In vitro Aktivitätsbestimmung von experimentellen Chemotherapeutika gegen *Plasmodium falciparum* in Lambaréné, Gabun

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Wagner, Lena Ines

2015

Dekan: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner
2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Peschel

Meinen Eltern

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis 1

1. Einleitung 2

1.1. Malaria 2

1.1.1. Epidemiologie 2

1.1.2. Ätiologie der Malaria 3

1.1.3. Lebenszyklus der Malariaparasiten 3

1.2. Therapie der Malaria 6

1.2.1. Wirkstoffklassen der Antimalariatherapie 6

1.2.1.1. Chinolinderivate (Chinin, Chloroquin, Amodiaquin) 7

1.2.1.2. Artemisininverbindungen (Artesunat, Dihydroartemisinin) 8

1.2.2. Chemoprophylaxe der Malaria 9

1.2.3. Chemotherapie der unkomplizierten *P. falciparum* Malaria 10

1.2.4. Chemotherapie der komplizierten *P. falciparum* Malaria 10

1.3. Resistenzentwicklung von *P. falciparum* 11

1.3.1. Resistenzentstehung 11

1.3.2. Chronologie der Resistenzentwicklung 11

1.3.2.1. Chinin 11

1.3.2.2. Chloroquin/Amodiaquin 12

1.3.2.3. Sulfadoxin/Pyrimethamin 12

1.3.2.4. Mefloquin 13

1.3.2.5. Artemisininverbindungen 13

1.3.3. Sensitivitätstestung 14

1.4. Entwicklung neuer Antimalariamedikamente 15

1.4.1. Medikamentenentwicklung 15

1.4.2. Proteasom-Inhibitoren 16

1.5. Zielsetzung 17

2. Material und Methoden 18

2.1. Material 18

2.2. Studienaufbau 22

2.2.1. Probenentnahme 22

2.2.2. Patientenbehandlung 23
2.2.3. Erfasste Daten 23
2.2.4. Ethik 23
2.3. Versuchsaufbau 23
2.3.1. Durchführung und Analyse des Malariaschnelltests Paracheck *Pf*® 23
2.3.2. Blutabnahme und hämatologische Analyse 24
2.3.3. Malariadiagnostik anhand des dicken Tropfens 25
2.3.3.1. Giemsa-Färbung 25
2.3.3.2. Absolute Parasitämiebestimmung (Lambaréné-Methode) 25
2.3.3.3. Absolute Parasitämiebestimmung (WHO-Methode) 26
2.3.3.4. Relative Parasitämiebestimmung 27
2.3.4. Untersuchte Substanzen 27
2.3.5. Kurzzeitkultivierung von klinischen *P. falciparum* Isolaten 28
2.3.5.1. Ansetzen eines kompletten Kulturmediums 28
2.3.5.2. Anfertigung der Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Substanzen 29
2.3.5.3. Zusammensetzung der Kulturlösung 30
2.3.5.4. Anfertigung des SAG-Mannitol-0+-Blutes 31
2.3.5.5. Ansetzen und Inkubation der Kurzzeitparasitenkultur 31
2.3.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 33
2.3.7. Definition des erfolgreichen Parasitenwachstums 34
2.3.8. Inhibitorische Konzentrationen der untersuchten Substanzen 35
2.3.9. Statistische Analyse 35

3. Ergebnisse 36
3.1. Basisparameter 36
3.1.1. Stichprobe 36
3.1.2. Patientencharakteristika 36
3.2. Inhibitorische Konzentrationen der untersuchten Substanzen 37
3.2.1. 50% inhibitorische Konzentrationen der untersuchten Substanzen 37
3.2.2. 99% inhibitorische Konzentrationen von Chloroquin 39
3.2.3. Verteilung des Datensatzes der IC_{50}-Werte 40
3.3. Korrelationstestung 42

3.4. Testung auf Unterschiede der IC_{50}-Werte zwischen einzelnen Regionen 43

4. Diskussion 50

4.1. Einführung 50

4.2. Interpretation von *in vitro* Daten aus Sensitivitätstests 50

4.3. *In vitro* Sensitivität von *P. falciparum* gegen Medikamente erster Wahl in Gabun 51

4.3.1. Artesunat 51

4.3.2. Dihydroartemisinin 53

4.3.3. Amodiaquin 54

4.4. *In vitro* Sensitivität von *P. falciparum* gegen Chinin 55

4.5. *In vitro* Sensitivität von *P. falciparum* gegen Chloroquin 56

4.6. Antiplasmodiale Wirksamkeit von PW28 gegen *P. falciparum* 58

4.7. Korrelationen 59

4.8. Regionale Unterschiede 60

5. Zusammenfassung 62

Literaturverzeichnis 64

Abbildungsverzeichnis 71

Tabellenverzeichnis 72

Eigenanteil 73

Danksagungen 74

Lebenslauf und Publikationen 75

Abkürzungsverzeichnis

°C – Grad Celsius
ANOVA – Engl: Analysis of Variance
AQ – Amodiaquin
Aqua dest. – destilliertes Wasser
AS – Artesunat
BSA – Bovines-Serum-Albumin
c – Centi
CERMEL – Franz: Centre de Recherches Medicales de Lambaréné
CO_2 – Kohlenstoffdioxid
CQ – Chloroquin
DHA – Dihydroartemisinin
DTG – Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit e.V.
EDTA – Ethylendiaminetetraacetic Acid
ELISA – Engl: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FP – Ferriprotoporphyrin IX
g – Gramm, Erdbeschleunigung
GCP – Good Clinical Practice
GPS – Engl: Global Positioning System
HEPES – 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HKT – Hämatokrit
HRP2 – Engl: Histidin-Rich-Protein-2
IC – Engl: Inhibitory Concentration
ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
Ig – Immunglobulin
k – Kilo
l – Liter
m – Milli
MGW – Molekulargewicht
n – Nano
N – Patientenanzahl
p – P-Wert/Signifikanzwert
PBS – Engl: Phosphate-Buffered-Saline
Pf – Plasmodium falciparum
QN – Chinin
r – Korrelationskoeffizient
r^2 – Determinationskoeffizient
RCF – Relative Zentrifugalbeschleunigung
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
SAG-Mannitol – Engl: Sodium-Adenine-Glucose-Mannitol
TMB – 3,3’5,5’-Tetramethylbenzidine
WHO – Wold Health Organisation
µ – Mikro

1. Einleitung

1.1. Malaria

1.1.1. Epidemiologie

Malaria gehört zu den wichtigsten Infektionskrankheiten weltweit. Die Inzidenz von Malaria lag nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahre 2010 bei 219 Millionen Erkrankungen, 80 % davon wurde der Region Subsahara-Afrika zugeordnet. Die Anzahl der letalen Malariafälle wurde mit rund 660 000 im Jahr 2010 angegeben, 91 % davon wiederum in Subsahara-Afrika und ungefähr 86 % der letalen Malariafälle weltweit betraf Kinder im Alter unter fünf Jahren (WHO 2012). Forscher an der Universität Washington schätzen die tatsächliche Anzahl letaler Malariafälle weit höher ein und geben sie für das Jahr 2010 weltweit mit 1,2 Millionen an (Murray *et al.* 2012). Dies verdeutlicht die Schwierigkeit einer genauen Schätzung von Inzidenz und Mortalität hinsichtlich Malariaerkrankungen. In jedem Fall zeigen die Zahlen, dass die Bedeutung der Malaria sehr groß ist.

Die WHO setzte als Ziel für Länder mit Malariaübertragung bis 2015 einen Rückgang der gemeldeten Malariafälle um 75 % bezogen auf das Jahr 2000 zu erreichen. Durch die allmähliche weltweite Einführung von neuen Kontrollstrategien, wie insektizid-imprägnierte Moskitonetze, Versprühen von Insektiziden in Innenräumen, sofortige effektive Malariatherapie sowie eine Überwachung der Medikamentenwirksamkeit, geht die WHO momentan davon aus, dass voraussichtlich 50 der 99 betroffenen Länder dieses Ziel erreichen werden (WHO 2012).

Regionen mit mindestens einem Malariafall pro 1 000 Einwohner pro Jahr zählen nach Angaben der WHO zu den Hochrisikogebieten für Malaria. Dazu gehört das Land Gabun an der Westküste Zentralafrikas (siehe Abbildung 8). Die gesamte Bevölkerung des Landes, rund 1,5 Millionen Einwohner in 2011, lebt unter einem hohen Malariarisiko (WHO 2012). In Gabuns Hauptstadt Libreville wurde durch das Einführen von neuen Kontrollstrategien im Jahr 2003 ein Rückgang des Anteils von Malariapatienten im Kollektiv der fieberhaften

Patienten im Alter unter elf Jahren von 45 % in 2000 auf 15 % im Jahr 2008 beobachtet (Bouyou-Akotet *et al.* 2009). Eine weitere Studie aus Libreville berichtet über eine ähnliche Tendenz. Hier wurde für die Altersgruppe unter 11 Jahren ein Rückgang der positiven Malariatestrate von 27,9 % in 2005 auf 15,2 % in 2008 ermittelt. Diesem Rückgang folgte jedoch ein erneuter Anstieg auf 24,1 % in 2011 (Mawili-Mboumba *et al.* 2013).

1.1.2. Ätiologie der Malaria

Malaria wird durch einzellige Parasiten des Genus *Plasmodium* hervorgerufen. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt über die weibliche Stechmücke der Gattung *Anopheles*. Lange ging man von vier humanpathogenen Plasmodien-Spezies aus: *P. falciparum* als Erreger der Malaria tropica, welche fast ausschließlich für komplizierte und letale Verläufe der Malaria verantwortlich ist, die Erreger *P. ovale* und *P. vivax* der Malaria tertiana sowie *P. malariae* als Ursache der Malaria quartana (White 2009). Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass die primär affenpathogene Art *P. knowlesi* ebenfalls regelmäßg schwere Malariaverläufe beim Menschen verursacht und heute als fünfte humanpathogene Plasmodienart betrachtet wird (White 2008).

