ladung abgehalten (Abb. 1.5.2.). Durch den Austausch der Aminosäure Lysin zu Threonin im CQR-Stamm verliert das Protein eine positive Ladung und Chloroquin kann das Protein ungehindert passieren. Hierdurch wird die Chloroquinkonzentration in der Nahrungsvakuole vermindert und die Suszeptibilität steigt.

Durch Zugabe eines Chemosensibilisators wie z.B. Verapamil zu CQR-Stämmen werden diese wieder gegenüber Chloroquin sensitiv (Martin *et al.*, 1987; Wellems *et al.*, 1990), während in CQS-Stämmen kein Effekt zu beobachten ist (Lakshmanan *et al.*, 2005). Verapamil ist auch als Kalziumkanal-Blocker bekannt.

Ein weiteres Protein, PfMDR1 (*P. falciparum* „multi drug resistance 1“), wird oft in Zusammenhang mit Chinin-Resistenz gebracht und ebenfalls mit Mefloquin- und Halofantrin-Resistenz assoziiert (Cowman *et al.*, 1994; Reed *et al.*, 2000). Es fungiert eventuell auch als Modulator im CQR-Phänotyp (Reed *et al.*, 2000).

Es ist ortholog zu P-Glykoproteinen in Säugerzellen, wo es Verapamil-reversible Multimedikamentenresistenz in Krebszellen vermittelt (Higgins, 2007) und wird daher manchmal auch mit Pgh1 bezeichnet. P-Glykoproteine gehören zu der Familie der ABC (ATP „binding cassette“) Transporter. Das Gen liegt auf Chromosom 5 und kodiert ein 162 kDa großes Protein, das hauptsächlich in der Membran der Nahrungsvakuole lokalisiert ist (Cowman *et al.*, 1991). Das Protein besteht aus zwei homologen Domänen, die beide sechs TMDs und je eine Nukleotidbindedomäne haben (Peel, 2001; Duraisingh *et al.*, 2005). Die

Nukleotidbindedomäne liegt im Zytoplasma (Karcz *et al.*, 1993). Abb. 1.5.3. gibt die Topologievorhersage von PfMDR1 wieder.

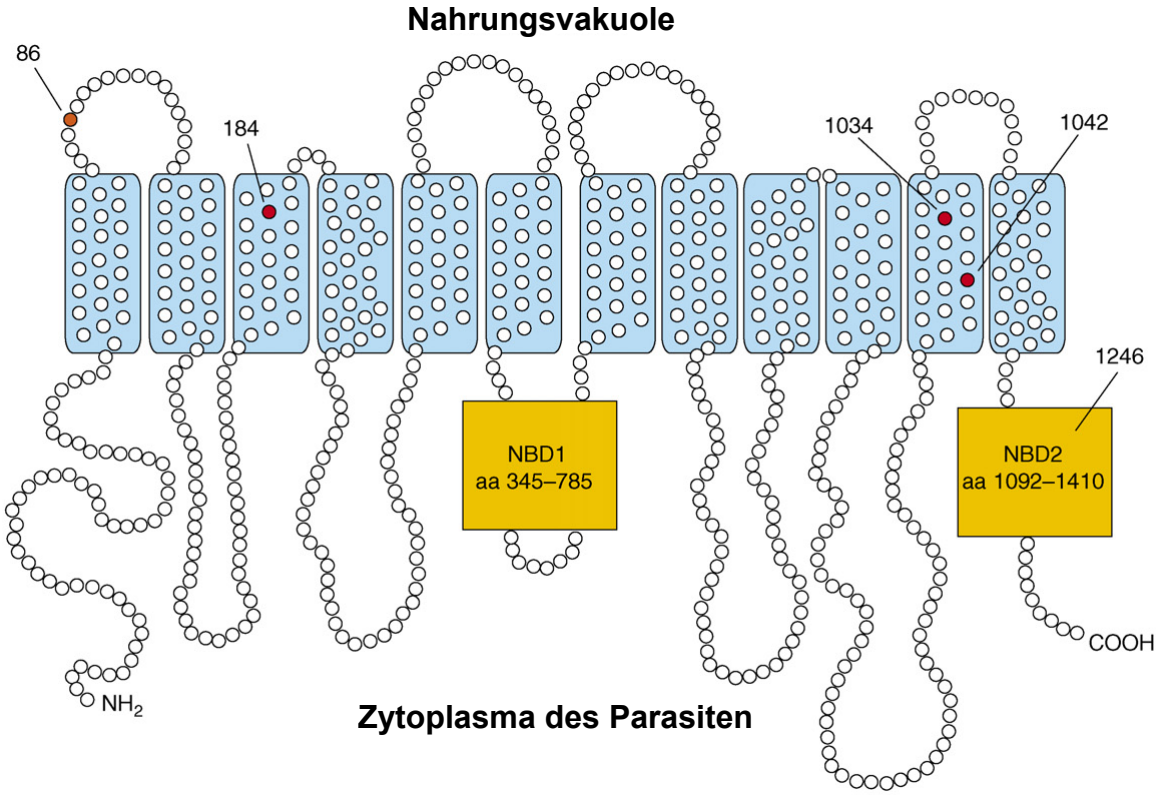

Abb. 1.5.3.: Topologievorhersage von PfMDR1; verändert nach (Valderramos *et al.*, 2006)
PfMDR1 besteht aus zwei homologen Domänen mit jeweils sechs TMDs. Die Nukleotidbindedomänen (NBD1 und NBD2) befinden sich im Zytoplasma des Parasiten zusammen mit dem C- und N-Terminus. Die kritischen Mutationen sind in rot eingezeichnet.

Nicht nur verschiedene Polymorphismen in *pfmdr1* an den Aminosäurepositionen 86, 184, 1034, 1042 und 1246, sondern auch die Amplifikation werden oft mit einer verminderten *in vitro* Suszeptibilität von Chinin und anderen Antimalariamitteln in Zusammenhang gebracht (Price *et al.*, 2004; Reed *et al.*, 2000; Sidhu *et al.*, 2005; Sidhu *et al.*, 2006). So konnten Sidhu *et al.* durch Ausschalten einer von zwei *pfmdr1* Kopien eine gesteigerte Mefloquin-, Lumefantrin-, Halofantrin-, Artemisinin- und Chinin-Suszeptibilität zeigen (Sidhu *et al.*, 2006). Das Expressionsniveau von PfMDR1 ist in CQR- und CQS-Stämmen gleich, weshalb eine Überexpression für die Chloroquin-Resistenz nicht verantwortlich sein kann (Cowman *et al.*, 1991). Die Punktmutation N1042D scheint bei der Chinin- und Chinidin-Resistenz eine große Rolle zu spielen (Sidhu *et al.*, 2005). Sanchez *et al.* konnten keinen Zusammenhang zwischen den untersuchten Polymorphismen in PfMDR1 und der Chinin-Akkumulation feststellen (Sanchez *et al.*, 2008b), während Ferdig *et al.* in der QTL-Analyse basierend auf IC_{90}-Daten zumindest eine kleine Beteiligung von PfMDR1 an einer verminderten Suszeptibilität nachweisen konnten (Ferdig *et al.*, 2004).

Ein weiterer Transporter, der in selbiger QTL-Analyse mit Chinin-Resistenz in Verbindung gebracht werden konnte, ist PfNHE (Natrium-Protonen-Austauscher), dessen Gen auf Chromosom 13 liegt. Der Vergleich von 71 verschiedenen *P. falciparum* Stämmen ließ auf eine Assoziation zwischen der DNNND Wiederholungslänge des Mikrosatelliten-polymorphismus ms4760 und einer veränderten *in vitro* Chinin-Suszeptibilität schließen (Ferdig *et al.*, 2004). In einer Studie von Nkrumah *et al.*, bei der das PfNHE-Expressionsniveau durch Allelaustausch in drei *P. falciparum* Stämmen (1BB5, 3BA6 und GC03) reduziert wurde, verminderte sich auch der Chinin-IC_{90}-Wert gegenüber den Elternstämmen, wenn in PfCRT die K76T Mutation vorlag. Keine Änderung der Chinin-Suszeptibilität war festzustellen, wenn zwar die PfNHE-Expression verringert war, aber PfCRT das Wildtyp-Allel hatte (Nkrumah *et al.*, 2009).

1.6. „Quantitative Trait Loci“-Analyse (QTL-Analyse)

1.6.1. Prinzipien der QTL-Analyse

Ein „Quantitative Trait Locus” beschreibt einen Abschnitt eines Chromosoms mit möglichen Kandidatengenen, die in einer entsprechenden Studie einen Einfluss auf die Ausprägung eines quantitativ phänotypischen Merkmals des untersuchten Organismus haben. Dabei wird ein quantitatives Merkmal von mehreren Genen beeinflusst, die alleine teilweise nur zu einem kleinen Teil an der Ausprägung des Merkmals teilhaben und von Genen, die zu einem größeren Teil zur Merkmalsausbildung beitragen, überdeckt werden (Paterson, 1995). Die Umwelt kann ebenfalls einen Einfluss auf die Merkmalsausprägung ausüben (Wu *et al.*, 2007; Mackay, 2001). Während beim Menschen diskrete Merkmale, wie die Augenfarbe, nur bestimmte und voneinander abgrenzbare Ausprägungen haben können, kommen quantitative Merkmale wie beispielsweise Körpergröße und Gewicht in allen Ausprägungen vor und sind von genetischen Faktoren aber auch von der Ernährungsweise und Gesundheit abhängig. Mutationen in den zugehörigen Genen sind für die unterschiedlichen Merkmalsausprägungen verantwortlich (Paterson, 1995).

In einer QTL-Analyse wird der Phänotyp eines bestimmten Merkmals für eine möglichst große Anzahl Individuen bestimmt und diese dann in Relation zu Variationen von genetischen Markern untersucht. Es soll also ein statistischer Zusammenhang zwischen Marker und Merkmalsausprägung gefunden werden. Dabei sind Marker Abschnitte auf einem Chromosom, sogenannte Allele, die in den untersuchten Individuen Unterschiede aufweisen.

Solche Unterschiede können beispielsweise Einzelnukleotidaustausche, die als SNPs („single nucleotide polymorphisms“) bezeichnet werden, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs) oder Längenpolymorphismen sein (Mackay, 2001).

Soll das ganze Genom auf QTL untersucht werden, wird eine größere Zahl an Markern benötigt, die gleichmäßig über das ganze Genom des zu untersuchenden Organismus verteilt sind. Bis in die achtziger Jahre waren daher erfolgreiche QTL-Analysen und eine präzise Zuordnung des Lokus auf Grund der zu geringen Markeranzahl limitiert (Paterson, 1995). Erst mit der Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von Kary Mullis im Jahr 1983 war es möglich, DNA-Polymorphismen zu detektieren (Mullis *et al.*, 1987). Ein QTL umfasst oft nicht nur ein Gen, sondern einen Chromosomenabschnitt mit mehreren Genen. Die QTL-Größe, die daher mit der Anzahl möglicher Kandidatengene korreliert, ergibt sich aus der Dichte der Marker. Die Dichte der Marker wird in Centimorgan (cM) gemessen. Es ist die Maßeinheit der genetischen Distanz. Gene, die auf dem gleichen Chromosom liegen, bleiben normalerweise während der Meiose zusammen und werden gekoppelt vererbt. Entstehen während der Chromosomentrennung „Crossing-over“ (engl. für Überkreuzung), dann werden Allele desselben Chromosoms getrennt auf die Tochterzellen vererbt und damit genetisch entkoppelt. Zwei Loki oder zwei Marker sind 1 cM entfernt, wenn die Rekombinations- bzw. die „Crossing-over“-Wahrscheinlichkeit zwischen ihnen 1 % pro Meiose beträgt, was bedeutet, dass in 100 Meiosen ein „Crossing-over“ stattfindet. Ist ein QTL genetisch mit einem Marker verbunden, werden beide somit zusammen vererbt. Eine Kopplung wird dann festgestellt, wenn bei deutlich weniger als der Hälfte der Nachkommen Rekombination stattgefunden hat, also sie weniger als 50 cM auseinander liegen.

Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Genorte auf dem Chromosom nahe beeinander liegen und somit gekoppelt vererbt werden, wird mit dem „LOD-Score“ („logarithm of the odds“) wiedergegeben. Der „LOD-Score“ ist der dekadische Logarithmus (Logarithmus zur Basis 10) des Quotienten aus Kopplungs- und Rekombinationshäufigkeit.

Erste Schritte in der Identifizierung des Kandidatengens liegen darin, den Chromosomenabschnitt zu sequenzieren und mögliche Gene zu identifizieren. Ein direkter Sequenzvergleich der Gene mit schon bekannten Genen in vorhandenen Datenbanken lässt eventuell eine Beurteilung über die Funktion und auch den möglichen Einfluss des Gens auf den Phänotyp zu. Vorhandene Polymorphismen innerhalb des Gens können die mögliche Ursache der unterschiedlichen Merkmalsausprägungen sein.

1.6.2. QTL-Analysen in *P. falciparum* – Voraussetzungen und Möglichkeiten

Grundvoraussetzung für eine QTL-Analyse in *P. falciparum* zur Untersuchung des genetischen Hintergrundes der Medikamentenresistenzen oder der Akkumulationen von Substanzen ist eine vorhandene genetische Kreuzung zweier Stämme, die unterschiedliche Ausprägungen des zu untersuchenden Merkmals aufzeigen. Auch muss für selbige Kreuzung eine Markerkarte bereitgestellt sein, die eine genetischen Distanz zwischen den einzelnen Markern von maximal 10 cM auf den jeweiligen Chromosomen aufweist (Sen *et al.*, 2004).
Für die Untersuchung der Chinolin-Resistenz bzw. Akumulation eignet sich die genetische Kreuzung von HB3 mit Dd2 mit insgesamt 35 F1-Nachkommen (Wellems *et al.*, 1990; Kirkman *et al.*, 1996; Su *et al.*, 1997). Während HB3 ein CQS-Stamm mit Wildtyp *pfcrt*-Allel ist, zeigt Dd2 geringere Suszeptibilität und hat ein mutiertes (K76T) *pfcrt*-Allel.
Über das ganze Genom kontinuierlich verteilt und mit einer hohen Frequenz von 17 kb pro cM ereigneten sich die meiotischen „Crossing-over“. Die existierende Markerkarte mit 901 Markern, die sich auf 14 Chromosomen verteilen, hat eine Auflösung von etwa 5 cM und steht auf der Homepage von NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2000; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Malaria/Mapsmarkers/PfSegData/segdata.html) bereit (Su *et al.*, 1999; Walker-Jonah *et al.*, 1992). Es lassen sich 326 Segmente auf der Markerkarte unterscheiden. Zu jedem Segment können ein oder mehrere Marker zugeordnet werden, was in einer mittleren Segmentlänge von 80 kb und damit in etwa einer Auflösung von 5 cM resultiert. Auch ist das Genom (ca. 24 Mb mit 1 Gen pro 5 kb) eines Stamms komplett sequenziert (3D7 Genom) und eine Datenbank fasst alle Informationen zusammen (PlasmoDB, 2008; Sen *et al.*, 2004). Für HB3 und Dd2 stehen teilweise ebenfalls Sequenzen bereit (PlasmoDB, 2008; BROAD, 2009).
Das Genom von *P. falciparum* ist fast im ganzen Lebenszyklus haploid und bietet auch damit gute Voraussetzungen für eine QTL-Analyse, da der F1-Nachkomme nur ein elterliches Allel tragen kann. Lediglich im Mitteldarm der Mücke, nachdem Mikro- und Makrogamete zur Zygote verschmelzen, ist er für kurze Zeit diploid. Schon während der Oozysten-Phase erfolgt mitotische Teilung zu tausenden von Sporozoiten. Ein haploides Genom vereinfacht die Auswertung der QTL-Analysen und wird als Rückkreuzung zweier Inzucht-Mäusestämme behandelt (Sen *et al.*, 2004).
Trotzdem stellt die kleine Individuenanzahl von nur 35 F1-Nachkommen einen limitierenden Faktor für eine hochauflösende QTL-Analyse dar, da vermutlich nur zwei bis drei Loki mit

hohem Effekt detektiert werden können. Wird die Signifikanzgrenze verringert, lassen sich möglicherweise vier bis fünf QTL aufspüren, allerdings erhöht sich damit auch die Wahrscheinlichkeit der Detektion falsch positiver Loki (Lander *et al.*, 1994; Sen *et al.*, 2004).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Chloroquin war lange Zeit das wichtigste und einstmals effektivste Antimalariamittel. Ende der fünfziger Jahre traten aber auf Grund des übermäßigen Gebrauchs Resistenzen gegen Chloroquin auf. Ein weiteres effektives und weitverbreitetes Antimalariamittel ist Chinin. Allerdings bringt auch hier der vielfache Gebrauch eine verminderte Suszeptibilität mit sich (Bloland, 2001; Pukrittayakamee *et al.*, 1994; Segurado *et al.*, 1997; Jelinek *et al.*, 1995).
Während bei der Ausbildung der Chloroquin-Resistenz hauptsächlich *pfcrt* (*P. faciparum* „chloroquine resistance transporter“) eine wichtige Rolle zu spielen scheint, sind die Faktoren, die auf die Chinin-Suszeptibilität eine Auswirkung haben, noch nicht entschlüsselt. Es wird angenommen, dass Chloroquin und Chinin zwar gemeinsame Faktoren teilen, dass aber die Chinin-Resistenz komplexer ist.
Eine verminderte Chinin-Akkumulation scheint nicht zwangsläufig in einer erhöhten Chinin-Resistenz zu resultieren (Sanchez *et al.*, 2008b). Nurhasanah stellte kürzlich fest, dass einer der Hauptkomponenten der Chinin-Akkumulation *pfcrt* ist, dass aber noch ein weiterer Faktor auf Chromosom 7 eine wichtige Rolle spielt, während Chinin-IC_{90}-Werte von *pfcrt*, *pfmdr1* (*P. falciparum* „multi drug resistance 1“) und einem Gen auf Chromosom 13, *pfnhe* (Natrium-Protonen-Austauscher), verursacht wird (Nurhasanah, 2009; Ferdig *et al.*, 2004; Nkrumah *et al.*, 2009). Da IC_{50}- bzw. IC_{90}-Daten ein Maß für die Lebensfähigkeit der Zelle und den Zell-Tod nach 72 h Medikamentenbelastung sind, können diese Werte von mehreren Faktoren beeinflusst sein. Solche Faktoren können z.B. die Affinität des Medikamentes an sein Ziel-Molekül oder die durch Transportprozesse beeinflusste intrazelluläre Medikamentenkonzentration sein. Die Akkumulation von Substanzen hingegen erfolgt schon nach wenigen Minuten, weshalb sie lediglich durch Transport- und Partitionierungsprozesse über die Membranen bestimmt wird.
Ziel dieser Arbeit war es, die von Nurhasanah durchgeführte QTL-Analyse basierend auf Chinin-Akkumulationen in den Stämmen der Kreuzung aus HB3 und Dd2 mit der Messung der Chinidin-Akkumulation und nachfolgender QTL-Analyse zu komplementieren. Auch die Chloroquin-Akkumulation sollte bestimmt werden, um die direkte Beteiligung von *pfcrt* an

der Akkumulation zu zeigen und eine interne Kontrolle zu haben. Weiterhin sollten mathematische Interaktionen zwischen den QTL mögliche Synergieeffekte aufdecken und bioinformatische Analysen das Eingrenzen der Lokusregion auf der Suche nach dem Kandidatengen erleichtern. Der Einfluss von PfNHE auf die Chloroquin-, Chinidin- und Chinin-Akkumulation sollte ebenfalls untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborausstattung

Analytische Waage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Tuttnauer Systec 2540, Wettenberg
Computer-Software	
EndNote X1	ISI Research Soft, CA, USA
Internet Explorer	Microsoft Communication Corp., CA, USA
MS Powerpoint	Microsoft Corporation, CA, USA
MS Word, 2003	Microsoft Corporation, CA, USA
SigmaPlot 9.01	Systat Software Inc.
BioEdit Version 7.0.9.0., 2007	Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA
DNA-Elektrophoreseapparat	Biorad, München, Elektrowerkstatt Heidelberg
Drucker hp LaserJet 1300	Hewlett Packard, Heidelberg
Eismaschine AF 30	Scotsman, Milano, Italy
Flüssigstickstofftanks	Air Liquide, Ludwigshafen / MVE Cryosystem 6000
Flüssigszintillationszähler TRI-CARB 2100 TR	Packard
Gasbrenner Gasprofi 1 micro	WLD-TEC
GeneAmp PCR System 9700	AppliedBiosystems, CA USA
Inkubatoren (*P. falciparum* Kultur)	Heraeus Instruments
Kamera, DC120 Zoom digital	Kodak, New York
Kühlschränke	Liebherr, Biberach
Leica DMIL Lichtmikroskop	Leica
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mikrowelle	AEG, Nürnberg
Multipipette	Eppendorf, Germany
Netzgerät: Power Pac 300	Biorad, München
Optisches Lichtmikroskop Axiolab	Zeiss, Jena
pH-Meter pH 537	WTW, Weilheim

Pipetman Gilson P10; P20; P200; P1000	Abimed, Langenfeld
Pipetus- Akku	Hirschmann Labortechnik, Eberstadt
Pipetus® Standard	Hirschmann Labortechnik, Eberstadt
Rotor JA20.1	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA
Spektrophotometer UVIKON 923	Kontron Instruments,
Steril-Werkbänke	Herasafe, Heraeus Instruments, Hanau / Sterilgard ClassII Type A/B 3, The Baker Company, USA
Stoppuhr	Roth, Karlsruhe
T Gradient Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thoma-Zählkammer	Marienfeld, Germany
Tiefkühlschrank -80 ºC, UF85-300S	Heraeus GmbH, Hanau
Tiefkühlschränke -20 ºC	Liebherr, Biberach
UV-Tisch UV-Transilluminator	Gibco BRL, Karlsruhe
VarioMACS, MACS system	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Vortex Genie 2	Roth, Karlsruhe
Zentrifugen	
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau
J2-MC	Beckman, Krefeld
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments, Hanau
RC5BPlus	Sorvall, Langenselbold

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe
Deckgläschen für das Hämatozytometer	Roth, Karlsruhe
Eppendorf Kombispitzen 1,25 ml	Eppendorf, Germany
Eppendorf Kombispitzen 5 ml	Eppendorf, Germany
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Kryogefäße	Nalgene®, Wiesbaden

MACS-Säulen CS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mini PolyQ Vials 6 ml (Szintillationsröhrchen)	Beckman Instruments Inc., USA
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Parafilm	American International CanTM, USA
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Biozym Scientific, GmbH
Petrischalen (10 cm Durchmesser)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Petrischalen (25 cm Durchmesser)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Corning Inc., Bodenheim
Plastikpipetten (1 ml; 2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml)	Corning Inc., Bodenheim
Quarzküvetten	HELLMA, Präzisionsküvetten aus Quarzglas suprasil®
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Saarstedt, Nümbrecht, Germany
Reaktionsgefäße 15 und 50 ml	Corning Inc., Bodenheim
Saarstedt Szintillationsröhrchen 20 ml	Saarstedt, Nümbrecht, Germany
Sterilfilter (0,2 µm)	Millipore GmbH, Ashburn
Sterilfiltrationseinheit	Corning Inc., Bodenheim
Thermowell PCR-Reaktionsgefäße	Corning Inc., Bodenheim
Zentrifugengefäße, Polypropylen 18/95	Greiner Bio-one, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien

Die nicht-radioaktiven Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Boehringer JT Baker, Roche Molecular Biochemicals, Calbiochem-Novabiochem GmbH, cc Pro, Fluka, Gibco Invitrogen, ICN Biomedicals, Molecular Probes, Packard Canberra Bioscience Company, Riedel-de-Haen, Carl Roth GmbH, Sigma Chemie

Radioaktives [^{3}H]-Chloroquin, [^{3}H]-Chinidin und [^{3}H]-Chinin (20.0 Ci mmol-1) wurde von der Firma American Radiolabeled Chemicals Inc. bezogen.

2.1.4 Biologische Materialien

2.1.4.1. Parasitenstämme

Die Parasitenstämme Dd2, HB3 und alle 34 F1-Nachkommen, wurden von MR4 (Malaria Research and Reference Reagent Resource Center, USA) bezogen. Die drei Austauschmutanten stammen aus dem Labor von David A. Fidock in New York (Nkrumah *et al.*, 2009).

Dd2	Chloroquin-resistenter Parentalstamm (CQR) aus Indochina
HB3	Chloroquin-sensitiver Parentalstamm (CQS) aus Honduras
B1SD	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
QC13	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
QC01	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
B4R3	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
SC05	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
TC08	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
GC03	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
3BA6	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
1BB5	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
3BD5	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
SC01	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
QC34	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
QC23	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
TC05	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
GC06	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
D43	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
C188	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
C408	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
CH3-116	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
CH3-61	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
7C3	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
7C7	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
7C12	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3

7C16	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
7C20	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
7C46	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
7C111	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
7C126	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
7C140	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
7C159	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
7C170	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
7C183	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
7C421	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
7C424	F1-Nachkomme der Kreuzung aus Dd2 und HB3
M-1 ^{GC03}	Austauschmutante mit reduzierter *pfnhe* Expression, GC03 Hintergrund (siehe Anhang Abb. 7.1.)
M-1 ^{3BA6}	Austauschmutante mit reduzierter *pfnhe* Expression, 3BA6 Hintergrund (siehe Anhang Abb. 7.1.)
M-1 ^{1BB5}	Austauschmutante mit reduzierter *pfnhe* Expression, 1BB5 Hintergrund (siehe Anhang Abb. 7.1.)

2.1.4.2 Enzyme und DNA-Marker

Restriktionsenzym ApoI	New England Biolabs, Schwalbach
Taq DNA-Polymerase Eurotaq	EuroClone Genomics, Italien
GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder Plus	Fermentas

2.1.4.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. bezogen.

Oligonukleotide zur Überprüfung der verwendeten Stämme mittels Längenpolymorphismus (siehe 2.2.2.2.)

C1M4_fwd	5'-atatcctacaacggtaagca-3'
C1M4_rev	5'-ttctttttgaggagtaatgt-3'
C1M67_fwd	5'-acaggatttttgaagaaaaag-3'
C1M67_rev	5'-taggataaatgtagctttag-3'
C1M62_fwd	5'-gaattcacttaaatgtatttatttg-3'
C1M62_rev	5'-atgaagttatccattcgttt-3'
C13M13_fwd	5'-gttataagtatagcagacga-3'
C13M13_rev	5'-atacattacggtattttaaa-3'
C13M63_fwd	5'-agagatactatgattatttta-3'
C13M63_rev	5'-atattacaaagcttactacc-3'
C14M17_fwd	5'-acacaaagagaataggtata-3'
C14M17_rev	5'-tagtaattctagtttaccta-3'
B5M124_fwd	5'-taataagtgtaagaaatatgga-3'
B5M124_rev	5'-ataaaacagagcaaaataaag-3'
B5M5_fwd	5'-taaataatacaactactaatga-3'
B5M5_rev	5'-attgatccatatttatatctc-3'

Oligonukleotide zur Überprüfung der verwendeten Stämme mittels verschachtelter PCR zur Detektion der K76T Mutation in PfCRT (siehe 2.2.2.3.)

CRTP1 (erste PCR)	5'-ccgttaataataaatacacgcag-3'
CRTP2 (erste PCR)	5'-cggatgttacaaaactatagttacc-3'
CRTD1 (zweite PCR)	5'-tgtgctcatgtgtttaaactt-3'
CRTD2 (zweite PCR)	5'-caaaactatagttaccaattttg-3'

Oligonukleotide zum Auffinden und zur Charakterisierung neuer Marker (siehe 2.2.3.6.)

		T_{An} [°C]	3% MP Agarose	2% Agarose
Mal7P1.205_LP_fwd	5'-gtt ctc tta gac ttt gtt atc c-3'	62	√	
Mal7P1.205_LP_rev	5'-gtc tga ttt atg gca tcc ttt c-3'			
Mal7P1.207_LP_fwd	5'-gtg gat gca gat cat tat tcc-3'	60	√	
Mal7P1.207_LP_rev	5'-cat ctt gtg cac aca aac ttg-3'			
Mal7P1.208_LP_fwd	5'-cag tta cca aaa ggt atc tac c-3'	62	√	
Mal7P1.208_LP_rev	5'-cta att ctt cag cag tca tag c-3'			
Mal7P1.22_LP_fwd	5'-gtt taa cga tat ata tag taa tga c-3'	58	√	
Mal7P1.22_LP_rev	5'-gaa aat aaa ttt tct tct aca tac c-3'			
Mal7P1.17_LP_fwd	5'-cag gat gaa aac gta tct att g-3'	60	√	
Mal7P1.17_LP_rev	5'-ggt aat aaa aga taa atc att gtg-3'			
PF07_0015_LP_fwd	5'-gtg cta atg aag atg agg acc-3'	58	√	
PF07_0015_LP_rev	5'-cta att aag tcg tta ctc ttt tg-3'			
PF07_0019_LP_fwd	5'-gtc atc aaa ctg gga att gaa c-3'	62	√	
PF07_0019_rev_	5'-gga ttg ggc caa ttc gga g-3'			
PF07_0020_LP_fwd	5'-ccg tat gag cac ttt tta gaa-3'	60		√
PF07_0020_LP_rev	5'-act att cat ttt ttc tcg aca g-3'			
PF07_0021_fwd_1	5'-gag tat tca tat cag tga tga ag-3'	60	√	
PF07_0021_LP_rev_1	5'-cta ttt aca ctt tga tta gtt cc-3'			
PF07_0021_LP_fwd_2	5'-cct ttg aat ctt atg aaa aat gac-3'	62		√
PF07_0021_LP_rev_2	5'-gaa tga tta att tcg tat tca tcg-3'			
PF07_0022_LP_fwd_1	5'-gat gtc caa aat aag gtg tgt g-3'	62	√	
PF07_0022_rev_1	5'-gat tta ttg tgt tca atg cat tc-3'			
PF07_0022_fwd_3B	5'-ctg att atg atc aaa tac aag aac-3'	60	√	
PF07_0022_LP_rev_2	5'-cat gta caa gtt gta ata aaa tac-3'			
PF07_0024_LP_fwd_1	5'-caa agc aat tcc atg ttt gat c-3'	62	√	
PF07_0024_LP_rev_1	5'-cct ctg aaa gtt tac tat cac g-3'			
PF07_0024_LP_fwd_2	5'-gaa cct ata aaa gtg agc acg-3'	58	√	
PF07_0024_rev_3	5'-cca tct cca tta tca taa ccg-3'			
PF07_0024_LP_fwd_3	5'-gga gtt gat gag gat gac ga-3'	60	√	
PF07_0024_rev_4	5'-cta tca gaa gtg cta cta tcg-3'			

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Aufbereitung von humanen Erythrozyten

Das Erythrozytenkonzentrat stammt von Spendern der Blutgruppe A^+. Es wird unter sterilen Bedingungen in 50 ml Plastikröhrchen aliquotiert und 10 ml Zellkultur-Medium zugegeben. Anschließend wird bei 2100 rpm für 5 min zentrifugiert. Bei 300 rpm wird die Bremse der Heraeuszentrifuge ausgeschaltet, um eine Verwirbelung des Blutes zu vermeiden. Die Erythrozyten werden maximal 2 Wochen lang verwendet und bei 4°C gelagert.

2.2.1.2. Aufbereitung von humanem Serum

Humanes Serum der Blutgruppen A^+ und AB werden aus Blutplasmaspenden der Blutbank gewonnen, indem die Gerinnungsfaktoren entzogen werden. Um Qualitätsunterschiede auszugleichen, wird das Plasma verschiedener Spender unter sterilen Bedingungen gemischt und anschließend in 50 ml Plastikröhrchen abgefüllt. Pro 50 ml Plasma wird 800 µl 1 M sterilfiltriertes Kalziumchlorid zugegeben. Das Plasma wird im Wasserbad für 30 min bei 37 °C und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wird das über Nacht geronnene Fibrin durch Abklopfen von der Gefäßwand abgelöst und das Plasma bei 3800 rpm 1 Stunde zentrifugiert. Im Wasserbad wird das Serum bei 56 °C 30 min hitzeinaktiviert und anschließend bei –20 °C gelagert. Das Fibrinpellet wird bei der Verwendung des Serums verworfen.

2.2.1.3. Kultivierung von P. falciparum

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme HB3, Dd2 und ihre 34 F1-Nachkommen (Ferdig *et al.*, 2004; Wellems *et al.*, 1990) können wie jedes erythrozytäre Parasitenstadium von *P. falciparum* kontinuierlich in Kultur gehalten werden (Trager *et al.*, 1976).
Zur Kultivierung werden Petrischalen für Gewebekulturen mit einem Durchmesser von entweder 10 cm oder 14,5 cm und 14 ml oder 35 ml HEPES gepuffertem RPMI Medium verwendet, das 10 % hitzeinaktiviertes humanes Serum, 100 µM Hypoxanthin und 20 µg/ml Gentamicin enthält. Die Parasiten werden hierbei in humanen A^+ Erythrozyten mit einem

Hämatokrit von ca. 5 % gehalten. Das bedeutet, in einer kleinen Schale werden 0,5 ml und in einer großen Schale 1,5 ml Erythrozytenkonzentrat zugegeben. Die Kulturen werden im Inkubator bei 37 °C, 3 % CO_2, 5 % O_2, 92 % N_2, and 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.
Alle zwei bis drei Tage wird die Parasitämie mittels Blutausstrich kontrolliert und die Kulturen verdünnt bzw. das Medium gewechselt. Beim Mediumwechsel wird das überstehende Medium über den sedimentierten, infizierten Erythrozyten abgenommen und durch eine entsprechende Menge neuen Mediums ersetzt. Dabei werden die Erythrozyten resuspendiert. Die Parasitämie der Kulturen sollte 5-10 % nicht übersteigen, da toxische Abbauprodukte von den Parasiten in das Medium abgegeben werden und zum Absterben der Parasiten führen können. Zur Verdünnung und weiteren Erhaltung der Kultur impft man eine neue Petrischale mit frischem, vorgewärmtem Zellkultur-Medium und Erythrozyten mit der gewünschten Menge infizierter Erythrozyten der Ausgangsplatte an.

Zellkultur-Medium
10 % Humanes Serum
20 µg/ml Gentamicin
100 µM Hypoxanthin
in RPMI 25 mM HEPES L-Glutamin (Gibco)

Das Medium wird bei 4 °C gelagert.

2.2.1.4. Mikroskopische Darstellung von P. falciparum mittels Giemsa-Färbung

Zur Unterscheidung der einzelnen Stadien und zur Bestimmung der Parasitämie der Kultur wird eine Giemsa-Färbung des Ausstrichs durchgeführt und lichtmikroskopisch begutachtet.
Giemsa ist ein Farbstoffgemisch aus Eosin, Methylenblau, Methylenazur und Methylenviolett, das die Erythrozyten rötlich, die Parasiten blau und deren Zellkerne blau-schwarz färbt. Sedimentierte Erythrozyten werden aus der Petrischale mit der Pipette abgenommen, auf einen Objektträger übertragen und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Der Ausstrich wird luftgetrocknet, in 99 % Methanol fixiert und erneut luftgetrocknet.
Vor Gebrauch wird die Giemsa-Färbelösung (Sigma) 1:10 in VE-Wasser verdünnt. Die Ausstriche werden ca. 5-10 min gefärbt, anschließend unter fließendem VE-Wasser abgespült,

trockengetupft und ohne Deckglas mit dem 100 x Öl-Immersionsobjektiv an einem Lichtmikroskop betrachtet. Dies entspricht einer Gesamtvergrößerung von 1000 x.

2.2.1.5. Bestimmung der Parasitämie

Die Parasitämie gibt das prozentuale Verhältnis der Erythrozyten zur Anzahl der mit *P. falciparum* infizierten roten Blutzellen an. Zur Bestimmung der Parasitämie wird in einem mit Giemsa gefärbten Ausstrich (siehe 2.2.1.4.) ein Sichtfeld mit einer einlagigen Schicht von Erythrozyten ausgewählt und die Anzahl der Erythrozyten und Parasiten in neun angrenzenden Feldern ausgezählt. Mehrfachinfektionen werden dabei einfach gezählt. Die Parasitämie berechnet sich wie folgt:

(Anzahl Parasiten / (Anzahl Erythrozyten $*$ Anzahl Felder)) $*$ 100 = Parasitämie [%]

2.2.1.6. Auftauen von Parasiten

Das Kryoröhrchen mit dem gewünschten *P. falciparum*-Stamm wird aus dem Flüssigstickstofftank genommen und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Pro 1 ml Blut werden 0,2 ml 12 % NaCl (Auftau-Lösung 1) zugeben und anschließend geschüttelt. Danach wird das 9-fache Volumen 1,6 % NaCl (Auftau-Lösung 2) tropfenweise unter ständigem Schütteln zugegeben. Die Zellen werden bei 1900 rpm und RT für 2 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Ein dünner Flüssigkeitsfilm soll auf dem Sediment verbleiben in dem das Pellet durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert wird. Das 7-fache Volumen 0,9 % NaCl / 0,2 % Glukose (Auftau-Lösung 3) wird mit 1-2 Tropfen pro Sekunde unter ständigem Schütteln zugeben. Die Zellen werden erneut 2 min bei 1900 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen. Das Sediment wird in 14 ml vorgewärmtem 37 °C Zellkultur-Medium resuspendiert, in eine kleine Petrischale gegeben und 0,5 ml Erythrozyten zugeben. Die Parasiten werden für zwei Tage im Inkubator belassen, am dritten Tag wird das Medium gewechselt und die Kultur bei Bedarf gesplittet.
Alle benötigten Salzlösungen werden sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt. Vor Gebrauch werden sie auf 37 °C vorgewärmt.