Die WHO geht davon aus, dass in Gabun im Jahre 2010 der weitaus größte Teil der Malariafälle durch *P. falciparum* verursacht wurde und diese überwiegend durch die Hauptvektoren *Anopheles gambiae*, *funestus* und *melas* übertragen wurden (WHO 2012). Die Spezies *P. vivax* wurde in Gabun bisher nicht beobachtet, dafür wurden bei 0,5 % der Malariafälle eine Infektion mit *P. ovale* und bei 0,5 % mit *P. malariae* nachgewiesen (Mawili-Mboumba *et al.* 2010). *P. knowlesi* Infektionen sind in Gabun sehr unwahrscheinlich da die Affengattung der Makaken, die das Reservoir des Parasiten bildet, in Zentralafrika nicht heimisch ist (Jongwutiwes et al. 2011).

1.1.3. Lebenszyklus der Malariaparasiten

Der Lebenszyklus der Plasmodien läuft im Menschen und in der *Anopheles*-Stechmücke ab (siehe Abbildung 1). Der Mensch dient als Zwischenwirt, in dem die asexuelle Phase mit exoerythrozytärer und erythrozytärer Schizogonie

stattfindet. Die exoerythrozytäre Schizogonie beginnt mit dem Stich einer infektiösen weiblichen Stechmücke (White 2009). Die Mücke deponiert dabei sich in ihrem Speichel befindende Sporozoiten in den menschlichen Blutkreislauf (Rosenberg *et al.* 1990). Innerhalb von maximal 45 Minuten gelangen die Sporozoiten über die Blutbahn zur Leber und infizieren Hepatozyten. Dort erfolgt eine asexuelle Vermehrung und der Parasit reift zu einem Leberschizonten heran, der sich weiter zu bis zu 30 000 Merozoiten pro infizierter Zelle entwickelt. *P. vivax* und *P. ovale* bilden zusätzlich Dauerstadien, sogenannte Hypnozoiten, welche Monate bis Jahre im Lebergewebe verbleiben und zu Rezidiven der Malaria tertiana führen können. Der herangereifte Leberschizont platzt bei *P. falciparum* im Durchschnitt 5,5 Tage, bei *P. knowlesi* 5 bis 7 Tage, bei *P. vivax* sowie *P. ovale* 8 bzw. 9 Tage und bei *P. malariae* 15 Tage nach der Hepatozyteninfizierung. Dadurch gelangen je nach Spezies 2 000 (*P. malariae*) bis 30 000 (*P. falciparum*) Merozoiten in die Blutbahn. Von dort infizieren die freigewordenen Merozoiten Erythrozyten und die erythrozytäre Schizogonie beginnt. Intraerythrozytär durchwandert der Parasit innerhalb von ungefähr 24 Stunden bei *P. knowlesi*, 48 Stunden bei *P. falciparum*, *vivax* und *ovale*, beziehungsweise 72 Stunden bei *P. malariae* verschiedene Reifestadien – von der Ringform (junger Trophozoit), über das reife Trophozoiten-, bis hin zum Schizonten-Stadium. Ein reifer Trophozoit ist durch sichtbares Malariapigment, bestehend vor allem aus dem erythrozytären Hämoglobinabbauprodukt Hämozoin, in der Vakuole des Parasiten charakterisiert (White 2009). Von einem Schizonten spricht man, wie oben erwähnt, wenn sich der Nukleus anfängt zu teilen. Hat der Parasit alle Stadien durchlaufen, werden der Erythrozyt und die parasitophore Vakuole zerstört und eine neue Generation von 8 bis 32 Merozoiten gelangt in die Blutbahn um neue Erythrozyten zu infizieren (Desakorn *et al.* 2005). Die sukzessive Infektion von Erythrozyten durch asexuelle Parasitengenerationen führt zu einer exponentiellen Vermehrung der Parasiten, die nur durch metabolische Restriktion und eine mögliche Immunantwort gebremst werden kann. Während den erythrozytären Schizogoniezyklen differenziert ein geringer Teil der Merozoiten zu männlichen Mikrogametozyten und weiblichen

Makrogametozyten. In der darauffolgenden Gametozytogonie findet eine Reifung dieser Gametozyten statt - ein Prozess, der für *P. falciparum* sieben bis zehn Tage dauert. Mit den reifen Geschlechtsformen wird das infektiöse Stadium für den Endwirt, die *Anopheles*-Mücke, erreicht. Nimmt die Stechmücke bei einem Stich eines infizierten Menschen weibliche und männliche Gametozyten auf, kann eine Befruchtung im Darm der Mücke, die sogenannte Sporogonie, stattfinden. In dieser sexuellen Phase entwickeln sich neue Sporozoiten, die in die Speicheldrüse der Mücke wandern und dort verbleiben, bis ein weiterer Mensch gestochen wird. Der Zyklus kann von neuem beginnen (White 2009).

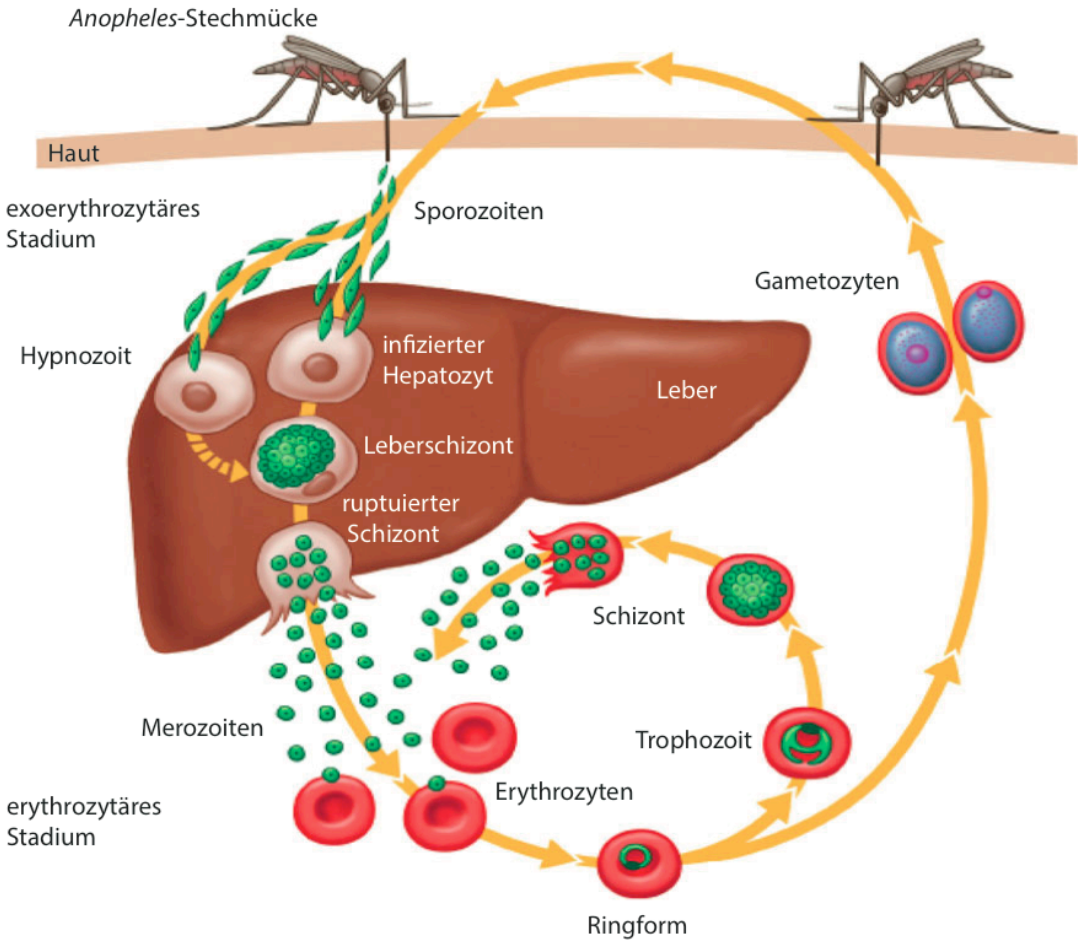

Abbildung 1: Lebenszyklus der Malariaparasiten (nach Hill 2011)
Der Mensch dient als Zwischenwirt der Malariaparasiten. In ihm findet die asexuelle Phase mit exoerythrozytärer und erythrozytärer Schizogonie statt. Die sexuelle Phase erfolgt in der *Anopheles*-Stechmücke, dem Endwirt (Hill 2011).

1.2. Therapie der Malaria

Mortalitäts- und Morbiditätsstatistiken der Malariaerkrankung korrelierten in der Vergangenheit mit der Verfügbarkeit oder dem Mangel an effektiven Antimalariamedikamenten (Olliaro & Wells 2009). Präventive Maßnahmen, wie die Expositionsprophylaxe durch zum Beispiel das Tragen langer, heller Kleidung oder die Vektorkontrolle, beispielsweise mit insektizid-imprägnierten Mosquitonetzen, können zwar die Wahrscheinlichkeit einer Malariainfektion verringern, bieten jedoch keinen kompletten Schutz vor der Erkrankung (WHO 1997, Philips-Howard *et al.* 2003). Die Entwicklung einer effektiven Schutzimpfung würde einen wichtigen Schritt in Richtung Kontrolle und Elimination der Malaria bedeuten (Mordmüller 2010). Verschiedene Impfstoffkandidaten befinden sich in klinischen Studienphasen, wobei ein Vakzinekandidat, RTS,S/AS01, bereits in Phase 3 getestet wird. Vorläufige Ergebnisse der Studie ergaben, dass nach der dritten Impfung bei Kindern im Alter zwischen 5 und 17 Monaten die Impfstoffwirksamkeit gegen klinische Malaria bei 55,8 % und im Alter zwischen 6 und 12 Wochen bei 31,3 % liegt (Agnandji et al. 2011, Agnandji et al. 2012). Solange es keine hochwirksame Impfung gibt, bleibt somit das Haupt-Standbein der Malariakontrolle die Chemotherapie mit Antimalariamedikamenten (Mordmüller 2010).