Verwendete Lösungen

Auftau-Lösung 1	Auftau-Lösung 2	Auftau-Lösung 3
12 % NaCl	1,6 % NaCl	0,9 % NaCl
		0,2 % Glucose

Auftau-Lösung 1 und 2 werden autoklaviert, Auftau-Lösung 3 wird sterilfiltriert. Alle Lösungen werden bei 4 °C gelagert.

2.2.1.7. Einfrieren von Parasiten

Das Einfrieren der Parasiten ist nur im Ringstadium möglich, da die Einfrierlösung Sorbitol enthält. Die Parasitämie der Ringstadien sollte bei ca. 5 % liegen, so dass die Parasiten nach dem Auftauen schnell anwachsen.
Das Medium der Parasitenkultur wird weitestgehend abgenommen und die Parasitenkultur für 2 min bei 1900 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Volumen der sedimentierten Erythrozyten bestimmt. Es wird das gleiche Volumen einer sterilfiltrierten Einfrierlösung (28 % Glycerin, 3 % Sorbitol, 0,65 % NaCl) zugegeben, schnell gemischt und die Suspension in Kryoröhrchen überführt. Die Parasiten werden umgehend in einem Gemisch aus 99 % Ethanol und Trockeneis für ca. 10-15 min eingefroren. Anschließend bei -80 °C mindestens einen Tag gelagert, bevor sie im Stickstofftank bei -196 °C deponiert werden.

Einfrier-Lösung

Glycerin	28 %
Sorbitol	3 %
NaCl	0,65 %

Die Lösung wird sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

2.2.1.8. Synchronisieren von P. falciparum infizierten Blutkulturen mit Sorbitol

Für die Akkumulationsexperimente sollen ausschließlich junge *P. falciparum* Trophozoiten verwendet werden. Bei der kontinuierlichen Kultivierung der Parasiten kommt es jedoch zu einem asynchronen Wachstum. Durch die Zugabe von einer 5 %igen D-Sorbitol-Lösung zur

Kultur wird diese im Ringstadium synchronisiert, da Sorbitol in das tubulovesikuläre System von Trophozoiten und Schizonten eindringen kann, während dies im Ringstadium nicht möglich ist. Infolge dessen nehmen die Zellen vermehrt Zucker auf und es kommt aufgrund des osmotischen Schocks, der beim Mediumwechsel von Sorbitol zu Zellkultur-Medium stattfindet, zur Lyse der Parasiten im Trophozoiten- und Schizontenstadium (Lambros *et al.*, 1979). Die Blutkultur enthält damit nur noch uninfizierte Erythrozyten und rote Blutkörperchen mit Parasiten im Ringstadium. Um den Parasitenverlust durch die Behandlung mit Sorbitol möglichst gering zu halten, sollten für die Synchronisierung nur Kulturen mit einem hohen Anteil an Ringstadien verwendet werden. Das Synchronisieren sollte 16-18 h vor dem eigentlichen Experiment mit den Parasiten erfolgen, um junge Trophozoiten zu erhalten.

Das Medium der Blutkultur wird abgenommen und die Blutzellen in 10 ml einer vorgewärmten 5 % D-Sorbitol- Lösung resuspendiert (sowohl bei 10 cm wie auch bei 14,5 cm Petrischalen) und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 37 °C im Wasserbad werden die Erythrozyten für 2 min bei 1900 rpm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, die Blutzellen in 10 ml vorgewärmten Zellkultur-Medium gewaschen und erneut bei 1900 rpm für 2 min und RT abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Sediment in 14 ml (kleine Petrischale) oder 35 ml (große Petrischale) Zellkultur-Medium aufgenommen.

<u>Lösung zum Synchronisieren</u>

5 % D-Sorbitol in ddH_2O

Die Lösung wird sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

2.2.1.9. Aufreinigung von Trophozoiten durch magnetische Separation

Während seines intraerythrozytären Lebenszyklus verstoffwechselt der Parasit das Hämoglobin der roten Blutzelle in seiner Nahrungsvakuole. Durch den Abbau erhält der Parasit wichtige Aminosäuren, aber es ensteht auch das toxische Nebenprodukt Häm, welches paramagnetisch ist. Dieses wird zu dem unlöslichen und nicht-toxischen Hämozoin biomineralisiert.

Für die Akkumulationsexperimente werden Trophozoitenkulturen mit hohen Parasitämien benötigt. Um Parasitämien von 95-99 % zu erreichen, macht man sich die paramagnetischen Eigenschaften von Hämozoin in Trophozoiten zu Nutze (Uhlemann *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu können rote Blutzellen durch ihr dia-magnetisches Oxyhämoglobin nicht aufgereinigt werden. Da auch Schizonten paramagnetisch sind, muss die Parasitenkultur zuvor gut synchronisiert werden (siehe 2.2.1.8.), damit eine möglichst reine Trophozoitenkultur erhalten wird.

Die magnetischen Säulen (MACS Separation Columns CS) werden nach Angaben des Herstellers in den Magneten (Vario MACS, Miltenyi Biotec) eingespannt und mit MACS-Puffer äquilibriert. Die Parasiten können anschließend direkt in Kulturmedium auf die Säule gegeben werden, wobei die Parasiten die Säule langsam durchlaufen sollten, damit Trophozoiten gut binden können. Hierzu wird das Ventil gerade so weit geöffnet, dass der Durchfluß tropfenweise aus der Säule austritt. Die Säule wird so lange mit MACS-Puffer gewaschen (ungefähr 5-6 Säulenvolumen), bis der Durchfluss klar ist und keine Erythrozyten mehr enthält. Anschließend wird die Säule aus dem Magneten entfernt und die gebundenen infizierten Erythrozyten können mit ausreichenden Mengen MACS-Puffer eluiert werden. Das Eluat wird zentrifugiert (2000 rpm, 2 min, RT) und das Parasitenpellet in dem gewünschten Puffer resuspendiert.

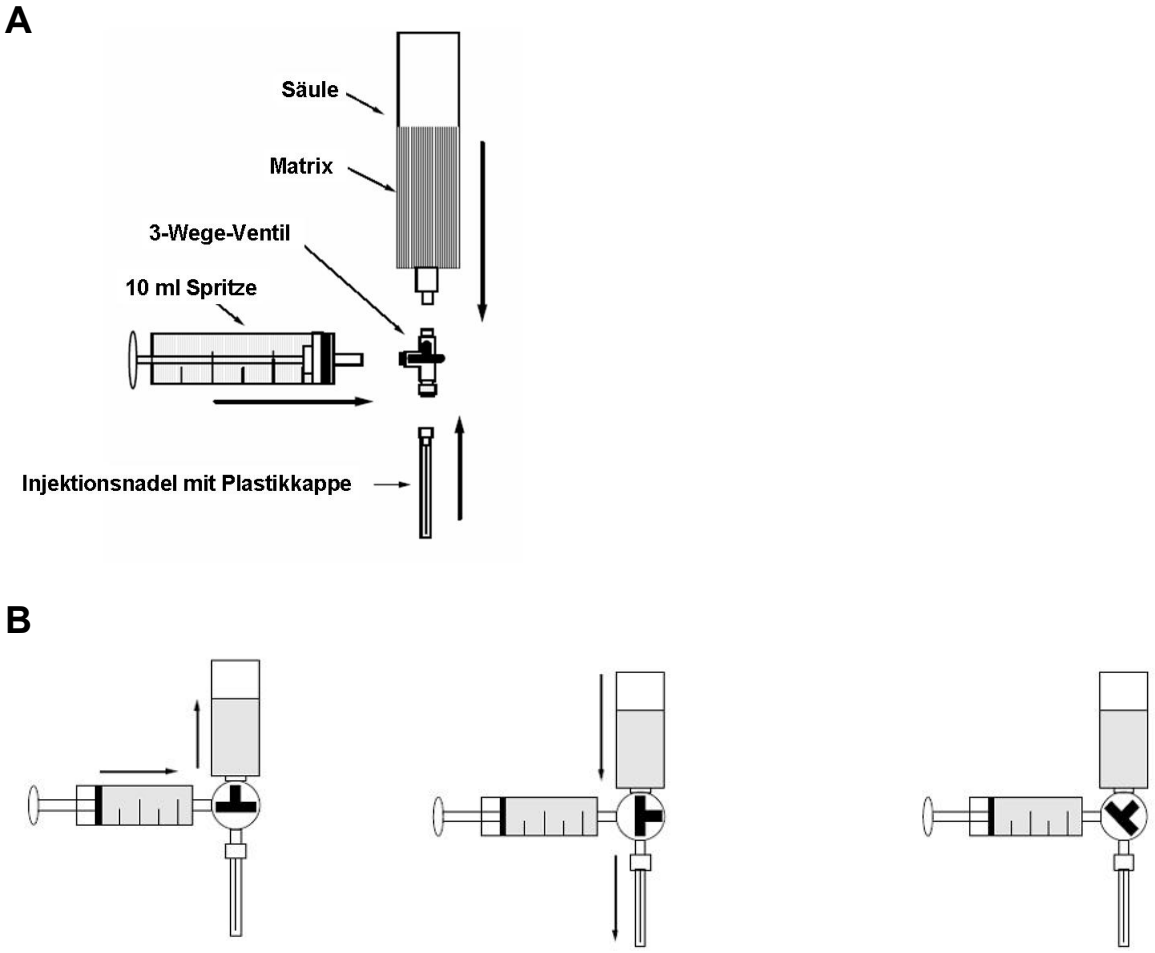

Abb. 2.2.1.: Magnetische Separation (Vogt, 2008)
(A) Zusammenbau der magnetischen Säule (B) Drei verschiedene Positionen des 3-Wege-Ventils: Der Puffer fließt von der Spritze zur Säule (Links), von der Säule durch die Nadeln (Mitte), nicht (Endposition) (Rechts)

<u>MACS-Puffer</u>

PBS	1 x
EDTA	2 mM
BSA	0.5 %

PBS wird mit dem zugesetzten EDTA autoklaviert und bei RT gelagert. Vor Gebrauch wird das BSA frisch zugesetzt.

2.2.1.10. Benutzung der Thoma-Zählkammer zur Bestimmung der Erythrozytenkonzentration

Im Akkumulationsexperiment sollen möglichst immer gleiche Zellkonzentrationen verwendet werden, daher wird die Konzentration der nach der magnetischen Separation aufkonzentrierten Trophozoiten in der Thoma-Zählkammer bestimmt, was auch für die spätere Berechnung der Akkumulation herangezogen wird. Vor der Benutzung des Hämatozytometers wird dieses und das Deckgläschen mit 70 % Ethanol und einem weichen Tuch gereinigt. Anschließend wird die Kammer durch Anhauchen leicht angefeuchtet und das Deckgläschen auf die Kammer geschoben, so dass Newtonsche Ringe auf den Trägerstegen entstehen. Nach dem Trocknen wird eine entsprechend verdünnte Zellsuspension seitlich aufpipettiert, die sich durch die Kapillarkraft in die Zwischenräume saugt. Die Verdünnung sollte so gewählt werden, dass die Zellen gleichmäßig verteilt werden und nicht übereinander liegen. Die Zellsuspension breitet sich in einer Schicht mit genau bekannter Dicke aus. Nach Auszählung der auf den Zählfeldern liegenden Zellen unter dem Lichtmikroskop mit Durchlicht im 10 x Objektiv, lässt sich deren Anzahl je Volumeneinheit errechnen. Der Abstand zwischen Deckglas und Objektträger beträgt 0,1 mm. Auf dem Objektträger sind Kleinquadrate mit einer Seitenlänge von 0,05 mm eingezeichnet, also mit einer Fläche von 0,0025 mm^2 und einem Volumen von 0,00025 mm^3. Jeweils 16 Kleinquadrate werden zu einem Großquadrat zusammengefasst. Insgesamt bilden 16 Großquadrate die Zählkammer. Es gibt somit 256 Kleinquadrate. Da es zwei Zählnetze gibt, wird der Mittelwert beider gezählten Zellzahlen für die Bestimmung gebildet.

Die Formel zur Bestimmung lautet:

$$\frac{N * x * 4000}{256}$$

N ist der Mittelwert der Zellen in den beiden ausgezählten Zählnetzen und x der Verdünnungsfaktor.

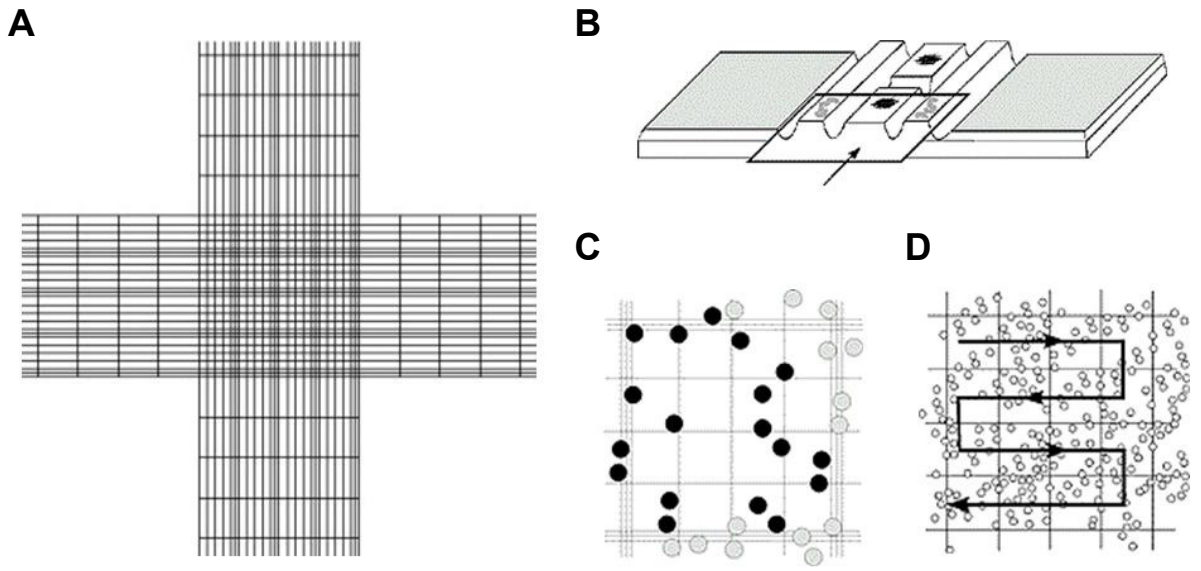

Abb. 2.2.2.: Thoma-Zählkammer (Marienfeld, 2009)
(A) Zählnetz (B) Zusammenbau (C) Zählbereich (nur schwarze Zellen werden mitgezählt) (D) mäanderförmiger Zählvorgang beginnend von oben links in Pfeilrichtung

2.2.2. Überprüfung der Stämme

2.2.2.1. Isolierung von genomischer DNA aus P. falciparum

Erythrozyten-Lyse

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *P. falciparum* verwendet man bevorzugt Parasitenkulturen im späten Parasitenstadien, da Trophozoiten und Schizonten im Vergleich zu Ringstadien mehr DNA enthalten. Das Medium einer Parasitenkultur in einer 14,5 cm Kulturschale wird abgenommen und das mit ca. 26 ml TKM1 resuspendierte Blut gleichmäßig auf zwei 15 ml Reaktionsgefäße verteilt. Es erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 1900 rpm, 2 min und RT. Der Überstand wird verworfen. Beide Pellets werden in je 14 ml TKM1 Puffer resuspendiert und die Erythrozyten durch Zugabe von je 150 µl 10 %igem Saponin lysiert. Hierbei wird schnell durch Invertieren gemischt und nach der Lyse 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 3800 rpm, 8 min und 4 °C wird der Überstand erneut verworfen, die Pellets in zunächst je 1 ml TKM1 resuspendiert und anschließend weitere 13 ml TKM1 je Reaktionsgefäß zugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 3800 rpm für 8 min bei 4 °C wird wiederum der Überstand abgenommen.

Nach diesem Schritt können die Pellets bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert werden.

gDNA-Extraktion

Das gefrorene Pellet wird bei RT aufgetaut und mit 150 µl TKM1 durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wird 2,4 ml TKM2 zugegeben und erneut gevortext. Die Suspension wird in ein 12 ml Zentrifugengefäß (Greiner Polypropylen-12/75 Zentrifugengefäß) überführt und 150 µl 20 %iges SDS zugegeben. Es folgt eine 15minütige Inkubation bei 56 °C bevor 1,35 ml 4 M NaCl zugegeben wird. Durch Invertieren wird gemischt und danach bei 10500 rpm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert (Beckman Rotor JA20.1). Der Überstand wird in ein neues 12 ml Zentrifugengefäß überführt, 2 Volumen 100 % Ethanol zugegeben und durch Invertieren gemischt. Die DNA Fällung erfolgt bei -20 °C über Nacht. Am nächsten Tag wird bei 10500 rpm für 40 min und 4 °C zentrifugiert (Beckman Rotor JA20.1), der Überstand abdekandiert und das Pellet vorsichtig mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 10500 rpm für 10 min und 4 °C wird der Überstand wieder abgenommen und die pellettierte gDNA kopfüber für 5-10 min getrocknet. Anschließend wird die gDNA in 50 ml TE-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die gDNA kann bei -20 °C über mehrere Jahre gelagert werden.

Verwendete Lösungen

TKM1	
Tris, pH 7,6	10 mM
KCl	10 mM
$MgCl_2$	10 mM
EDTA	2 mM

TKM2	
Tris, pH 7,6	10 mM
KCl	10 mM
$MgCl_2$	10 mM
EDTA	2 mM
NaCl	0,4 M

TE-Puffer	
Tris/HCl, pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

Sonstige Lösungen	
EtOH	100%
EtOH	70%
SDS	20%
Saponin	10%

Alle Lösungen werden in ddH_2O angesetzt und bei RT gelagert. TKM1, TKM2 und TE-Puffer werden autoklaviert.

2.2.2.2. Bestimmung von Längenpolymorphismen zur Charakterisierung der P. falciparum Stämme

Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wird DNA *in vitro* vervielfältigt (Saiki *et al.*, 1985). Für analytische PCR-Reaktionen wird Taq DNA-Polymerase (EuroTaq, EuroClone Genomics, Italien) verwendet.

Bestimmung von Längenpolymorphismen

Das *P. falciparum* Genom enthält viele hoch-polymorphe Regionen, die sich entweder durch einzelne Nukleotidaustausche, sogenannte SNPs („single nucleotide polymorphisms“) wie z.B. K76T in PfCRT, oder durch Längenpolymorphismen von Stamm zu Stamm unterscheiden (Anderson *et al.*, 1999; Su *et al.*, 1999; Su *et al.*, 1996). Auch HB3 und Dd2 unterscheiden sich an vielen Stellen. Da die F1-Nachkommen der Kreuzung beider Stämme im Blutstadium haploid sind, besitzen sie somit nur das Allel eines Elternteils, was sich mittels PCR einfach nachweisen lassen. Acht verschiedene Primerpaare (Sequenz von Dr. Mu, MR4, freundlicherweise zur Verfügung gestellt) werden für die Bestimmung der Längenpolymorphismen aller F1-Nachkommen und HB3 und Dd2 für die PCR-Reaktion verwendet. Die PCR-Amplifikate der Primer-Paare B5M124 und C4M62 werden auf Grund des großen Längenunterschieds auf ein normales 2 %iges Agarosegel aufgetragen, während die Amplifikate der restlichen Primer-Paare über ein hochauflösendes 3 %iges MetaPhor® Agarosegel getrennt werden (siehe 2.2.2.4.).

Primer-Paar	”Annealing”-Temperatur [T_{An}] in °C	PCR-Reaktionsmix (25 µl)		
C1M4	59	EuroTaq Puffer (10 x)	2,5	µl
C1M67	55	dNTPs (10 mM)	0,5	µl
C1M62	59	Primer 1 (50 µM)	0,5	µl
C13M13	55	Primer 2 (50 µM)	0,5	µl
C13M63	55	$MgCl_2$ (50 mM)	1,25	µl
C14M17	55	gDNA Templat	0,5	µl
B5M124	55	DNA-Polymerase (1 U/µl)	0,25	µl
B5M5	55	H_2O	19	µl

PCR-Programm

Denaturierung	94 °C	4	min	
Denaturierung	94 °C	45	s	35 Zyklen
Primer-“Annealing”	55 °C oder 59 °C	45	s	35 Zyklen
Elongation	68 °C	45	s	35 Zyklen
Elongation	68 °C	10	min	
	4 °C	∞		

2.2.2.3. Verschachtelte PCR zur Detektion der K76T Mutation in PfCRT

Der Austausch der Aminosäure 76 von Lysin zu Threonin wird in allen CQR-Parasiten beobachtet. Die F1-Nachkommen der Kreuzung von HB3 mit Dd2 haben die Aminosäure von einem der beiden Eltern vererbt bekommen, von welchem Elternteil lässt sich durch die verschachtelte PCR nachweisen. Die Detektion der K76T Mutation in PfCRT wurde zusätzlich zu der Typisierung der Stämme nach Längenpolymorphismen (siehe 2.2.2.2.) angewandt, wenn die Charakterisierung nicht eindeutig war (Djimde *et al.*, 2001).

Verschachtelte PCR

Die erste PCR erfolgt mit dem Primerpaar CRTP1 und CRTP2 auf *pfcrt*, was zu einem PCR-Produkt von 537 bp Länge führt. Die zweite PCR mit dem inneren Primerpaar CRTD1 und CRTD2, das direkt in der Nähe der mutierten Stelle bindet, führt zu einem 145 bp langen PCR-Amplifikat (Djimde *et al.*, 2001). Nach den ersten 10 Zyklen der ersten PCR wird diese

angehalten und 0,5 µl PCR-Reaktion aus dem Gefäß entnommen, um damit als Templat für die zweite PCR zu dienen. Das PCR-Gerät wird erneut mit 35 Zyklen gestartet.

PCR-Reaktionsmix

Erste PCR-Reaktion (25 µl)			Zweite PCR-Reaktion (25 µl)		
EuroTaq Puffer (10 x)	2,5	µl	EuroTaq Puffer (10 x)	2,5	µl
dNTPs (10 mM)	0,5	µl	dNTPs (10 mM)	0,5	µl
CRTP1 Primer (50 µM)	0,5	µl	CRTD1 Primer (50 µM)	0,5	µl
CRTP2 Primer (50 µM)	0,5	µl	CRTD2 Primer (50 µM)	0,5	µl
$MgCl_2$ (50 mM)	1,25	µl	$MgCl_2$ (50 mM)	1,25	µl
gDNA Templat	0,5	µl	PCR-Amplifikat aus erster PCR	0,5	µl
DNA-Polymerase (1 U/µl)	0,25	µl	DNA-Polymerase (1 U/µl)	0,25	µl
H_2O	19	µl	H_2O	19	µl

PCR-Programme

Erstes Programm				Zweites Programm			
94 °C	4	min		94 °C	4	min	
94 °C	45	s	10 Zyklen	94 °C	45	s	35 Zyklen
59 °C	45	s		59 °C	45	s	
68 °C	1	min		68 °C	1	min	
68 °C	10	min		68 °C	10	min	
4 °C	∞			4 °C	∞		

Restriktion der PCR-Produkte

Restriktionsenzyme sind bakterielle Restriktionsendonukleasen, die die DNA sequenzspezifisch schneiden, wobei 5´- bzw. 3´-Überhänge oder glatte DNA-Enden entstehen. Die Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen dient hier der Detektion von einer eventuellen K76T Mutation in PfCRT.

Die PCR Produkte werden mit ApoI verdaut. Dieses Restriktionsenzym kann nur das Chloroquin-sensitive (CQS) Allel verdauen, d.h. wenn bei Position 76 ein Threonin steht. In diesem Fall wird das Amplifikat um 34 bp verkürzt, das resistente Allel kann nicht verdaut werden. Die Restriktion erfolgt für 6 h bei 50 °C.

Restriktionsansatz

Amplifikat aus zweiter PCR	8 µl
NEB Puffer 3	1 µl
BSA (10 x)	1 µl
Restriktionsenzym ApoI	0,5 µl

Der Verdau wird anschließend auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und für mindestens 40 min bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.2.4.).

2.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook, 1989) wird zur Charakterisierung und Aufreinigung von doppelsträngiger DNA eingesetzt. Im elektrischen Feld wandert die negativ geladene DNA zur Anode. Diese Eigenschaft wird in der Agarose-Gelelektrophorese ausgenutzt, um unterschiedlich große DNA-Fragmente voneinander zu trennen. Größere DNA-Fragmente wandern dabei langsamer als kleinere, da die Gelmatrix die Wanderung größerer Fragmente stärker behindert. Für linear doppelsträngige DNA ist die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe.
In dieser Arbeit wurden für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmente zwei verschiedene Agarosearten eingesetzt. Für Amplifikate mit großem Längenunterschied wurde normale 2 %ige Agarose verwendet, für Fragmente mit kleinen Längenunterschieden (mindestens 3 bp Längenunterschied) wurde die hoch-auftrennende MetaPhor®-Agarose (Cambrex Bio Science Rockland) oder die Biozym Phor Agarose (Biozym Scientific, Hess. Oldendorf), die die gleichen Eigenschaften besitzt, eingesetzt. Diese hoch-auftrennenden Agarosen haben einen Trennbereich von 20 bis 800 bp, wobei Fragmentunterschiede von 2 % erkannt werden können und haben eine Schmelztemperatur im mittleren Bereich von ≤ 75 °C. Sie wird in 1 x TAE-Puffer angerührt und zunächst auf dem Magnetrührer aufgelöst, um eine Verklumpung zu verhindern. In der Mikrowelle wird sie dann erst 2 min bei hoher Energie, dann 5 min bei niedriger Energie unter gelegentlichem Schütteln geschmolzen. Nach dem Abkühlen auf 50-55 °C werden pro 100 ml Agarose 8 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und das Gemisch in die Gießkammer mit Kamm gegossen.
Ethidiumbromid interkaliert auf Grund seiner planaren Struktur in die DNA. Dabei wechselwirken seine aromatischen Ringe mit den heteroaromatischen Ringen der Basen der Nukleinsäuren. Es kann im UV-Licht (254-366 nm) angeregt und im orange-roten Bereich bei

590 nm detektiert werden und eignet sich damit zur Lokalisation der DNA im Gel. Die Bindung des Ethidiumbromids and die DNA ruft eine verstärkte Fluoreszenz hervor, weshalb die DNA-Banden gegenüber der Hintergrundfluoreszenz gut erkennbar sind.
Nach dem Abkühlen und Aushärten bei RT wird das Gel anschließend bei 4 °C weiter abgekühlt. Vor dem Auftragen der Proben wird der Kamm entfernt. Das Gel gibt man in die Elektrophoresekammer, bedeckt es mit vorgekühltem 1 x TAE-Puffer und pippetiert die mit 6 x Probenpuffer (Methylenblau) oder 10 x Probenpuffer (Xylencyanol) versetzten PCR-Amplifikate in die Geltaschen. Die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas) dient als Längenstandard. Die angelegte Spannung liegt etwas niedriger als die normalerweise übliche Spannung von 5 V/cm. Das Gel wird anschließend auf einer UV-Lichtplatte (Gibco BRL, UV Transilluminator; 260-360nm) analysiert und mit einer Kamera (DC120 Zoom Digital Camera, Kodak, New York) fotografiert.

Verwendete Lösungen:

50 x TAE

Tris		242 g
Eisessig		57,1 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0		100 ml
H_2O	ad	1000 ml

Längenstandard

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus	50 µl
6 x Ladepuffer Bromphenolblau	100 µl
1 x TAE	350 µl

6 x Ladepuffer Bromphenolblau [10 ml]

Glycerin	60 %	6 ml
EDTA	60 mM	0,22 g
Bromphenolblau	0,25 %	25 mg
H_20	ad	10 ml

10 x Ladepuffer Xylencyanol [10 ml]

Glycerin	60 %	6 ml
150 mM Tris, pH 7,6	50 mM	3,3 ml
Xylencyanol	25 %	25 mg

Ethidiumbromid

10 mg/ml in H_2O

2.2.3. Chloroquin- Chinidin- und Chinin-Akkumulations-experimente in *P. falciparum*

Die Akkumulationsexperimente werden mit sehr synchronen Parasiten im Trophozoiten-Stadium durchgeführt. Die Kultur soll eine Parasitämie von 95-99 % haben. Um dies zu gewährleisten, müssen die Kulturen vor dem eigentlichen Experiment mindestens dreimal synchronisiert werden (siehe 2.2.1.8.) und müssen darüber hinaus über die magnetische Separation angereichert werden (siehe 2.2.1.9.). Anschließend werden die aufkonzentrierten Trophozoiten auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Mit der Zugabe des Tritium-markierten Antimalariamittels wird die eigentliche Aufnahme begonnen. Die Bestimmung der Menge des radioaktiven Medikaments in der Zelle erfolgt nach der von Sanchez *et al.* beschriebenen Methode (Sanchez *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2008b).

2.2.3.1. Vorbereitung der Plasmodien-Kultur

Die nach der magnetischen Separation aufkonzentrierten infizierten Erythrozyten werden bei 2000 rpm, 2 min und RT abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in vorgewärmtem RPMI (pH 7,4 bei 37 °C) resuspendiert. Die Zellkonzentration sollte dabei zwischen 22000-32000 Zellen/µl liegen. Die genaue Konzentration wird mit der Thoma-Zählkammer bestimmt (siehe 2.2.1.10.). Die Synchronizität der Kultur und die Parasitämie werden durch das Auszählen eines Giemsa-Ausstriches unter dem Lichtmikroskop beurteilt (siehe 2.2.1.4.).

2.2.3.2. Akkumulationsexperiment

Vor Beginn des Akkumulationsexperimentes werden die Zellen bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wird entweder 40 nM [^{3}H]-CQ, 40 nM [^{3}H]-QD oder 40 nM [^{3}H]-QN zugegeben, gemischt, weiterhin im 37 °C Wasserbad inkubiert und die Zeit gemessen. Nach 5, 7, 10, 15 und 20 min werden 2,5 µl einer 500 mM Glukoselösung zugegeben, damit eine fortwährende Energiezufuhr gewährleistet und der Ausgang des Experiments nicht durch mangelnde Energie verfälscht wird. Zu festgelegten Zeitpunkten werden zweimal 75 µl entnommen und in je ein mit 100 µl Öl und 75 µl RPMI (pH 7,4 bei 4 °C) vorgelegtes 0,2 ml Reaktionsgefäß ohne Deckel pipettiert, die zuvor auf Eis vorinkubiert werden. Die niedrige

Temperatur und eine anschließende Zentrifugation (13000 rpm, 1 min, RT) beenden die Akkumulation der Medikamente in die Zellen. Da die Tischzentrifuge nur 1,5 ml Reaktionsgefäße halten kann, werden die 0,2 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße ohne Deckel gestellt. Das Öl, welches aus 5 Teilen Dibutylphtalat und 4 Teilen Oktylphtalat besteht, trennt durch die Zentrifugation die Zellen vom Überstand und verhindert eine weitere Akkumulation der radioaktiv-markierten Medikamente.

Nach der Zentrifugation werden aus beiden Duplikat-Reaktionsgefäßen 75 µl Überstand entnommen und in ein einziges Szintillationsgefäß mit 2 ml Szintillations-Cocktail gegeben, gemischt und im Szintillations-Gerät gemessen.

Die Spitze des 0,2 ml Reaktionsgefäßes, in dem sich das durch das Öl abzentrifugierte Pellet befindet, wird mit einem Skalpell abgetrennt und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Hier sollte darauf geachtet werden, dass wenig Öl mit transferiert wird. Der restliche Inhalt wird verworfen. Zu dem Pellet werden 100 µl eines Gemisches aus zwei Teilen Ethanol und einem Teil „Tissue Solubilizer“ gegeben, gevortext und bei 55 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird das braune Lysat mit 25 µl 30 % Wasserstoffperoxid entfärbt und mit 25 µl 1 N HCl angesäuert. Das Lysat wird in ein 4 ml Szintillationsgefäß gegeben und die Radioaktivität gemessen. Dabei wird das Lysat eines Pellets in einem Gefäß gemessen. Pro Zeitpunkt erhält man somit einen Wert für den Überstand und zwei Werte für die Pelletlysate, deren Mittelwert für die Berechnung ermittelt werden muss.

Die intrazelluläre CQ-, OD- oder QN-Konzentration wird aus der Menge des radioaktiven Medikaments, das von den Zellen aufgenommen wurde und dem angenommenen Volumen eines mit einem Trophozoiten infizierten Erythrozyten von 75 fl (Saliba *et al.*, 1998) berechnet. Die Akkumulation wird dann als das Verhältnis der intrazellularen zur extrazellulären Medikamentenkonzentration wiedergegeben (CQ_{in}/CQ_{out}, QD_{in}/QD_{out} bzw. QN_{in}/QN_{out}) (Sanchez *et al.*, 2008b).

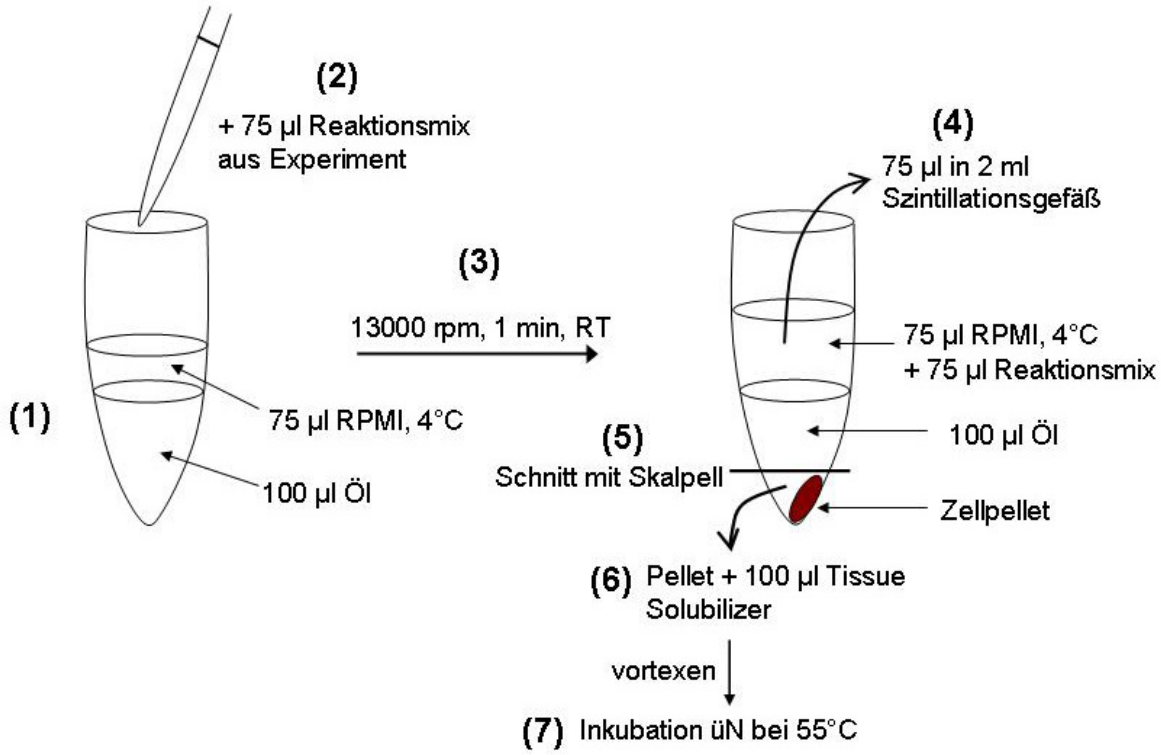

Abb. 2.2.3.: Versuchsaufbau des Akkumulationsexperiments
(1) Vorlage von 100 µl Öl und 75 µl RPMI, 4 °C, in 0,2 ml Reaktionsgefäß ohne Deckel (2) Zugabe von 75 µl Reaktionsmix aus dem Experiment zum Meßzeitpunkt (3) Die Zellen werden durch das Öl pelletiert und so vom Überstand getrennt (4) 75 µl des Überstandes wird in ein 2 ml Szintillationsgefäß gegeben (5) Um das Pellet vom Öl und Überstand getrennt weiterzubehandeln, wird es mit einem Skalpell entfernt (6) Das Pellet wird mit 100 µl „Tissue Solubilizer" versetzt und gevortext (7) Inkubation über Nacht bei 55 °C

Verwendete Lösungen

Tritium-markierte Antimalariamittel

	Stammlsg.	Endkonzentration
[^{3}H]-CQ	10 µM	40 nM
[^{3}H]-QD	10 µM	40 nM
[^{3}H]-QN	10 µM	40 nM

Die Medikamente werden bei -20 °C gelagert.

GIBCO RPMI 1640 Pulver

+ L-Glutamin

+ 25 mM HEPES

- $NaHCO_3$

In 1000 ml ddH_20 lösen und jeweils 500 ml im Eisbad bzw. im 37 °C Wasserbad auf einen pH von 7,4 °C einstellen. Die Lösungen werden aliquotiert und bei 4 °C gelagert.