1.2.1. Wirkstoffklassen der Antimalariatherapie

Für die Chemoprophylaxe und -therapie der Malaria stehen verschiedene Wirkstoffklassen zur Verfügung. Hierzu zählen Chinolinderivate, Artemisininverbindungen und Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette. Des Weiteren werden Antibiotika, welche neben einer antibakteriellen auch eine antiplasmodiale Wirkung haben, verwendet. Eine wichtige Rolle dabei spielen die Folsäuresynthese-Inhibitoren. Tabelle 1 zeigt die unterschiedlichen Wirkstoffklassen mit ihren Vertretern (White 2009). Im Folgenden wird speziell auf die Chinolinderivate Chinin (QN), Chloroquin (CQ) und Amodiaquin (AQ) sowie die Artemisininverbindungen Artesunat (AS) und Dihydroartemisinin (DHA) (in Tabelle 1 kursiv markiert) eingegangen, da diese in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Tabelle 1: Wirkstoffklassen der Antimalariatherapie und ihre klinisch verwendeten Vertreter

Wirkstoffklasse	Vertreter
Chinolinderivate	*Chinin*, *Chloroquin, Amodiaquin*, Chinidin, Mefloquin, Halofantrin, Lumefantrin, Piperaquin, Pyronaridin, Primaquin
Artemisininverbindungen	*Artesunat, Dihydroartemisinin*, Artemether, Artemotil, Artemisinin
Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette	Atovaquon
Folsäuresynthese-Inhibitoren	Pyrimethamin, (Chlor-) Proguanil, Trimethoprim, Sulfonamide, Sulfone
Antibiotika mit antiplasmodialer Wirkung	Tetracyclin, Doxycyclin, Clindamycin, Azithromycin

1.2.1.1. Chinolinderivate (Chinin, Chloroquin, Amodiaquin)

1820 gelang es den französischen Chemikern Pelletier und Caventou Chinin aus der Rinde des Chinarindenbaums zu isolieren. Schon bald wurde es zum Mittel der Wahl für Wechselfieber (Yeka *et al.* 2009, Bruce-Chwatt 1988). In den 1940er Jahren versuchte man Chinin durch einen ähnlichen, jedoch synthetisch hergestellten Wirkstoff zu ersetzen. Es wurde die Gruppe der 4-Aminochinoline entwickelt, zu der Chloroquin und Amodiaquin gehören (Wernsdorfer & Payne 1991). Durch seine relativ gute Verträglichkeit, hohe Effektivität und einfache sowie kostengünstige Herstellung wurde Chloroquin das meist verbreitete Antimalariamedikament zur Therapie der unkomplizierten *P. falciparum* Malaria (Slater 1993). Nach Entdeckung erster Resistenzfälle (siehe 1.3.2.2) wurden zunehmend alternative Antimalariamedikamente eingesetzt (Wernsdorfer & Payne 1991).

Der Wirkmechanismus der Chinolinderivate beeinflusst den Hämoglobinabbau des Parasiten und betrifft nur die intraerythrozytären Parasitenstadien (Slater 1993). Die genauen Angriffspunkte der unterschiedlichen Chinolinderivate sind jedoch nicht vollständig geklärt (Gorka *et al.* 2013). Studien ergaben, dass Chloroquin einen Komplex mit Ferriprotoporphyrin IX (FP) bildet. Chloroquin akkumuliert in der Nahrungsvakuole des intraeryhtrozytären Parasiten, in der

FP, ein toxisches Abbauprodukt von Hämoglobin, gebildet wird. FP wird in unschädliches Hämozoin oder Malaria-Pigment umgewandelt. Diese Umwandlung wird in Anwesenheit von Chloroquin gehemmt. Die erhöhte Konzentration von freiem FP führt zur Abtötung des Parasiten (Slater 1993, Ginsburg *et al.* 1999). Der Wirkmechanismus von Chinin und Amodiaquin scheint jedoch nicht identisch mit dem von Chloroquin zu sein, da Chinin, wie auch Amodiaquin, zum Teil gegen chloroquinresistente Parasiten wirksam ist (Gorka *et al.* 2013).

1.2.1.2. Artemisininverbindungen (Artesunat, Dihydroartemisinin)

Artemisinin und seine noch potenteren Derivate stellen die momentan hochwirksamsten Antimalariasubstanzen dar, mit einer raschen Beseitigung der Parasitämie und schnellen Linderung der Symptome. Sie zeigen eine gute Verträglichkeit und Sicherheit (WHO 2010a, Ribeiro & Olliaro 1998). Seit 1967 unterstützte das Militär der Volksrepublik China die Forschung an einheimischen Pflanzen, die als traditionelle Heilmittel benutzt wurden, als Ursprung für neue Medikamente. Dazu zählte unter anderem der einjährige Beifuß, *Artemisia annua*, aus dem 1972 die kristalline Verbindung Artemisinin, ein Sesquiterpen-Lacton-Endoperoxid, isoliert werden konnte. *Artemisia annua* wurde in der traditionellen chinesischen Medizin gegen Symptome wie Schüttelfrost und Fieber bei Malariaerkrankung angewendet (Klayman 1985). Heute ist das meist verwendete Artemisininderivat das besser wasserlösliche Artesunat. Es wird sehr schnell und fast ausschließlich *in vivo* in Dihydroartemisinin umgewandelt, welches die größte Wirksamkeit der Artemisininverbindungen zeigt (Hall *et al.* 2013).

Artemisininverbindungen wirken gegen alle Blutstadien, angefangen vom Ringform- bis zum frühen Schizontenstadium (White 2009). Außerdem wurde eine moderate Verringerung der frühen Gametozytenstadien und somit der Malariatransmission durch ihren Einsatz festgestellt (Bousema *et al.* 2006, Shah *et al.* 2013). Der Wirkmechanismus ist bis heute nicht vollständig geklärt und wird kontrovers diskutiert. Entscheidend für die Antimalariaaktivität scheint die Peroxidbrücke des Artemisinins und seiner Derivate zu sein (White 2009).

Eine Annahme geht davon aus, dass es durch die Anwesenheit von Eisen-Ionen zur Peroxidbrückenspaltung kommt, instabile sauerstoffzentrierte Radikale frei werden, zu kohlenstoffzentrierten Radikalen umgesetzt werden und einen oxidativen Stress im Parasiten auslösen (Meshnick *et al.* 1991, Meshnick *et al.* 1993, Olliaro *et al.* 2001). Eckstein-Ludwig *et al.* vermuten hingegen, dass die Hemmung der kalziumabhängigen ATPase *Pf*ATP6 des Malaria-Parasiten durch Artemisinin eine entscheidende Rolle im Wirkmechanismus spielt. Es konnte gezeigt werden, dass die Peroxidbrückenspaltung erst nach Bindung dieses Enzyms stattfindet. *Pf*ATP6 ist im sarkoplasmatischen Retikulum von *P. falciparum* lokalisiert (Eckstein-Ludwig *et al.* 2003).

1.2.2. Chemoprophylaxe der Malaria

Abhängig von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel dem geplanten Reisegebiet mit entsprechender Resistenzlage und der Aufenthaltsdauer, werden unterschiedliche Medikamente, die im Folgenden genannt werden, zur Chemoprophylaxe der Malaria empfohlen. Diese wirken auf verschiedene Lebenszyklusstadien der Parasiten. Sie verhindern nicht die Infektion, sondern unterdrücken den klinischen Ausbruch einer Malariainfektion (DTG 2013). Während Chloroquin und Mefloquin blutschizontozid sind, das heißt während des erythrozytären Stadiums wirken, zeigt die Kombination aus Atovaquon/Proguanil zusätzlich eine kausalprophylaktische Aktivität, das heißt die Parasiten werden bereits im Leberstadium bekämpft (Baird 2005, Boggild *et al.* 2007). Doxycyclin wirkt ebenfalls blutschizontozid und teilweise kausalprophylaktisch (Tan *et al.* 2011). Primaquin ist momentan das einzig zugelassene Medikament zur Bekämpfung von Hypnozoiten einer *P. vivax* oder *P. ovale* Infektion (Hill *et al.* 2006). Des Weiteren ist es gegen reife *P. falciparum* Gametozyten wirksam und bekämpft Parasiten aller Malariaspezies im Leberstadium. Es könnte somit auch als primäre Prophylaxe (kausalprophylaktisch) eingesetzt werden (Shekalaghe *et al.* 2007, Hill *et al.* 2006). Doxycyclin und Primaquin sind jedoch beide als Malariaprophylaxe in Deutschland nicht zugelassen (DTG 2013). Da Artemisininverbindungen eine

sehr kurze Halbwertszeit haben, dienen sie nicht zur Chemoprophylaxe gegen Malaria (White 2009).