Öl
5 Teile Dibutylphtalat
4 Teile Oktylphtalat

"Tissue Solubilizer"
2 Teile Ethanol
1 Teil Tissue Solubilizer

Sonstige Lösungen
500 mM Glucose sterilfiltriert
30 % H_2O_2
1 N HCl

2.2.3.3. QTL-Analyse

Die „Quantitative Trait Loci"-Analyse (QTL-Analyse), die in diesem Projekt durchgeführt wurde, stützt sich auf ein Excel basierendes Programm, das von Prof. W. Stein von der Hebrew Universität in Jerusalem, Israel, entwickelt wurde. Es beruht auf einer einfachen Regressionsmethode, die schon 1992 von Haley und Knott beschrieben wurde (Haley *et al.*, 1992). Für die F1-Nachkommen der Kreuzung aus HB3 mit Dd2 steht eine Excel-Datei mit der Information von 901 Mikrosatellitenmarkern auf der Homepage von NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Malaria/Mapsmarkers/PfSegData/segdata.html (National Center for Biotechnology Information, 2000) hinsichtlich des Elternteils, von dem der Marker vererbt wurde und der Lage in cM (Centimorgan) auf den einzelnen Chromosomen, zur Verfügung (Su *et al.*, 1999).
Von den ursprünglich 901 Markern werden 83 Marker für die Analyse herausgenommen, da für diese nur unvollständige Daten zur Verfügung stehen, was den Markersatz auf 818 reduziert. Allerdings wurden in dieser Arbeit 15 weitere Marker gefunden und charakterisiert und somit hat der Markerdatensatz 833 Marker.
Für die QTL-Analyse werden alle Marker ihrer Lage auf den Chromosomen entsprechend untereinander aufgelistet. Die Information eines Markers befindet sich somit entlang einer Reihe, während die Information eines Stamms in einer Spalte wiederzufinden ist. Der Akkumulationswert wird direkt unter den Markername eingetragen. Ein Marker, der von HB3 auf den F1-Nachkommen vererbt wurde, wird mit einer 0 markiert und ein Marker, der von Dd2 vererbt wurde, mit einer 1. Somit steht eine Matrix von 833 (genetischen Markern) x 36 (34 F1-Nachkommen und 2 Elternstämme) Nummern mit 0 und 1 zur Verfügung (siehe Tabelle 2.2.1.)

Tabelle 2.2.1.: Beispielhafter Auszug aus der Matrix für die QTL-Analyse
Marker von Dd2; Marker von HB3

Marker	Position auf Chromosom (cM)	Chromosom	Dd2	HB3	B1SD	QC13	QC01	B4R3	SC05	TC08
			257	2032	2294	2404	1700	1756	2291	1781
C1M38	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
C1M17	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
C1M18	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
C1M19	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
C1M43	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
C1M25	8.6	1	1	0	1	1	1	0	0	1
C1M24	8.6	1	1	0	1	1	1	0	0	1
C1M41	11.5	1	1	0	1	1	1	0	0	1
C1M16	11.5	1	1	0	1	1	1	0	0	1
C1M39	11.5	1	1	0	1	1	1	0	0	1
C1M20	11.5	1	1	0	1	1	1	0	0	1
C1M11	14.4	1	1	0	1	1	1	0	0	1
B7M97	17.3	1	1	0	1	1	1	0	0	1
CAATP	17.3	1	1	0	1	1	1	0	0	1
C1M10	25.9	1	1	0	1	1	1	0	0	0
C1M32	25.9	1	1	0	1	1	1	0	0	0
C1M29	25.9	1	1	0	1	1	1	0	0	0
C1M27	28.8	1	1	0	1	1	1	0	0	0
C1M8	31.7	1	1	0	1	1	1	0	0	0
C1M4	34.6	1	1	0	1	1	1	0	0	0

Für jeden genetischen Marker (d.h. in jeder Reihe) wird eine Regression nach Pearson für alle Nullen (0) und Einser (1) gegen die Medikamentenakkumulation durchgeführt, womit man den r-Wert nach Pearson erhält. Dieser r-Wert ist ein Maß dafür, wie gut die Akkumulationswerte zu der Verteilung der Nullen und Einser in den F1-Nachkommen innerhalb eines Markers passen. Mit der Anzahl der Freiheitsgrade (Anzahl der Stämme minus zwei) wird die Regressions-Abweichung F bestimmt und aus dieser erhält man den Überschreitungswahrscheinlichkeitswert p (p-Wert), der ungleich Null ist. Die p-Werte aller 833 Marker werden jeweils durch den Mittelwert aller Marker dividiert. Der Quotient zeigt, ob der p-Wert größer oder kleiner als der Mittelwert ist. Der reziproke Logarithmus ergibt den „LOD-Score“ (engl. „logarithm of the odds“). Hat ein Marker einen negativen „LOD-Score“, ist sein p-Wert kleiner als der Mittelwert und umgekehrt. Ein p-Wert, der 100mal kleiner als der Mittelwert ist ($p < 0{,}01$), bildet die Signifikanzgrenze und wird in jeder Abbildung eingezeichnet.

Zur graphischen Darstellung der QTL-Analyse werden die „LOD-Scores“ entlang der Ordinate und die Marker entlang der cM-Position, Chromosom für Chromosom, auf der

Abszisse eingetragen. Mit der eingetragenen Signifikanzgrenze $p < 0,01$ kann man in der Abbildung erkennen, wo sich signifikante Maxima befinden.
Aus dem Vorzeichen des r-Wertes kann man schließen, ob dieser Marker zu einer Erhöhung der Akkumulation (positives Vorzeichen) oder zu einer Verringerung der Akkumulation (negatives Vorzeichen) beiträgt.
Der „Primary Scan“ der QTL-Analyse wird mit der Regressionsanalyse aller 36 Stämme durchgeführt. Hier werden alle Hauptfaktoren, die bei der Akkumulation eine Rolle spielen, aufgezeigt. Um auch Faktoren aufzuspüren, die zu einem geringeren Maß zu der Akkumulation beitragen, werden sogenannte „Secondary Scans“ durchgeführt. Die 36 Stämme werden hierzu in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe enthält 17 Stämme die das *pfcrt*-Allel von Dd2 vererbt bekommen haben (CQR-Stämme), die verbleibenden 19 Stämme gehören zu der Gruppe mit *pfcrt*-Allel von HB3 (CQS-Stämme). Eine andere Variante ist die Gruppierung nach dem in der QTL-Analyse aufgefundenen B5M12-Maximums, das im Ergebnisteil beschrieben wird. Hierzu wird der Effekt von B5M12 entfernt. Mit den Akkumulationswerten der zugehörigen Stämme der einzelnen Gruppen wird erneut eine QTL-Analyse nach oben beschriebenem Vorgang durchgeführt, wobei die Freiheitsgrade angepasst werden müssen. Signifikante Maxima deuten auf Faktoren, die zu Akkumulationsvariationen innerhalb der Gruppe führen.

2.2.3.4. Mathematische Analyse der Lokus-Interaktionen

Die Mittelwerte der Akkumulationen von Stämmen mit bestimmten Lokus-Kombinationen (siehe Ergebnisse 3.4.) werden berechnet. Danach werden die p-Werte zwischen den Mittelwerten bestimmt und die Signifikanzunterschiede in Form von Sternchen wiedergegeben.
Dabei gilt:

ns	nicht signifikant
*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
***	$p < 0,001$

Besteht nun zwischen den Mittelwerten ein signifikanter Unterschied, wird untersucht, ob eine Korrelation zwischen den unterschiedlichen Allelen der Stämme und den analysierten Genorten besteht. So können mögliche Interaktionen durch einfache statistische Kalkulationen ermittelt werden.

2.2.3.5. Bioinformatische Analyse

Die chromosomalen Abschnitte, der in der QTL-Analyse gefundenen Loki, werden bioinformatisch untersucht, um mögliche Kandidatengene zu identifizieren.
Zunächst wird die genaue Position des Maximums ermittelt und die Markernamen mit der auf der NCBI erhältlichen Marker- und Genkarte verglichen (National Center for Biotechnology Information, 2008). Die Markernamen oder auch Mikrosatteliten sind hier unter der Rubrik STS („sequence tagged site“) wiederzufinden. Neben den Markern sind auch die Gene, die sich auf dem Chromosomenabschnitt befinden, aufgezeigt. Diese werden nun mit den Genen auf der Internetseite von PlasmoDB (PlasmoDB, 2008) verglichen und eine Abfolge der Gene zwischen den Markern erstellt. Die Informationen von NCBI und PlasmoDB fließen dabei zusammen.
Um ein mögliches Kandidatengen zu identifizieren, wird gezielt nach SNPs („single nucleotide polymorphisms“) oder Längenpolymorphismen zwischen der HB3- und Dd2-Sequenz gesucht. Dazu wird mit der Gensequenz von 3D7, die auf PlasmoDB erhältlich ist, auf der Internetseite des BroadMIT (BROAD, 2009) ein BLAST (BLASTn) gegen alle Sequenzen von HB3 und Dd2 durchgeführt, um die neuesten Sequenzen des Gens für HB3 und Dd2 zu erhalten. Außerdem wird auch die Proteinsequenz aufgezeigt. Mit einem direkten Vergleich beider Sequenzen in BioEdit (Version 7.0.9.0., 2007) kann man die SNPs und Längenpolymorphismen identifizieren.
Ebenfalls auf PlasmoDB erhältlich sind Informationen zur Anzahl der Transmembrandomänen (TMDs) im Protein und auch zu möglichen Funktionen des Proteins. Sind diese Informationen nicht ausreichend, wird mit der 3D7 Gensequenz ein Basic BLAST auf der Internetseite vom „Swiss Institute for Bioinformatics“ (EMBNet, 2008) durchgeführt, um eine mögliche Funktion des Proteins durch Sequenzvergleich mit allen in der Datenbank bekannten Sequenzen festzustellen.
Besonders von Interesse sind Gene mit Transmembrandomänen (TMDs), die möglicherweise auf einen Transporter, der an der Akkumulation beteiligt ist, hindeuten, da Polymorphismen in Transportern schon seit langem für die veränderte Chinolin-Sensitivität verantwortlich gemacht werden (Lakshmanan *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2008a; Sidhu *et al.*, 2002; Fidock *et al.*, 2000) und TMDs eine Vorraussetzung für Transportproteine sind (Busch *et al.*, 2002). Für die Bestimmung der TMDs werden zwei unterschiedliche Algorithmen angewendet. Eine Bestimmung basiert auf dem TMHMM-Modell (engl. „Transmembrane Domain Hidden Markov Model“), durchführbar auf dem TMHMM Server v. 2.0 (CBS, 2007), die andere

Vorhersage beruht auf verschiedenen Hydropathie-Indices z.B. von Kyte und Doolittle oder von Eisenberg (Kyte *et al.*, 1982; Eisenberg, 1984),die man auf der Seite von ExPASy durchführen lassen kann (ExPASy, 2009). Die Fenster Größe („window size“) wird auf 19 gesetzt.

2.2.3.6. Auffinden und Charakterisierung neuer Marker

Da der chromosomale Abschnitt eines Maximums sehr groß sein kann, besteht ein besonderes Interesse diesen Bereich zu minimieren, um möglichst wenig weitere Gene bei der Suche des Kandidatengens zu analysieren. Eine Möglichkeit besteht darin, den „Crossing-over“-Bereich weiter einzuschränken. Eine andere Möglichkeit ist, zwischen den Markern, die auf der genetischen Karte dieselbe Centimorgan-Position besitzen, ein Doppel-„Crossing-over“ in einem der F1-Nachkommen aufzufinden. In beiden Fällen sind Längenpolymorphismen zwischen HB3 und Dd2 besonders interessant, da sich diese Bereiche schnell mittels PCR amplifizieren und auf dem Agarosegel sichtbar machen lassen (siehe 2.2.2.2.).

Die bereits bekannten Marker des Maximum-Bereichs werden nach der genauen Reihenfolge geordnet und die jeweils angrenzenden Marker mit niedrigeren „LOD-Scores“ ebenfalls aufgelistet. Zwischen den Markern der beiden „Crossing-over“-Bereiche werden Längenpolymorphismen gesucht, um die genaue Lage des „Crossing-overs“ zu bestimmen und einzuengen. Auch werden Bereichen zwischen Markern derselben Position, die aber um einige Gene auseinanderliegen, untersucht, um mögliche und bisher unentdeckte „Crossing-over“-Ereignisse zu entdecken.

Die PCR-Amplifikate sollen ca. zwischen 150 und 500 bp Länge haben, wobei kleine Längenunterschiede in kurzen Amplifikaten besser gezeigt werden können.

Die Oligomere („Primer“) werden mit einer vorhergesagten „Annealing“-Temperatur von 56 – 62 °C entworfen. Dabei gilt die Formel:

$$T_{An}\ [°C] = (\text{Anzahl GC-Paare}) * 4 + (\text{Anzahl AT-Paare}) * 2$$

Die Amplifikate werden je nach Längenunterschied entweder auf ein 2 %iges Agarosegel oder auf ein hochauflösendes 3 %iges Biozym Phor Agarosegel (Biozym Scientific, Hess. Oldendorf) aufgetragen.

PCR-Reaktionsmix (50 µl)

EuroTaq Puffer (10 x)	5	µl
dNTPs (10 mM)	1	µl
Primer 1 (50 µM)	1	µl
Primer 2 (50 µM)	1	µl
$MgCl_2$ (50 mM)	2,5	µl
gDNA Templat	0,5	µl
DNA-Polymerase (1 U/µl)	0,5	µl
H_2O	38,5	µl

PCR-Programm

Denaturierung	94 °C	4	min	
Denaturierung	94 °C	45	s	35 Zyklen
Primer-“Annealing”	T_{An} siehe 2.1.4.3.	45	s	35 Zyklen
Elongation	68 °C	45	s	35 Zyklen
Elongation	68 °C	10	min	
	4 °C	∞		

3. Ergebnisse

3.1. Überprüfung der im Akkumulationsexperiment eingesetzten Stämme

Vor der eigentlichen Messung der Akkumulationen von Chloroquin und Chinidin im Parasiten, wurden die Parentalstämme HB3 und Dd2 und die 34 verwendeten F1-Nachkommen dieser Kreuzung (Wellems *et al.*, 1990; Kirkman *et al.*, 1996) auf ihren genetischen Hintergrund überprüft (siehe Abschnitt 2.2.2.2. und 2.2.2.3.). Ein ursprünglich 35ster zur Verfügung stehender F1-Nachkomme (C101) konnte für die Messungen nicht verwendet werden, da er seitens des MR4 nicht geliefert werden konnte.

HB3 und Dd2 unterscheiden sich durch viele hoch-polymorphe Regionen im Genom. Sehr einfach können Längenpolymorphismen mittels PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden, aber auch einzelne Nukleotidaustausche, sogenannte SNPs („single nucleotide polymorphisms“) wie z.B. K76T in PfCRT (Djimde *et al.*, 2001), können durch Sequenzierung oder durch Restriktionsanalysen, sofern sie eine Restriktionsschnittstelle enthalten, für die Charakterisierung eines Stammes herangezogen werden. Die haploiden Blutstadien der F1-Nachkommen der Kreuzung aus HB3 und Dd2 erben Genabschnitte immer nur von einem Elternteil, so dass sich alle Stämme durch Polymorphismenbestimmung eindeutig zuordnen lassen. Detaillierte Informationen von 901 Mikrosatellitenmarkern stehen auf der Homepage von NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2008) zur Verfügung. Eine Auswahl von acht verschieden Längenpolymorphismen wurde für die Validierung von Dr. J. Mu aus dem NIH vorgeschlagen, während die Detektion der K76T Mutation in PfCRT über eine verschachtelte PCR, wie zuvor beschrieben (Djimde *et al.*, 2001), erfolgte.

Die Segregationsdaten der verwendeten Mikrosatellitenmarker und die Aminosäure an Position 76 in PfCRT sind in Tabelle 3.1.1. für alle verwendeten Stämme zusammengestellt.

Durch den Vergleich der mittels PCR bzw. Restriktion erhaltenen Daten mit Tabelle 3.1.1. konnten alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme eindeutig zugeordnet werden.

Tabelle 3.1.1.: Segregationsdaten der für die Validierung verwendeten Mikrosatellitenmarker sowie der *pfcrt* Vererbung
D = Marker stammt von Dd2; H = Marker stammt von HB3; die Parentalstämme wurden in dunkelgrau hervorgehoben.

Marker	Dd2	HB3	B1SD	QC13	QC01	B4R3	SC05	TC08	GC03	3BA6	1BB5	3BD5	SC01	QC34	QC23	TC05	GC06	D43	C188
C1M4	D	H	D	D	D	H	H	H	D	H	D	D	H	D	D	H	D	D	H
C1M67	D	H	H	H	D	H	D	H	D	D	D	D	D	H	H	H	D	H	H
C4M62	D	H	D	D	H	H	H	H	D	H	D	D	D	D	H	D	D	D	D
C13M13	D	H	D	H	D	H	D	H	H	D	H	H	H	D	D	D	D	D	D
C13M63	D	H	D	H	D	H	H	H	H	D	H	H	H	D	D	D	D	D	D
C14M17	D	H	H	H	D	D	H	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	H
B5M124	D	H	D	D	D	H	H	H	H	D	H	H	H	H	D	H	H	H	D
B5M5	D	H	D	D	H	H	H	D	D	H	D	H	D	H	H	D	D	H	H
pfcrt	D	H	H	H	H	H	H	H	H	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H

Marker	Dd2	HB3	C408	116	61	7C3	7C7	7C12	7C16	7C20	7C46	7C111	7C126	7C140	7C159	7C170	7C183	7C421	7C424
C1M4	D	H	H	D	H	D	D	H	D	D	D	D	D	H	D	H	D	D	H
C1M67	D	H	D	H	D	D	H	D	H	H	H	D	H	H	D	H	H	H	H
C4M62	D	H	D	D	D	H	H	D	H	H	D	D	H	D	D	H	H	H	D
C13M13	D	H	D	D	D	D	D	D	H	H	H	H	H	D	D	D	H	H	H
C13M63	D	H	D	D	D	D	D	D	H	H	H	H	H	H	D	D	D	H	H
C14M17	D	H	H	D	D	H	D	D	H	D	D	H	H	D	D	D	D	D	H
B5M124	D	H	H	D	H	D	H	D	H	H	H	D	D	D	D	H	D	H	D
B5M5	D	H	D	D	D	H	H	D	D	H	H	D	D	H	D	H	H	H	D
pfcrt	D	H	D	H	H	H	H	D	H	H	D	D	H	H	H	H	D	D	D

3.2. Akkumulationsexperimente

3.2.1. Messung der Zeitreihe der Parentalstämme HB3 und Dd2

Zunächst wurden Chloroquin- und Chinidin-Akkumulationen in einer Zeitreihe für die beiden Elternstämme HB3 und Dd2 gemessen. Die Akkumulation (CQ_{in}/CQ_{out}) gibt dabei das Verhältnis der intrazellulären zur extrazellulären Chloroquinkonzentration an. Für Chinidin gilt das gleiche. Zu Beginn der Zeitkurve steigt die Akkumulation in der Anfangsphase linear an und endet dann nach einigen Minuten in der stationären Phase in einem Plateau (Abb. 3.2.1.). Dabei wird die stationäre Phase für Chloroquin früher erreicht als für Chinidin. Die Messung jedes Zeitpunktes in der Zeitreihe wurde mindestens fünfmal wiederholt und daraus der dargestellte Mittelwert und der eingezeichnete Standardfehler (SEM) berechnet. In der Zeitreihe wurden die optimalen Zeitpunkte für spätere Messungen der F1-Nachkommen ermittelt, da für diese nicht alle Zeitpunkte gemessen werden sollten. So wurden für die nachfolgenden Akkumulationsmessungen der F1-Nachkommen je ein Zeitpunkt in der Anfangsphase und ein Zeitpunkt in der frühen stationären Phase festgelegt. Im Nachfolgenden wurde die Chloroquin-Akkumulation bei 4 min (Anfangsphase) und 15 min (stationäre Phase) und die Chinidin-Akkumulation bei 5 min (Anfangsphase) und 25 min (stationäre Phase) gemessen (Abschnitt 3.2.2.). Die Zeitpunkte wurden mit Ellipsen in den Graphen gekennzeichnet.

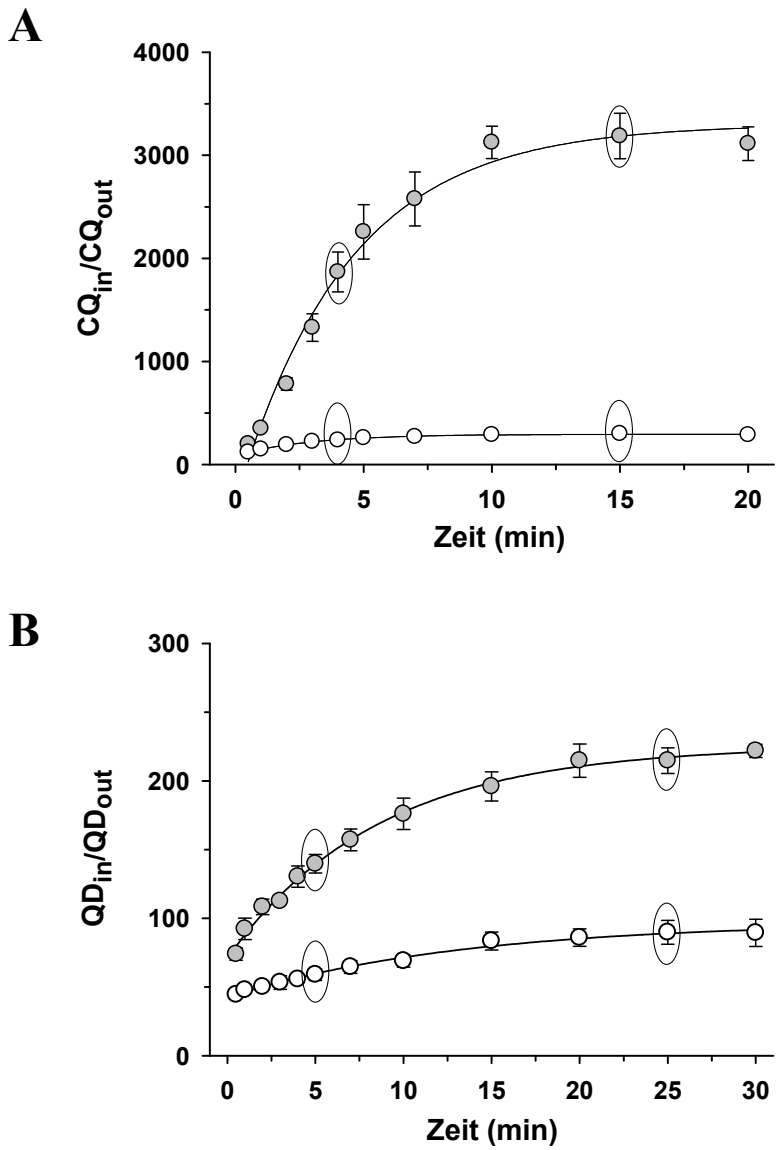

Abb. 3.2.1.: Zeitkurven der Medikamentenakkumulation von Chloroquin und Chinidin
Chloroquin-Akkumulation über einen Zeitraum von 20 min (A), Chinidin-Akkumulation über einen Zeitraum von 30 min (B). Die eingezeichneten Ellipsen weisen auf die Akkumulations-Zeitpunkte der F1-Nachkommen hin. (●HB3;○Dd2)

3.2.2. Messung der Akkumulation in den F1-Nachkommen

Nach den Messungen der Zeitreihen für die Chloroquin- und Chinidin-Akkumulationen erfolgte die Bestimmung der Aufnahme dieser Antimalariamedikamente in ihren 34 F1-Nachkommen, einmal in der Anfangsphase und einmal in der frühen stationären Phase der Akkumulation. Die Akkumulationen von [^{3}H]-Chloroquin sind in Abb. 3.2.2. und von [^{3}H]-Chinidin in Abb. 3.2.3. dargestellt. Es wurden mindestens acht Messungen pro Zeitpunkt durchgeführt und daraus der Mittelwert und der Standardfehler berechnet.

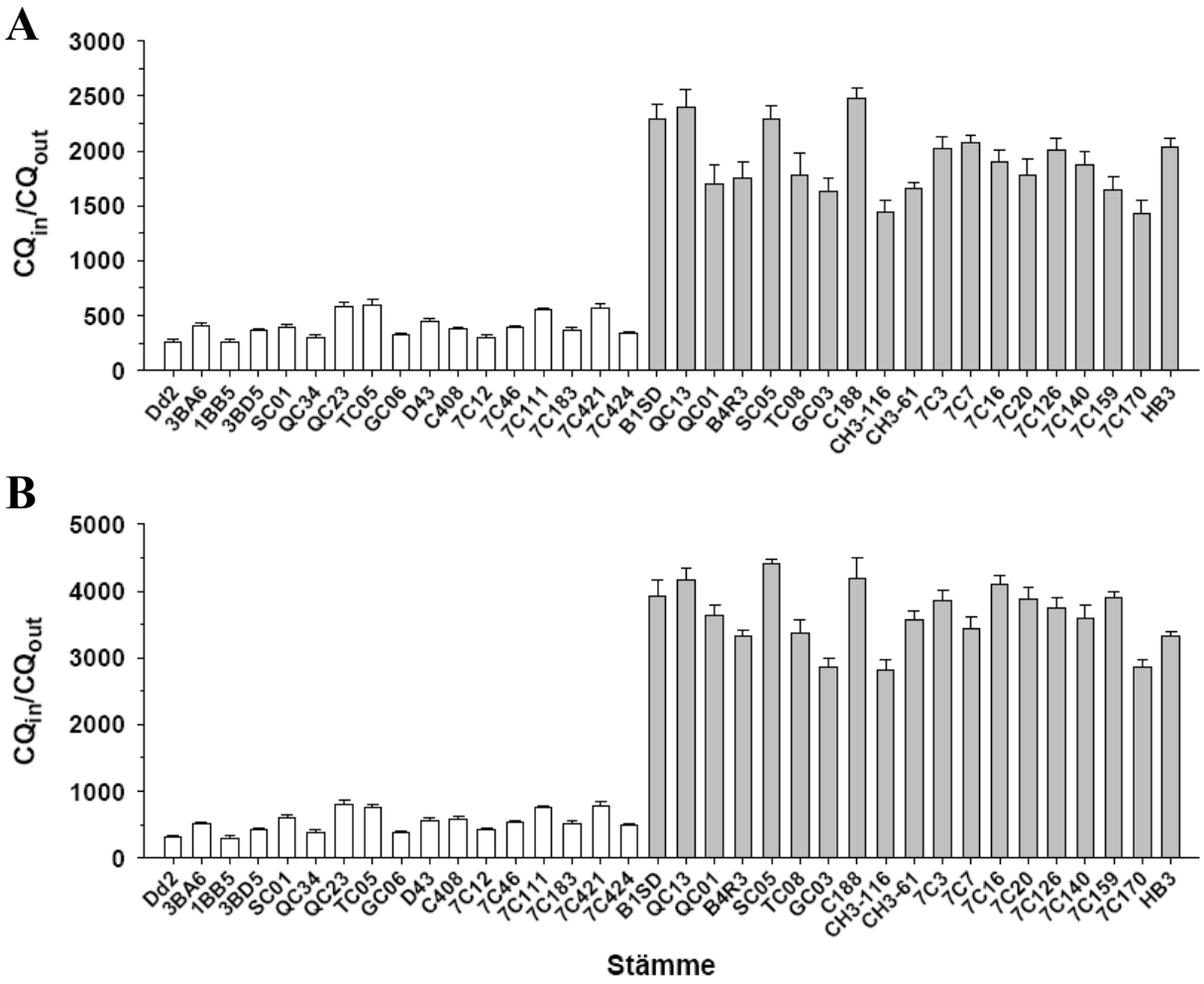

Abb. 3.2.2.: Akkumulation von Chloroquin in den F1-Nachkommen und den Parentalstämmen
Akkumulation von [^{3}H]-Chloroquin zu den Zeitpunkten 4 min (A) und 15 min (B) nach Beginn des Experimentes. Die Stämme, die das *pfcrt*-Allel von Dd2 haben, sind weiß, die Stämme mit HB3 *pfcrt*-Allel sind grau. Die Mittelwerte ± SEM von mindestens acht unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

Ein Vergleich beider Zeitpunkte (Abb. 3.2.2.A mit B und Abb. 3.2.3.A mit B) zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Akkumulationswerten eines Stamms, trotzdem wurden im Nachfolgenden für beide Zeitpunkte die „Primary Scans“ der QTL-Analyse zum Vergleich durchgeführt.

Die Abb. 3.2.2. zeigt, dass die 17 CQR-Stämme (Balken in weiß) sehr wenig Chloroquin akkumulierten (400 ± 27 fach), während die 19 CQS-Stämme mit Wildtyp *pfcrt* etwa fünfmal soviel Chloroquin aufnahmen (1904 ± 70 fach) und somit ein klarer Unterschied beider Gruppen ersichtlich war. Hier lag eine bimodale Verteilung der F1-Nachkommen der genetischen Kreuzung aus HB3 mit Dd2 vor, was auf die Mendelsche Segregationsregel und demzufolge auf einen Haupteffekt eines einzelnen Gens deutete (Sen *et al.*, 2004). Diese Beobachtung stimmte mit der schon früher gefundenen Erkenntnis überein, dass *pfcrt* der

Hauptfaktor für die Ausbildung der Chloroquin-Resistenz (Ferdig *et al.*, 2004) und für die Akkumulation ist (Fidock *et al.*, 2000; Lakshmanan *et al.*, 2005; Sidhu *et al.*, 2002).

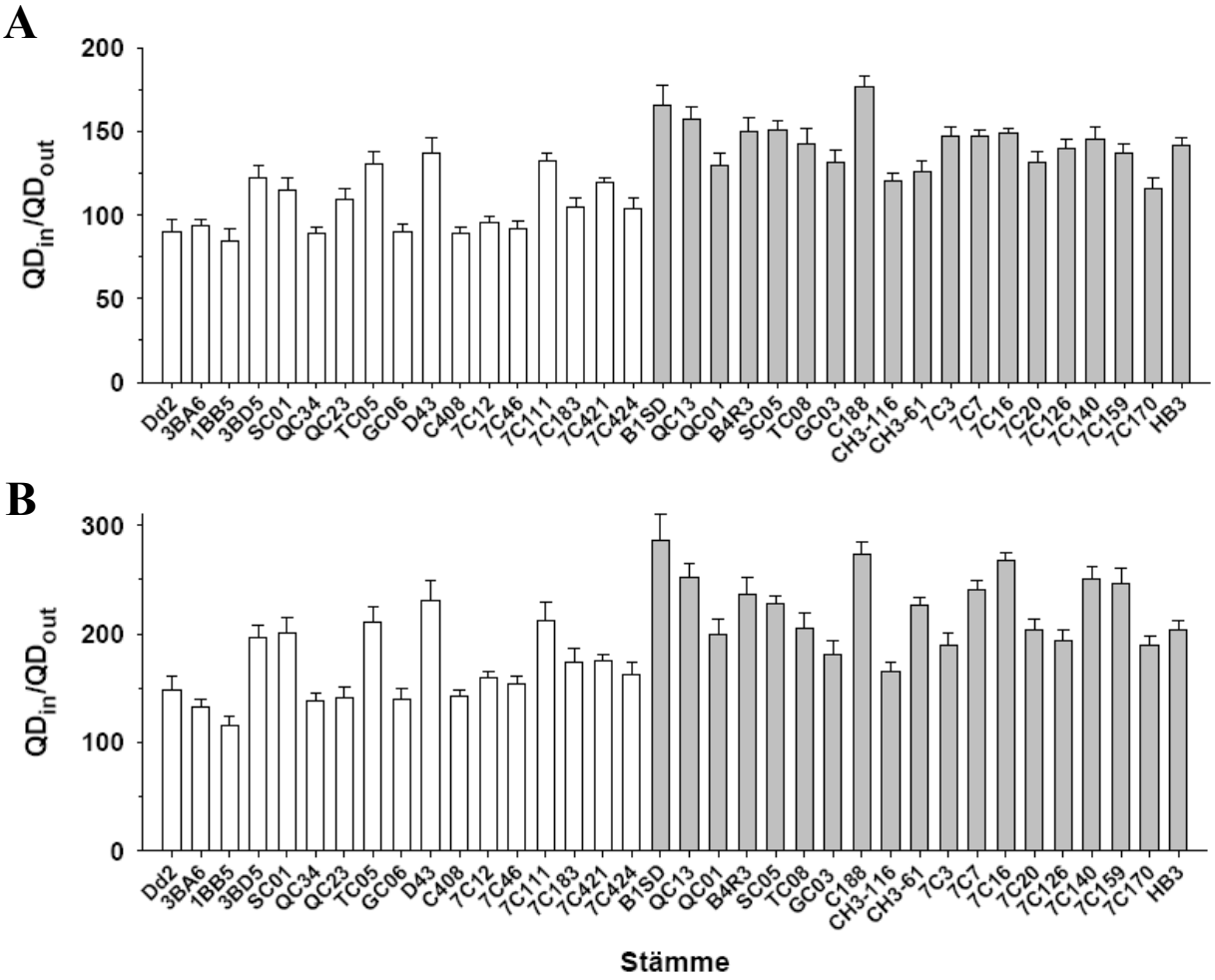

Abb. 3.2.3.: Akkumulation von Chinidin in den F1-Nachkommen und den Parentalstämmen
Akkumulation von [^{3}H]-Chinidin zu den Zeitpunkten 5 min (A) und 25 min (B) nach Beginn des Experimentes. Die Stämme, die *pfcrt* von Dd2 haben, sind weiß, die Stämme deren *pfcrt* von HB3 ist, sind grau. Die Mittelwerte ± SEM von mindestens acht unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

Die Chinidin-Akkumulation in Abb. 3.2.3. konnte hingegen keine solch klare Gruppierung der CQR bzw. der CQS-Stämme aufweisen (106 ± 6 und 143 ± 6 fach). Während HB3 142 ± 4 fach Chinidin aufnahm, akkumulierte D43, ein CQR-Stamm, eine vergleichbare Menge (137 ± 9 fach). Auch akkumulierten einige CQS-Stämme (7C170: 116 ± 6; CH3-116: 120 ± 5 und CH3-61: 126 ± 7 fach) weniger Chinidin als CQR-Stämme mit dem mutierten *pfcrt*-Allel von Dd2 (D43: 137 ± 9; 7C111: 132 ± 5 und TC05: 130 ± 7 fach). Hier wurde, statt einer klaren Gruppierung, ein fließender Übergang ersichtlich, denn in beiden Gruppen gab es intermediäre Phänotypen zu beobachten. Solch ein komplexer, unimodaler Phänotyp kann nur mit der Beteiligung mehrerer Gene erklärt werden (Sen *et al.*, 2004).

Ein direkter Vergleich zwischen der Chloroquin- und der Chinidin-Akkumulation wird in Abb. 3.2.4. gezeigt. Hier wurde die Chloroquin- (y-Achse) gegen die Chinidin-Akkumulation (x-Achse) aufgetragen. Entlang der y-Achse, also der Chloroquin-Akkumulation, sind zwei getrennte Gruppen ersichtlich, während der Verlauf der Akkumulationen entlang der x-Achse eine kontinuierlich verteilte Chinidin-Aufnahme deutlich macht.

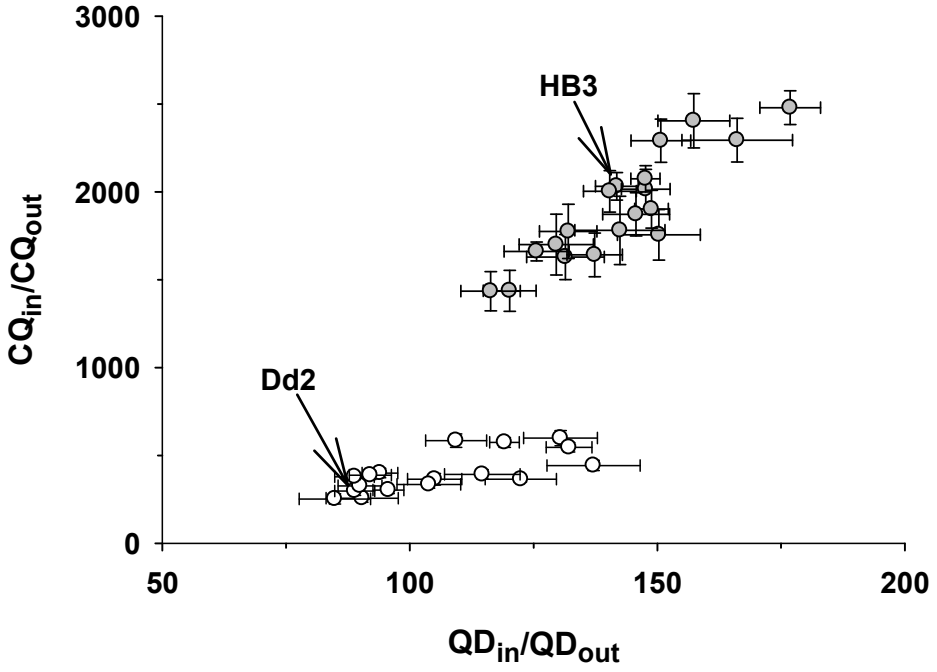

Abb. 3.2.4.: Vergleich der Chloroquin- und der Chinidin-Akkumulation
Entlang der Chloroquin-Achse befinden sich zwei Gruppen, die in CQR und CQS aufgeteilt werden können und entweder das Wildtyp- oder das mutierte *pfcrt*-Allel enthalten. Entlang der Chinidin-Achse hingegen sind die F1-Nachkommen kontinuierlich über die Achse verteilt, was auf mehrere Faktoren, die die Chinidin-Akkumulation beeinflussen, schließen lässt. Die beiden Parentalstämme HB3 und Dd2 sind gekennzeichnet.
(● Stämme mit *pfcrt* von HB3; ○ Stämme mit *pfcrt* von Dd2)

Ein statistischer Vergleich der Mittelwerte beider Gruppen (CQR mit CQS) für die Chloroquin-Akkumulation ergab einen extrem signifikanten Unterschied mit $p < 1*10^{-10}$, aber auch für die Chinidin-Akkumulation waren beide Gruppen höchst unterschiedlich ($p = 7{,}6*10^{-8}$). Aus diesem Grund scheint die Chinidin-Akkumulation ebenfalls größtenteils von *pfcrt* bestimmt zu werden, allerdings spielen hier auch andere Faktoren eine Rolle.
Die einzelnen Akkumulationswerte sind im Anhang in Tabelle 7.1. aufgelistet.
Die Regression zwischen den Chinin-Akkumulationswerten von Nurhasanah und den Chinidin-Akkumulationen zeigt einen linearen Zusammenhang beider Medikamentenakkumulationen (Abb. 3.2.5.) und ergab einen Korrelationskoefizienten $r = 0{,}98$ mit $r^2 = 0{,}95$. Dabei besteht bei einem Wert $r = 1$ ein vollständig positiver Zusammenhang zwischen beiden betrachteten Gruppen. Bei einem Korrelationskoeffizienten

r = 0 besteht kein Zusammenhang. Da in Abb. 3.2.5. die Werte nahezu auf einer Graden liegen und der angegebene Korrelationskoeffiziet r = 0,98 also nahezu r = 1 ist, hängen Chinin- und Chinidin-Akkumulation direkt positiv voneinander ab. Chinidin ist ein Diasteromer von Chinin, weshalb diese Korrelation zu erwarten war.

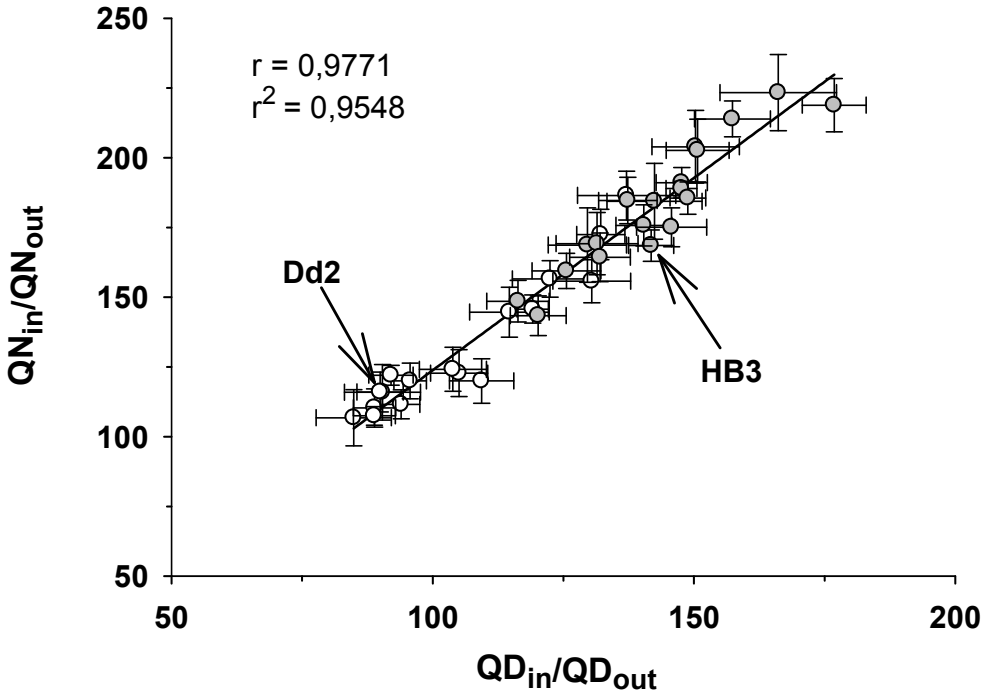

Abb. 3.2.5.: Regression zwischen Chinidin- und Chinin-Akkumulation (Nurhasanah, 2009)
Auf der y-Achse sind die Werte der Chinin- und auf der x-Achse die Werte der Chinidin-Akkumulation eingetragen. Alle Werte liegen nahezu auf einer Graden mit einem Korrelationskoeffizienten r = 0,98 und r^2 = 0,95. Es besteht somit ein direkter positiver Zusammenhang zwischen beiden Medikamentenakkumulationen. (● Stämme mit *pfcrt* von HB3; ○ Stämme mit *pfcrt* von Dd2)

3.3. QTL-Analyse

Im Anschluss an die Akkumulationsexperimente erfolgte die „Quantitative Trait Loci"-Analyse (QTL-Analyse). Mit dieser Methode sollten diejenigen chromosomalen Abschnitte aufgezeigt werden, die maßgeblich an der Akkumulation beteiligt sind.

Schon 2004 konnten Ferdig *et al.* zeigen, dass *pfcrt* der Hauptfaktor bei der Ausbildung der Chloroquin-Resistenz ist. Ausgangswerte für die Analyse waren IC_{90}-Daten der genetischen Kreuzung von HB3 und Dd2 und ihren 35 F1-Nachkommen. In der gleichen Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass an der Chinin-Resistenz (ein Stereoisomer von Chinidin) zwar auch *pfcrt* beteiligt ist, allerdings spielen hier noch weitere Faktoren auf Chromosom 13 und 5 eine Rolle. Darüber hinaus wurden paarweise Effekte von Chromosom 9 und 6 mit Chromosom 13 und 7 aufgedeckt (Ferdig *et al.*, 2004).

3.3.1. „Primary Scans“

Zunächst wurde eine auf Regression basierende QTL-Analyse, die bereits 1992 von Haley und Knott beschrieben wurde (Haley *et al.*, 1992), mit allen 34 F1-Nachkommen und den beiden Parentalstämmen durchgeführt. Bei diesem sogenannten „Primary Scan“ sollten die Hauptfaktoren der Medikamentenakkumulation aufgespürt werden.

Der „LOD-Score“ („logarithm of the odds”) steht hierbei mit einem QTL in Zusammenhang, d.h., ob der Phänotyp mit einem bestimmten Chromosomenabschnitt assoziiert ist.

Das Vorzeichen des in der QTL-Analyse errechneten Pearson-Regressionskoeffizienten r für jeden einzelnen Marker gibt Aufschluss über den Beitrag des Markers zur Akkumulation. Ist das Vorzeichen negativ, besteht eine negative Korrelation zur Akkumulation, ist das Vorzeichen positiv, trägt der Marker positiv zur Akkumulation bei.

Die Signifikanzgrenze $p < 0{,}01$ hat bei allen QTL-Analysen einen „LOD-Score“ von zwei. Alle Maxima, die einen „LOD-Score“ von ≥ 2 haben, sind demnach signifikant und hatten einen Einfluss auf die Akkumulation. Die Maximum-Spitze kann von einem bis elf Markern definiert werden, die alle die gleiche Centimorgan (cM) Position besitzen, weshalb immer der in der Mitte stehende Marker als Name verwendet wurde (siehe auch Abschnitt 2.2.3.3.).

Die Analyse der Chloroquin-Akkumulationsdaten (Abb. 3.3.1.) sollte als interne Kontrolle dienen, da schon zuvor in einer QTL-Analyse *pfcrt* als einziger Faktor der Chloroquin-Resistenz identifiziert wurde (Ferdig *et al.*, 2004; Bray *et al.*, 2005). Es wurde auch gezeigt, dass diejenigen Stämme mit mutiertem *pfcrt*-Allel an der Aminosäureposition 76 resistent gegen Chloroquin waren, aber Stämme mit Wildtyp *pfcrt*-Allel sensitiv auf Chloroquin reagierten (Cooper *et al.*, 2007; Sidhu *et al.*, 2002; Fidock *et al.*, 2000; Lakshmanan *et al.*, 2005).

Wie zu erwarten, ist ein hoher „LOD-Score“ auf Chromosom 7 an der Position von *pfcrt* sowohl für die vierminütige (Abb. 3.3.1.A) als auch für die 15minütige (Abb. 3.3.1.B) Akkumulation (4 min: LOD = 19,08; 15 min: LOD = 23,53) aufgetreten. Die Pearson-Regressionskoeffizienten beider Maxima auf *pfcrt* zeigen ein negatives Vorzeichen, was bedeutet, dass *pfcrt* negativ zur Akkumulation beiträgt und damit die Akkumulation vermindert. Diese Beobachtung ist im Einklang mit den vorherigen Aussagen, in denen *pfcrt* mit der Chloroquin-Resistenz assoziierten wurde, indem dieses als aktiver Chloroquin-„Efflux-Carrier“ fungiert (Fidock *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Naude *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2007a).

Wie erwartet, sehen beide „LOD-Score“-Graphen gleich aus, da sich schon die Akkumulationsdaten nicht voneinander unterschieden. Im Folgenden wurden aus diesem Grund nur die Daten der vierminütigen Akkumulation analysiert.

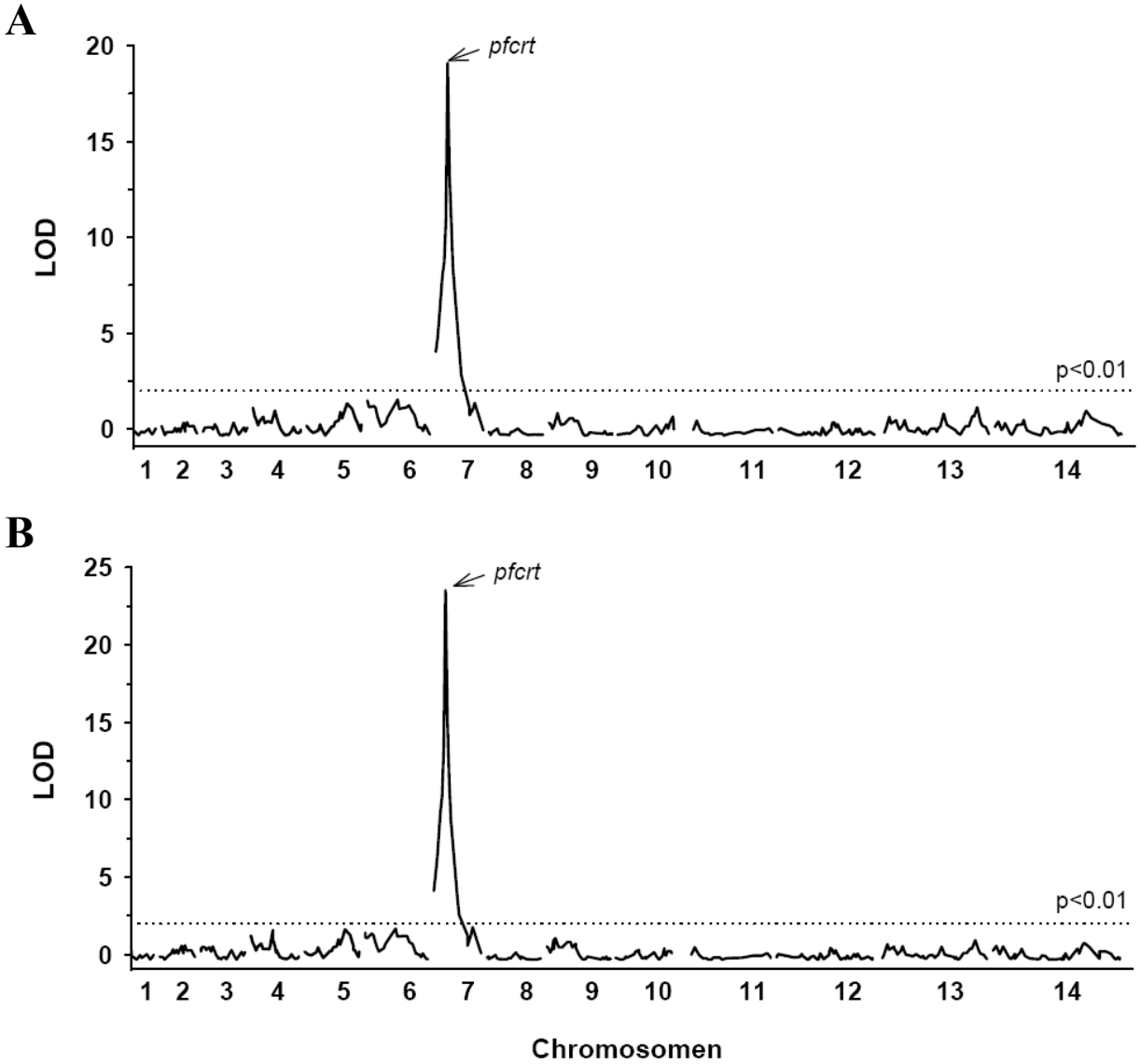

Abb. 3.3.1.: „Primary Scans“ der QTL-Analysen der Chloroquin-Akkumulation
Die anfängliche (4 min) Chloroquin-Akkumulation (A) weist ebenso wie die Akkumulation in der frühen stationären Phase nach 15 min (B) nur ein signifikantes Maximum in der QTL-Analyse auf, in dem *pfcrt* lokalisiert ist. Die gepunktete Linie gibt die Signifikanzgrenze $p < 0{,}01$ an.

Die „LOD-Score“-Graphen der Chinidin-Akkumulation in Abb. 3.3.2. weisen, wie zuvor angenommen, mehrere Maxima auf, was auf mehrere, an der Chinidin-Akkumulation beteiligte Faktoren hinweist. So tritt, wie erwartet, *pfcrt* als Hauptfaktor mit einem „LOD-Score“ von 7,06 (5 min) bzw. 4,75 (25 min) auf. Sanchez *et al.* hatten bereits gezeigt, dass *pfcrt* maßgeblich an der Chinin-Akkumulation beteiligt ist (Sanchez *et al.*, 2008b), was durch eine QTL-Analyse der Chinin-Akkumulation der Kreuzung von HB3 mit Dd2 ebenfalls bestätigt wurde (Nurhasanah, 2009). Auch bei Chinin IC_{90}-Werten wurde in einer QTL-

Analyse *pfcrt* als einer der bestimmenden Faktoren herausgedeutet (Ferdig *et al.*, 2004; Nurhasanah, 2009).

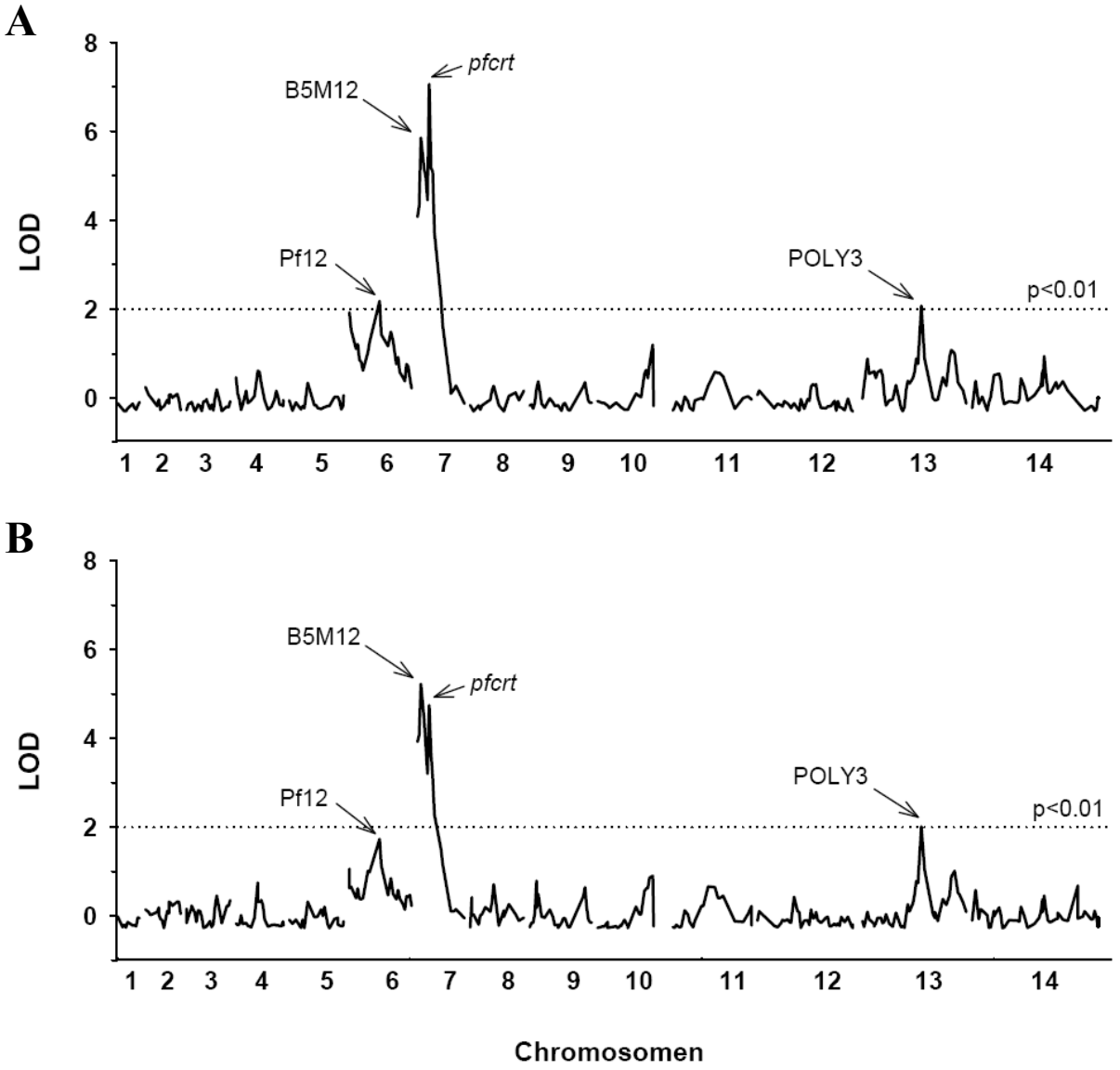

Abb. 3.3.2.: „Primary Scans" der QTL-Analysen der Chinidin-Akkumulation
Im „LOD-Score"-Graph der anfänglichen (5 min) Chinidin-Akkumulation (A) treten insgesamt vier Maxima auf, während in der frühen stationären Phase nach 25 min (B) nur drei Maxima die Signifikanzgrenze von $p < 0{,}01$ erreichen. Ein Doppelmaximum liegt auf Chromosom 7, das rechte Maximum stimmt mit *pfcrt* überein, während das linke, unbekannte Maximum mit B5M12 bezeichnet wurde (Nurhasanah, 2009). Ein auf Chromosom 6 in der Anfangsphase auftretender Lokus (Pf12) erreicht die Signifikanzgrenze in der stationären Phase nicht mehr, während ein weiteres Maximum auf Chromosom 13 (POLY3) in beiden Graphen signifikant ist. Die gepunktete Linie gibt die Signifikanzgrenze $p < 0{,}01$ an.

In Abbildung 3.3.2. ist zu erkennen, dass beide Graphen abermals sehr ähnlich sind. Das Maximum auf Chromosom 6, das in der QTL-Analyse der anfänglichen Chinidin-Akkumulation zwar noch die Signifikanzgrenze überschritten hat (LOD = 2,18), ist in der stationäre Phase der Akkumulation nicht mehr signifikant (LOD = 1,73). Dieser Unterschied

und die Differenzen in der Höhe der „LOD-Scores“ können jedoch mit Schwankungen während der Akkumulationsexperimente erklärt werden. Möglicherweise waren Transportprozesse schon gesättigt oder die Parasiten können nach längerer Zeit ohne optimale Bedingungen Einbußen in der Lebensfähigkeit erlitten haben. Auch im Falle der Chinidin-Analyse wurde nur mit den Ergebnissen der Messungen der Anfangsphase fortgefahren.
Neben *pfcrt* auf Chromosom 7 erscheint ein separater Lokus, der auch schon in der Chinin QTL-Analyse von Nurhasanah aufgetreten war (Nurhasanah, 2009). Dies ist nicht verwunderlich, da es sich bei Chinin um ein Stereoisomer von Chinidin handelt. Dieser zuvor unbekannte Lokus wurde von Nurhasanah als B5M12 bezeichnet (Nurhasanah, 2009). Er hat in der Chinidin QTL-Analyse einen „LOD-Score“ von 5,86. *Pfcrt* hat, wie auch in der Chloroquin QTL-Analyse, einen negativen Regressionskoeffizienten, aber auch B5M12 trägt negativ zur Akkumulation bei. B5M12 und *pfcrt* sind durch sieben Marker voneinander getrennt.
Zwei weitere, die Signifikanzgrenze $p < 0{,}01$ streifende Maxima, befinden sich auf Chromosom 6 (Pf12, LOD = 2,18) und auf Chromosom 13 (POLY3, LOD = 2,07). Da der „LOD-Score“ logarithmisch ist, tragen diese beiden Maxima wohl nur zu einem sehr geringen Teil zur Akkumulation bei.

3.3.2. „Secondary Scans“

Mit dem „Secondary Scan“ sollten Faktoren aufgezeigt werden, die zu einem geringeren Maß an der Akkumulation beteiligt sind. Die 36 Stämme wurden hierzu in zwei Gruppen eingeteilt. Die QTL-Analysen wurden nur mit den Akkumulationsdaten einer Gruppe durchgeführt. Hier sollten Faktoren aufgedeckt werden, die für Schwankungen innerhalb der Gruppe sorgen. Zum einen wurde der Effekt von *pfcrt* in der Chloroquin- und der Chinidin-Analyse entfernt, zum anderen wurde der Effekt von B5M12 aus der Chinidin-Analyse entnommen, da dieses Maximum nicht im „Primary Scan“ der Chloroquin QTL-Analyse aufgetreten ist. Für den „Secondary Scan“ ohne *pfcrt* wurden die 19 Vertreter der CQS-Stämme, die das *pfcrt*-Allel von HB3 haben, in eine Gruppe geordnet und die 17 Vertreter der CQR-Stämme, die das *pfcrt*-Allel von Dd2 enthalten, in einer weiteren Gruppe zusammengeführt. Hierzu mussten einige Marker, die mit *pfcrt* segregieren, von der QTL-Analyse eliminiert werden, um den Haupteffekt von *pfcrt* zu entfernen. Der „Secondary Scan“ ohne den Effekt von B5M12 hat eine Gruppe mit 20 Vertretern mit HB3 Hintergrund, die andere Gruppe enthält 16 Vertreter mit B5M12 von Dd2. Auch hier mussten die Marker, die mit B5M12 segregieren, von der

QTL-Analyse entfernt werden, so dass die Kurven an diesen Stellen in den „LOD-Score“-Graphen unterbrochen sind.

Der „Secondary Scan“ der Chloroquin-Akkumulation nach der Elimination von *pfcrt* zeigt kein Maximum im Fall der Gruppe mit mutiertem *pfcrt*-Allel (Abb. 3.3.3.A), allerdings ist ein signifikantes Maximum auf Chromosom 14 unter den 19 Stämmen mit Wildtyp *pfcrt*-Allel aufgetreten (Abb. 3.3.3.B). Dieser, als TPI bezeichnete Lokus, hat einen „LOD-Score“ von 3,35 und wird mit einer Reduktion der Chloroquin-Akkumulation assoziiert.

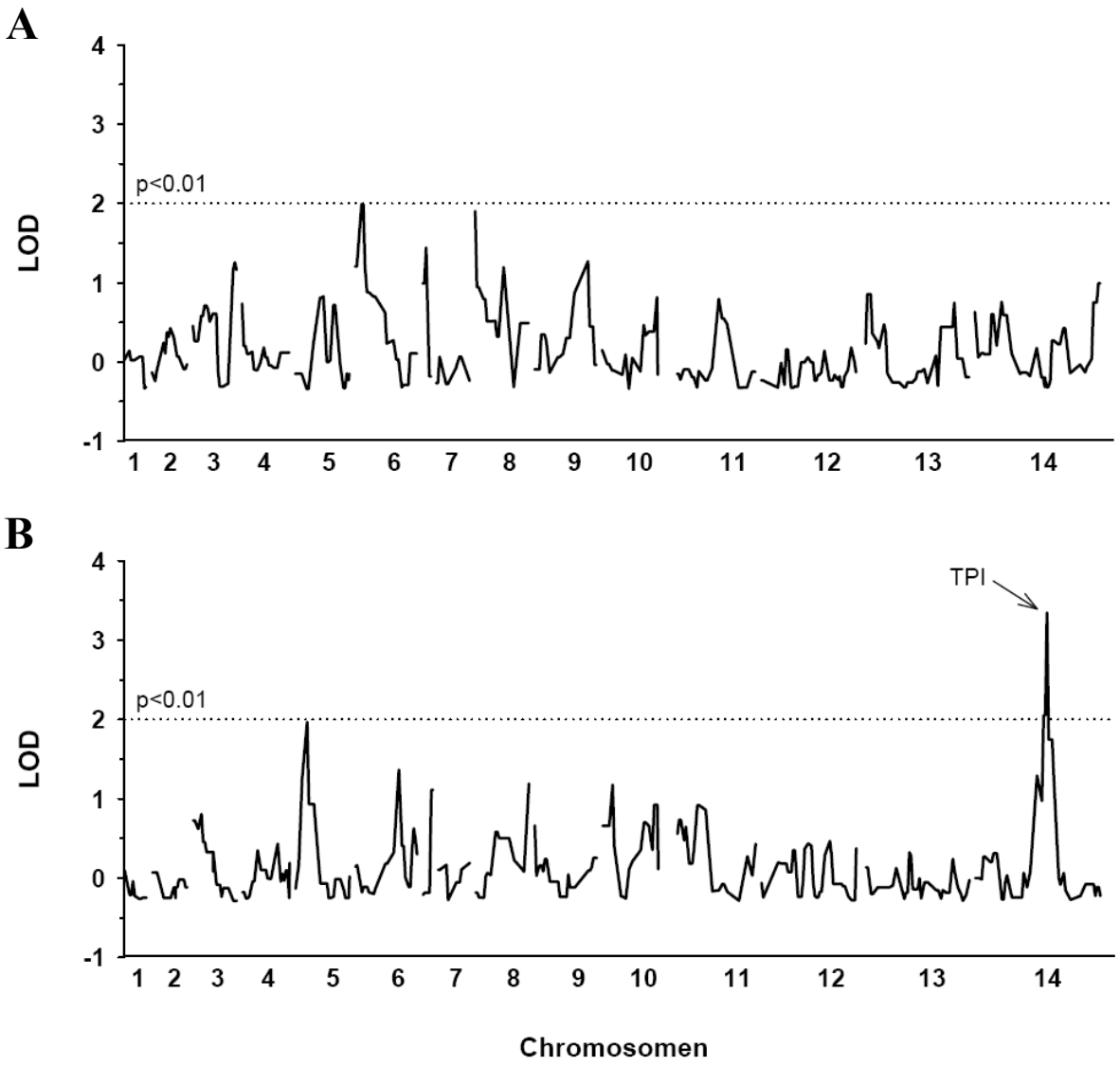

Abb. 3.3.3.: „Secondary Scan“ der Chloroquin-Akkumulation ohne *pfcrt*
Im „LOD-Score“-Graph der 17 CQR-Stämme (A) erreicht kein Maximum die Signifikanzgrenze, hingegen befindet sich im Graph der 19 CQS-Stämme (B) ein Maximum (TPI) auf Chromosom 14, das mit einem „LOD-Score“ von 3,35 deutlich die Signifikanzgrenze überschreitet. Die gepunktete Linie gibt die Signifikanzgrenze $p < 0{,}01$ an.

In der QTL-Analyse des „Secondary Scans“ von Chinidin tritt B5M12 als Hauptmaximum mit negativer Korrelation und einem „LOD-Score“ von 3,28 auf. Dies deutet auf eine

Verminderung der Akkumulation durch diesen Lokus in den Stämmen mit *pfcrt*-Allel von Dd2 hin (Abb. 3.3.4.A). Darüberhinaus treten zwei weitere signifikante Maxima auf den Chromosomen 5 und 13 auf. Das Maximum auf Chromosom 5, in dem der „Multidrug" Transporter *pfmdr1* (hier als MDR1 bezeichnet) liegt, konnte mit einer gesteigerten Chinidin-Akkumulation in Verbindung gebracht werden und hat einen „LOD-Score" von 2,71. *Pfmdr1* ist ortholog zu P-Glykoproteinen der Säugetiere. Änderungen in der Amplifikation und Polymorphismen in *pfmdr1* werden mit einer verminderten *in vitro* Suszeptibilität gegenüber Chinin und anderen Antimalariamittel in Verbindung gebracht (Wilson *et al.*, 1993; Cowman *et al.*, 1994; Duraisingh *et al.*, 2000; Reed *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2004; Sidhu *et al.*, 2005).

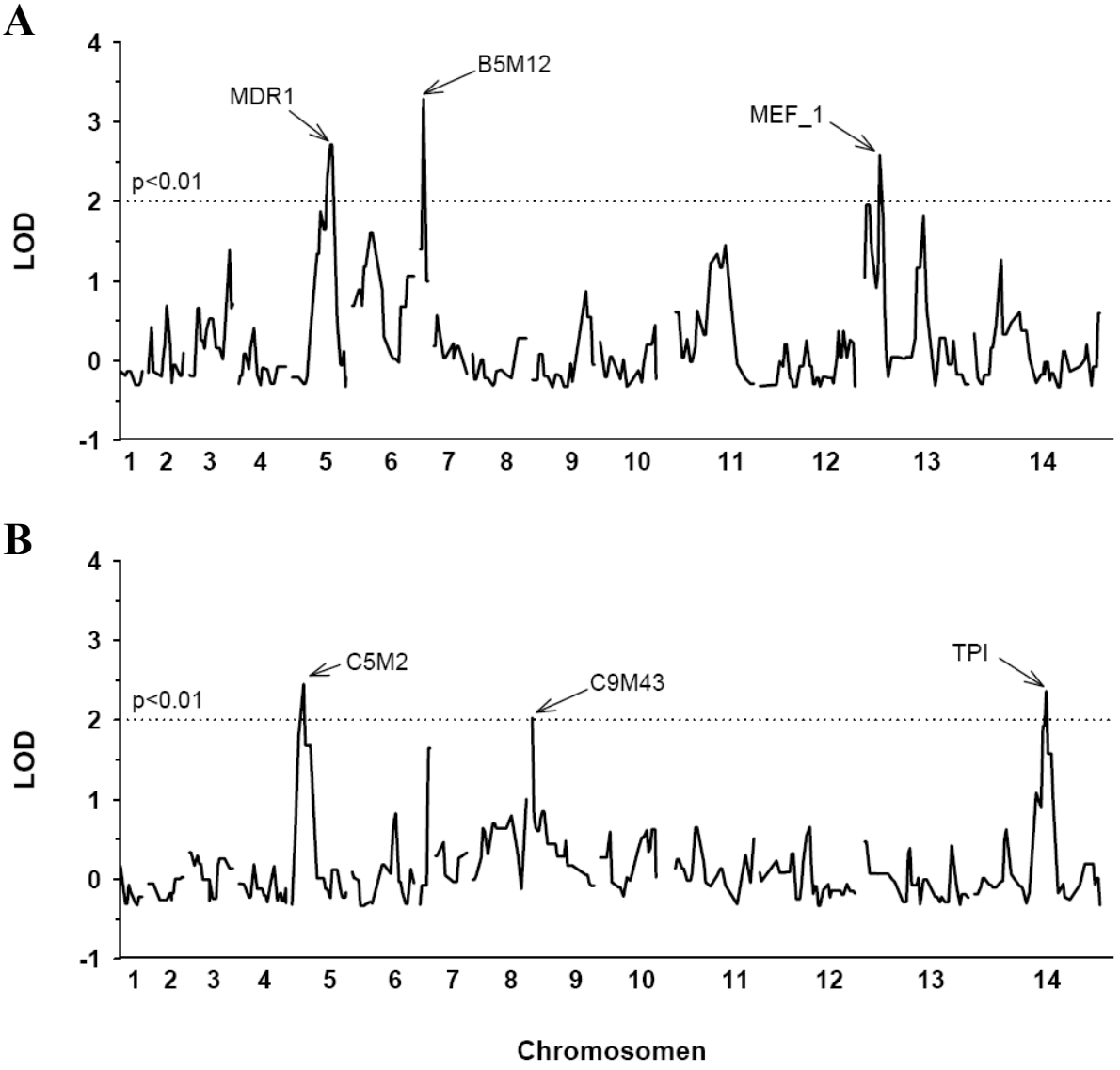

Abb. 3.3.4.: „Secondary Scan" der Chinidin-Akkumulation ohne *pfcrt*
Im „LOD-Score"-Graph der 17 CQR-Stämme (A) erreichen drei Maxima die Signifikanzgrenze (MDR1, B5M12 und MEF_1), ebenso sind im Graph der 19 CQS-Stämme (B) drei Maxima (C5M2, C9M43 und TPI) zu verzeichnen, die die Signifikanzgrenze erreichen. Die gepunktete Linie gibt die Signifikanzgrenze $p < 0{,}01$ an.

Das Maximum auf Chromosom 13 tritt an der Stelle des Markers MEF_1 mit einem „LOD-Score“ von 2,58 und einem negativen Pearson-Regressionskoeffizienten auf. Dieses Maximum liegt nicht in der Nähe vom Natrium-Protonenaustauscher (*pfnhe*), der mit der Chinin-Resistenz in Verbindung gebracht wird (Bennett *et al.*, 2007; Ferdig *et al.*, 2004). Vielmehr befinden sich beide Orte an entgegengesetzten Enden des Chromosoms (32,6 cM (MEF_1) und 173,1 cM (*pfnhe*)).

Im „Secondary Scan“ der CQS-Stämme (Abb. 3.3.4.B) gibt es zwei Hauptmaxima. C5M2 auf Chromosom 5 mit einem „LOD-Score“ von 2,45 konnte positiv, also zu einer erhöhten Chinidin-Akkumulation, beitragen, während TPI auf Chromosom 14, wie auch schon im „Secondary Scan“ der Chloroquin-Akkumulation (Abb. 3.3.3.B) beobachtet, zu einer verminderten Akkumulation beiträgt (LOD = 2,36). Ferner besteht noch ein weiteres Maximum auf Chromosom 9, C9M43, das nur knapp die Signifikanzgrenze erreichte und nur zu einem geringen Maß mit einer gesteigerten Chinidin-Akkumulation assoziiert werden kann.

Ein Secondery Scan mit eliminiertem B5M12 auf Chromosom 7 zeigt *pfcrt* als Hauptlokus in der Gruppe der Stämme mit B5M12 von Dd2 (Abb. 3.3.5.A). *Pfcrt* ersetzt hierbei das B5M12 Maximum im „Secondary Scan“ der CQR-Stämme und trägt zu einer Verminderung der Chinidin-Akkumulation bei. Ein zweites Maximum (Pf12) auf Chromosom 6 tritt ebenfalls in der Gruppe der Dd2 segregierenden Stämme auf. Dieser Lokus war auch schon im „Primary Scan“ vorhanden und konnte negativ mit der Chinidin-Akkumulation assoziiert werden.