1.2.3. Chemotherapie der unkomplizierten *P. falciparum* Malaria

Die seit 2006 empfohlene Therapie der WHO für unkomplizierte *P. falciparum* Malariafälle in endemischen Gebieten ist eine orale Artemisinin-Kombinationstherapie (White 2009). Diese beinhaltet Therapien, in welchen die eine Komponente das Artemisinin oder eines seiner oral wirksamen Derivate (Artesunat, Dihydroartemisinin, Artemether) und die andere Komponente eine der folgenden langwirksamen Partnerdrogen ist: Amodiaquin, Lumefantrin, Mefloquin, Sulfadoxin-Pyrimethamin oder Piperaquin (WHO 2010a). Beide Komponenten haben unabhängige biochemische Angriffspunkte im Parasiten sowie eine unterschiedliche Pharmakokinetik. Durch die Kombination der kurzwirksamen Artemisininverbindungen mit langwirksamen Partnerdrogen verkürzt sich die Therapiedauer und erhöht sich somit die Compliance. Außerdem wird der Resistenzentwicklung der Parasiten entgegengewirkt, da die Wahrscheinlichkeit der Parasiten, Resistenzen gegen beide Komponenten zu entwickeln, niedriger ist, als gegen eine Komponente alleine (Kremsner & Krishna 2004, Mordmüller & Kremsner 2006).

Für Gabun wird als erste Wahl zur Behandlung der unkomplizierten Malaria die Kombination aus Artesunat und Amodiaquin empfohlen. Vier Milligramm Artesunat pro Kilogramm Körpergewicht und zehn Milligramm Amodiaquin pro Kilogramm Körpergewicht sollen einmal täglich für drei Tage oral verabreicht werden. Als Alternative steht Artemether-Lumefantrin zur Verfügung (Ministère de la Santé de Gabon 2008, WHO 2010a).

1.2.4. Chemotherapie der komplizierten *P. falciparum* Malaria

Zur Therapie der komplizierten *P. falciparum* Malaria wird für alle Altersklassen als erste Wahl eine Therapie mit Artesunat empfohlen (Sinclair *et al.* 2012, Dondorp *et al.* 2010, WHO 2010a). Hierbei werden 2,4 mg Artesunat pro Kilogramm Körpergewicht intravenös oder intramuskulär bei Aufnahme sowie nach 12 und 24 Stunden und danach einmal täglich verabreicht. Als Alternative

kann eine intravenöse oder intramuskuläre Chinin-Dihydrochlorid-Therapie angewandt werden. Acht Stunden nach einer Chinin-Sättigungsdosis von 20 mg/kg Salz (äquivalent zu 16 mg/kg Base) pro Kilogramm Körpergewicht wird eine Chinin-Erhaltungsdosis von 10 mg Salz (äquivalent zu 8 mg/kg Base) pro Kilogramm Körpergewicht im 8-Stunden-Intervall verabreicht (Lesi & Meremikwu 2004, WHO 2010a). Beide Therapien müssen mindestens über 24 Stunden verabreicht werden und sollten dann, sobald der Patient klinisch stabil ist, auf eine orale Antimalariatherapie in Form einer Artemisinin-Kombinationstherapie (siehe 1.2.3) umgestellt werden (WHO 2010a).

1.3. Resistenzentwicklung von *P. falciparum*

1.3.1. Resistenzentstehung

Bislang führte jeder verbreitete Einsatz eines Antimalariamedikamentes zum Auftreten von resistenten Parasiten gegen die eingesetzte Substanz (siehe 1.3.2). Spontane Mutationen im Erbgut der Plasmodien oder Gen-Vervielfältigungen sind der erste Schritt zur Resistenzentstehung. Diese entstandenen Mutanten können vor allem in subtherapeutischen Konzentrationen der Antimalariamedikamente besser überleben als sensitive Parasiten. Sie werden selektiert und können sich weiter ausbreiten – der zweite Schritt zur Resistenzentstehung. Um dieser Entwicklung entgegenzuwirken ist die genaue Einhaltung der empfohlenen Medikamentenschemata von großer Wichtigkeit (Mordmüller & Kremsner 2006, White 2009).

1.3.2. Chronologie der Resistenzentwicklung

1.3.2.1. Chinin

1910 erfolgte der erste Bericht über Resistenzfälle von *P. falciparum* gegen das damalige Antimalariamedikament der ersten Wahl, Chinin. Da Chinin schon bald durch andere Medikamente ersetzt und fast ausschließlich nur noch für komplizierte Malariafälle eingesetzt wurde, waren die Parasiten bis Anfang der 1980er Jahre einem eher geringen Medikamentendruck ausgesetzt (siehe 1.3.2.4) und es konnten zunächst keine großen Veränderungen der Sensitivität

von *P. falciparum* gegen Chinin beobachtet werden (Wernsdorfer & Payne 1991).

1.3.2.2. Chloroquin/Amodiaquin

Die ersten Chloroquin-Resistenzfälle gegen *P. falciparum* wurden 1960 in Venezuela und 1962 an der Grenze zwischen Thailand und Kambodscha entdeckt (Maberti 1960, Harinasuta *et al.* 1965). Von dort breiteten sich die Resistenzfälle weiter aus und erreichten nach circa zwei Jahrzehnten den afrikanischen Kontinent (Wernsdorfer & Payne 1991). Heute gibt es nur noch wenige Länder in tropischen Gebieten, z.B. nördlich des Panamakanals, in denen Chloroquin gegen *P. falciparum* wirksam ist (White 2009). Jedoch wurde in einigen Regionen, wie z.B. in Malawi, ein Wiederanstieg der Chloroquin-Wirksamkeit gegen *P. falciparum* nach längerem Wegfall des Medikamentendrucks durch Therapieänderung festgestellt (Takechi *et al.* 2001). Chloroquin-Resistenz der Parasiten ist mit Mutationen im *Pf*CRT-Gen von *P. falciparum* (*P. falciparum chloroquine resistance transporter gene*) assoziiert. Die in diesem Gen kodierten Proteine besitzen eine Transportfunktion und regulieren dadurch die intraparasitäre Medikamentenkonzentration (Fidock *et al.* 2000, Valderramos & Fidock 2006). Diese bekannten DNA-Abschnitte im Genom des Parasiten werden als Resistenzmarker bezeichnet.

Gegen Amodiaquin wurden vor allem in Südamerika Resistenzen ermittelt, während in West- und Zentralafrika dieses Antimalariamedikament weiterhin Wirksamkeit zeigt und zum Teil, wie in Gabun, als Partnerdroge von Artesunat empfohlen wird (Echeverry *et al*. 2006, Brasseur *et al.* 1999, Olliaro & Mussano 2003, Eyase *et al.* 2013, Ministère de la Santé 2008). Auch bei diesem 4-Aminochinolin wurde eine Assoziation von Mutationen im *Pf*CRT-Gen mit Resistenzen gegen Amodiaquin festgestellt (Valderramos & Fidock 2006).

1.3.2.3. Sulfadoxin/Pyrimethamin

Als Alternative bei chloroquinresistenten Fällen wurde ab Mitte der 1960er Jahre vor allem die Kombination des Sulfonamids Sulfadoxin mit Pyrimethamin

eingesetzt. Schon bald wurden jedoch Resistenzen von *P. falciparum* gegen Pyrimethamin festgestellt (Wernsdorfer & Payne 1991). Die Kombination mit Sulfadoxin ist nun in den meisten Teilen Ostasiens, sowie in Süd- und Zentralafrika und Südamerika, nicht mehr wirksam (White 2009). Pyrimethamin sowie Sulfadoxin greifen beide in die Folsäuresynthese des Parasiten ein. Ersteres hemmt die Diyhdrofolatreduktase (DHFR), während Zweiteres die Dihydropteroatsynthase (DHPS) inhibiert. Resistenzen von *P. falciparum* gegen diese Medikamente sind mit Mutationen im entsprechenden *Pf*DHFR-Gen bzw. *Pf*DHPS-Gen assoziiert, wobei häufig eine Kombination von Mutationen in beiden Genen beobachtet werden kann (Peterson *et al.* 1988, Hyde 2002).

1.3.2.4. Mefloquin

Nach der Verbreitung von Chloroquin- und Sulfadoxin/Pyrimethamin-Resistenzen erfolgte Anfang der 1980er Jahre der vermehrte Einsatz von Chinin als Tertiärtherapie (White 2009). Chininresistenzfälle blieben beschränkt auf die indochinesische Halbinsel und einige westliche Pazifikinseln (Wernsdorfer & Payne 1991). 1984 ersetzte Mefloquin, ein fluoriertes Chinolin, Chinin als erste Wahl gegen *P. falciparum* Malaria in Thailand (White 2009). Jedoch schon bald konnten Studien Mefloquin-Resistenzen in Thailand und an seinen Grenzen feststellen (Nosten *et al.* 1991, Fontanet *et al.* 1993). Eine erhöhte Kopienzahl im *Pf*MDR1-Gen (*P. falciparum* multidrug resistance gene1) von *P. falciparum* ist assoziiert mit mefloquin- und chininresistenten Parasiten (Price *et al.* 2004, White 2009).

1.3.2.5. Artemisininverbindungen

In den 1990er Jahren drohte vor allem in Thailand, Kambodscha und Vietnam, aufgrund von ineffektiven Medikamenten, Malaria nicht mehr behandelbar zu sein. Entlang der Grenze zwischen Thailand und Kambodscha, der Ausgangspunkt von sulfadoxin-, pyrimethamin- sowie chloroquinresistenten Stämmen, traten immer wieder multiresistente Parasiten auf. Das in China wiederentdeckte Antimalariamittel Artemisinin und seine Derivate (siehe 1.2.1) zeigte jedoch sogar bei multiresistenten Parasiten eine hohe Wirksamkeit. Die erste Artemisinin-Kombinationstherapie (damals Artesunat mit Mefloquin) wurde

landesweit 2001 in Kambodscha eingesetzt (White 2009). Um gegen eine Resistenzentwicklung dieser neuen Wirkstoffgruppe anzukämpfen, beschloss die WHO, Artemisininverbindungen nur in Kombination mit mindestens einer Partnerdroge (siehe 1.2.3) für unkomplizierte *P. falciparum* Malariafälle zu verabreichen (WHO 2010a).