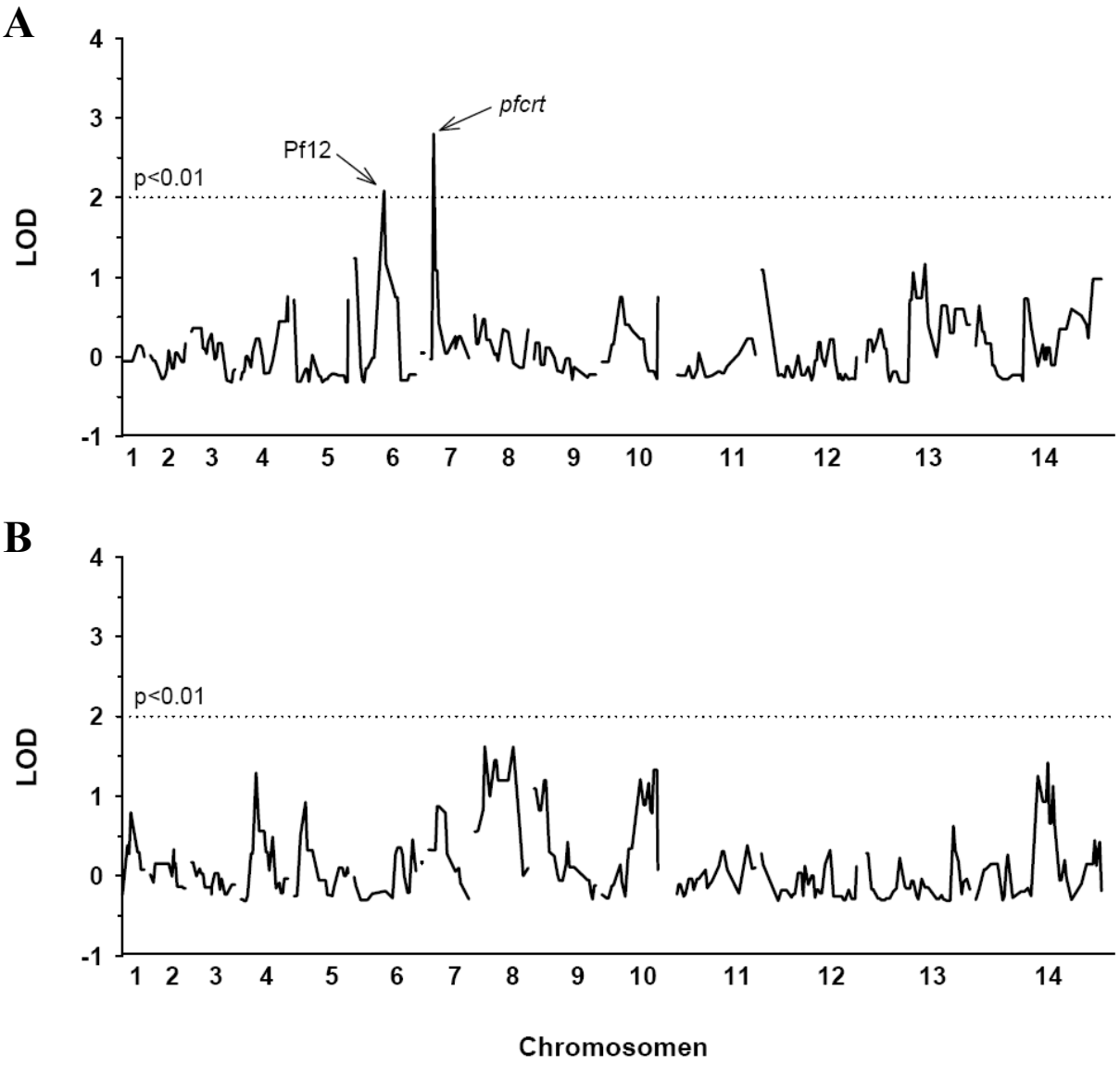

Abb. 3.3.5.: „Secondary Scan“ der Chinidin-Akkumulation ohne B5M12
Die QTL-Analyse der 16 Vertreter mit mutiertem B5M12 (A) ergibt zwei Maxima (Pf12 und *pfcrt*), während die QTL-Analyse der 20 Stämme mit Wildtyp B5M12 (B) kein Maximum aufweist. Die gepunktete Linie gibt die Signifikanzgrenze $p < 0{,}01$ an.

Sowohl im „Secondary Scan“ der Gruppe mit dem Wildtyp *pfcrt*-Allel sowie der Gruppe mit Wildtyp B5M12 treten an den Stellen von B5M12 und von *pfcrt* keine Maxima auf. Daraus kann geschlossen werden, dass mutiertes B5M12 die Chinidin-Akkumulation nur reduziert, wenn auch *pfcrt* mutiert ist.

Alle Maxima der Chinidin-Akkumulation wurden in den nachstehenden Tabellen 3.3.1., 3.3.2. sowie in 3.3.3. zusammen mit den Pearson-Regressionskoeffizienten aufgelistet.

Tabelle 3.3.1.: Liste der Maxima im „Primary Scan“ der Chinidin-Akkumulation
Das Minus (-) steht für eine negative Korrelation (r).

Chromosom	Marker	Position (cM)	LOD	r
6	Pf12	51,7	2,18	-0,47
7	B5M12	5,8	5,86	-0,71
7	*pfcrt*	20,2	7,06	-0,76
13	POLY3	107,3	2,07	-0,46

Tabelle 3.3.2.: Liste der Maxima im „Secondary Scan“ der Chinidin-Akkumulation, wenn *pfcrt* eliminiert ist
Das Minus (-) steht für eine negative Korrelation (r), das Plus (+) weist auf eine positive Korrelation (r).

Chromosom	Marker	Position (cM)	LOD wenn *pfcrt* von Dd2	r	LOD wenn *pfcrt* von HB3	r
5	C5M2	20	-0,29	-0,04	2,45	+0,65
5	MDR1	65,9	2,71	+0,71	-0,23	+0,06
7	B5M12	5,8	3,28	-0,76	-0,07	+0,14
9	C9M43	0	-0,24	-0,07	2,03	+0,60
13	MEF_1	32,6	2,58	-0,69	0,07	+0,20
14	TPI	123,4	-0,01	-0,18	2,36	-0,64

Tabelle 3.3.3.: Liste der Maxima im „Secondary Scan“ der Chinidin-Akkumulation, wenn B5M12 eliminiert ist
Das Minus (-) steht für eine negative Korrelation (r).

Chromosom	Marker	Position (cM)	LOD wenn B5M12 von Dd2	r
6	Pf12	51,7	2,09	-0,65
7	*pfcrt*	20,2	2,80	-0,73

3.4. Mathematische Analyse der einzelnen Maxima

Alle, in den QTL-Analysen aufgetretenen Maxima, wurden mathematisch untersucht. Hierbei sollte festgestellt werden, unter welchen genotypischen Bedingungen sie die Akkumulation beeinflussen.

3.4.1. Synergistischer Effekt von B5M12 und *pfcrt* bei der Chinidin-Akkumulation

Der „Primary Scan“ der Chinidin-Akkumulation zeigt zwei Hauptmaxima, beide auf Chromosom 7 (Abb. 3.3.2.). Um ihren Beitrag zur Chinidin-Akkumulation besser zu verstehen, wurden die Stämme gemäß ihrem B5M12- bzw. *pfcrt*-Genotyp in Gruppen geordnet. Die erste Gruppe hat den B5M12- und den *pfcrt*-Lokus von HB3 mit insgesamt 17 Vertreter, während die zweite Gruppe aus fünf F1-Nachkommen besteht und entweder B5M12 oder *pfcrt* von Dd2 hat. Die letzten 14 der 36 Stämme bilden die dritte Gruppe und haben beide Genorte von Dd2. Für jede Gruppe wurde der Mittelwert der anfänglichen Chinidin-Akkumulation ermittelt. Stämme, die beide Marker von HB3 haben, akkumulieren Chinidin 141,8 fach, was keinen Unterschied ($p = 0,74$) zur zweiten Gruppe macht. Diese hat entweder B5M12 oder *pfcrt* von Dd2 vererbt bekommen und weist einen mittleren Akkumulationswert von 139,4 auf (Abb. 3.4.1.).

Sind jedoch beide Genorte ursprünglich von Dd2, verringert sich die Chinidin-Akkumulation signifikant ($p = 3,0*10^{-10}$) auf einen Mittelwert von 99,9. Der Unterschied in der Chinidin-Akkumulation zwischen HB3 (141,8 ± 4,3) und Dd2 (90,4 ± 7,3) ist somit hauptsächlich einem Synergieeffekt von B5M12 und *pfcrt* zuzuschreiben (aus dem griechischen: syn „zusammen“ und érgon „das Werk“).

Die Akkumulation von Dd2 (90,4 fach) unterscheidet sich kaum von der Gruppe, die beide Marker von Dd2 hat. HB3 zeigt sogar den gleichen Akkumulationswert, verglichen mit der Gruppe, die beide Genorte des Wildtyps tragen.

Die Zugehörigkeit der Stämme zu den einzelnen Gruppen ist im Anhang in Tabelle 7.2. aufgezeigt.

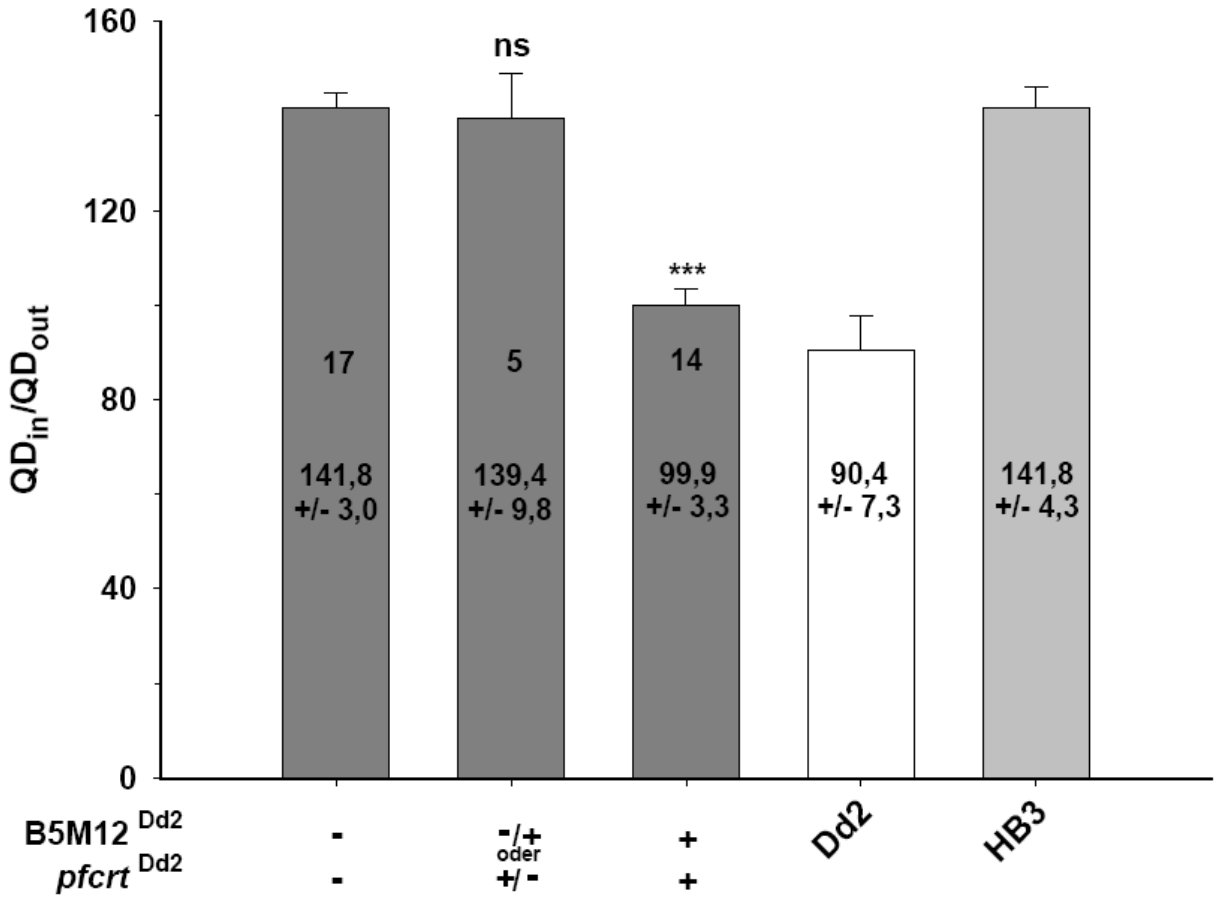

Abb. 3.4.1.: Der B5M12- und der *pfcrt*-Lokus tragen synergistisch zur Chinidin-Akkumulation bei
Die Gruppe der Stämme mit beiden Markern von Dd2 (14 Stämme) wurde ebenso wie die Gruppe mit gemischter Lokus-Herkunft (fünf Stämme) mit der Gruppe, die beide Genorte von HB3 vererbt bekommen hatten (17 Stämme), verglichen und die p-Werte rechnerisch ermittelt. ns, nicht-signifikant; ***, $p < 0{,}001$

B5M12 tritt nicht nur im „Primary Scan“ auf, sondern auch im „Secondary Scan“ in der Gruppe der Stämme mit *pfcrt*-Allel von Dd2, also mit mutiertem *pfcrt*, aber nicht in der Gruppe der CQS-Stämme, die Wildtyp *pfcrt* haben (Abb. 3.3.4.A und B).

Für den mathematischen Test wurden die Stämme nach ihrem *pfcrt*- und B5M12-Genotyp aufgespalten (Abb. 3.4.2.). Die Herkunft von *pfcrt* wurde auf der Abszisse mit einem D (Dd2) oder H (HB3) indiziert, der Genotyp von B5M12 wurde mit unterschiedlicher Farbgebung veranschaulicht (weiß: Dd2; grau: HB3).

In Abb. 3.4.2. wird deutlich, dass nur B5M12 von Dd2 (weiße Punkte) in Kombination mit dem mutierten *pfcrt*-Allel die Akkumulation signifikant ($p < 0{,}001$) verringert. Hingegen hat mutiertes B5M12 keinen Einfluss, wenn *pfcrt* von HB3 stammt. Diese Beobachtung entsprach der zuvor gemachten Entdeckung, dass B5M12 nur im „Secondary Scan“ der CQR-Stämme auftritt.

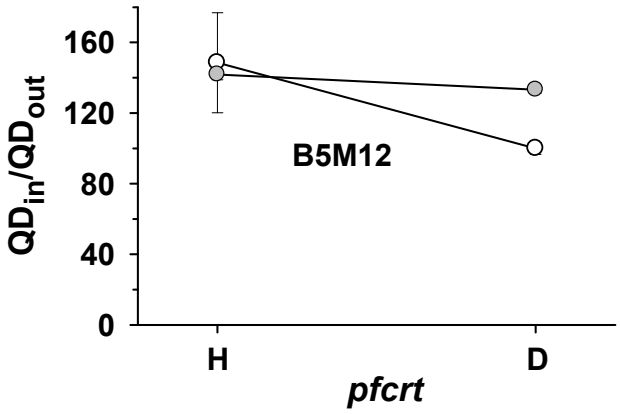

Abb. 3.4.2.: B5M12 von Dd2 verringert die Akkumulation in CQR-Stämmen signifikant
Die Herkunft von *pfcrt* wurde auf der Abszisse verdeutlicht, während der Genotyp von B5M12 mit zwei unterschiedlichen Farben veranschaulicht wurde. (● Stämme mit B5M12 von HB3; ○ Stämme mit B5M12 von Dd2)

3.4.2. POLY3 und Pf12 verringern die Akkumulation nur, wenn sie von Dd2 stammen

Die beiden Maxima POLY3 und Pf12 tauchen nur im „Primary Scan“ der Chinidin-Akkumulation auf und erreichen beide mit einem „LOD-Score“ von 2,07 und 2,18 nur knapp die Signifikanzgrenze. Beide haben negative Korrelationskoeffizienten und sorgten so für eine Verminderung der Chinidin-Akkumulation. Dies sollte nun auf weiterem Wege geprüft werden. In Abb. 3.4.3.A wurde POLY3 mit dem Effekt von *pfcrt* getestet, und in Abb. 3.4.3.B im Hinblick auf B5M12 überprüft.

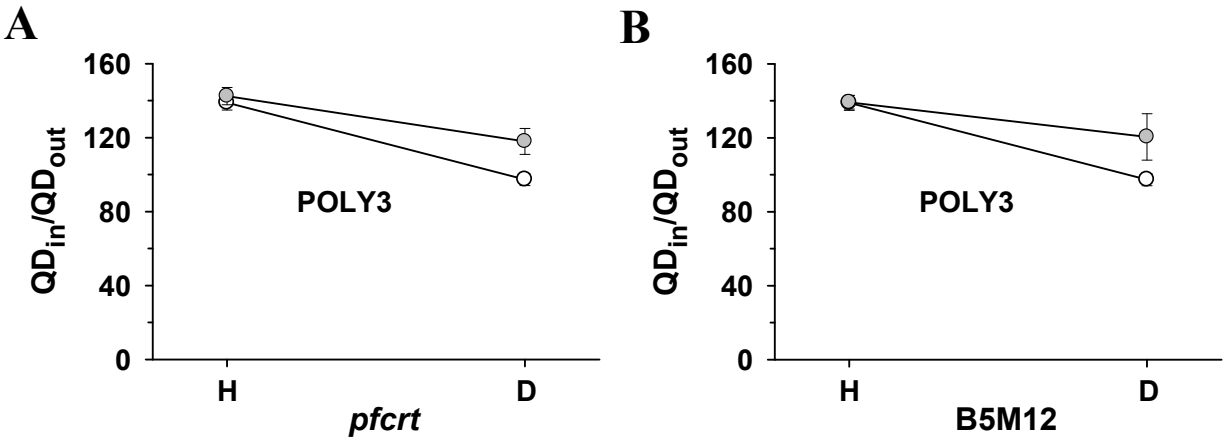

Abb. 3.4.3.: Der Effekt von POLY3 auf die Chinidin-Akkumulation
Mutiertes POLY3 verringert die Akkumulation nur, wenn *pfcrt* (A) bzw. B5M12 (B) ebenfalls von Dd2 stammen. (● Stämme mit POLY3 von HB3; ○ Stämme mit POLY3 von Dd2)

POLY3 verringert in beiden Tests die Akkumulation nur, wenn es selbst von Dd2 abstammt und auch der Referent den Dd2-Genotyp hat (A: $p < 0{,}01$.; B: $p < 0{,}05$). Es interagiert somit synergistisch mit *pfcrt* und B5M12.

Pf12 auf Chromosom 6 verringert die Akkumulation nur dann signifikant (p = 0,0061), wenn es selbst und auch B5M12 von Dd2 abstammt (Abb. 3.4.4.B), hingegen zeigt es keinen signifikanten Beitrag zur Akkumulation im Test mit *pfcrt* (Abb. 3.4.4.A). Hier erreicht der p-Wert im Test nur einen Wert von 0,073.

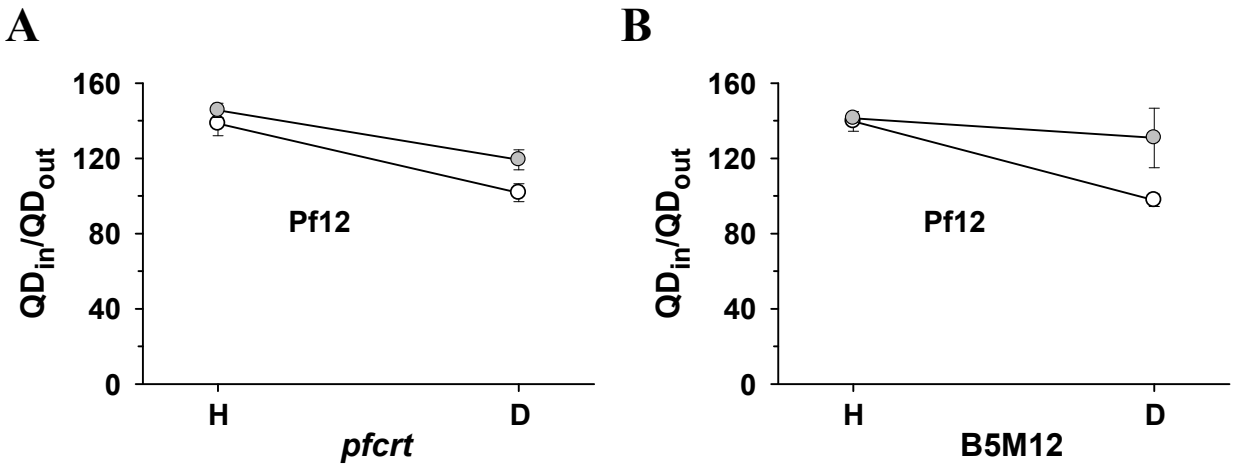

Abb. 3.4.4.: Der Effekt von Pf12 auf die Chinidin-Akkumulation
Pf12 zeigt keinen signifikanten Beitrag zur Akkumulation im Test mit *pfcrt* (A), jedoch verringert mutiertes Pf12 die Akkumulation, wenn B5M12 ebenfalls von Dd2 abstammt (B).
(● Stämme mit Pf12 von HB3; ○ Stämme mit Pf12 von Dd2)

3.4.3. Gegenläufige Beiträge von MDR1 und MEF_1 zur Chinidin-Akkumulation

Bei der Chinidin-Akkumulation treten die Maxima von MDR1 und MEF_1 nur im „Secondary Scan“ in der Gruppe der CQR-Stämme auf (Abb. 3.3.4.A). Ein Beitrag im „Primary Scan“ konnte nicht beobachtet werden, weshalb beide Maxima generell nur zu einem kleinen Teil zur Akkumulation beitragen.

Zwar konnten Änderungen in der Amplifikation und Polymorphismen innerhalb des *pfmdr1* Gens mit einer verminderten *in vitro* Suszeptibilität von Chinin in Zusammenhang gebracht werden (Wilson *et al.*, 1993; Cowman *et al.*, 1994; Duraisingh *et al.*, 2000; Reed *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2004; Sidhu *et al.*, 2005), jedoch zeigten Sanchez *et al.*, dass die zuvor gezeigten Polymorphismen nicht die Chinin-Akkumulation im *Xenopus laevis* Oozytenexperiment veränderten (Sanchez *et al.*, 2008b; Sanchez *et al.*, 2008a).

In der vorliegenden Arbeit, die auf Chinidin-Akkumulation innerhalb weniger Minuten beruht, konnte jedoch *pfmdr1* mit dem Transport von Chinidin in Zusammenhang gebracht

werden, wenn auch nur zu einem geringen Teil. Auch Nurhasanah zeigte, dass *pfmdr1* den Chinin-Transport positiv beeinflusst, wenn es mutiert ist (Nurhasanah, 2009).

In Abb. 3.4.5.A kann gezeigt werden, dass MDR1 synergistisch mit *pfcrt* interagiert, wenn beide von Dd2 abstammen. Die Chinidin-Akkumulation wird durch mutiertes MDR1 signifikant von 89,8 auf 114,6 erhöht ($p = 0{,}0015$). Möglich wäre aber auch, dass die erhöhte Kopienzahl von *pfmdr1* in Dd2 (vier detektiert mit „Southern Blot“, drei detektiert mit „Real Time PCR“) positiv zur Akkumulation beiträgt, wenn *pfcrt* mutiert ist.

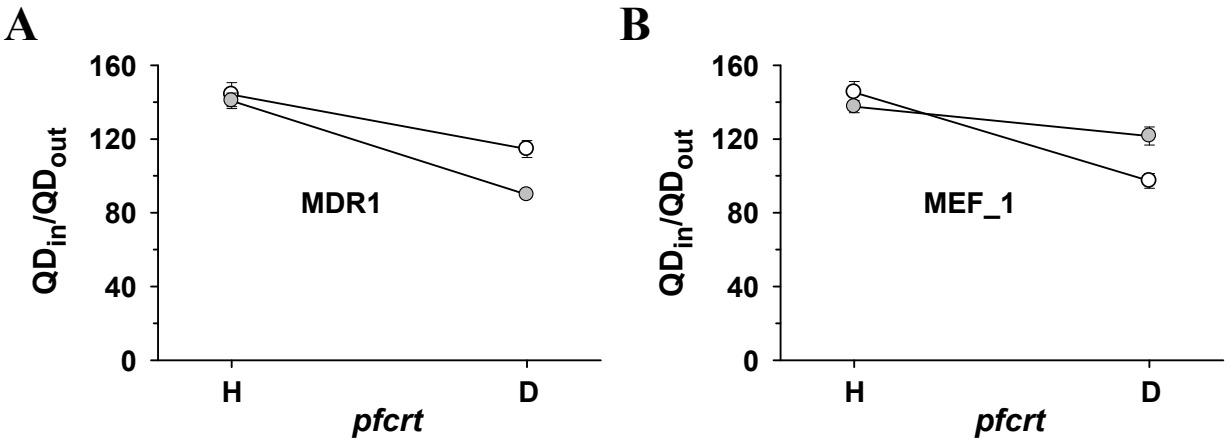

Abb. 3.4.5.: MDR1 und MEF_1 zeigen gegenläufige Effekte in CQR-Stämmen, wenn sie mutiert sind
Mutiertes MDR1 erhöht die Akkumulation in CQR-Stämmen (A), während mutiertes MEF_1 die Akkumulation negativ beeinflusst (B). (● Stämme mit MDR1/MEF_1 von HB3; ○ Stämme mit MDR1/MEF_1 von Dd2)

Auch MEF_1 und *pfcrt* zeigen einen Synergieeffekt, jedoch verringert mutiertes MEF_1 die Akkumulation von 121,6 auf 97,2 fach, wenn auch *pfcrt* von Dd2 abstammt (Abb. 3.4.5.B). MDR1 und MEF_1 beeinflussen somit die Chinidin-Akkumulation gegenläufig.

3.4.4. Effekt von C5M2, C9M43 und TPI auf die Akkumulation

Die Maxima von C5M2, C9M43 und TPI treten nur im „Secondary Scan“ in der Gruppe der Stämme mit *pfcrt* von HB3 auf. Alle drei Genorte beeinflussen somit nur im geringen Maße die Akkumulation.

Nur wenn C5M2 von Dd2 kommt, erhöht es die Akkumulation in den CQS-Stämmen signifikant ($p < 0{,}01$; Abb. 3.4.6.A). C9M43 auf Chromosom 9 wirkt ebenso wie C5M2 und erhöht die Akkumulation in den Stämmen mit dem *pfcrt*-Allel von HB3 ($p < 0{,}01$;

Abb. 3.4.6.B). In Stämmen mit dem *pfcrt*-Allel von Dd2 zeigen beide Genorte keinerlei Effekt.

TPI ist neben *pfcrt* das einzige Maximum, das in den QTL-Analysen von Chloroquin auftritt (Abb. 3.3.1. und 3.3.3.B). Mit einem „LOD-Score“ von 3,35 erscheint er im „Secondary Scan“ der CQS-Stämme. Weder im Primary noch im „Secondary Scan“ der CQR-Stämme tritt dieses Maximum auf. Auch im „Secondary Scan“ der CQS-Stämme der Chinidin-Akkumulation erscheint dieses Maximum, was bedeutet, dass es, genauso wie *pfcrt*, zur Akkumulation beider Medikamente beiträgt. In beiden Fällen besteht eine negative Korrelation, was auch die gesonderte mathematische Analyse mit *pfcrt* als Referenz zeigt. In Abb. 3.4.6.C und 3.4.6.D wird gezeigt, dass mutiertes TPI die Akkumulation von Chinidin (C) und Chloroquin (D) in den Wildtyp *pfcrt*-Stämmen signifikant verringert (QD: p = 0,003 und CQ: p = 0,0004).

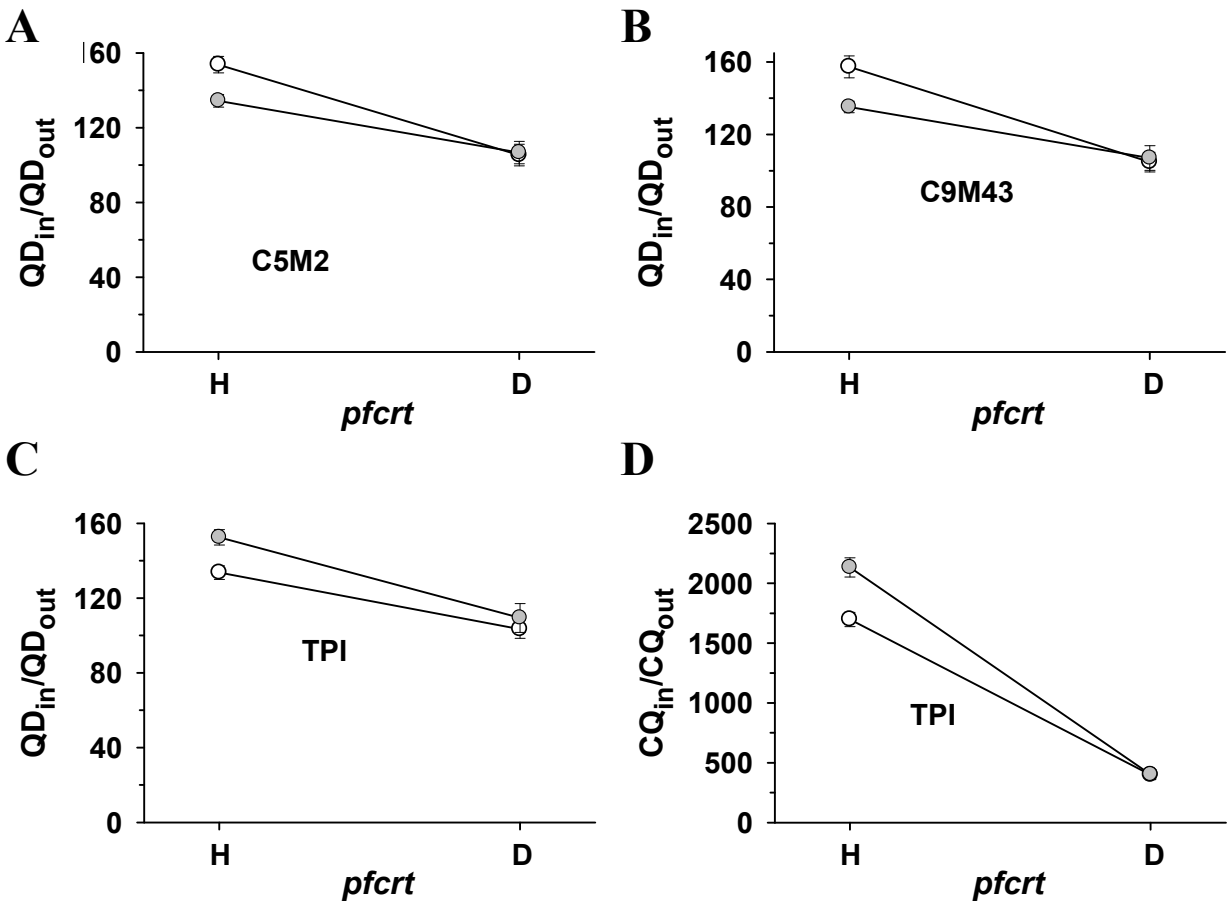

Abb. 3.4.6.: TPI wirkt C5M2 und C9M43 in CQS-Stämmen entgegen
C5M2 (A) und C9M43 (B) erhöhen im mutierten Zustand die Akkumulation, wenn gleichzeitig Wildtyp *pfcrt* vorliegt, während mutiertes TPI (C) die Chinidin-Akkumulation negativ beeinflusst. Im „Secondary Scan“ der CQS-Stämme tritt in der Chloroquin-Akkumulation ebenfalls TPI auf. Es interagiert synergistisch mit Wildtyp *pfcrt*, wenn es mutiert ist (D). (● Stämme mit C5M2/C9M43/TPI von HB3; ○ Stämme mit C5M2/C9M43/TPI von Dd2)

3.5. Bioinformatische Analyse des B5M12-Lokus

Der, neben dem *pfcrt* Maximum gelegene B5M12-Lokus auf Chromosom 7, sollte bioinformatisch untersucht werden, um mögliche Kandidatengene zu identifizieren, die an der Chinidin-Akkumulation beteiligt sind. Dieser Lokus entsprach schon dem zuvor von Nurhasanah beschriebenen Lokus und wurde auch von Nurhasanah analysiert (Nurhasanah, 2009). Er sollte aber auf Grund einiger Abweichungen neu betrachtet werden.

Zunächst wurde hierfür die genaue Position des Maximums ermittelt und die Markernamen mit der auf der NCBI erhältlichen Marker- und Genkarte verglichen (National Center for Biotechnology Information, 2008). Die Markernamen oder auch Mikrosatteliten sind hier unter der Rubrik STS („sequence tagged site“) wiederzufinden. Der B5M12-Lokus-Bereich umfasst fünf Marker mit dem höchsten „LOD-Score“ (LT103, B5M2, B5M12, BM2 und BM25) und die an beiden Seiten angrenzenden Marker mit jeweils niedrigeren „LOD-Scores“ (B5M141 und PE14D). Ein Marker (BM25) konnte nicht lokalisiert und daher nicht in Tabelle 3.5.1. eingezeichnet werden. Neben den Markern sind auch die Gene, die sich auf dem Chromosomenabschnitt befinden, aufgezeigt. Die Genkarte von NCBI wurden mit der Genreihenfolge auf der Internetseite von PlasmoDB (PlasmoDB, 2008) verglichen und eine genaue Abfolge der Gene aufgestellt (Tabelle 3.5.1.). Hierbei wurde festgestellt, dass neben den 19 Genen in NCBI noch weitere 17 Gene in PlasmoDB annotiert waren und somit 36 Gene in der Lokus-Region gefunden wurden.

Um ein mögliches Kandidatengen zu identifizieren, wurde gezielt nach SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) oder Längenpolymorphismen zwischen der HB3- und Dd2-Sequenz gesucht. PlasmoDB verfügt hauptsächlich über Informationen des 3D7-Genoms, jedoch befindet sich auf der Seite des jeweiligen 3D7-Gens auch ein Sequenzvergleich zwischen 3D7, HB3, Dd2 und IT. Da die verwendeten Sequenzen von HB3 und Dd2 für den Vergleich veraltet waren, wurde die aktuellste 3D7-Sequenz in ein FASTA-Format umgewandelt und auf der Internetseite des BroadMIT (BROAD, 2009) ein BLAST (BLASTn) gegen die neuesten HB3- und Dd2-Sequenzen durchgeführt. Die Proteinsequenzen wurden ebenfalls mit aufgezeigt und bei der Polymorphismensuche berücksichtigt. Ein direkter Vergleich der HB3- und Dd2-Sequenzen mit dem Programm BioEdit (Version 7.0.9.0., 2007) deckte SNPs und Längenpolymorphismen auf, allerdings waren die Sequenzen von HB3 und besonders von Dd2 oft nur unvollständig oder gar nicht verfügbar, was die Suche nach Polymorphismen beeinträchtigte. Trotzdem konnten drei Gene auf Grund kompletter Sequenzhomologien von der Suche ausgeschlossen werden (MAL7P1.20,

PF07_0023 und MAL7P1.206). Auch vier Gene, die tRNAs kodieren, konnten vernachlässigt werden (MAL7_tRNA_Thr1, MAL7_tRNA_His1, MAL7_tRNA_Lys1 und MAL7_tRNA_Lys2). Die Anzahl der Kandidatengene konnte so von 36 auf 29 reduziert werden.

Auf PlasmoDB sind Informationen zu möglichen Funktionen des Proteins erhältlich. Waren diese Informationen nicht ausreichend, wurde ein Basic BLAST mit der 3D7-Gensequenz auf der Internetseite vom „Swiss Institute for Bioinformatics“ (EMBNet, 2008) durchgeführt. Eine mögliche Funktion des Proteins sollte so im Sequenzvergleich mit allen in der Datenbank enthaltenen bekannten Proteinen aufgedeckt werden. Hier gab es jedoch keine weiteren Erkenntnisse, da die Bit-Scores und E-Werte keine statistische Relevanz boten.

Für die Bestimmung der Transmembrandomänen (TMDs) wurden zwei unterschiedliche Algorithmen angewendet. Eine Bestimmung basiert auf dem TMHMM-Modell („Transmembrane Domain Hidden Markov Model“), durchgeführt auf dem TMHMM Server v. 2.0 (CBS, 2007), die andere Vorhersage beruht auf einem Hydropathie-Index von Kyte und Doolittle (Kyte *et al.*, 1982; Eisenberg, 1984).

Von den verbleibenden 29 Genen haben zehn Gene im TMHMM-Modell vorhergesagte TMDs. Die TMD-Vorhersage mit der Methode von Kyte und Doolittle stimmte größtenteils nicht mit der Vorhersage nach dem TMHMM-Modell überein. Dies könnte zum einen an den verschiedenen, verwendeten Methoden liegen, zum anderen ist die Aussage nach Kyte und Doolittle subjektiv, da man selbst die Grenzen einer TMD definieren muss, während die TMD-Anzahl in der TMHMM-Methode vom Computer errechnet wird. Da bestimmte Proteine keine TMDs haben sollten, nach der Methode von Kyte und Doolittle aber trotzdem TMDs aufwiesen, wurde nur die TMHMM-Methode in der Bestimmung der TMDs berücksichtigt.

Polymorphismen in Transportern werden schon seit langem für die veränderte Chinolin-Sensitivität verantwortlich gemacht (Lakshmanan *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2008a; Sidhu *et al.*, 2002; Fidock *et al.*, 2000). Da TMDs eine Vorraussetzung für Transportproteine sind (Busch *et al.*, 2002), waren bei der Suche nach einem geeigneten Kandidaten besonders Gene mit TMDs interessant (MAL7P1.16, MAL7P1.17, PF07_0016, MAL7P1.19, PF07_0018, MAL7P1.339, MAL7P1.340, MAL7P1.203, MAL7P1.204 und MAL7P1.205). Die meisten „Carrier“ haben zwischen zehn und zwölf TMDs (Busch *et al.*, 2002), aber auch Gene mit weniger TMDs können sich zu Dimeren oder Tetrameren zusammenlagern und so den Transporter bilden. *Pfcrt* hat z.B. zehn TMDs, während *pfmdr1* zwölf TMDs mit zwei homologen Hälften und je einer konservierten Nukleotidbindedomäne hat (Valderramos *et al.*,

2006). Polymorphismen in Membrankanälen könnten ebenfalls zu einer veränderten Akkumulation beitragen, da ausgetauschte Aminosäuren die Pore sterisch verengen, schließen oder durch eine geladene Aminosäure die Moleküle abweisen könnten. Die meisten α-helikalen Kanäle haben ein bis sechs TMDs. Diese kleine TMD-Anzahl spiegelt die oligomere Struktur der Kanal-formenden Proteine wider (Busch *et al.*, 2002).

Des Weiteren waren auch Gene von Interesse, deren Produkte posttranslational Proteine modifizieren, da diese auch eine Veränderung an *pfcrt* bewirken könnten (PF07_0015, MAL7P1.18, MAL7P1.19 und PF07_0026). Von besonderm Interesse waren hierbei die Ubiquitin-Transferase (MAL7P1.19), die Ubiquitin-Proteinligase E3 (PF07_0026) oder die Serin/Threonin Proteinkinase (MAL7P1.18). Ubiquitinierung wird sowohl mit einer veränderten Degradation sowie mit „Protein-Trafficking“ in Verbindung gebracht (Schwartz *et al.*, 2003).

Als drittes waren Gene interessant, die ATPasen kodieren. MAL7P1.340 kodiert eine ATP Synthaseuntereinheit c. ATP-Synthasen können, gekoppelt an einen Protonengradienten, ATP aus ADP und Phosphat erzeugen oder durch Hydrolyse von ATP Protonen über die Membran pumpen und so eine Änderung des pH-Wertes herbeiführen (Boyer, 1997). Eine AAA Familie ATPase wird von MAL7P1.209 kodiert. Das AAA steht für „Associated with diverse cellular Activities”, also einer Assoziation mit verschiedenen zellulären Aktivitäten. Charakteristisch für diese Proteine ist das Koppeln chemischer Energie durch Hydrolyse von ATP mit der Ausübung mechanischer Kräfte auf Makromoleküle (Iyer *et al.*, 2004).

Über Expressionslevel der Genprodukte, die ebenfalls auf PlasmoDB erhältlich sind, konnten keinerlei Gene von der Suche ausgeschlossen werden, da alle Gene in den intraerytrozytären Stadien und somit auch im Trophozoit-Stadium der Parasiten exprimiert werden.

Tabelle 3.5.1.: Gene, die im B5M12-Lokus liegen

Grau unterlegte Gene wurden nur in PlasmoDB gefunden, nicht in NCBI; K & D (Kyte und Doolittle)

Marker	Gen	Funktion	TMDs TMHMM	TMDs K & D	Polymorphismen
B5M141	MAL7P1.16	konserviertes Membranprotein; unbekannte Funktion	8	9	ja
	MAL7P1.17	konserviertes Membranprotein; unbekannte Funktion	7	6	ja
	PF07_0015	putative Methyltransferase	0	1	ja
	PF07_0016	konserviertes Membranprotein; unbekannte Funktion	4	4	ja
	PF07_0017	putatives Phosphoinositid-Bindeprotein	0	2	ja
LT103	MAL7P1.18	putative Serin/Threonin Proteinkinase	0	3	ja
B5M2	MAL7P1.19	putative Ubiquitin-Transferase	6	4	ja
	PF07_0018	konserviertes Membranprotein; unbekannte Funktion	7	5	ja
	PF07_0019	konserviertes Protein; unbekannte Funktion	0	0	ja
	MAL7P1.20	putativer Peptidkettenfreilassungsfaktor	0	0	nein
	PF07_0020	putatives mRNA „Capping“ Enzym	0	1	ja
	PF07_0021	konserviertes Protein; unbekannte Funktion	0	3	ja
	PF07_0022	konserviertes Protein; unbekannte Funktion	0	2	ja
	MAL7P1.21	putative “origin recognition complex subunit 2”	0	2	ja
	PF07_0023	putativer “DNA replication licensing factor mcm7 homologue”	0	1	nein
	PF07_0024	putative Inositolphosphatase	0	0	ja
	MAL7P1.201	putative RNA-Helikase	0	1	ja
	MAL7P1.300	putatives 40S ribosomales Protein S29	0	0	ja
	MAL7P1.339	Putative Ca^{++} chelatbildende Serinprotease	1	2	ja
	MAL7P1.340	putative ATP Synthaseuntereinheit c	2	0	ja
	MAL7P1.202	konserviertes Protein; unbekannte Funktion	0	0	ja
	MAL7P1.203	konserviertes Protein; unbekannte Funktion	1	2	ja
B5M12	MAL7P1.320	putatives ribosomales Protein L37e	0	1	ja
BM2	MAL7P1.204	konserviertes Protein; unbekannte Funktion	3	5	ja
	MAL7P1.205	konserviertes Protein; unbekannte Funktion	3	3	ja
	MAL7P1.206	putatives „DNA mismatch repair“ Enzym	0	2	nein
	MAL7_tRNA_Thr1	tRNA			-
	MAL7_tRNA_His1	tRNA			-

	MAL7_tRNA_Lys1	tRNA			-
	MAL7_tRNA_Lys2	tRNA			-
	MAL7P1.207	konserviertes Protein; unbekannte Funktion	0	3	ja
	MAL7P1.208	Rifin-ähnliches Protein	0	4	ja
	MAL7P1.209	putative AAA Familie ATPase	0	2	ja
	MAL7P1.22	konserviertes Protein; unbekannte Funktion	0	4	ja
	PF07_0025	konserviertes Protein; unbekannte Funktion	0	1	a
PE14D	PF07_0026	putative Ubiquitin-Proteinligase E3	0	3	ja

3.6. Lokuseinschränkung durch Identifizierung und Charakterisierung neuer Marker

Der B5M12-Lokus ist sowohl für die Chinin- als auch für die Chinidin-Akkumulation relevant (Nurhasanah, 2009). Da nach der bioinformatischen Analyse weiterhin 29 Gene in der Lokus-Region des B5M12-Markers lagen, wurden neue Marker gesucht, die die „Crossing-over"-Bereiche des Maximums näher definieren und somit die Kandidatengenanzahl einschränken sollten.

3.6.1. Eingrenzung der „Crossing-over"-Bereiche zwischen B5M141 und LT103 sowie zwischen BM2 und PE14D

B5M141 (2,9 cM) und PE14D (11,5 cM) flankieren die Region mit dem höchsten „LOD-Score" um den Marker B5M12 (5,8 cM). Es sollte der genaue „Crossing-over"-Bereich gefunden werden, der auf der einen Seite des Lokus zwischen dem Marker B5M141 und LT103 (5,8 cM) und auf der anderen Seite zwischen dem Marker BM2 (5,8 cM) und PE14D liegt. Hierzu wurde nach Längenpolymorphismen zwischen der HB3- und der Dd2-Sequenz gesucht, da sich diese mittels PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese unterscheiden lassen.

Zwei bisher unbekannte Längenpolymorphismen (SM17 und SM15) wurden zwischen den Markern B5M141 und LT103 lokalisiert, der eine im Gen MAL7P1.17, der andere in PF07_0015 (Abb. 3.6.1.). Beide Längenpolymorphismen stimmen mit dem B5M141-Marker überein. Das „Crossing-over" muss somit zwischen SM15 und dem nachfolgenden LT103 liegen. Die beiden Gene MAL7P1.16 und MAL7P1.17 konnten von der Suche nach dem Kandidatengen ausgeschlossen werden, da sie nicht im Lokus mit dem höchsten „LOD-Score" liegen. Der begrenzende und damit wichtige Stamm war C408. PF07_0015 muss weiterhin als Kandidatengen in Erwägung gezogen werden, da der Marker mitten im Gen liegt und sich somit auch das „Crossing-over" im Gen befinden könnte. Ein für die Chinin- und Chinidin-Akkumulation relevanter Polymorphismus in diesem Gen konnte somit nicht ausgeschlossen werden.

Zwischen den Markern BM2 und PE14D giebt es vier Längenpolymorphismen (SM205, SM207, SM208 und SM22) in den Genen MAL7P1.205, MAL7P1.207, MAL7P1.208 und

MAL7P1.22 (Abb. 3.6.1.). Die Marker SM205, SM207 und SM208 stimmen mit BM2 überein, SM22 jedoch zeigt eine völlig neue Segregation. Die beiden relevanten Stämme sind 7C111 und TC05. Im F1-Nachkommen 7C111 fand ein „Crossing-over“ zwischen den Markern SM208 und SM22 statt, während sich in TC05 ein „Crossing-over“ zwischen SM22 und PE14D ereignete (Abb. 3.6.1.), was den Bereich um weitere zwei Gene eingrenzte. PF07_0025 und PF07_0026 liegen außerhalb und haben einen niedrigeren „LOD-Score“, MAL7P1.22 darf weiterhin, wie PF07_0015, von der Suche nach dem Kandidatengen nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt konnte mit diesen sechs neuen Markern der Lokus-Breich um 30 kb und damit um vier Gene weiter eingeschränkt werden.
Weitere Längenpolymorphismen konnten nicht ausfindig gemacht werden, da große Teile der HB3-Sequenz und vor allem der Dd2-Sequenz nicht bekannt waren. So konnte nur in sequenzierten Regionen nach Längenpolymorphismen gesucht werden.

3.6.2. Suche nach einem unbekannten Doppel-„Crossing-over“ zwischen den Markern B5M2 und B5M12

Die Marker B5M2 und B5M12 (beide 5,8 cM) trennt ein ca. 90 kb großer Chromosomenabschnitt (Abb. 3.6.1.). Zwischen ihnen befindet sich kein anderer bekannter Marker, weshalb ein bisher unentdecktes Doppel-„Crossing-over“ in dieser Region nicht ausgeschlossen werden konnte. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde erneut nach Längenpolymorphismen in den Genen dieser Region gesucht und neun Längenpolymorphismen zwischen HB3 und Dd2 entdeckt (SM19, SM20, SM21A, SM21B, SM22A, SM22B, SM24A, SM24B und SM24C).
PCR-Amplifikationen dieser Regionen und anschließende Agarosegelelektrophorese zeigten, dass keiner der neuen Marker eine andere Segregation innerhalb der F1-Nachkommen als B5M2 und B5M12 aufweist. Somit konnte mit diesen neun neuen Markern kein Gen auf der Suche nach dem Kandidatengen ausgeschlossen werden, weshalb die Anzahl der relevanten Gene bei 25 verbleibt.

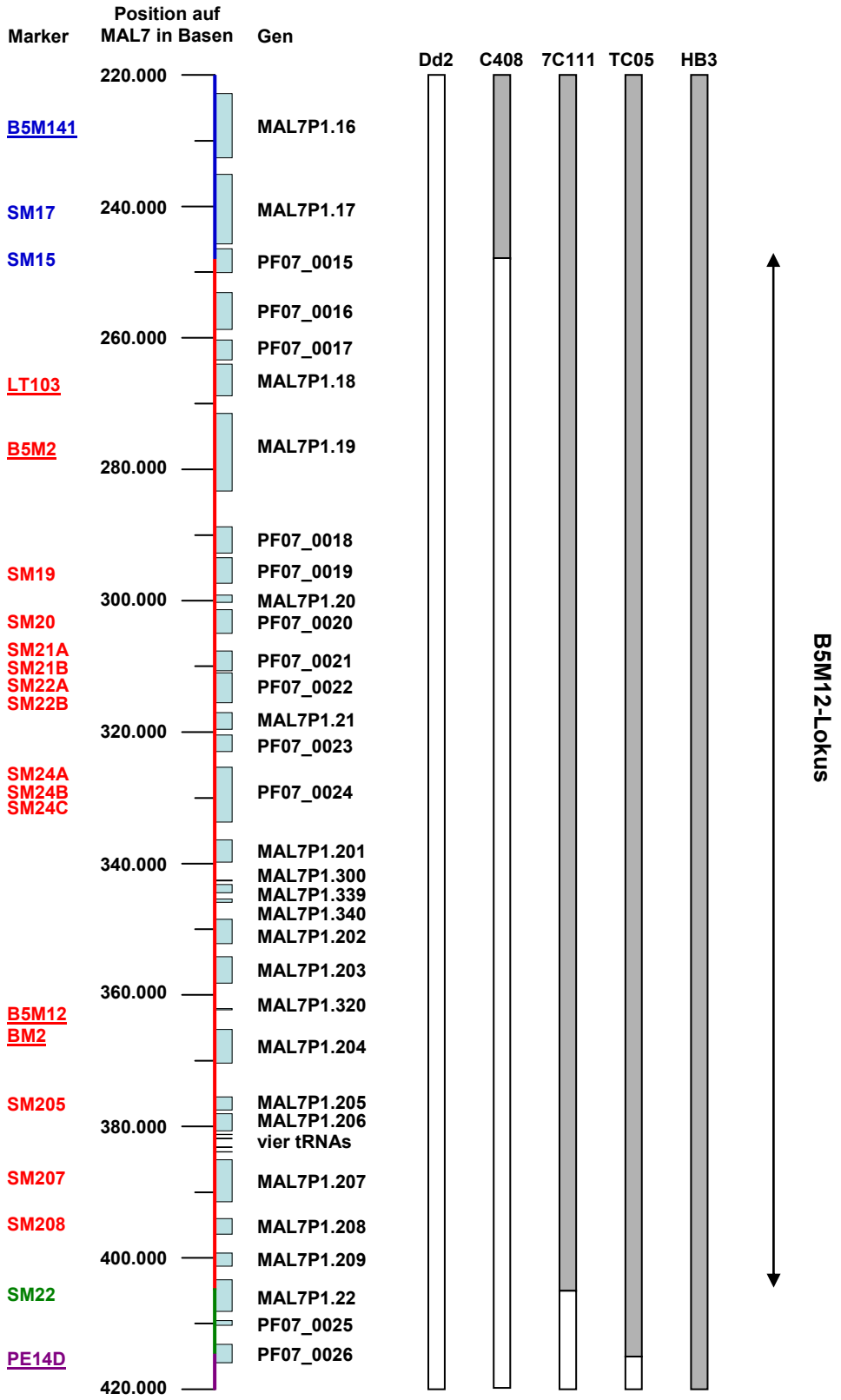

Abb. 3.6.1.: Karte der Chromosom-Region MAL7 mit B5M12-Lokus, der sowohl für die Chinin- als auch für die Chinidin-Akkumulation relevant ist

Der B5M12-Lokus konnte auf die Region zwischen den Markern LT103 und SM208 eingeschränkt werden, was einer Verkürzung von 30 kb entspricht. Alte Marker sind unterstrichen; rot: Lokus um B5M12 mit höchstem „LOD-Score“, grün: neuer Marker mit neuer Position; blau: Marker mit niedrigerem „LOD-Score“; lila: alter, zuvor an den B5M12-Lokus angrenzender, Marker; graue Segmente: HB3; weiße Segmente: Dd2; hellblau: Gene

3.7. Einfluss von *pfnhe* auf die Chloroquin-, Chinidin- und Chinin-Akkumulation

Auf Chromosom 13 befindet sich der Natrium-Protonenaustauscher (*pfnhe*), der in Ferdigs IC_{90} QTL-Analyse mit einer veränderten Chinin-Sensitivität assoziiert wurde (Ferdig et al., 2004). Drei verschiedene Punktmutationen und drei unterschiedliche Wiederholungs-polymorphismen wurden in 71 Isolaten aus aller Welt betrachet. Es konnte hierbei eine Assoziation zwischen der Dd2-Typ DNNND Mikrosatellitenlänge in *pfnhe* (ms4760-1) und erhöhten Chinin IC_{50}-Werten festgestellen werden. Eine weitere Studie von 244 *P. falciparum* Isolaten aus Indien unterstütze zusätzlich die Theorie, dass die Mikrosatellitenlänge von ms4760-1 eine Rolle bei der Resistenzausbildung spielt (Vinayak et al., 2007).

In einer Untersuchung von Nkrumah *et al*., bei der drei Austauschmutanten (Anhang Abb. 7.1.) mit ca. 50 % reduzierter *pfnhe*-Expression verwendet wurde, konnte gezeigt werden, dass die beiden Austauschmutanten mit dem *pfcrt*-Allel von Dd2 eine 30 %ige Verminderung der Chinin-IC_{50}-Werte hervorriefen, während die Austauschmutante mit dem *pfcrt*-Allel von HB3 keinen statistischen Unterschied zur Kontrolle erbrachte (Anhang Abb. 7.2.). Nkrumah *et al*. vermuteten, dass *pfnhe* nur in Verbindung mit *pfcrt*, wenn dieses von Dd2 stammte, eine Rolle bei der Chinin-Suszeptibilität spielt (Nkrumah *et al.*, 2009). Da der andere, oft mit Chinin-Resistenz in Verbindung gebrachte Faktor *pfmdr1* (Wilson *et al.*, 1993; Cowman *et al.*, 1994; Duraisingh *et al.*, 2000; Reed *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2004; Sidhu *et al.*, 2005) bei allen drei Stämmen von HB3 abstammte, schloß er eine Mitwirkung dieses Gens aus.

Selbige drei Austauschmutanten wurden auch für die Untersuchung des Einflusses von *pfnhe* auf die Chloroquin-, Chinidin- und Chinin-Akkumulation verwendet. Die Messungen der Chinin-Akkumulation sollten nicht nur die Chloroquin- und die Chinidin-Akkumulationsdaten komplementieren, sondern auch einen direkten Vergleich zu den von Nkrumah *et al.* gemessenen IC_{50}-Daten möglich machen. Der genetische Hintergrund der Ausgangsstämme der Austauschmutanten ist in Tabelle 3.7.1. aufgezeigt.

Tabelle 3.7.1.: Genetischer Hintergrund der Ausgangsstämme
D = Polymorphismus stammt von Dd2; H = Polymorphismus stammt von HB3

Stamm	*pfmdr1* N1042D	*pfcrt* K76T	*pfnhe* ms4760-1
1BB5	H	D	D
3BA6	H	D	D
GC03	H	H	D

Die Akkumulationen wurden für [^{3}H]-Chloroquin nach 4 min und für [^{3}H]-Chinidin und [^{3}H]-Chinin nach 5 min, analog zu den Messungen in Abschnitt 3.2.2., in der Anfangsphase der Medikamentenaufnahme gemessen. Die Mittelwerte ± SEM von mindestens fünf unabhängigen Messungen wurden bestimmt. Die Ausgangsstämme wurden ebenfalls als Kontrollen nochmals gemessen und die Mittelwerte ± SEM aus den neuen und den alten Akkumulationswerten (Tabelle 7.1.) errechnet. Alle Mittelwerte der Akkumulation sind in Abb. 3.7.1. graphisch dargestellt.

Ein Vergleich des Ausgangsstamms (schwarz) mit seinem jeweiligen *pfnhe* „knockdown“ Stamm (dunkelgrau) ergab bei allen drei Medikamenten und allen Stämmen keinen signifikanten Unterschied in den Akkumulationswerten ($p > 0,05$), weshalb eine Beteiligung des PfNHE an der Chloroquin-, Chinidin- und Chinin-Akkumulation ausgeschlossen werden konnte.

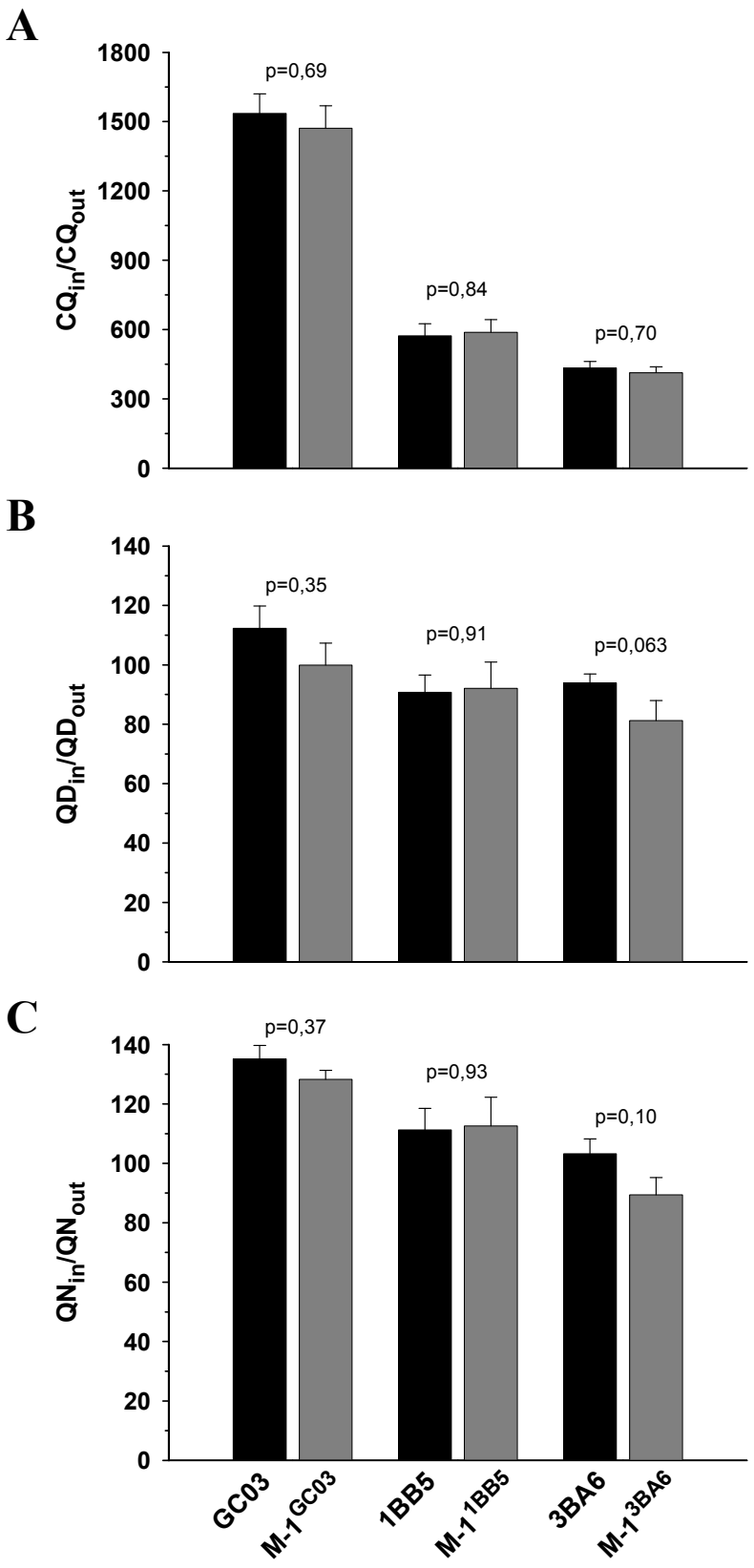

Abb. 3.7.1.: Vergleich der Akkumulationswerte zwischen den *pfnhe* „knockdown"- und ihren Ausgangsstämmen

Chloroquin- (A), Chinidin- (B) und Chinin-Akkumulation (C); Säulen in schwarz stellen die Ausgangsstämme dar, während Säulen in dunkelgrau die *pfnhe* „knockdown" Stämme repräsentieren; Tatsächliche p-Werte sind angegeben und sind alle nicht signifikant, da $p > 0,05$. Die Mittelwerte ± SEM wurden aus mindestens fünf unabhängigen Versuchen errechnet.

3.8. Erneute QTL-Analyse mit 15 neuen Markern

Da die QTL-Analysen in Abschnitt 3.3. nur mit einem Markersatz von 818 ohne die 15 neu charakterisierten Marker durchgeführt wurde, sollte die QTL-Analyse mit den 15 neuen Markern, also insgesamt mit 833 Markern erneut durchgeführt werden. Hierbei sollte durch eine höhere Markerzahl ein höherer „LOD-Score“ erreicht werden.

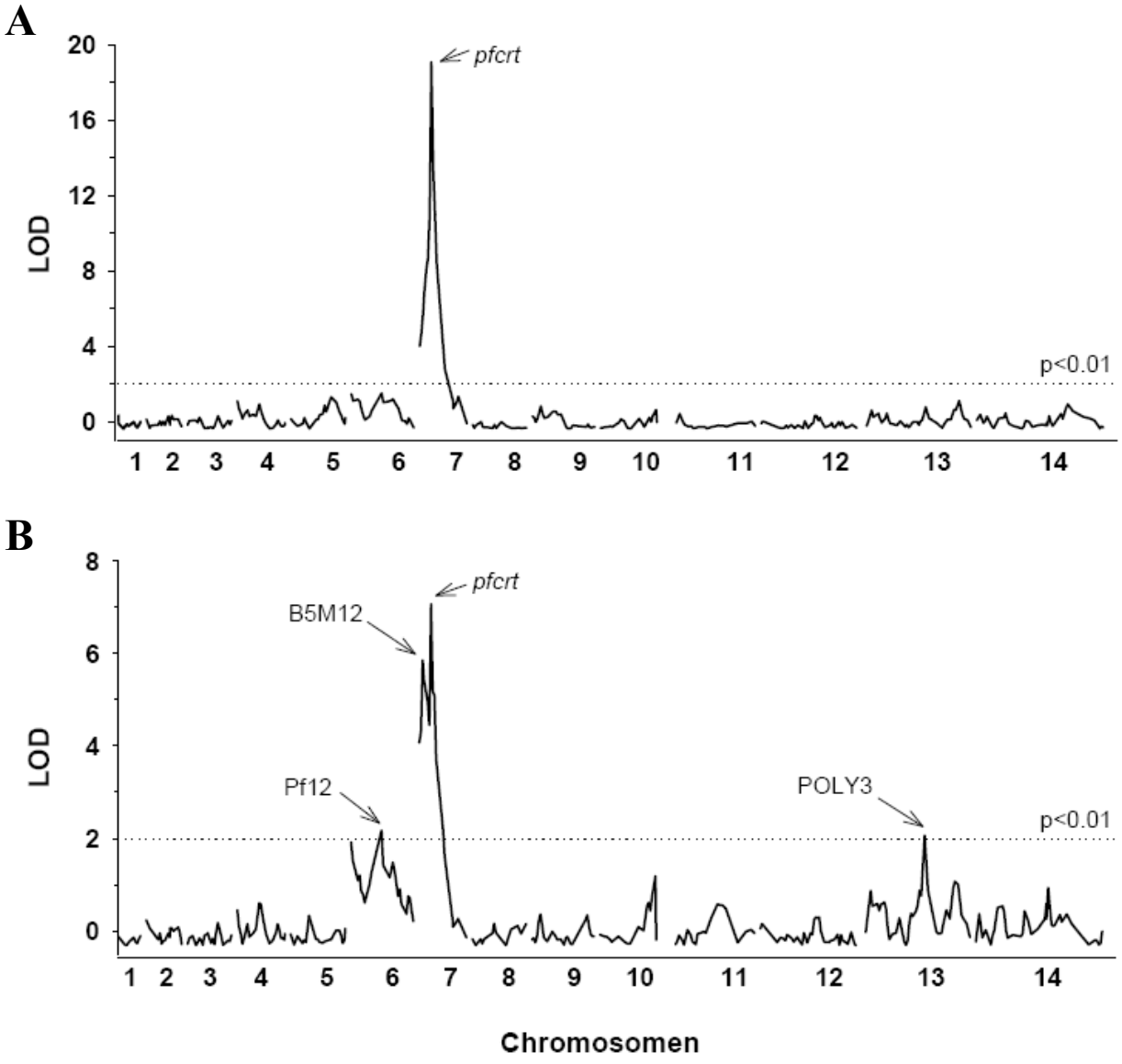

Abb. 3.8.1.: „Primary Scans“ der QTL-Analyse der Chloroquin-Akkumulation und Chinidin-Akkumulation mit 15 neuen Markern
Die QTL-Analyse der anfänglichen (4 min) Chloroquin-Akkumulation (A) zeigt ebenso wie die QTL-Analyse der anfänglichen (5 min) Chinidin-Akkumulation (B) keinen Unterschied zu der QTL-Analyse ohne die 15 neuen Markern in Abschnitt 3.3.; Die gepunktete Linie gibt die Signifikanzgrenze $p < 0{,}01$ an.

In Abb. 3.8.1.A ist der „Primary Scan“ der Chloroquin QTL-Analyse in der Anfangsphase nach 4 min gezeigt, während in Abb. 3.8.1.B die QTL-Analyse der fünfminütigen Chinidin-Akkumulation dargestellt ist. Im Vergleich zu den QTL-Analysen ohne die 15 neuen Markern in Abschnitt 3.3. ist kein Unterschied feststellbar. Der „LOD-Score“ des *pfcrt*-Maximums in der Chloroquin-Analyse ändert sich minimal von 19,08 auf 19,07. Der „LOD-Score“ des B5M12- und *pfcrt*-Maximums der Chinidin-Analyse verbleibt bei einem Wert von 5,86 und 7,06. Auch Pf12 und POLY3 bleiben unverändert.

Die 15 neuen Marker haben die QTL-Analyse somit nicht beeinflusst.

4. Diskussion

In diesem Projekt wurden QTL-Analysen, basierend auf Chloroquin- und Chinidin-Akkumulationsdaten, durchgeführt. Diese zeigen, dass die Chloroquin-Akkumulation von einem Faktor, *pfcrt*, die Chinidin-Akkumulation aber von vier Faktoren beeinflusst wird. Neben *pfcrt* auf Chromosom 7 ist ein zweiter Hauptfaktor im Bereich des B5M12-Maximums lokalisiert. Dieser Lokus interagiert synergistisch mit *pfcrt* und reduziert die Chinidin- und Chinin-Akkumulation signifikant. Die beiden weiteren Faktoren, die sich in den Loki von Pf12 und POLY3 befinden, zeigen geringere Effekte. Das Gen, welches sich in dem B5M12-Lokus verbirgt und für die Reduktion der Akkumulation sorgt, konnte zwar nicht identifiziert werden, allerdings konnten die 36 Gene auf 25 Kandidaten reduziert werden.

4.1. Akkumulationsstudien, QTL-Analysen und mathematische Untersuchungen der QTL

Der Mechanismus, welcher der Chloroquin-Resistenz unterliegt, scheint weniger komplex zu sein, als der Mechanismus zur Ausbildung der Chinidin- und Chinin-Resistenzen. Während mit der Mutation K76T in *pfcrt* der Hauptfaktor der Chloroquin-Resistenz in zahlreichen Studien eingegrenzt werden konnte, sind die an der Chinidin- und Chinin-Resistenz beteiligten Faktoren, trotz vieler epidemiologischer und molekulargenetischer Untersuchungen, weniger eindeutig.

Eine zuvor durchgeführte QTL-Analyse basierend auf Chloroquin-IC_{90}- und auf Chinin IC_{90}-Daten in der genetischen Kreuzung von HB3 und Dd2 zeigten, dass die Chloroquin IC_{90}-Werte von einem Gen, die Chinin IC_{90}-Werte jedoch von mindestens zwei Hauptfaktoren beeinflusst und damit komplexer waren (Ferdig *et al.*, 2004). Eine Beteiligung von *pfcrt* konnte sowohl für die Chloroquin als auch für die Chinin IC_{90}-Werte gezeigt werden. Zusätzlich zu *pfcrt* wurde ein Lokus auf Chromosom 13 mit veränderten Chinin IC_{90}-Werten in Verbindung gebracht. Dieser Lokus beinhaltet das Gen von PfNHE, das womöglich durch unterschiedliche DNNND-Wiederholungssequenzen des Mikrosatellitenpolymorphismus ms4760 Auswirkungen auf die Chinin-Resistenz hat. Auch eine QTL-Analyse basierend auf Chinin-Akkumulationsdaten von Nurhasanah zeigte zwei, an der Chinin-Akkumulation beteiligte Hauptfaktoren. Diese waren *pfcrt* und ein bisher unbekanntes Maximum, was sich

ebenfalls auf Chromosom 7 befindet (Nurhasanah, 2009). Ein Kandidatengen in diesem, als B5M12 bezeichneten Lokus, konnte bisher nicht identifiziert werden. Darüber hinaus konnte keine Beteiligung von *pfnhe* an der Akkumulation über die QTL-Analyse festgestellt werden.

Da IC_{90}-Daten ein Maß für die Proliferation des Parasiten sind und das Überleben des Parasiten unter Medikamentenbehandlung über einen Zeitraum von 72 h wiedergeben, geben diese Daten keinen direkten Aufschluss über Resistenzmechanismen. Akkumulationsdaten in Assoziationsstudien ermöglichen die direkte Messung von Faktoren, die auf die intrazellulären Medikamentenkonzentrationen wirken. Diese werden von Transport- und Partitionierungsprozessen über die Membran bestimmt und nicht von Faktoren, die zum Tod der Zelle führen. So wurden in diesem Projekt Chloroquin- und Chinidin-Akkumulationsdaten erhoben, um unter anderem auch die von Nurhasanah bestimmten Chinin-Akkumulationsdaten zu vervollständigen. Die Chloroquin-Daten sollten zusätzlich eine interne Kontrolle bieten. Ein Vergleich der Chinin- mit den Chinidin-Daten sollte mögliche stereospezifische Akkumulationsmechanismen aufklären.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Chloroquin-Akkumulationen in der Anfangsphase nach 4 min und in der frühen stationären Phase nach 15 min (Abb. 3.2.2.) zeigen eine bimodale Verteilung der F1-Nachkommen und der beiden Elternstämme der genetischen Kreuzung aus HB3 und Dd2. Dies deutet auf die Mendelsche Segregationsregel und demnach auf einen Haupteffekt eines einzelnen Gens hin (Sen *et al.*, 2004). Eine Gruppierung der Chinidin-Akkumulationsdaten war nicht möglich, da manche Stämme mit mutiertem *pfcrt*-Allel ähnlich viel Chinidin wie der sensitive HB3-Parentalstamm akkumulierten (D43: 137 ± 9; 7C111: 132 ± 5 und TC05 ± 130 ± 7 verglichen mit HB3: 142 ± 4 fach) und einige Stämme mit Wildtyp *pfcrt*-Allel ähnliche Akkumulationswerte wie der resistente Dd2-Parentalstamm aufwiesen (7C170: 116 ± 6; CH3-116: 120 ± 5 und CH3-61: 126 ± 7 verglichen mit Dd2: 90 ± 7 fach; Abb. 3.2.3. und Tabelle 7.1.). Diese Akkumulationsdaten deuten auf ein Zusammenspiel meherer Loki hin.

Die Regression zwischen den Chinin-Akkumulationswerten von Nurhasanah und den Chinidin-Akkumulationen spiegelt einen linearen Zusammenhang beider Medikamentenakkumulationen wider (Abb. 3.2.5.). Der Korrelationskoeffizient r = 0,98 und r^2 = 0,95 zeigt an, dass die Akkumulationswerte nahezu ideal auf einer ansteigenden Graden liegen und damit positiv korreliert sind. Ein Wert r = 1 ist der Idealzustand einer positiven Korrelation. Kein Zusammenhang bestünde bei Werten von r = 0. Da Chinidin ein Diastereomer von Chinin ist, ist anzunehmen, dass beide Medikamente ähnlich wirken und auch die Akkumulations- und Resistenzmechanismen ähnlich sind. Etwaige stereospezifische

Unterschiede sind somit nur in Faktoren mit geringerem Einfluss auf die Akkumulation zu erwarten.

Die QTL-Analysen wurden alle in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst sollte der „Primary Scan“ Aufschluss über die, an der Akkumulation beteiligten Hauptfaktoren geben. Der „Secondary Scan“ diente dann der Aufschlüsselung weiterer Faktoren, die innerhalb bestimmter Gruppen für eine Varianz im Phänotyp sorgten und von den Einflüssen der Maxima im „Primary Scan“ möglicherweise überschattet wurden. Eine mögliche Gruppierung war die Sortierung der Stämme nach dem *pfcrt*-Allel, also eine Unterteilung in CQR- bzw. CQS-Stämme. Eine andere Möglichkeit war die Gruppierung nach dem B5M12-Allel. Die mathematische Analyse einzelner Loki sollte mögliche Interaktionen aufdecken.

In diesem Projekt konnte *pfcrt* mit der Chloroquin-Akkumulation assoziiert werden. Die Akkumulationsmessungen und die darauf basierende QTL-Analyse ergaben im „Primary Scan“ einen einzigen Lokus auf Chromosom 7, der an der Akkumulation beteiligt war und mit *pfcrt* übereinstimmte (Abb. 3.3.1.). Mit einem „LOD-Score“ von 19,08 bei der vierminütigen Akkumulation und 23,53 nach einer Akkumulation von 15 min, war die Assoziation von *pfcrt* eindeutig. Es erreichte kein weiteres Maximum im „Primary Scan“ die Signifikanzgrenze mit einem „LOD-Score“ von zwei. Seitdem Polymorphismen in PfCRT mit Chloroquin-Resistenz in Verbindung gebracht worden sind (Fidock *et al.*, 2000; Djimde *et al.*, 2001; Cooper *et al.*, 2002; Sidhu *et al.*, 2002; Lakshmanan *et al.*, 2005), besteht die Frage, wie genau PfCRT die Resistenz vermittelt. PfCRT gehört zu den „drug/metabolite“ Transportern (Tran *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2004), zu denen auch „Carrier“ zählen, die schwache Basen und/oder zweiwertige organische Kationen im Symport oder Antiport über die Membran transportieren. Es gibt einige Hinweise, dass PfCRT als aktiver „Efflux-Carrier“ Chloroquin aus der Nahrungsvakuole pumpt (Fidock *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Naude *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2005). So konnte durch Trans-Stimulations-Kinetiken, bei denen die Zellen vorher mit Chloroquin beladen wurden, die Aufnahme von weiterem Chloroquin aus dem externen Medium in CQR-Parasiten auf das maximale Niveau stimuliert werden (Sanchez *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2005). „Carrier“ können trans-stimuliert werden, während Kanäle darauf nicht reagieren, sondern durch gegenläufige Bewegungen eher noch blockiert werden (Sanchez *et al.*, 2007a). Andere Meinungen vertreten die Ansicht, dass in CQR-Parasiten PfCRT als spannungsgesteuerter Kanal die passive Diffusion von protoniertem Chloroquin entlang seines Konzentrationsgradienten erleichtert (Warhurst *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Bray *et al.*, 2006). Ob PfCRT ein Kanal oder ein „Carrier“ ist, bleibt unklar.