Trotz dieser Bemühungen berichten neue Studien über eine verminderte Wirksamkeit gegen Artemisininverbindungen in Form einer verspäteten Parasiten-Clearance an der Grenze zwischen Thailand und Kambodscha (Dondorp *et al.* 2009, Phyo *et al.* 2012, Amaratung *et al.* 2012). Jedoch nur für sehr wenige Parasiten konnten Noedl *et al.* eine Kombination aus leicht verringerten *in vitro* Sensitivitätswerten, Behandlungsversagen und verlängerter Parasiten-Clearance nach einer Artesunat-Monotherapie feststellen. Diese Parasiten erfüllten somit die von Krishna und Kremsner definierten Kriterien der Parasitenresistenz (siehe 1.3.3) (Noedl *et al.* 2008, Krishna & Kremsner 2013). Auf der Suche nach einem Resistenzmechanismus oder molekularen Marker der Parasiten mit verminderter Sensitivität gegen Artemisininverbindungen, konnten Ariey *et al.* einen Zusammenhang zwischen K13-Propeller Mutationen und einer verminderten Artemisininwirksamkeit nachweisen (Ariey *et al.* 2014).

1.3.3. Sensitivitätstestung

Nach Krishna und Kremsner wird Parasitenresistenz durch ein Therapieversagen, das mit erhöhten *in vitro* Sensitivitätswerten korreliert, sowie einer zusätzlich verlängerten Parasiten-Clearance bei einem adäquaten Spiegel des untersuchten Medikamentes im Blut des Patienten definiert. Außerdem kann die Suche nach Resistenzmarkern hilfreich sein. Ein validierter Resistenzmarker für ein bestimmtes Medikament kann jedoch erst bestimmt werden, wenn für dieses Medikament bereits ein Therapieversagen beobachtet wurde (Krishna & Kremsner 2013). Eine Ausnahme bei der Definition der Parasitenresistenz wird bei Artemisininverbindungen gemacht. Laut WHO liegt eine bestätigte Resistenz vor, wenn nach einer oralen Artemisinin-Kombinationstherapie mit ausreichender Medikamentenkonzentration im Blut die Parasiten entweder für 7 Tage persistieren, oder für 3 Tage, jedoch nur

dann, wenn ein Wiederausbruch der Krankheit innerhalb von 28 bis 42 Tagen erfolgt (WHO 2012). Diese Definition ist umstritten, da sie nicht alle Kriterien des beschriebenen Goldstandards beinhaltet (Krishna & Kremsner 2013).

Wie oben erwähnt, werden zur Bestimmung von Parasitensensitivitäten gegen Antimalariamedikamente neben klinischen Studien auch *in vitro* Sensitivitätstests durchgeführt. Hierbei wird die Inhibierung einer Substanz auf das Parasitenwachstum über eine Zeitspanne in einer Zellkultur gemessen. Dadurch wird der direkte Kontakt zwischen Parasit und Substanz untersucht, während störende Wirtsfaktoren, zum Beispiel die Immunität des Patienten, vermieden werden (WHO 2010b). Das Wachstum des Parasiten kann durch unterschiedliche Methoden, wie die mikroskopische Bestimmung der Parasitenanzahl, die Radioisotop-Aufnahme in den Parasiten oder nicht-radioaktive Methoden bestimmt werden. Zu den nicht-radioaktiven Methoden gehören beispielsweise, neben fluorometrischen Nachweisen, Immunoassays (WHO 2007). Hierzu zählt die von Noedl *et al.* entwickelte Methode, in der das Parasitenwachstum durch die Quantifizierung des „*P. falciparum*-Histidin-reichen-Proteins-2“ (*Pf*HRP2) (Noedl *et al.* 2005) bestimmt wird. *Pf*HRP2 ist ein messbares, histidin- und alaninreiches Protein, das von *P. falciparum* während der Wachstums- und Entwicklungsphase in großen Mengen synthetisiert wird und somit das Parasitenwachstum widerspiegelt (Desakorn *et al.* 1997, Noedl *et al.* 2005). Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt.

1.4. Entwicklung neuer Antimalariamedikamente

1.4.1. Medikamentenentwicklung

Da Antimalariamedikamente nach wie vor eine entscheidende Rolle in der Malariakontrolle spielen, sie jedoch permanent bedroht sind ihre Wirksamkeit durch Senstivitätsverluste der Parasiten zu verlieren, ist die Entwicklung neuer Antimalariamedikamente essentiell (Mordmüller 2010). Bis ein neues Chemotherapeutikum zugelassen wird, muss es erst in der präklinischen und klinischen Phase getestet werden. In der präklinischen Phase wird die Wirksamkeit der Substanz durch *in vitro* Tests mit Laborstämmen der Malariaparasiten und - bei guten Ergebnissen - danach mit klinischen Isolaten

untersucht. Klinische Isolate spiegeln die aktuelle Resistenzlage der Parasiten einer bestimmten Region wider. Dadurch kann getestet werden, ob Resistenzen gegen bestehende Antimalariamedikamente die Empfindlichkeit der Parasiten gegen die neue Substanz verringern. Als nächster Schritt erfolgt eine *in vivo* Überprüfung des neuen Chemotherapeutikums in Mausmodellen mit murinen Malariaerregern wie *P. berghei*. Erst nach Toxizitätstests in verschiedenen Tiergruppen und einer aufwendigen Herstellung nach pharmazeutischen Kriterien beginnen die klinischen Phasen I bis III der Entwicklung, in denen die neue Substanz im menschlichen Organismus untersucht wird (Fidock *et al.* 2004).

1.4.2. Proteasom-Inhibitoren

Eine neue Wirkstoffgruppe gegen Malariaerreger stellen Proteasom-Inhibitoren dar. Das Proteasom gehört zu den Threoninpeptidasen und ist ein Enzymkomplex, der für den nichtlysosomalen kontrollierten Proteinabbau in eukaryotischen Zellen zuständig ist. Sie beeinflussen somit die Zellproliferation, die Qualität der Proteine, den Zelltod sowie die Signaltransduktion (Nandi *et al.* 2006, Kreidenweiss *et al.* 2008). Avram Hershko, Aaron Ciechanover and Irwin Rose erhielten für diese Entdeckung 2004 den Nobelpreis für Chemie (Giles 2004). Weitere Forschungen ergaben, dass Proteasome auch in *P. falciparum* vorkommen und während des gesamten Zellzyklus exprimiert werden (Mordmüller *et al.* 2006). Die Gruppe der Proteasom-Inhibitoren erlangte großes Interesse nachdem der erste Proteasom-Inhibitor, Bortezomib (Velcade®), zur Therapie des multiplen Myeloms zugelassen wurde (Tsukamoto & Yokosawa 2009). In verschiedenen Studien konnte eine antiplasmodiale Wirksamkeit von Proteasom-Inhibitoren festgestellt werden (Tschan *et al.* 2011). Eine neue Klasse der Proteasom-Inhibitoren sind Peptido-Sulfonyl-Fluoride (Brouwer *et al.* 2012). Ein Vertreter hiervon ist die Substanz PW28, die in vorangegangen Untersuchungen sehr gute Wirksamkeiten gegen Laborstämme von *P. falciparum* zeigte (Tschan *et al.* 2013). Teile der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten von PW28 wurden bereits in dieser Publikation veröffentlicht.

1.5. Zielsetzung

Sensitivitätsverluste von Malariaparasiten gegenüber Antimalariamedikamenten stellen eine permanente Gefahr für die Bekämpfung der Malariaerkrankung dar. Um die aktuelle Wirksamkeit von Antimalariamedikamenten zur Behandlung der unkomplizierten und komplizierten Malaria in einer bestimmten Region zu ermitteln und periodische Veränderungen zu überwachen ist die regelmäßige Durchführung von Sensitivitätstests zur Ermittlung der Parasitenempfindlichkeit gegenüber Medikamenten in einer Zellkultur essentiell.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die *in vitro* Sensitivitätsbestimmung von *P. falciparum* gegenüber Antimalariamedikamenten in Lambaréné (Gabun) und Umgebung – einem Hochrisikogebiet für *P. falciparum* Malaria. Hierzu sollen die Sensitivitäten der Parasiten gegen die Therapeutika der ersten Wahl bei der Behandlung der komplizierten und unkomplizierten Malaria, Amodiaquin und Artesunat sowie dessen aktiver Metabolit Dihydroartemisinin, überwacht werden, um bei eventuellem Wirksamkeitsverlust einen Medikamentenwechsel anzustreben. Außerdem wird die Wirksamkeit von Chinin, dem Alternativtherapeutikum zu Artesunat, bei der Behandlung der komplizierten Malaria getestet. Da in einigen Regionen ein Wiederanstieg der Parasitensensitivität gegen Chloroquin nach Einstellung der Chloroquingabe festgestellt wurde (siehe 1.3.2.2), soll die Wirksamkeit von Chloroquin in Lambaréné und Umgebung ermittelt werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der *in vitro* Wirksamkeit eines neu zu untersuchenden Chemotherapeutikums, dem Proteasom-Inhibitor PW28, gegen klinische *P. falciparum* Isolate. Außerdem wird auf die Problematik der Interpretation von *in vitro* Sensitivitätstests eingegangen.

Abschließend werden zwei Fragestellungen verfolgt. Es soll ermittelt werden, ob erstens Korrelationen und zweitens regionale Unterschiede zwischen den Wirksamkeiten der oben genannten Chemotherapeutika bestehen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Materialien werden in den Tabellen 2 bis 7 wiedergegeben.