Weiterhin wurde in diesem Projekt die Chinidin-Akkumulation auf mögliche QTL untersucht. Die QTL-Analyse der Akkumulation in der Anfangsphase wies insgesamt vier Maxima auf, die mit einer veränderten Chinidin-Akkumulation assoziiert werden konnten. Damit bestätigten sie die nach den Akkumulationsdaten gemachte Aussage, dass mehrere Loki an der Chinidin-Akkumulation mitwirken. Die Hauptfaktoren bildeten die beiden Loki von *pfcrt* und der schon von Nurhasanah erwähnte B5M12-Lokus. Die zwei weiteren Maxima waren auf Chromosom 6 und 13 lokalisiert und wurden mit Pf12 und POLY3 bezeichnet. Beide erreichten nur knapp die Signifikanzgrenze, weshalb sie eher nur zu einem geringen Teil an der veränderten Chinidin-Akkumulation beteiligt waren. Das Maximum auf Chromosom 13 (107,3 cM) konnte nicht mit *pfnhe* assoziiert werden, da es in einiger Entfernung von dem von Ferdig *et al.* als C13M56 (178,8 cM) bezeichneten *pfnhe*-Lokus gelegen ist (Ferdig *et al.*, 2004). Zwischen dem POLY3- und dem C13M56-Marker liegen 36 weitere Marker. Die von Nurhasanah durchgeführte Reanalyse der IC_{90}-Daten ergab ein Doppelmaximum (VAPA- und C13M73-Marker) auf Chromosom 13 mit *pfnhe* im Sattelpunkt (Nurhasanah, 2009) an Stelle nur eines Maximums, wie es Ferdig *et al.* beschrieben haben. Beide Maxima waren funktionell getrennt, da beide Loki unterschiedlich auf Verapamil reagierten. Trotzdem konnte *pfnhe* als Kandidatengen nicht ausgeschlossen werden, da in weitern Studien DNNND-Wiederholungssequenzpolymorphismen in *pfnhe* mit Chinin-Resistenz assoziiert werden konnten (Ferdig *et al.*, 2004; Bennett *et al.*, 2007; Nkrumah *et al.*, 2009).

Die beiden, in der Chinidin QTL-Analyse gefundenen Hauptmaxima B5M12 und *pfcrt* haben zu einer verminderten Chinidin-Akkumulation beigetragen, da sie jeweils negative Regressionskoeffizienten besitzen (Tabelle 3.3.1.). Die mathematische Analyse der Maxima ergab, dass die beiden Loki synergistisch interagieren. Nur wenn beide Genorte von Dd2 abstammten, verringerte sich die Akkumulation auf einen mit Dd2 vergleichbaren Wert ohne statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 3.4.1.). Während Dd2 90 ± 7 fach Chinidin akkumulierte, nahmen die 14 Stämme mit *pfcrt*- und B5M12-Allel von Dd2 100 ± 3 fach Chinidin auf. Diesen Effekt konnte auch Nurhasanah in der Chinin-Akkumulationsstudie zeigen (Nurhasanah, 2009). Die synergistische Interaktion von *pfcrt* und B5M12 könnte erklären, dass einige Stämme, trotz mutiertem *pfcrt*, viel Chinidin akkumulierten, obwohl sie das *pfcrt*-Allel von Dd2 tragen (Tabelle 4.1.1.).

Tabelle 4.1.1.: Genetischer Hintergrund und Akkumulationswerte einiger ausgesuchter Stämme
D = Polymorphismus stammt von Dd2; H = Polymorphismus stammt von HB3; Der Standardfehler (SEM) ist jeweils hinter dem Akkumulationswert angegeben.

Stamm	*pfcrt*	B5M12	QD_{in}/QD_{out}
HB3	H	H	142 ± 4
Dd2	D	D	90 ± 7
D43	D	H	137 ± 9
7C111	D	H	132 ± 5
TC05	D	H	130 ± 7

Auch in Studien mit Chinin, in denen Austauschmutanten mit *pfcrt*-Allel von Dd2 im F1-Nachkommen GC03 (*pfcrt* und B5M12 von HB3) generiert wurden, waren die Mutanten weiterhin empfindlich gegenüber Chinin (Sidhu *et al.*, 2002). In dieser Studie wurden auch Chinidin IC_{50}-Werte bestimmt. Hier konnte sogar keinerlei Veränderungen in der Suszeptibilität gegenüber GC03 festgestellt werden, trotz *pfcrt*-Allel von Dd2. In einer Studie von Sanchez *et al.* bei der selbige Austauschmutanten in Bezug auf die Chinin-Akkumulation untersucht wurden, konnte, trotz mutiertem *pfcrt*-Allel, die Akkumulation nicht auf den Wert der Dd2-Akkumulation reduziert werden (Sanchez *et al.*, 2008b). Diese Ergebnisse können damit erklärt werden, dass der B5M12-Lokus weiterhin von HB3 stammte. Nur wenn beide Loki von Dd2 stammen, können diese auch für eine statistisch signifikante Reduktion sorgen.
Die zwei weiteren Maxima im „Primary Scan“, Pf12 auf Chromosom 6 und POLY3 auf Chromosom 13, zeigten nur einen Einfluss, wenn sie mutiert waren und trugen zu einer verringerten Akkumulation bei. Dabei mussten Pf12 und B5M12 mutiert sein, damit Pf12 die Akkumulation verringerte (Abb. 3.4.4.B). Im Test mit *pfcrt* zeigte sich hingegen, dass es generell keinen signifikanten Einfluss hatte (Abb. 3.4.4.A). Mutiertes POLY3 verringerte die Akkumulation im Test, wenn *pfcrt* und auch B5M12 von Dd2 abstammten (Abb. 3.4.3.A und B). Sowohl Pf12 als auch POLY3 wurden in der Chinin QTL-Analyse von Nurhasanah weder im „Primary Scan“ noch im „Secondary Scan“ detektiert (Nurhasanah, 2009). Der Pf12-Lokus erreicht im „Primary Scan“ der 25minütigen Chinidin-Akkumulation nicht die Signifikanzgrenze. Möglicherweise ist dieser QTL falsch positiv. POLY3 könnte dennoch mit stereospezifischen Unterschieden beider Medikamente erklärt werden.
Ein „Secondary Scan“ der Chloroquin-Akkumulationsdaten auf Basis der CQS-Stämme ergab nur ein Maximum, das auf Chromosom 14 liegt. Dieser mit TPI bezeichnete Lokus und mit negativem Korrelationskoeffizienten verringert die Chloroquin-Akkumulation in Wiltyp *pfcrt*-Stämmen signifikant, wenn TPI mutiert ist (Abb. 3.4.6.). Sanchez *et al.* haben in einer Studie

gezeigt, dass auch CQS-Parasiten einen „Carrier“ besitzen, der Chloroquin aus der Zelle schleußen kann (Sanchez *et al.*, 2007a). Dieser „Carrier“ hat allerdings andere Transporteigenschaften als der „Carrier“ in CQR-Parasiten, da beide unterschiedliche Kinetiken aufweisen. Ist dies möglicherweise nicht PfCRT, sondern ein anderes Protein, das sich im TPI-Lokus befindet und so für eine Chloroquin-Reduktion in CQS-Stämmen sorgt? Diese Frage muss in dieser Arbeit offen bleiben.

Die Untersuchung der Chinidin-Akkumulationsdaten auf weitere QTL im „Secondary Scan“ ergab mehrere Maxima, nachdem der Effekt des *pfcrt*-Lokus aus der Analyse und mit ihm die Überschattung kleinerer Effekte entfernt wurde. Sowohl in der QTL-Analyse der CQR-Stämme, als auch in der Analyse der CQS-Stämme, traten jeweils drei Maxima auf (Abb. 3.3.4.A und B).

B5M12 hat den höchsten „LOD-Score“ mit einem Wert von 3,28 und negativer Korrelation. Dieser Lokus verringerte die Akkumulation in den CQR-Stämmen signifikant, wenn es mutiert war (Abb. 3.4.2.) und bestätigte den „Primary Scan“, wo dieses Maximum neben dem *pfcrt*-Lokus auftritt (Abb. 3.3.2.). B5M12 erschien auch im „Secondary Scan“ von Nurhasanah, basierend auf den Chinin-Akkumulationsdaten der CQR-Stämme.

Ein weiters Maximum im „Secondary Scan“ der CQR-Stämme ist MEF_1 (Abb. 3.3.4.A). Es trat ebenfalls in der Chinin-Analyse auf und verringerte die Akkumulation, wenn es selbst und auch *pfcrt* von Dd2 abstammte, was für alle CQR-Stämme zutrifft.

Das dritte Maximum, das im „Secondary Scan“ der Chinidin QTL-Analyse basierend auf den CQR-Stämmen auftrat, ist der MDR1-Lokus auf Chromosom 5 mit einem „LOD-Score“ von 2,71 (Abb. 3.3.4.A). Interessanterweise trägt der Dd2-Typ MDR1-Lokus zu einer Erhöhung der Chinidin-Akkumulation in den CQR-Stämmen bei und interagiert synergistisch mit *pfcrt*. PfMDR1 wird oft mit einer veränderten Suszeptibilität gegenüber verschiedenen Antimalariamitteln in Zusammenhang gebracht (Cowman *et al.*, 1994; Reed *et al.*, 2000; Duraisingh *et al.*, 2005) und fungiert eventuell auch als Modulator im CQR-Phänotyp (Reed *et al.*, 2000). PfMDR1 befindet sich in der Nahrungsvakuolenmembran (Cowman *et al.*, 1991) mit seinen Nukleotidbindedomänen im Zytoplasma (Karcz *et al.*, 1993). Eine Studie von Rohrbach *et al.* stellte eine Assoziation der subzellulären Verteilung des Fluorochroms Fluo-4 und bestimmten Mutationen in PfMDR1 her, mit dem Ergebnis, dass bestimmte PfMDR1-Varianten gelöste Substanzen, darunter auch einige Antimalariamittel, in die Nahrungsvakuole transportieren können (Rohrbach *et al.*, 2006). Sanchez *et al.* zeigten in *pfmdr1*-exprimierende *Xenopus laevis* Oozyten, dass polymorphe Varianten dieses Gens, Substanzen unterschiedlich transportieren können, darunter auch die Antimalariamittel

Halofantrin, Chloroquin und Chinin. Allerdings konnte in dieser Studie unter denselben Bedingungen kein Transport von Chinidin über die Membran gezeigt werden (Sanchez *et al.*, 2008a). Auch Unterschiede in der Amplifikation wird mit einer veränderten *in vitro* Suszeptibilität von Chinin und anderen Antimalariamitteln in Verbindung gebracht (Reed *et al.*, 2000; Sidhu *et al.*, 2005). Die Dd2-Version von PfMDR1 scheint also Chinin und nach dieser Studie auch Chinidin in die Nahrungsvakuole transportieren zu können, was mit einer gesteigerten Sensitivität dieser Medikamente einhergeht. Nurhasanah lokalisierte ebenfalls ein Maximum auf Chromosom 5. Dieses Maximum kolokalisierte nicht direkt mit MDR1, liegt allerding in unmittelbarer Nachbarschaft. Während MDR1 in einer genetischen Distanz von 65,9 cM auf Chromosom 5 liegt, befindet sich der von Nurhasanah gefundene B5M86-Lokus bei 60,2 cM. Trotzdem schloss sie eine Beteiligung von PfMDR1 nicht aus (Nurhasanah, 2009).

Ein vierter von Nurhasanah beschriebener Lokus, B7M99 auf Chromosom 11, wurde in der Chinidin QTL-Analyse, basierend auf den CQR-Stämmen, nicht detektiert (Abb. 3.3.4.A). Möglicherweise spielt hier die Sterospezifität beider Medikamente eine Rolle.

Im „Secondary Scan“ der Chinidin-Akkumulation basierend auf den CQS-Stämmen, tritt TPI interessanterweise ebenfalls auf (Abb. 3.3.4.B) und scheint damit nicht nur die Chloroquin-Akkumulation in den CQS-Stämmen zu beeinflussen, sonder auch die Chinidin-Akkumulation in den Stämmen mit *pfcrt* von HB3. Auch hier verringert TPI die Akkumulation, wenn es mutiert ist und interagiert synergistisch mit Wildtyp *pfcrt* (Abb. 3.4.6.C). Nurhasanah konnte diesen Lokus in der Chinin QTL-Analyse nicht nachweisen. Ein erneutes Betrachten der Daten zeigte jedoch, dass TPI mit einem „LOD-Score“ von 1,85 die Signifikanzgrenze nur knapp verfehlte und dieses Maximum das zweithöchste des „Secondary Scans“ basierend auf den CQS-Stämmen war. Möglicherweise hat es somit auch einen Einfluss auf die Chinin-Akkumulation.

Sowohl im „Secondary Scan“ der QTL-Analyse der Chinin-Akkumulation von Nurhasanah als auch in der QTL-Analyse der Chinidin-Akkumulation gab es ein weiteres Maximum auf Chromosom 5, C5M2, das nicht dem MDR1-Lokus entspricht (Nurhasanah, 2009). Während C5M2 bei 20 cM liegt, ist die Position von MDR1 bei 65,9 cM. In beiden Fällen erhöht mutiertes C5M2 in den Stämmen mit Wildtyp *pfcrt*-Allel signifikant die Akkumulation durch synergistische Interaktion mit Wildtyp *pfcrt* (Abb. 3.4.6.A).

Das dritte Maximum ist C9M43 auf Chromosom 9 (Abb. 3.3.4.B), das knapp die Signifikanzgrenze erreichte. Auch dieser Lokus hatte nur Auswirkungen auf die Akkumulation in Stämmen mit *pfcrt*-Allel von HB3 und erhöhte in dieser Gruppe durch

synergistische Interaktion mit *pfcrt* die Akkumulation signifikant, wenn C9M43 ebenfalls von HB3 abstammte (Abb. 3.4.6.B). Die Chinin-Akkumulation wies an diesem Genort kein Maximum auf (Nurhasanah, 2009). Stereospezifische Unterschiede könnten hierfür abermals die Gründe sein.

Die Gruppierung im „Secondary Scan“ nach der Herkunft des B5M12-Allels ergab für die Gruppe der Stämme mit B5M12-Allel von HB3 kein Maximum (Abb. 3.3.5.B). Der „Secondary Scan“ der Gruppe mit B5M12-Allel von Dd2 wies zwei Maxima auf. Das Maximum auf Chromosom 6 zeigte den auch im „Primary Scan“ vorkommenden Pf12-Lokus. Ebenfalls schon im „Primary Scan“ aufgetreten war der zweite Lokus, *pfcrt*, auf Chromosom 7.

Die mathematische Analyse des Pf12-Lokus ergab, dass Pf12 im Hinblick auf *pfcrt* keinen signifikanten Beitrag zur Akkumulation leistet, aber im Zusammenhang sorgt mutiertes Pf12 in Stämmen mit B5M12 von Dd2 für eine Reduktion der Akkumulation (Abb. 3.4.4.A und B). Dieser Lokus ist der Einzige, der nur einen synergistischen Effekt mit B5M12, aber nicht mit *pfcrt* zeigte und wie zu erwarten, tauchte er im „Secondary Scan“ der Stämme mit B5M12-Allel von Dd2 wieder auf.

Wie erwartet war *pfcrt* in der Gruppe der Stämme mit B5M12-Allel von Dd2 wieder erschien, da die mathematische Analyse eine synergistische Interaktion von Dd2-Typ-B5M12 und mutiertem *pfcrt* ergab.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Unterschiede in der initiale Chloroquin-Akkumulation hauptsächlich mit Variationen im *pfcrt*-Gen erklärt werden können. Die QTL-Analyse ergab lediglich einen weiteren Faktor im „Secondary Scan“, TPI auf Chromosom 14, der für eine Reduktion der Akkumulation in den Stämmen mit Wildtyp *pfcrt* sorgte, wenn dieser Lokus von Dd2 abstammte.

Die Diffenenzen der initialen Chinidin-Akkumulationen in den verschiedenen Stämmen sind weitaus komplexer und werden von mehreren genetischen Faktoren kontrolliert. Die zwei Hauptfaktoren, *pfcrt* und B5M12, stimmen mit den beiden Hauptfaktoren der Chinin-Akkumulation von Nurhasanah überein. Zusätzlich zu diesen sind zwei weitere Faktoren im „Primary Scan“ der Chinidin-Analyse aufgetreten. Diese haben zwar einen niedrigen „LOD-Score“ und damit einen geringeren Effekt, sind aber möglicherweise für stereospezifische Unterschiede in der Akkumulation verantwortlich.

Die „Secondary Scans“, die separat in CQR- und CQS-Stämmen durchgeführt wurden, deckten weitere Faktoren auf, die zu kleineren Unterschieden innerhalb der Gruppen führten. Einige dieser Maxima waren auch in der Analyse der Chinin-Akkumulation von Nurhasanah

aufgetreten, andere wiederum entweder in der Chinin QTL-Analyse oder in der Analyse der Chinidin-Akkumulation. Diese kleinen und feinen Unterschiede sind möglicherweise mit stereospezifischen Unterschieden dieser beiden Diastereomere zu erklären.

4.2. Bioinformatische Untersuchung und Einschränkung des B5M12-Lokus

Trotz einer detallierten bioinformatischen Analyse des B5M12-Lokus und Einschränkung des Lokus durch die nahezu exakte Bestimmung der „Crossing-over"-Regionen konnte bisher noch kein Kandidatengen identifiziert werden, das als möglicher Faktor bei der Akkumulation mitwirkt. Die Kandidatengenanzahl konnte dennoch von ursprüglich 36 Genen auf 25 Kandidaten reduziert werden. Als Kandidatengen konnten eindeutig solche Gene ausgeschlossen werden, die keinerlei Sequenzunterschiede zwischen der HB3- und der Dd2-Sequenz aufwiesen, da Polymorphismen in Form von SNPs oder RFLPs schon seit langem mit einer veränderten *in vitro* Suszeptibilität in Verbindung gebracht werden. Auch die durch PfCRT vermittelte Chloroquin-Resistenz ist hauptsächlich einer Mutation der Aminosäure 76 zuzuschreiben (Fidock *et al.*, 2000).

Änderungen in der Amplifikation eines Gens konnten generell nicht berücksichtigt werden, da dies weitere Versuche erfordert hätte. Sie müssen aber weiterhin in Erwägung gezogen werden, da z.B. unterschiedliche Kopienzahl des *pfmdr1*-Gens mit einer verminderten *in vitro* Suszeptibilität von Chinin und anderen Antimalariamitteln assoziiert werden (Price *et al.*, 2004; Reed *et al.*, 2000; Sidhu *et al.*, 2005; Sidhu *et al.*, 2006). Durch das Eliminieren einer von zwei *pfmdr1*-Kopien konnten Sidhu *et al.* eine erhöhte Mefloquin-, Lumefantrin-, Halofantrin-, Artemisinin- und Chinin-Suszeptibilität zeigen (Sidhu *et al.*, 2006).

Der Lokus hatte vor der Eingrenzung eine Größe von 193 kbp mit insgesamt 36 offenen Leserahmen (Tabelle 3.5.1.), die in PlasmoDB und in NCBI annotiert sind. Vier Gene, die t-RNAs kodieren, konnten von der Suche ausgeschlossen werden, sowie drei weitere Gene, die keine Polymorphismen zwischen der HB3- und der Dd2-Sequenz aufwiesen. Somit lagen noch immer 29 Kandidatengene auf diesem Chromosomenabschnitt.

Durch das Auffinden 15 neuer Marker, allesamt Längenpolymorphismen zwischen der HB3 und der Dd2-Sequenz, konnten die beiden „Crossing-over"-Bereiche auf eine 162 kbp Region eingeschränkt werden (Abb. 3.6.1.). Dies entspricht einer Reduktion um 31 kbp, also knapp einem Sechstel der Urspungsregion (Abb. 3.6.1.). Trotzdem verblieben hiernach 25

Kandidatengene im B5M12-Lokus, was noch immer rund zweidrittel aller Gene im Bereich des Maximums entspricht.

Von Interesse waren besonders Gene mit TMDs. Acht der 25 Gene hatten ein oder mehrere vorhergesagte TMDs. Polymorphismen in Transportern oder Membrankanälen könnten zu einer veränderten Chinidin-Akkumulation beitragen.

Da die mathematische Analyse einen Synergieeffekt zwischen PfCRT und dem Faktor im B5M12-Lokus vorhersagte, wäre eine direkte Interaktion zwischen PfCRT und dem unbekannten Protein denkbar. Enzyme, die posttranslational Proteine modifizieren, könnten eine Änderung an PfCRT bewirken, die beispielsweise eine Signalkaskade auslösen oder den Abbau von PfCRT einleiten. So könnte eine Ubiquitinierung von PfCRT die Degradation beeinflussen. Von Interesse wäre hierbei die Ubiquitin-Transferase (MAL7P1.19). Die Serin/Threonin Proteinkinase (MAL7P1.18) könnte durch die Phosphorylierung PfCRTs einen Einfluß auf die Signaltransduktion ausüben. Auch eine AAA Familie ATPase ist unter den Kandidatengenen (MAL7P1.209). Diese sind laut ihres Namens mit diversen zellulären Aktivitäten assoziiert, wie der Proteindegradation, Signaltransduktion und der Genexpressionsregulation.

4.3. Einfluss von PfNHE auf die Akkumulation

Der Mikrosatellitenlängenpolymorphismus ms4760-1 in PfNHE auf Chromosom 13 wurde in einigen Studien mit einer veränderten Chinin-Sensitivität assoziiert (Ferdig *et al.*, 2004; Bennett *et al.*, 2007; Nkrumah *et al.*, 2009).

Um auch den Einfluss von PfNHE auf die initiale Akkumulation zu bestimmen, wurde die [^{3}H]-Chloroquin-, [^{3}H]-Chinidin- und die [^{3}H]-Chinin-Aufnahme in drei *pfnhe*-Austauschmutanten bestimmt. In einer Studie von Nkrumah *et al.* konnten selbige Austauschmutanten mit veränderten Chinin IC_{50}-Werten assoziiert werden (Abb. 7.2.; Nkrumah *et al.*, 2009). In dieser Arbeit konnte allerdings weder ein statistisch signifikanter Unterschied in der Chloroquin-, noch in der Chinidin- oder der Chinin-Akkumulation zwischen Austauschmutanten und Ausgangsstämmen gezeigt werden (Abb. 3.7.1.). In frühen Transportprozessen dieser Antimalariamittel scheint somit PfNHE keine Rolle zu spielen.

4.4. Ausblick

Obwohl in dieser Arbeit einige chromosomale Abschnitte, die mit einer veränderten Chinidin-Akkumulation einhergehen, aufgedeckt werden konnten, müssen diese Loki dennoch Gen für Gen nach den möglichen Kandidaten untersucht werden, um den genauen Akkumulationsmechanismus zu enträtseln. Ein Problem, was hierbei zunächst gelöst werden muss, ist die vollständige Sequenzierung der beiden Parentalstämme HB3 und Dd2, um Differenzen zwischen den beiden Genomsequenzen zu entschlüsseln. Die beiden Hauptfaktoren der Akkumulation sind PfCRT und ein weiterer Faktor auf Chromosom 7, der im B5M12-Lokus liegt. Beide Faktoren interagieren synergistisch. Alle weiteren, an der Akkumulation beteiligten Faktoren, scheinen entweder mit PfCRT oder mit dem im B5M12-Lokus befindlichen Faktor zu interagieren. Ob diese Faktoren auch untereinander wechselwirken, muss in weiteren mathematischen Analysen Lokus für Lokus untersucht werden. Polymorphismenstudien in anderen Laborstämmen und Feldisolaten sollten zum Vergleich herangezogen werden, um diese mit den Polymorphismen in HB3 und Dd2 zu assoziieren. Auch die Untersuchung möglicher Amplifikationsunterschieden sollte in Erwägung gezogen und Unterschiede in den Promotorregionen oder regulatorischen Elementen überprüft werden. Die Etablierung stabiler Transfektanten für die funktionelle Analyse der Kandidatengene sollte weiteren Aufschluss liefern. Auch die Expression der membranständigen Kandidatengene im *Xenopus laevis* Oozytensystem sollte Hinweise zu möglichen Funktionen und Aktivitäten der Proteine liefern.

Somit waren diese Arbeiten nur der Anfang eines weitgreifenden Projektes mit vielen Möglichkeiten zur Enträtselung des Mechanismus der Chinidin-Akkumulation.

5. Literaturverzeichnis

Ackerman, H., Usen, S., Jallow, M., Sisay-Joof, F., Pinder, M. and Kwiatkowski, D.P. (2005). A comparison of case-control and family-based association methods: the example of sickle-cell and malaria. *Ann Hum Genet* **69,** 559-565.

Allison, A.C. (1954). Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malareal infection. *Br Med J* **1,** 290-294.

Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F. and Menard, R. (2006). Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med* **12,** 220-224.

Anderson, T.J., Su, X.Z., Bockarie, M., Lagog, M. and Day, K.P. (1999). Twelve microsatellite markers for characterization of Plasmodium falciparum from finger-prick blood samples. *Parasitology* **119 (Pt 2),** 113-125.

Ball, E.G., Mc, K.R. and et al. (1948). Studies on malarial parasites; chemical and metabolic changes during growth and multiplication in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **175,** 547-571.

Baruch, D.I. (1999). Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. *Best Practice & Research Clinical Haematology* **12,** 747-761.

Baruch, D.I., Gormely, J.A., Ma, C., Howard, R.J. and Pasloske, B.L. (1996). Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93,** 3497-3502.

BayerAG (1988) Meilensteine Leverkusen, Bayer AG.

Bennett, T.N., Patel, J., Ferdig, M.T. and Roepe, P.D. (2007). Plasmodium falciparum Na+/H+ exchanger activity and quinine resistance. *Mol Biochem Parasitol* **153,** 48-58.

Berendt, A.R., Ferguson, D.J., Gardner, J., Turner, G., Rowe, A., McCormick, C.*, et al.* (1994). Molecular mechanisms of sequestration in malaria. *Parasitology* **108 Suppl,** S19-28.

Bloland, P.B. (2001) Drug resistance in malaria, WHO.

Boyer, P.D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* **66,** 717-749.

Bray, P.G., Martin, R.E., Tilley, L., Ward, S.A., Kirk, K. and Fidock, D.A. (2005). Defining the role of PfCRT in Plasmodium falciparum chloroquine resistance. *Mol Microbiol* **56,** 323-333.

Bray, P.G., Mungthin, M., Hastings, I.M., Biagini, G.A., Saidu, D.K., Lakshmanan, V., *et al.* (2006). PfCRT and the trans-vacuolar proton electrochemical gradient: regulating the access of chloroquine to ferriprotoporphyrin IX. *Molecular Microbiology* **62,** 238-251.

BROAD. (2009). [WWW document]. URL http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/plasmodium_falciparum_spp/MultiHome.html

Busch, W. and Saier, M.H. (2002). The Transporter Classification (TC) System, 2002. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **37,** 287 - 337.

CBS. (2007). [WWW document]. URL http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/

Chevli, R. and Fitch, C.D. (1982). The antimalarial drug mefloquine binds to membrane phospholipids. *Antimicrob Agents Chemother* **21,** 581-586.

Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., Pattanapanyasat, K., Chierakul, W., Simpson, J., Looareesuwan, S. and White, N. (2002). Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe P falciparum malaria. *Blood* **100,** 1172-1176.

Clark, I.A. and Chaudhri, G. (1988). Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol* **70,** 99-103.

Cogswell, F.B. (1992). The hypnozoite and relapse in primate malaria. *Clin Microbiol Rev* **5,** 26-35.

Cooper, R.A., Ferdig, M.T., Su, X.Z., Ursos, L.M., Mu, J., Nomura, T., *et al.* (2002). 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,** 35-42.

Cooper, R.A., Hartwig, C.L. and Ferdig, M.T. (2005). pfcrt is more than the Plasmodium falciparum chloroquine resistance gene: a functional and evolutionary perspective. *Acta Trop* **94,** 170-180.

Cooper, R.A., Lane, K.D., Deng, B., Mu, J., Patel, J.J., Wellems, T.E., *et al.* (2007). Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine. *Molecular Microbiology* **63,** 270-282.

Cowman, A.F., Galatis, D. and Thompson, J.K. (1994). Selection for mefloquine resistance in Plasmodium falciparum is linked to amplification of the pfmdr1 gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91,** 1143-1147.

Cowman, A.F., Karcz, S., Galatis, D. and Culvenor, J.G. (1991). A P-glycoprotein homologue of Plasmodium falciparum is localized on the digestive vacuole. *J. Cell Biol.* **113,** 1033-1042.

Dahl, E.L., Shock, J.L., Shenai, B.R., Gut, J., DeRisi, J.L. and Rosenthal, P.J. (2006). Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother* **50,** 3124-3131.

Danquah, I. and Mockenhaupt, F.P. (2008). Alpha(+)-thalassaemia and malarial anaemia. *Trends Parasitol* **24,** 479-481.

de Villiers, K.A., Marques, H.M. and Egan, T.J. (2008). The crystal structure of halofantrine-ferriprotoporphyrin IX and the mechanism of action of arylmethanol antimalarials. *Journal of Inorganic Biochemistry* **102,** 1660-1667.

Djimde, A., Doumbo, O.K., Cortese, J.F., Kayentao, K., Doumbo, S., Diourte, Y.*, et al.* (2001). A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med* **344,** 257-263.

Duraisingh, M.T. and Cowman, A.F. (2005). Contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop* **94,** 181-190.

Duraisingh, M.T., Jones, P., Sambou, I., von Seidlein, L., Pinder, M. and Warhurst, D.C. (2000). The tyrosine-86 allele of the pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol* **108,** 13-23.

Dutta, P. and Fitch, C.D. (1983). Diverse membrane-active agents modify the hemolytic response to ferriprotoporphyrin IX. *J Pharmacol Exp Ther* **225,** 729-734.

Eckstein-Ludwig, U., Webb, R.J., Van Goethem, I.D., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M.*, et al.* (2003). Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature* **424,** 957-961.

Egan, T.J., Combrinck, J.M., Egan, J., Hearne, G.R., Marques, H.M., Ntenteni, S.*, et al.* (2002). Fate of haem iron in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Biochem J* **365,** 343-347.

Eisenberg, D. (1984). Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu Rev Biochem* **53,** 595-623.

Ejigiri, I. and Sinnis, P. (2009). Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Curr Opin Microbiol*.

Elliott, D.A., McIntosh, M.T., Hosgood, H.D., 3rd, Chen, S., Zhang, G., Baevova, P. and Joiner, K.A. (2008). Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105,** 2463-2468.

EMBNet. (2008). [WWW document]. URL http://www.ch.embnet.org/software/bBLAST.html

Ersmark, K., Samuelsson, B. and Hallberg, A. (2006). Plasmepsins as potential targets for new antimalarial therapy. *Medicinal Research Reviews* **26,** 626-666.

ExPASy. (2009). [WWW document]. URL http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl

Farber, P.M., Arscott, L.D., Williams, C.H., Jr., Becker, K. and Schirmer, R.H. (1998). Recombinant Plasmodium falciparum glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue. *FEBS Lett* **422,** 311-314.

Feng, Z., Smith, D.L., McKenzie, F.E. and Levin, S.A. (2004). Coupling ecology and evolution: malaria and the S-gene across time scales. *Math Biosci* **189,** 1-19.

Ferdig, M.T., Cooper, R.A., Mu, J., Deng, B., Joy, D.A., Su, X.Z. and Wellems, T.E. (2004). Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Mol Microbiol* **52,** 985-997.

Fichera, M.E. and Roos, D.S. (1997). A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* **390,** 407-409.

Fidock, D.A., Nomura, T., Talley, A.K., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T*., et al.* (2000). Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* **6,** 861-871.

Fischer, K., Horrocks, P., Preuss, M., Wiesner, J., Wunsch, S., Camargo, A.A. and Lanzer, M. (1997). Expression of var genes located within polymorphic subtelomeric domains of Plasmodium falciparum chromosomes. *Mol Cell Biol* **17,** 3679-3686.

Fitch, C.D. (2004). Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci* **74,** 1957-1972.

Fitch, C.D., Cai, G.Z., Chen, Y.F. and Ryerse, J.S. (2003a). Relationship of chloroquine-induced redistribution of a neutral aminopeptidase to hemoglobin accumulation in malaria parasites. *Arch Biochem Biophys* **410,** 296-306.

Fitch, C.D., Cai, G.Z., Chen, Y.F. and Shoemaker, J.D. (1999). Involvement of lipids in ferriprotoporphyrin IX polymerization in malaria. *Biochim Biophys Acta* **1454,** 31-37.

Fitch, C.D., Cai, G.Z. and Shoemaker, J.D. (2000). A role for linoleic acid in erythrocytes infected with Plasmodium berghei. *Biochim Biophys Acta* **1535,** 45-49.

Fitch, C.D., Chen, Y.F. and Cai, G.Z. (2003b). Chloroquine-induced masking of a lipid that promotes ferriprotoporphyrin IX dimerization in malaria. *J Biol Chem* **278,** 22596-22599.

Fitch, C.D. and Chou, A.C. (1997). Regulation of heme polymerizing activity and the antimalarial action of chloroquine. *Antimicrob Agents Chemother* **41,** 2461-2465.

Flint, J., Harding, R.M., Boyce, A.J. and Clegg, J.B. (1998). The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol* **11,** 1-51.

Fowkes, F.J., Allen, S.J., Allen, A., Alpers, M.P., Weatherall, D.J. and Day, K.P. (2008). Increased microerythrocyte count in homozygous alpha(+)-thalassaemia contributes to protection against severe malarial anaemia. *PLoS Med* **5,** e56.

Fry, M. and Pudney, M. (1992). Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol* **43,** 1545-1553.

Ghosh, A., Edwards, M.J. and Jacobs-Lorena, M. (2000). The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitol Today* **16,** 196-201.

Ghosh, A.K., Devenport, M., Jethwaney, D., Kalume, D.E., Pandey, A., Anderson, V.E*., et al.* (2009). Malaria parasite invasion of the mosquito salivary gland requires interaction between the Plasmodium TRAP and the Anopheles saglin proteins. *PLoS Pathog* **5,** e1000265.

Gilles, H.M., Fletcher, K.A., Hendrickse, R.G., Lindner, R., Reddy, S. and Allan, N. (1967). Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, sickling, and malaria in African children in South Western Nigeria. *Lancet* **1,** 138-140.

Gligorijevic, B., McAllister, R., Urbach, J.S. and Roepe, P.D. (2006). Spinning disk confocal microscopy of live, intraerythrocytic malarial parasites. 1. Quantification of hemozoin development for drug sensitive versus resistant malaria. *Biochemistry* **45,** 12400-12410.

Goldberg, D.E. (2005). Hemoglobin degradation. *Curr Top Microbiol Immunol* **295,** 275-291.

Guttmann, P. and Ehrlich, P. (1891). Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berlin Klin. Wochenschr.* **28,** 953-956.

Haley, C.S. and Knott, S.A. (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* **69,** 315-324.

Hedrick, P. (2004). Estimation of relative fitnesses from relative risk data and the predicted future of haemoglobin alleles S and C. *J Evol Biol* **17,** 221-224.

Hempelmann, E., Motta, C., Hughes, R., Ward, S.A. and Bray, P.G. (2003). Plasmodium falciparum: sacrificing membrane to grow crystals? *Trends Parasitol* **19,** 23-26.

Hernandez-Rivas, R., Mattei, D., Sterkers, Y., Peterson, D.S., Wellems, T.E. and Scherf, A. (1997). Expressed var genes are found in Plasmodium falciparum subtelomeric regions. *Mol Cell Biol* **17,** 604-611.

Hien, T.T. and White, N.J. (1993). Qinghaosu. *Lancet* **341,** 603-608.

Higgins, C.F. (2007). Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **446,** 749-757.

Hyde, J.E. (2005). Exploring the folate pathway in Plasmodium falciparum. *Acta Trop* **94,** 191-206.

Hyde, J.E. (2007). Drug-resistant malaria- an insight. *FEBS Journal* **274,** 4688-4698.

Iyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E.V. and Aravind, L. (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol* **146,** 11-31.

Jani, D., Nagarkatti, R., Beatty, W., Angel, R., Slebodnick, C., Andersen, J., *et al.* (2008). HDP-a novel heme detoxification protein from the malaria parasite. *PLoS Pathog* **4,** e1000053.

Jelinek, T., Schelbert, P., Loscher, T. and Eichenlaub, D. (1995). Quinine resistant falciparum malaria acquired in east Africa. *Trop Med Parasitol* **46,** 38-40.

Jin, Y., Kebaier, C. and Vanderberg, J. (2007). Direct microscopic quantification of dynamics of Plasmodium berghei sporozoite transmission from mosquitoes to mice. *Infect Immun* **75,** 5532-5539.

Johnson, D.J., Fidock, D.A., Mungthin, M., Lakshmanan, V., Sidhu, A.B., Bray, P.G. and Ward, S.A. (2004). Evidence for a central role for PfCRT in conferring Plasmodium falciparum resistance to diverse antimalarial agents. *Mol Cell* **15,** 867-877.

Joy, D.A., Feng, X., Mu, J., Furuya, T., Chotivanich, K., Krettli, A.U., *et al.* (2003). Early origin and recent expansion of Plasmodium falciparum. *Science* **300,** 318-321.

Kain, K.C., Harrington, M.A., Tennyson, S. and Keystone, J.S. (1998). Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. *Clin Infect Dis* **27,** 142-149.

Kain, K.C., Shanks, G.D. and Keystone, J.S. (2001). Malaria chemoprophylaxis in the age of drug resistance. I. Currently recommended drug regimens. *Clin Infect Dis* **33,** 226-234.

Karcz, S.R., Galatis, D. and Cowman, A.F. (1993). Nucleotide binding properties of a P-glycoprotein homologue from Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **58,** 269-276.

Kaufman, T.S. and Ruveda, E.A. (2005). The quest for quinine: those who won the battles and those who won the war. *Angew Chem Int Ed Engl* **44,** 854-885.

Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J. and Zinkernagel, R.M. (2001) Medizinische Mikrobiologie Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Kirkman, L.A., Su, X.Z. and Wellems, T.E. (1996). Plasmodium falciparum: isolation of large numbers of parasite clones from infected blood samples. *Exp Parasitol* **83,** 147-149.

Klayman, D.L. (1985). Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* **228,** 1049-1055.

Kohler, S., Delwiche, C.F., Denny, P.W., Tilney, L.G., Webster, P., Wilson, R.J., *et al.* (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* **275,** 1485-1489.

Krugliak, M., Zhang, J. and Ginsburg, H. (2002). Intraerythrocytic Plasmodium falciparum utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol Biochem Parasitol* **119,** 249-256.

Kuhn, Y., Rohrbach, P. and Lanzer, M. (2007). Quantitative pH measurements in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes using pHluorin. *Cell Microbiol* **9,** 1004-1013.

Kwiatkowski, D., Cannon, J.G., Manogue, K.R., Cerami, A., Dinarello, C.A. and Greenwood, B.M. (1989). Tumour necrosis factor production in Falciparum malaria and its association with schizont rupture. *Clin Exp Immunol* **77,** 361-366.

Kwiatkowski, D.P. (2005). How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet* **77,** 171-192.

Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157,** 105-132.

Lakshmanan, V., Bray, P.G., Verdier-Pinard, D., Johnson, D.J., Horrocks, P., Muhle, R.A.*, et al.* (2005). A critical role for PfCRT K76T in Plasmodium falciparum verapamil-reversible chloroquine resistance. *EMBO J* **24,** 2294-2305.

Lambros, C. and Vanderberg, J.P. (1979). Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* **65,** 418-420.

Lander, E.S. and Schork, N.J. (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science* **265,** 2037-2048.

Lew, V.L., Tiffert, T. and Ginsburg, H. (2003). Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Blood* **101,** 4189-4194.

Loria, P., Miller, S., Foley, M. and Tilley, L. (1999). Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem J* **339 (Pt 2),** 363-370.

Luzzatto, L., Usanga, F.A. and Reddy, S. (1969). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science* **164,** 839-842.

Mackay, T.F. (2001). The genetic architecture of quantitative traits. *Annu Rev Genet* **35,** 303-339.

Marchiafava, E. and Celli, A. (1885). Weitere Untersuchungen über die Malariainfektion. *Fortschritte der Medicin* **3,** 787-806.

Marienfeld. (2009). [WWW document]. URL www.marienfeld-surperior.com

Martin, R.E. and Kirk, K. (2004). The Malaria Parasite's Chloroquine Resistance Transporter is a Member of the Drug/Metabolite Transporter Superfamily. *Mol Biol Evol* **21,** 1938-1949.

Martin, S.K., Oduola, A.M. and Milhous, W.K. (1987). Reversal of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum by verapamil. *Science* **235,** 899-901.

Martinsen, E.S., Perkins, S.L. and Schall, J.J. (2008). A three-genome phylogeny of malaria parasites (Plasmodium and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Mol Phylogenet Evol* **47,** 261-273.

McGregor, I.A., Wilson, M.E. and Billewicz, W.Z. (1983). Malaria infection of the placenta in The Gambia, West Africa; its incidence and relationship to stillbirth, birthweight and placental weight. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **77,** 232-244.

Medica, D.L. and Sinnis, P. (2005). Quantitative dynamics of Plasmodium yoelii sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. *Infect Immun* **73,** 4363-4369.

Modiano, D., Luoni, G., Sirima, B.S., Simpore, J., Verra, F., Konate, A., *et al.* (2001). Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. *Nature* **414,** 305-308.

Morrison, D.B. and Jeskey, H.A. (1948). Alterations in some constituents of the monkey erythrocyte infected with Plasmodium knowlesi as related to pigment formation. *J Natl Malar Soc* **7,** 259-264.

Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., *et al.* (2001). Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* **291,** 141-144.

Mu, J., Ferdig, M.T., Feng, X., Joy, D.A., Duan, J., Furuya, T., *et al.* (2003). Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol* **49,** 977-989.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155,** 335-350.

National Center for Biotechnology Information. (2000). [WWW document]. URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Malaria/Mapsmarkers/PfSegData/segdata.html

National Center for Biotechnology Information. (2008). [WWW document]. URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=5833

Naude, B., Brzostowski, J.A., Kimmel, A.R. and Wellems, T.E. (2005). Dictyostelium discoideum expresses a malaria chloroquine resistance mechanism upon transfection with mutant, but not wild-type, Plasmodium falciparum transporter PfCRT. *J Biol Chem* **280,** 25596-25603.

Newton, P. and White, N. (1999). Malaria: new developments in treatment and prevention. *Annu Rev Med* **50,** 179-192.

Nkrumah, L.J., Riegelhaupt, P.M., Moura, P., Johnson, D.J., Patel, J., Hayton, K., *et al.* (2009). Probing the multifactorial basis of Plasmodium falciparum quinine resistance: evidence for a strain-specific contribution of the sodium-proton exchanger PfNHE. *Mol Biochem Parasitol* **165,** 122-131.

Nurhasanah, A. (2009) A Genetic Approach towards Identification of Factors Affecting Quinine Responses in P. falciparum. Heidelberg, University of Heidelberg, pp. 93.

Olliaro, P., Castelli, F., Caligaris, S., Druilhe, P. and Carosi, G. (1989). Ultrastructure of Plasmodium falciparum "in vitro". II. Morphological patterns of different quinolines effects. *Microbiologica* **12,** 15-28.

Pagola, S., Stephens, P.W., Bohle, D.S., Kosar, A.D. and Madsen, S.K. (2000). The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature* **404,** 307-310.

Pain, A., Bohme, U., Berry, A.E., Mungall, K., Finn, R.D., Jackson, A.P.*, et al.* (2008). The genome of the simian and human malaria parasite Plasmodium knowlesi. *Nature* **455,** 799-803.

Pasvol, G., Weatherall, D.J. and Wilson, R.J. (1978). Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against P. falciparum malaria. *Nature* **274,** 701-703.

Paterson, A.H. (1995). Molecular dissection of quantitative traits: progress and prospects. *Genome Research* **5,** 321-333.

Peel, S.A. (2001). The ABC transporter genes of Plasmodium falciparum and drug resistance. *Drug Resistance Updates* **4,** 66-74.

Pel, P.K. (1886). Mededeelingen uit de Geneeskundige kliniek. Malaria infectie. *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* **22,** 341-358.

Piekarski, G. (1987) Medizinische Parasitologie Heidelberg, Springer Verlag.

PlasmoDB. (2008). [WWW document]. URL http://plasmodb.org/plasmo/

Playfair, J.H., Blackwell, J.M. and Miller, H.R. (1990). Modern vaccines. Parasitic diseases. *Lancet* **335,** 1263-1266.

Price, R.N., Uhlemann, A.C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L.*, et al.* (2004). Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number. *Lancet* **364,** 438-447.

Pukrittayakamee, S., Supanaranond, W., Looareesuwan, S., Vanijanonta, S. and White, N.J. (1994). Quinine in severe falciparum malaria: evidence of declining efficacy in Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **88,** 324-327.

Qinghaosu and Group, A.C.R. (1979). Antimalaria studies on Qinghaosu. *Chin Med J (Engl)* **92,** 811-816.

Reed, M.B., Saliba, K.J., Caruana, S.R., Kirk, K. and Cowman, A.F. (2000). Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in Plasmodium falciparum. *Nature* **403,** 906-909.

Roberts, D.J., Craig, A.G., Berendt, A.R., Pinches, R., Nash, G., Marsh, K. and Newbold, C.I. (1992). Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* **357,** 689-692.

Rohrbach, P., Sanchez, C.P., Hayton, K., Friedrich, O., Patel, J., Sidhu, A.B., *et al.* (2006). Genetic linkage of pfmdr1 with food vacuolar solute import in Plasmodium falciparum. *EMBO J* **25,** 3000-3011.

Rosenberg, R. (1985). Inability of Plasmodium knowlesi sporozoites to invade Anopheles freeborni salivary glands. *Am J Trop Med Hyg* **34,** 687-691.

Ruwende, C. and Hill, A. (1998). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J Mol Med* **76,** 581-588.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230,** 1350-1354.

Saliba, K.J., Horner, H.A. and Kirk, K. (1998). Transport and metabolism of the essential vitamin pantothenic acid in human erythrocytes infected with the malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* **273,** 10190-10195.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchez, C.P., McLean, J.E., Rohrbach, P., Fidock, D.A., Stein, W.D. and Lanzer, M. (2005). Evidence for a pfcrt-associated chloroquine efflux system in the human malarial parasite Plasmodium falciparum. *Biochemistry* **44,** 9862-9870.

Sanchez, C.P., Rohrbach, P., McLean, J.E., Fidock, D.A., Stein, W.D. and Lanzer, M. (2007a). Differences in trans-stimulated chloroquine efflux kinetics are linked to PfCRT in Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol* **64,** 407-420.

Sanchez, C.P., Rotmann, A., Stein, W.D. and Lanzer, M. (2008a). Polymorphisms within PfMDR1 alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol* **70,** 786-798.

Sanchez, C.P., Stein, W. and Lanzer, M. (2003). Trans Stimulation Provides Evidence for a Drug Efflux Carrier as the Mechanism of Chloroquine Resistance in Plasmodium falciparum&#x2020. *Biochemistry* **42,** 9383-9394.

Sanchez, C.P., Stein, W.D. and Lanzer, M. (2007b). Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in Plasmodium falciparum. *Trends Parasitol* **23,** 332-339.

Sanchez, C.P., Stein, W.D. and Lanzer, M. (2008b). Dissecting the components of quinine accumulation in Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol* **67,** 1081-1093.

Schlitzer, M. (2007). Malaria Chemotherapeutics Part I: History of Antimalarial Drug Development, Currently Used Therapeutics, and Drugs in Clinical Development. *ChemMedChem* **2,** 944-986.

Schwartz, D.C. and Hochstrasser, M. (2003). A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* **28,** 321-328.

Segurado, A.A., di Santi, S.M. and Shiroma, M. (1997). In vivo and in vitro Plasmodium falciparum resistance to chloroquine, amodiaquine and quinine in the Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **39,** 85-90.

Sen, Å. and Ferdig, M. (2004). QTL Analysis for Discovery of Genes Involved in Drug Responses. *Current Drug Targets - Infectious Disorders* **4,** 53-63.

Shear, H.L., Roth, E.F., Jr., Fabry, M.E., Costantini, F.D., Pachnis, A., Hood, A. and Nagel, R.L. (1993). Transgenic mice expressing human sickle hemoglobin are partially resistant to rodent malaria. *Blood* **81,** 222-226.

Sherman, I.W., Eda, S. and Winograd, E. (2003). Cytoadherence and sequestration in Plasmodium falciparum: defining the ties that bind. *Microbes Infect* **5,** 897-909.

Shortt, H.E. (1951). Life-cycle of the mammalian malaria parasite. *Br Med Bull* **8,** 7-9.

Shulman, C.E. and Dorman, E.K. (2003). Importance and prevention of malaria in pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **97,** 30-35.

Sidhu, A.B., Uhlemann, A.C., Valderramos, S.G., Valderramos, J.C., Krishna, S. and Fidock, D.A. (2006). Decreasing pfmdr1 copy number in plasmodium falciparum malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis* **194,** 528-535.

Sidhu, A.B., Valderramos, S.G. and Fidock, D.A. (2005). pfmdr1 mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol* **57,** 913-926.

Sidhu, A.B., Verdier-Pinard, D. and Fidock, D.A. (2002). Chloroquine resistance in Plasmodium falciparum malaria parasites conferred by pfcrt mutations. *Science* **298,** 210-213.

Snow, R.W., Guerra, C.A., Noor, A.M., Myint, H.Y. and Hay, S.I. (2005). The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. *Nature* **434,** 214-217.

Springer, A.L., Smith, L.M., Mackay, D.Q., Nelson, S.O. and Smith, J.D. (2004). Functional interdependence of the DBLbeta domain and c2 region for binding of the Plasmodium falciparum variant antigen to ICAM-1. *Mol Biochem Parasitol* **137,** 55-64.

Su, X., Ferdig, M.T., Huang, Y., Huynh, C.Q., Liu, A., You, J., *et al.* (1999). A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Science* **286,** 1351-1353.

Su, X., Kirkman, L.A., Fujioka, H. and Wellems, T.E. (1997). Complex polymorphisms in an approximately 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant P. falciparum in Southeast Asia and Africa. *Cell* **91,** 593-603.

Su, X. and Wellems, T.E. (1996). Toward a high-resolution Plasmodium falciparum linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. *Genomics* **33,** 430-444.

Suh, K.N., Kain, K.C. and Keystone, J.S. (2004). Malaria. *CMAJ* **170,** 1693-1702.

Trager, W. and Jensen, J.B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193,** 673-675.

Tran, C.V. and Saier, M.H., Jr. (2004). The principal chloroquine resistance protein of Plasmodium falciparum is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Microbiology* **150,** 1-3.

Uhlemann, A.C., Staalsoe, T., Klinkerta, M.Q. and Hviid, L. (2000). Analysis of Plasmodium falciparum-infectedred blood cells. *MACS & More* **4,** 2.

Valderramos, S.G. and Fidock, D.A. (2006). Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. *Trends Pharmacol Sci* **27,** 594-601.

Vanderberg, J.P. and Frevert, U. (2004). Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of Plasmodium berghei sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int J Parasitol* **34,** 991-996.

Vinayak, S., Alam, M.T., Upadhyay, M., Das, M.K., Dev, V., Singh, N.*, et al.* (2007). Extensive genetic diversity in the Plasmodium falciparum Na+/H+ exchanger 1 transporter protein implicated in quinine resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **51,** 4508-4511.

Vogt, A. (2008) Selection of trophozoites by using magnetic cell sorting (MACS). In *Methods in Malaria Research*, K. Moll, I. Ljungström, H. Perlmann, A. Scherf, M. Wahlgren (eds.) Fifth edn., pp. 31-33.

Wahlgren, M., Carlson, J., Helmby, H., Hedlund, I. and Treutiger, C.J. (1992). Molecular mechanisms and biological importance of Plasmodium falciparum erythrocyte rosetting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **87 Suppl 3,** 323-329.

Walker-Jonah, A., Dolan, S.A., Gwadz, R.W., Panton, L.J. and Wellems, T.E. (1992). An RFLP map of the Plasmodium falciparum genome, recombination rates and favored linkage groups in a genetic cross. *Mol Biochem Parasitol* **51,** 313-320.

Warhurst, D.C., Craig, J.C. and Adagu, I.S. (2002). Lysosomes and drug resistance in malaria. *Lancet* **360,** 1527-1529.

Warrell, D.A. and Gilles, H.M. (2002) Essential Malariology London, Edward Arnold.

Wellems, T.E., Panton, L.J., Gluzman, I.Y., do Rosario, V.E., Gwadz, R.W., Walker-Jonah, A. and Krogstad, D.J. (1990). Chloroquine resistance not linked to mdr-like genes in a Plasmodium falciparum cross. *Nature* **345,** 253-255.

Wellems, T.E. and Plowe, C.V. (2001). Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* **184,** 770-776.

Wellems, T.E., Walker-Jonah, A. and Panton, L.J. (1991). Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on Plasmodium falciparum chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88,** 3382-3386.

Wiesner, J., Ortmann, R., Jomaa, H. and Schlitzer, M. (2003). Neue Antimalaria-Wirkstoffe. *Angewandte Chemie* **115,** 5432-5451.

Williams, T.N. (2006). Human red blood cell polymorphisms and malaria. *Curr Opin Microbiol* **9,** 388-394.

Wilson, C.M., Volkman, S.K., Thaithong, S., Martin, R.K., Kyle, D.E., Milhous, W.K. and Wirth, D.F. (1993). Amplification of pfmdr 1 associated with mefloquine and halofantrine resistance in Plasmodium falciparum from Thailand. *Mol Biochem Parasitol* **57,** 151-160.

Wilson, R.J. (2002). Progress with parasite plastids. *J Mol Biol* **319,** 257-274.

Wirth, D.F. (2002). Biological revelations. *Nature* **419,** 495-496.

Woodrow, C.J., Haynes, R.K. and Krishna, S. (2005). Artemisinins. *Postgrad Med J* **81,** 71-78.

Woodward, R.B. and Doering, W.E. (1944). Total Synthesis of Quinine. *J. Am. Chem. Soc* **66,** 849.

Woodward, R.B. and Doering, W.E.v. (1945). Total Synthesis of Quinine. *J. Am. Chem. Soc.* **67,** 860-874.

World Health Organisation (2008) World Malaria Report 2008, World Health Organisation.

Wu, R., Ma, C.-X. and Casella, G. (2007) Statistical Genetics of Quantitative Traits, Springer.

Yamauchi, L.M., Coppi, A., Snounou, G. and Sinnis, P. (2007). Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol* **9,** 1215-1222.

Zhang, H., Paguio, M. and Roepe, P.D. (2004). The antimalarial drug resistance protein Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter binds chloroquine. *Biochemistry* **43,** 8290-8296.

6. Abkürzungen und Definitionen

[^{3}H]	Tritium, mit Tritium markiert
„Real Time“ PCR	PCR mit Quantifizierung der gewonnenen DNA
„Southern Blot“	Nachweis einer Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter 10^{-6}
µm	Mikrometer, 10^{-6} Meter
µM	Mikromolar, 10^{-6} molar
A	Adenin
aa	Aminosäure („amino acid“)
Abb.	Abbildung
ABC	ATP „binding cassette“
ad	auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
Akk.	Akkumulation
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base(n)
Bit-Score	quantitative Bewertung der Ähnlichkeit der Suchsequenz mit einer bekannten Sequenz im BLAST; je höher der Wert, desto ähnlicher sind die beiden Sequenzen
BLAST	Programm zur Analyse biologischer Sequenzdaten („Basic Local Alignment Search Tool”)
BLASTn	Vergleicht eine Nukleotidsequenz gegen eine Nukleotidsequenzdatenbank
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ca^{2+}	Kalzium-Ionen
Carrier	Transporter; Transportprotein
CD36	Thromospondin-Rezeptor („Cluster of Differentiation 36“)
cm	Zentimeter
cM	Centimorgan
CQ	Chloroquin
CQ_{in}/CQ_{out}	Chloroquin-Akkumulation (Verhältnis der CQ-Konzentration in der Zelle (im Pellet), zur Konzentration außerhalb (im Überstand))
CQR	Chloroquin-resistent
CQS	Chloroquin-sensitiv
Crossing-over	Stückaustausch zwischen väterlichen und mütterlichen Chromosomen während der Meiose
CSA	Chondroitinsulfat A
D	Dd2 oder Asparaginsäure
d.h.	das heißt
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase

DHPS	Dihydropteroat-Synthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRAP1	Dipeptidylaminopeptidase I
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	und andere („et alii“)
EtOH	Ethanol
E-Wert	Erwartungswert („expectation value“); er gibt die erwartete Anzahl der Hits an, deren Score mindestens so groß ist wie der beobachtete; je kleiner der Wert, desto ähnlicher sind die verglichenen Sequenzen
F	Regressions-Abweichung
FASTA-Format	textbasiertes Format zur Darstellung und Speicherung der Primärstruktur von Nukleinsäuren (Nukleinsäuresequenz) und Proteinen (Proteinsequenz)
fl	Femtoliter
fwd	vorwärts („forward”)
FY	Duffy Antigen
g	Gramm oder einfache Erdbeschleunigung
G	Guanin
G6PD	Glukose-6-Phosphatase-Dehydrogenase
gDNA	Genomisch DNA
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GYPA	Glykophorin A
GYPB	Glykophorin B
GYPC	Glykophorin C
h	Stunde, („hora“)
H	HB3
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HAP	Histo-Aspartat-Protease
HBA	α-Globin
HBB	β-Globin
HbC	Hämoglobin C
HbE	Hämoglobin E
HbS	Hämoglobin S
HCl	Hydrogenchlorid; Salzsäure
HDP	Häm-detoxifizierendes Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histdin
HP	Haptoglobin
IC_{50}	Mittlere inhibitorische Konzentration; Konzentration eines Inhibitors, bei der eine 50 %ige Inhibition beobachtet wird
IC_{90}	Konzentration eines Inhibitors, bei der eine 90 %ige Inhibition beobachtet wird
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1
K & D	Kyte und Doolittle
K76T	Lysin → Threonin Austausch an Position 76
kb	Kilobasen

kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Knockdown	teilweises Abschalten der Funktion eines Genes
l	Liter
LOD	„logarithm of the odds”
LOD-Score	statistische Kenngröße bei der Identifizierung von Quantitative Trait Loci; dekadischer Logarithmus des Quotienten von Kopplungs- und Rekombinationshäufigkeit
Lsg.	Lösung
M	Molar
MACS	„Magnetic Cell Sorting“
Mb	Megabasen
Met	Methionin
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm^2	Quadratmillimeter
mm^3	Kubikmillimeter
MP	MetaPhor
MR4	Malaria Research and Reference Reagent Resource Center
mRNA	„messenger” Ribonukleinsäure (Boten-RNA)
N	Normal oder Asparagin
NACl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NBD	Nukleotidbindedomäne
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
P.	*Plasmodium*
P.f.	*Plasmodium falciparum*
P.v:	*Plasmodium vivax*
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
Pellet	Sediment bei der Zentrifugation
PfATP6	*P. falciparum* Ca^{2+}-ATPase
PfCRT	*P. falciparum* „chloroquine resistance transporter“
pfcrt	*P. falciparum* „chloroquine resistance transporter“ (Genname)
PfEMP1	*P. falciparum* Erythrozyten Membranprotein 1
PfMDR1	*P. falciparum* „multi drug resistance 1“
pfmdr1	*P. falciparum* „multi drug resistance 1“ (Genname)
PfNHE	Natrium-Protonen-Austauscher
pfnhe	Natrium-Protonen-Austauscher (Genname)
Pgh1	P-Glykoprotein Homolog 1
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration $[H^+]$
Primary Scan	Erste Überprüfung mit allen getesteten Individuen
Primer	Oligonukleotid-Moleküle (einzelsträngige DNA), die an komplementäre DNA-Sequenzen binden und bei der PCR die Startsequenz bilden

Protein-Trafficking	Lieferung eines Proteins zu seinem spezifischen zellulären Einsatzort
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
QD	Chinidin
QD_{in}/QD_{out}	Chinidin-Akkumulation (Verhältnis der QD-Konzentration in der Zelle (im Pellet), zur Konzentration außerhalb (im Überstand))
QN	Chinin
QN_{in}/QN_{out}	Chinin-Akkumulation (Verhältnis der QN-Konzentration in der Zelle (im Pellet), zur Konzentration außerhalb (im Überstand))
QTL	„quantitative trait locus”
r	Pearson Regressionskoeffizient
R	Arginin
rev	rückwärts („reverse”)
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute”)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur/reverse Transkriptase
s	Sekunde
S	Serin
SCL4A1	CD233, Erythrozyt-Bande-3-Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
Secondary Scan	Zweite Überprüfung nach vorheriger Gruppierung der Individuen
SEM	Standardfehler („standard error of the mean”)
Ser	Serin
SERCA	Sarco-Endoplasmatisches-Retikulum Ca^{2+}-ATPase
SNP	Einzelnukleotidaustausch („single nucleotide polymorphism“)
STS	„sequence tagged site”
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T_{An}	„Annealing”-Temperatur
Taq	*Thermus aquaticus*
TE	Tris-EDTA
TKM	Tris-KCl-$MgCl_2$
TMD	Transmembrandomäne
TMHMM	„Transmembrane Domain Hidden Markov Model“
TNFα	Tumornekrosefaktor („tumor necrosis factor α“)
Tris	Tris (hydroxymethyl) - aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TSP	Thrombospondin
Tyr	Tyrosin
U	biochemische Einheit für Enzymaktivitäten („unit“)
üN	über Nacht
UTR	nicht-translatierte Region vor oder hinter einem Gen („untranslated region“)
UV	ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
VE	voll entsalztes Wasser
WHO	Weltgesundheitsorganisation („world health organisation“)
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

7. Anhang

Tabelle 7.1.: Zusammenstellung aller Akkumulationswerte
Der Standardfehler (SEM) ist jeweils hinter dem Akkumulationswert angegeben.

Stamm	CQ-Akk. 4 min	CQ-Akk. 15 min	QD-Akk. 5 min	QD-Akk. 25 min
Dd2	257,1 ± 24	315,4 ± 30,7	90,4 ±7,3	148,0 ± 13,4
3BA6	400,0 ± 27	503,4 ± 40,9	94,0 ±3,6	132,5 ± 7,0
1BB5	252,7 ± 29	303,5 ± 36,8	84,9 ± 7,2	114,9 ± 8,8
3BD5	364,4 ± 16	426,4 ± 14,7	122,4 ± 7,2	196,8 ± 11,9
SC01	392,3 ± 27	597,3 ± 48,9	114,7 ± 7,6	201,0 ± 14,1
QC34	296,8 ± 24	384,7 ± 36,7	88,9 ± 4,1	138,3 ± 6,5
QC23	584,2 ± 38	792,7 ± 65,0	109,3 ± 6,2	141,3 ± 9,7
TC05	598,5 ± 43	755,4 ± 50,8	130,4 ± 7,4	210,3 ± 14,3
GC06	327,2 ± 12	378,5 ± 22,6	89,9 ± 4,4	139,3 ± 10,9
D43	442,7 ± 29	559,0 ± 35,6	137,1 ± 9,4	230,4 ± 19,3
C408	378,8 ± 17	568,6 ± 44,7	88,8 ± 4,0	142,3 ± 6,0
7C12	302,6 ± 19	426,1 ± 23,2	95,7 ± 3,1	159,3 ± 5,9
7C46	387,0 ± 24	528,9 ± 37,4	92,0 ± 4,2	153,4 ± 7,9
7C111	546,1 ± 27	755,8 ± 32,1	132,2 ± 4,6	212,3 ± 16,7
7C183	364,6 ± 33	514,2 ± 45,5	105,0 ± 5,5	174,4 ± 12,1
7C421	573,7 ± 28	776,1 ± 62,0	119,1 ± 3,0	174,7 ± 5,9
7C424	334,9 ± 21	493,1 ± 28,9	103,9 ± 6,4	162,2 ± 11,1
B1SD	2293,8 ± 125	3918,1 ± 243,0	166,1 ± 11,2	286,1 ± 23,9
QC13	2404,4 ± 155	4164,6 ± 175,1	157,4 ± 7,3	251,5 ± 13,3
QC01	1699,7 ± 173	3640,5 ± 160,1	129,6 ± 7,5	200,0 ± 13,9
B4R3	1755,7 ± 144	3315,4 ± 90,8	150,3 ± 8,4	236,5 ± 15,6
SC05	2290,8 ± 123	4398,4 ± 67,0	150,7 ± 6,0	227,7 ± 6,9
TC08	1780,8 ± 195	3363,4 ± 195,3	142,4 ± 9,1	204,4 ± 15,3
GC03	1629,2 ± 128	2850,0 ± 150,9	131,4 ± 7,8	181,4 ± 11,9
C188	2479,0 ± 96	4180,4 ± 313,8	176,8 ± 6,1	273,5 ± 11,1
CH3-116	1437,1 ± 117	2824,8 ± 136,9	120,2 ± 5,3	165,6 ± 8,4
CH3-61	1661,1 ± 54	3562,9 ± 147,0	125,6 ± 6,6	226,1 ± 8,1
7C3	2015,1 ± 113	3854,3 ± 154,0	147,7 ± 4,9	190,1 ± 10,2
7C7	2074,1 ± 75	3426,9 ± 181,5	147,6 ± 3,0	240,1 ± 9,8
7C16	1901,2 ± 108	4089,1 ± 145,6	148,8 ± 3,4	267,2 ± 7,3
7C20	1774,4 ± 154	3877,2 ± 186,7	132,0 ± 5,8	203,9 ± 10,2
7C126	2002,7 ± 118	3749,4 ± 146,5	140,4 ± 5,3	194,4 ± 9,8
7C140	1871,9 ± 123	3593,7 ± 207,5	145,7 ± 6,7	250,0 ± 11,7
7C159	1641,3 ± 124	3900,8 ± 85,6	137,3 ± 5,6	246,2 ± 13,9
7C170	1434,1 ± 112	2869,9 ± 109,5	116,3 ± 6,0	190,0 ± 8,0
HB3	2031,5 ± 78	3335,7 ± 60,3	141,8 ± 4,3	203,6 ± 9,3

Tabelle 7.2.: Gruppierung der Stämme in Bezug auf Herkunft des B5M12- und *pfcrt*-Lokuses für die mathematische Analyse
Der Standardfehler (SEM) ist hinter dem Akkumulationswert angegeben.

B5M12 und *pfcrt* von HB3		B5M12 von Dd2 *pfcrt* von HB3		B5M12 von HB3 *pfcrt* von Dd2		B5M12 und *pfcrt* von Dd2	
Stamm	**QD-Akk.**	**Stamm**	**QD-Akk.**	**Stamm**	**QD-Akk.**	**Stamm**	**QD-Akk.**
HB3	141,8 ± 4,3	C188	176,8 ± 6,1	TC05	130,4 ± 7,4	Dd2	90,4 ±7,3
B1SD	166,1 ± 11,2	CH3-116	120,2 ± 5,3	D43	137,1 ± 9,4	3BA6	94,0 ±3,6
QC13	157,4 ± 7,3			7C111	132,2 ± 4,6	1BB5	84,9 ± 7,2
QC01	129,6 ± 7,5					3BD5	122,4 ± 7,2
B4R3	150,3 ± 8,4					SC01	114,7 ± 7,6
SC05	150,7 ± 6,0					QC34	88,9 ± 4,1
TC08	142,4 ± 9,1					QC23	109,3 ± 6,2
GC03	131,4 ± 7,8					GC06	89,9 ± 4,4
CH3-61	125,6 ± 6,6					C408	88,8 ± 4,0
7C3	147,7 ± 4,9					7C12	95,7 ± 3,1
7C7	147,6 ± 3,0					7C46	92,0 ± 4,2
7C126	140,4 ± 5,3					7C183	105,0 ± 5,5
7C140	145,7 ± 6,7					7C421	119,1 ± 3,0
7C159	137,3 ± 5,6					7C424	103,9 ± 6,4
7C170	116,3 ± 6,0						
7C16	148,8 ± 3,4						
7C20	132,0 ± 5,8						

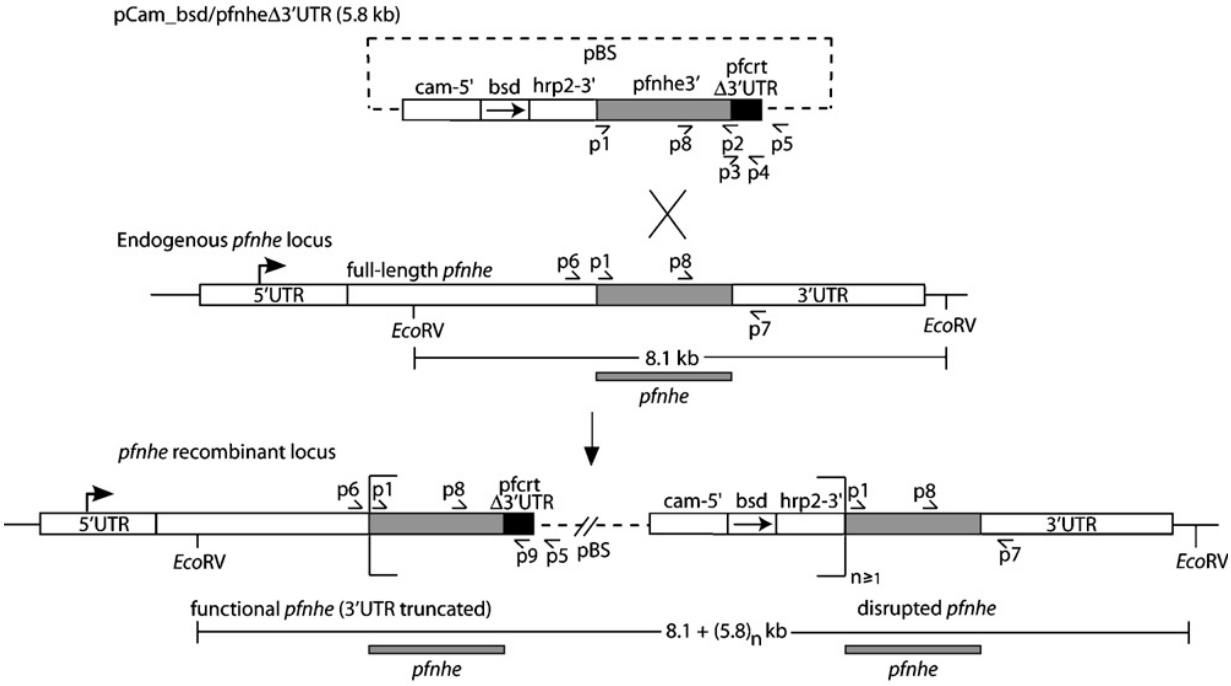

Abb. 7.1.: Herstellung der *pfnhe* „knockdown" Stämme (Nkrumah *et al.*, 2009)
Schematische Darstellung der pCam_bsd/pfnheΔ3'UTR Plasmidintegration in den *pfnhe* Lokus über homologe Rekombination und einfaches „Crossing-over", um den endogenen 3'UTR von *pfnhe* durch einen verkürzten 3'UTR von *pfcrt* zu ersetzen. Diese Integration führte zu einem funktionsfähigen rekombinanten *pfnhe*-Gen mit endogenem *pfnhe*-Promotor, der kompletten kodierenden Sequenz und einem 150 bp verkürzten 3'UTR von *pfcrt*. Dem nachfolgenden integrierten Blastizidin-S-Deaminase Selektionsmarker (*bsd*) mit 5'UTR von Calmodulin (*cam*) und *hrp2* 3'UTR folgt direkt ein nicht funktionsfähiger *pfnhe*-Überrest, dem 4,6 kb der 5' kodierenden *pfnhe* Sequenz und Promotor fehlen.

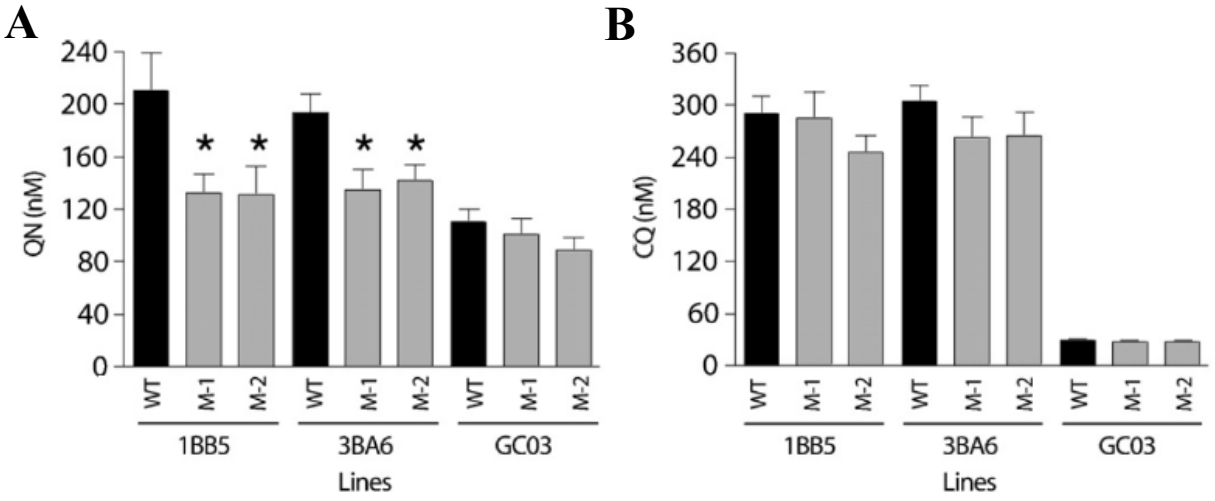

Abb. 7.2.: Suszeptibilität von Antimalariamitteln in den *pfnhe*-modifizierten Stämmen und ihrern Ausgangsstämmen (Nkrumah *et al.*, 2009)
Mittelwerte ± SEM der Chinin-IC_{50}-Werte (A) und der Chloroquin-IC_{50}-Werte (B) wurden aus 5-9 unabhängigen Untersuchungen (Duplikat) errechnet. (*, $p < 0,05$)