Tabelle 2: Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Substanzbezeichnung	Hersteller
Phosphate Buffered Saline (PBS)	GIBCO/ Invitrogen, Paisley
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat Tween®20	SIGMA-Aldrich, Steinheim
TMBOne (3,3',5,5'-Tetrametylbenzidin)	Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup
Schwefelsäure	VWR International Prolabo, Fontenay-sous-Bois
Gentamicin	GIBCO/ Invitrogen, Paisley
L-Glutamin	SIGMA-Aldrich, Steinheim
HEPES Pufferlösung (1M)	PAA, Pasching
Clearing Buffer Paracheck *Pf*®	Orchid Biomedical Systems, Verna/Goa
Natriumhydrogencarbonat	MERCK, Darmstadt
Glukose	SIGMA-Aldrich, Steinheim
Hypoxanthin	SIGMA-Aldrich, Steinheim
Glukose Monoydrat	Roth, Karlsruhe
Adenin	Roth, Karlsruhe
D-Mannitol	SIGMA-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	MERCK, Darmstadt
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	MERCK, Darmstadt
Pufferlösung nach WEISE pH 7,2	MERCK, Darmstadt

Tabelle 3: Nährmedien und Seren

Nährmedium/Serum	Hersteller
RPMI Medium 1640 Pulver + L-Glutamin	GIBCO/ Invitrogen, Paisley
RPMI Medium 1640 Flüssigkeit + HEPES	GIBCO/ Invitrogen, Paisley
Bovines Serum Albumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Albumax® II	GIBCO/ Invitrogen, Paisley

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper	Konzentration und Lösungsmittel	Hersteller
Monoclonal Mouse IgM anti-*P. falciparum*, MPFM-55A	9,4 mg/ml 0,02% Natriumazid	Immunology Consultants Laboratory, Inc, Newberg/Oregon
Monoclonal Mouse IgG anti-*P. falciparum*, MPFG-55P	1,0 mg/ml 0,002% Thiomersal	Immunology Consultants Laboratory, Inc, Newberg/Oregon

Tabelle 5: Medikamente

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Hersteller
Amodiaquin Dihydrochlorid Dihydrat	465	SIGMA
Artesunat	384	Sanofi Aventis
Chinin Hemisulfat Salz	374	SIGMA
Chloroquin Diphosphat Salz	516	SIGMA
Dihydroartemisinin	284	Shinpoong
PW28	657	Universität Utrecht, Arbeitsgruppe Liskamp

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Substanzbezeichnung	Hersteller
Einmallanzetten Unistik® 3 Extra	Owen Mumford, Großostheim-Ringheim
ELISAplatten 96 well Costar® 3590	Corning Incorporated, New York
Filterpapier MN 615¼ Ø 150 mm	Machery-Nagel, Dürren
Objektträger 76 x 26 mm ISO 8037	Langenbrinck, Emmendingen
S-Monovette® Li-Heparin (2,7 ml/5,5 ml)	Sarstedt, Nümbrech
S-Monovette® EDTA (1,2 ml)	Sarstedt, Nümbrech
Schnelltest Paracheck *Pf*®	Orchid Biomedical Systems, Verna/Goa
Sterile 96 well Kulturplatten mit Deckel Microtest TM 353075	Becton Dickson Labware Europe, Meylan Cedex
Parafilm PM 999	Pechiney Platic Packaging, Menasha
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Petrischalen	VWR International, West Chester/Pennsylvania
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Falcon® 5 ml Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix
Falcon® 15 ml Konisches Röhrchen	BD Biosciences, Erembodegem-Dorp
Falcon® 50 ml Konisches Röhrchen	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix
10 ml/25 ml Stripette Costar® 4101/4251	Corning Incorporated, New York
25 ml Stripette Costar® 4251	Corning Incorporated, New York
Transferpipette 3,5 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Safety-Multifly®-Set sterile 23G	SARSTEDT, Nümbrecht
Meßfilter für Thermometer ThermoScan® PC 20	Kaz/BRAUN, Lausanne
Vernichtungsbeutel	neoLab, Heidelberg

Tabelle 7: Geräte

Gerätbezeichnung	Hersteller
Trockner Incubator 40 °C Typ 405	Melag, Berlin
Mikroskop Olympus CH30	Olympus Optical Co., Tokio
ABX Pentra 60	Horiba ABX Diagnostics, Montpellier
Labgard Class II Laminar Flow Biological Saftey Cabinet	Nuiare, Plymouth/Minnesota
Zentrifuge Rotanta 460	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Water jacketed CO_2 Inkubator	Thermo Electron Corporation, Waltham/Massachusetts
Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen
Pipetten (verschiedene Größen)	Abimed, Langenfeld
12-Kanalpipette 20-200 µl	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Zizers
Kühlschrank	Beko, Istanbul
Gefrierschrank -20 °C	Concorde, European Union
Magnetischer Heizrührer	Heidolph, Schwabach
Magnetstäbchen	Roth, Karlsruhe
Feinwaage 440-33 N	Kern, Balingen
Waschpufferbehälter	Waddington&Duval, London
ELISAreader Original Multiskan ID 064	Thermo Electron Corporation, Waltham/Massachusetts
Mikrotiterplattenwaschgerät NuncImmuno TM Wash 12	Thermo Electron Corporation, Waltham/Massachusetts
Water Destiller 2012	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Thermometer ThermoScan®	Kaz/BRAUN, Lausanne
Glasglocke („candle jar“)	

2.2. Studienaufbau

Mit der unter 1.5 beschriebenen Zielsetzung wurde die im Folgenden dargestellte Studie erarbeitet. Sie wurde von November 2010 bis August 2011 am medizinischen Forschungslabor von Lambaréné (*franz. Centre de Recherches Medicales de Lambaréné* = CERMEL) und am Albert-Schweitzer-Krankenhaus in Lambaréné, Gabun, durchgeführt. In Tabelle 8 werden die Ein- und Ausschlusskriterien der Studie wiedergegeben.

Tabelle 8: Ein- und Ausschlusskriterien der Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
• Alter über sechs Monate • *P. falciparum* Monoinfektion • Parasitämie über 500 Parasiten/µl Blut • Schriftliche Einverständniserklärung*	• Einnahme von Antimalariamedikamenten in den vorangegangenen vier Wochen

* Bei Minderjährigen wurde die Einverständniserklärung durch die Eltern oder den rechtlichen Betreuer eingeholt. Bei Legasthenie wurde im Beisein eines Zeugen ein Fingerabdruck des Patienten genommen.

2.2.1. Probenentnahme

Bei Verdacht auf Malaria auf Grund von Fiebersymptomatik in den vorangegangenen 48 Stunden oder nach Messung der momentanen tympanischen Körpertemperatur über 37,5 °C wurde mittels kapillarer Blutabnahme ein Malariaschnelltest durchgeführt (siehe 2.3.1) und ein dicker Tropfen angefertigt (siehe 2.3.3). Bei positivem Ergebnis des Malariaschnelltests wurde eine venöse Blutabnahme durchgeführt und für die Blutbildanalyse ein 1,2 ml EDTA-Blutröhrchen sowie für den *in vitro* Sensitivitätstest ein 2,7 ml Lithium-Heparin-Blutröhrchen abgenommen (siehe 2.3.2).

2.2.2. Patientenbehandlung

Nach klinischer Untersuchung, Malariadiagnostik und Blutbildanalyse wurde der Patient nach den neuesten WHO-Richtlinien, wie unter 1.2 beschrieben, behandelt.

2.2.3. Erfasste Daten

Nach Zuteilung einer Identifikationsnummer wurden die persönlichen Daten eines jeden in die Studie eingeschlossenen Patienten in einem Dokumentationsbogen (*engl. Case Report Form = CRF*) erfasst. Die dabei erhobenen Daten sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Im Dokumentationsbogen erfasste Daten eines Studienpatienten

Demographische Daten	Geschlecht, Geburtsdatum & Alter, Geburtsort, Wohnort mit zugehörigen GPS-Koordinaten
Laborchemische und klinische Untersuchungen	Tympanische Körpertemperatur (°C), Parasitämie (Parasiten/µl)
Daten über die Krankheitsgeschichte der Malariainfektion	Fieber in den letzten 48 Stunden, Benutzung von Malariaprävention (Bettnetz, Insektizide, etc.), vorangegangene Einnahme von Malariamedikamenten (Name)

2.2.4. Ethik

Die Studie wurde durch das „Comité d'Ethique Regional Independent de Lambaréné" (CERIL) begutachtet und positiv bewertet. Die Patienten unterzeichneten nach entsprechender eingehender Aufklärung eine Einverständniserklärung. Die Studie folgte den ethischen Prinzipien der Helsinki-Deklaration (5. Fassung).

2.3. Versuchsaufbau

2.3.1. Durchführung und Analyse des Malariaschnelltests *Paracheck Pf*®

Gemäß den Herstellerangaben beruht das Prinzip des durchgeführten Malariaschnelltests (*Paracheck Pf*®) zur Schnelldiagnostik einer *P. falciparum*

Infektion auf einem zweiseitigen Sandwich Immunoassay, welcher quantitativ das Parasitenprotein *Pf*HRP2 (siehe 1.3.3) nachweist. Fünf Mikroliter kapilläres Vollblut des Patienten werden in ein Feld A des Schnelltests pipettiert (siehe Abbildung 2). Danach werden sechs Tropfen (ca. 300 µl) einer Pufferlösung („Clearing Buffer“) in das Feld B getropft und 15 Minuten bis zur Analyse des Tests gewartet. Bei einem positiven Testergebnis entsteht ein Komplex aus einem anti-*Pf*HRP2 monoklonalen Antikörper und dem im Blut vorhandenen *Pf*HRP2. In der Testregion T befindet sich ein zweiter monoklonaler Antikörper der gegen *Pf*HRP2 gerichtet ist. Er ist fest mit der Membran verbunden und lässt bei Bindung des vorher entstandenen Komplexes aus *Pf*HRP2 und erstem Antikörper einen roten Streifen auf der Testregion entstehen. Ist diese rote Bande nach 15 Minuten nicht vorhanden, steht dies für ein negatives Testergebnis. In der Kontrollregion C sind Kaninchen-Antikörper an die Membran gebunden. Sie immobilisieren ungebundene Komplexe und nicht reagierte Konjugate, die nach der Testregion weiter auf der Membran fließen. Auch hier bildet sich bei Bindung eine rote Bande, welche die Validität des Tests widerspiegelt (*Paracheck Pf*®, Orchid Biomedical Systems).

Feld A: Applikation des Vollblutes
Feld B: Applikation der Pufferlösung
Feld T: Testregion
Feld C: Kontrollregion

Abbildung 2: Positives Testergebnis eines Malariaschnelltests *Paracheck Pf*® (aus WHO 2008)

2.3.2. Blutabnahme und hämatologische Analyse

Bei positivem Malariaschnelltest wurde über eine venöse Blutabnahme ein 1,2 ml EDTA- sowie ein 2,7 ml Lithium-Heparin-Blutröhrchen abgenommen. Aus dem EDTA-Blutröhrchen wurde mit dem Hämatologieautomaten ABX PENTRA 60 eine große Blutbildanalyse durchgeführt und die folgenden Werte ermittelt: Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, mittleres korpuskuläres Volumen, mittleres korpuskuläres Hämoglobin, mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenverteilungsbreite, Thrombozyten,

mittleres Thrombozytenvolumen, Thrombokrit, Thrombozytenvolumen-verteilung, Lymphozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, atypische Lymphozyten und große unreife Zellen.

2.3.3. Malariadiagnostik anhand des dicken Tropfens

Zehn Mikroliter kapilläres Vollblut des Patienten wurden mittels einer vorher erstellten Schablone auf einem beschrifteten Glasobjektträger mit der Pipettenspitze verteilt. Die Schablone steckte für die WHO-Zählmethode eine Fläche in Form eines Kreises mit einem Durchmesser von ca. 1 cm ab sowie für die Lambaréné-Zählmethode eine Fläche in Form eines Rechteckes mit den Maßen 1,8 cm mal 1 cm, auf der das Blut gleichmäßig verteilt wurde (WHO 2010c, Planche *et al.* 2001). Der Unterschied zwischen den beiden Methoden ist, dass bei der Lambaréné-Methode ein exaktes Volumen Blut auf eine exakt bestimmte Fläche aufgetragen wird und daher die Menge Blut pro Fläche bekannt ist. Bei der WHO-Methode kann auch ohne Pipette ein Tropfen Blut auf dem Objektträger aufgebracht werden. Für die Quantifizierung werden hierbei die Anzahl der Parasiten und Leukozyten pro Gesichtsfeld bestimmt und mit dem Ergebnis der hämatologischen Analyse verglichen (siehe 2.3.3.3).

2.3.3.1. Giemsa-Färbung

Der dicke Tropfen wurde nach Anfertigung mindestens 15 Minuten in einem Inkubator (40 °C) getrocknet und danach für 20 Minuten in einer 20% Giemsa-Färbelösung gefärbt. Die Färbelösung wurde mit 20 ml Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung und 80 ml Pufferlösung nach WEISE (pH 7,2) angesetzt, gefiltert und in einen Färbebehälter überführt. Die Färbelösung wurde nicht länger als fünf Stunden benutzt. Nach der Färbung wurde der Objektträger vorsichtig in Wasser geschwenkt und im Inkubator (40 °C) getrocknet (WHO 2010c).

2.3.3.2. Absolute Parasitämiebestimmung (Lambaréné-Methode)

Die Lesung des dicken Tropfens erfolgte per Mikroskop bei einer hundertfachen Vergrößerung mit Ölimmersion. Der Großteil der Patienten nahm gleichzeitig an

der Phase II Studie des GMZ2-Malariaimpfstoffes teil. Hier war die WHO-Zählmethode zum Lesen des dicken Tropfens vom Studienprotokoll vorgesehen (siehe 2.3.3.3). Bei den übrigen Studienteilnehmern wurde der dicke Tropfen mit der Lambaréné-Zählmethode gelesen, da dies die Routinezählmethode im CERMEL darstellt und die Quantifizierung ohne Bestimmung der Leukozytenzahl ermöglicht. Es werden die vorhandenen asexuellen Parasiten pro Gesichtsfeld gezählt. Bei bis zu 5 gezählten Parasiten pro Gesichtsfeld müssen 100 Gesichtsfelder gelesen werden. Ab 50 Parasiten pro Gesichtsfeld werden nur 20 Felder gelesen und zwischen 5 und 50 Parasiten 30 Felder.

Bei der Lambaréné-Zählmethode wird die Parasitämie (asexuelle Parasiten/µl Blut) berechnet, indem man die Gesamtzahl der gezählten asexuellen Parasiten durch die Anzahl der ausgelesenen Gesichtsfelder dividiert und mit dem „Mikroskopfaktor“ multipliziert. Der „Mikroskopfaktor“ muss für jedes Mikroskop bestimmt werden. Für das in dieser Studie verwendete Mikroskop OLYMPUS CH30 beträgt er 700. Er gibt die Anzahl der Gesichtsfelder wieder, auf der ein Mikroliter Blut ausgestrichen ist (Planche *et al.* 2001).

2.3.3.3. Absolute Parasitämiebestimmung (WHO-Methode)

Bei der WHO-Methode werden gleichzeitig Parasiten und Leukozyten in einem Gesichtsfeld gezählt. Beträgt die Parasitenzahl zehn oder mehr nach 200 gezählten Leukozyten, kann das Ergebnis notiert werden. Bei einer Parasitenzahl unter 10 werden weitere Gesichtsfelder gelesen bis 500 Leukozyten gezählt sind. Die Parasitämie (asexuelle Parasiten/µl Blut) wird in diesem Fall berechnet, indem man die Anzahl der gezählten Parasiten mit der absoluten Leukozytenzahl multipliziert und das Ergebnis durch die gezählte Leukozytenzahl dividiert. Die absolute Leukozytenzahl wird zuvor bei der Blutbildanalyse bestimmt (siehe 2.3.2). Ein negatives Ergebnis ist erst festgestellt, wenn kein Parasit in mindestens 100 Gesichtsfeldern gefunden wird (WHO 2010c). Bei beiden Methoden wird das Parasitämie-Ergebnis der Erstlesung für das weitere Vorgehen verwendet.

2.3.3.4. Relative Parasitämiebestimmung

Ein Mikroliter Erythrozytenkonzentrat enthält eine Anzahl von ~10^7 Erythrozyten. Um die relative Parasitämie [%] zu bestimmen wird die absolute Parasitämie (asexuelle Parasiten/µl Blut) durch das Produkt aus Hämatokrit (HKT) und Erythrozytenanzahl pro µl Erythrozytenkonzentrat geteilt und mit dem Faktor 100 multipliziert:

$$\frac{absolute\ Parasitämie}{(HKT \bullet 10^7)} \bullet 100 = relative\ Parasitämie$$

2.3.4. Untersuchte Substanzen

In der vorliegenden Studie wurde eine *in vitro* Sensitivitätstestung von klinischen *P. falciparum* Isolaten gegen fünf klinisch zugelassene Antimalariasubstanzen durchgeführt. Des Weiteren wurde der Proteasom-Inhibitor PW28 auf seine Wirksamkeit gegen klinische *P. falciparum* Isolate untersucht. In Tabelle 10 sind die getesteten Substanzen mit ihren entsprechenden Molekulargewichten (MGW), Lösungsmitteln, Stammlösungen und angesetzten Startkonzentrationen aufgelistet.

Tabelle 10: Untersuchte Substanzen

Substanz	MGW [g/mol]	Lösungs-mittel	Stamm-lösung	Start-konzentration
klinisch zugelassene Antimalariasubstanzen				
Amodiaquin Dihydrochlorid Dihydrat	465	DMSO	100 mM	150 nM
Artesunat	384	70% Ethanol	100 mM	10/20/52 nM
Chinin Hemisulfat Salz	374	Methanol	100 mM	10 µM
Chloroquin Diphosphat Salz	516	Aqua dest.	100 mM	1 000 nM
Dihydroartemisinin	284	100% Ethanol	16,67 mM	10/20 nM
Proteasom-Inhibitor				
PW28	657	DMSO	10 mM	556/5 556 µM

Alle Verdünnungsschritte nach der Stammlösung wurden mit komplettem Kulturmedium (Zusammensetzung siehe 2.3.5.1) angesetzt. Für Artesunat, Dihydroartemisinin und PW28 sind verschiedene Startkonzentrationen angegeben, da sie im Laufe der Studie angepasst wurden. Die Lagerungstemperatur betrug für alle Substanzen -20 °C.

2.3.5. Kurzzeitkultivierung von klinischen *P. falciparum* Isolaten

Um die Wirksamkeit der Substanzen gegenüber klinischen *P. falciparum* Isolaten zu testen, wurden die Parasiten direkt kultiviert und in einer Verdünnungsreihe den zu untersuchenden Substanzen ausgesetzt.

2.3.5.1. Ansetzen eines kompletten Kulturmediums

Zum Ansetzen eines kompletten Kulturmediums wurde eine Albumaxlösung benötigt. Für 500 ml Albumax wurden die in Tabelle 11 aufgelisteten Substanzen gemischt, auf 500 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und auf einen pH-Wert von 7,2-7,4 eingestellt. Die Albumaxlösung wurde durch einen 0,2 µm Filter filtriert und bei -20 °C gelagert. Bei Bedarf wurden 50 ml Albumaxlösung zusammen mit 6 ml L-Glutamin (Lagertemperatur -20 °C) in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und steril in eine 500 ml RPMI1640-Flasche überführt. Des Weiteren wurden 500 µl Gentamicin und 12 ml einer 1 M HEPES-Pufferlösung in die RPMI1640-Flasche pipettiert, die beide bei 4 °C gelagert waren. Das komplette Kulturmedium wurde bei 4 °C gelagert und nicht länger als drei Wochen aufbewahrt.

Tabelle 11: Reagenzien für eine 500 ml Albumaxlösung

Substanzbezeichnung	Mengenangabe
RPMI Medium 1640 Pulver	5,2 g
Gentamicin (50 mg/ml)	500 µl
HEPES (1 M)	12 ml
Natriumhydrogencarbonat	1,67 g
D-(+)-Glukose	1 g
Hypoxanthin	0,1 g
Albumax II	25 g

2.3.5.2. Anfertigung der Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Substanzen

Die zu untersuchenden Substanzen wurden in seriellen Verdünnungsreihen auf eine sterile 96-Loch-Gewebekulturplatte mit Deckel pipettiert. Zur Verdünnung wurde komplettes Kulturmedium verwendet. Die Verdünnungsreihe einer Substanz wurde in einer fortlaufenden Dreifachverdünnung angefertigt, doppelt ausgeführt und enthielt in jeder Vertiefung eine Menge von 25 µl. Abbildung 3 gibt das Schema der 96-Loch-Gewebekulturplatten an und zeigt, wie viel Prozent der Startkonzentration der einzelnen Substanzen in den verschiedenen vertikalen Reihen vorhanden ist. Zeile H dient als Kontrollreihe mit jeweils 25 µl komplettem Kulturmedium ohne Testsubstanz pro Vertiefung.

	AQ	AQ	AS	AS	QN	QN	CQ	CQ	DHA	DHA	PW28	PW28
A	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
B	33,3 %	33,3 %	33,3 %	33,3 %	33,3 %	33,3 %	33,3 %	33,3 %	33,3 %	33,3 %	33,3 %	33,3 %
C	11,1 %	11,1 %	11,1 %	11,1 %	11,1 %	11,1 %	11,1 %	11,1 %	11,1 %	11,1 %	11,1 %	11,1 %
D	3,7 %	3,7 %	3,7 %	3,7 %	3,7 %	3,7 %	3,7 %	3,7 %	3,7 %	3,7 %	3,7 %	3,7 %
E	1,23 %	1,23 %	1,23 %	1,23 %	1,23 %	1,23 %	1,23 %	1,23 %	1,23 %	1,23 %	1,23 %	1,23 %
F	0,41 %	0,41 %	0,41 %	0,41 %	0,41 %	0,41 %	0,41 %	0,41 %	0,41 %	0,41 %	0,41 %	0,41 %
G	0,14 %	0,14 %	0,14 %	0,14 %	0,14 %	0,14 %	0,14 %	0,14 %	0,14 %	0,14 %	0,14 %	0,14 %
H	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %

Abbildung 3: Verdünnungsschema der 96-Well-Gewebekulturplatte.
In jeder Vertiefung ist die Prozentzahl der Startkonzentration der einzelnen Substanzen angeben.

Mit den in Tabelle 10 angegebenen Startkonzentrationen betrug der Endkonzentrationsbereich zwischen Reihe A bis Reihe G für AQ 150 bis 0,21 nM, für AS 52/20/10 bis 0,07/0,03/0,01 nM, für CQ 1 000 bis 1,37 nM, für DHA 20/10 bis 0,03/0,01 nM, für PW28 5 556/556 bis 7,62/0,76 nM und für QN 10 000 bis 13,72 nM.

Die mit den Verdünnungen beschickten Platten wurden bei -20 °C bis zu zwei Wochen gelagert.

2.3.5.3. Zusammensetzung der Kulturlösung

Für das optimale Wachstum der durchgeführten Kurzzeitkultur der klinischen *P. falciparum* Isolate wurde eine Kulturlösung benötigt, die eine Parasitämie von 0,02-0,05 % und einen Hämatokrit von 1,5 % enthielt. Pro Vertiefung der unter 2.3.5.2 angefertigten 96-Loch-Gewebekulturplatte waren 200 µl der Kulturlösung vorgesehen.

Die Kulturlösung setzte sich aus komplettem Kulturmedium, Erythrozyten der Malariapatienten (siehe 2.3.5.5) und gegebenenfalls nicht infizierten Spender-Erythrozyten zur Verdünnung der Parasitämie (siehe 2.3.5.4) zusammen.

Pro Platte wurden 20 ml Kulturmedium angesetzt. Um einen Hämatokrit von 1,5 % herzustellen wurde eine Erythrozytenmenge (Hämatokrit 100 %) von 300 µl benötigt.

Betrug die unter 2.3.3.4 bestimmte relative Parasitämie der klinischen Isolate 0,02-0,05 %, wurden 300 µl der Erythrozytenisolate für die Kulturlösung gewonnen. Bei einer Parasitämie von 0,05 % befanden sich somit 0,15 µl infizierte Erythrozyten in den 300 µl. Betrug die Parasitämie über 0,05 %, wurden die klinischen Erythrozytenisolate mit Spender-Erythrozyten verdünnt, um auf eine Parasitämie von 0,05 % zu kommen. Die benötigte Menge „x“ an klinischen Erythrozytenisolaten erhielt man mit folgender Rechnung:

$$x = \frac{0{,}05\%}{relative\ Parasitämie} \bullet 300\mu l$$

Die Spender-Erythrozytenmenge „y“ wurde folgendermaßen berechnet:

$$y = (300\mu l - x) \bullet 1{,}5$$

Da die Spender-Erythrozytenmenge „y“ aus dem unter 2.3.5.4 hergestellten SAG-Mannitol-0+-Blut entnommen wurde, wurde der Multiplikationsfaktor „1,5“ hinzugefügt, um den Hämatokritunterschied zwischen dem Hämatokrit von

ungefähr 100 % der klinischen Erythrozytenisolate und dem Hämatokrit von ungefähr 67 % des SAG-Mannitol-0+-Blutes auszugleichen.

2.3.5.4. Anfertigung des SAG-Mannitol-0+-Blutes

Für die unter 2.3.5.3 beschriebene Verdünnung der Parasitämien über 0,05 % wurden nicht infizierte Spender-Erythrozyten benötigt.

Dafür wurden 22 ml venöses Blut eines freiwilligen Spenders mit der Blutgruppe 0+, welcher noch keine Malariaepisode durchlebt hatte, in 5,5 ml Lithium-Heparin-Blutröhrchen abgenommen. Das Blut wurde steril in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RCF) von 652 g bei 24 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Das oben abgesetzte Plasma wurde entfernt. Die weißen Blutzellen in der obersten Schicht der unten abgesetzten Zellbestandteile wurden abpipettiert. Zum Waschen des übriggebliebenen Erythrozytenkonzentrates wurde die 1,5fache Menge des Konzentrates an komplettem Kulturmedium dazugegeben, vermischt und mit der gleichen Zentrifugeneinstellung zentrifugiert. Nach Abnahme des Mediumüberstandes und der obersten Erythrozytenzellschicht wurde die 0,5fache Menge des übriggebliebenen Erythrozytenkonzentrates an Natrium-Adenin-Glukose-Mannitol-Lösung (SAG-Mannitol-Lösung) dazugegeben und vermischt. Hierdurch stellte sich ein Hämatokrit von ca. 67 % ein. Zur Herstellung einer 100 ml SAG-Mannitol-Lösung wurden 900 mg Glukosemonohydrat, 21,5 mg Adenin (Hydrochlorid), 525 mg Mannitol und 877 mg Natriumchlorid in 100 ml destilliertem Wasser aufgelöst, steril filtriert und bei 4° C gelagert.

Aus 22 ml Spenderblut wurden ca. 9 ml SAG-Mannitol-0+-Blut gewonnen, das bei 4 °C für maximal vier Wochen aufbewahrt wurde.

2.3.5.5. Ansetzen und Inkubation der Kurzzeitparasitenkultur

Das komplette Kulturmedium, das SAG-Mannitol-0+-Blut und die unter 2.3.5.2 angefertigten Platten mit den angesetzten Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Substanzen wurden bei Raumtemperatur für 15 Minuten angewärmt, beziehungsweise aufgetaut. Innerhalb von vier Stunden nach

Abnahme wurde das Patientenblut (siehe 2.3.2) steril aus dem 2,7 ml Lithium-Heparin-Blutröhrchen in ein 15 ml Röhrchen überführt und mit einer RCF von 652 g bei 24 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Das sich oben abgesetzte Plasma und die weißen Blutkörperchen wurden steril abpipettiert und verworfen. Die übriggebliebenen Zellbestandteile stellten die für die Parasitenkultur benötigte, mit *P. falciparum* infizierte Probe dar. Die Zusammensetzung der Kulturlösung wurde, wie unter 2.3.5.3 beschrieben ausgerechnet und die entsprechende Menge an komplettem Kulturmedium, infizierter Probe und gegebenenfalls SAG-Mannitol-0+-Blut steril zusammengefügt. Danach wurden 200 µl der fertigen Kulturlösung in jede Vertiefung der vorher vorbereiteten und aufgetauten 96-Loch-Gewebekulturplatte pipettiert. Für die Inkubation der Kulturlösung wurden die Platten in eine Glasglocke mit Kerze (siehe Abbildung 4) gestellt. Ein Teelicht wurde am Boden der Glasglocke angezündet und mit Aluminiumfolie zum Hitzeschutz der Platten bedeckt. Die Glasglocke wurde mit Hilfe von Vaseline und einem Glasdeckel luftdicht verschlossen. Die Kerze schuf ein passendes Gasmilieu für die Parasitenkultur, indem sie einen Teil des Sauerstoffs in der luftdicht verschlossenen Glasglocke verbrauchte und Kohlenstoffdioxid produzierte, bis sie erlosch. Die Glasglocke wurde in einen Inkubator (37 °C) gestellt. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurden die Platten aus der Glasglocke entnommen und bei -20 °C eingefroren.

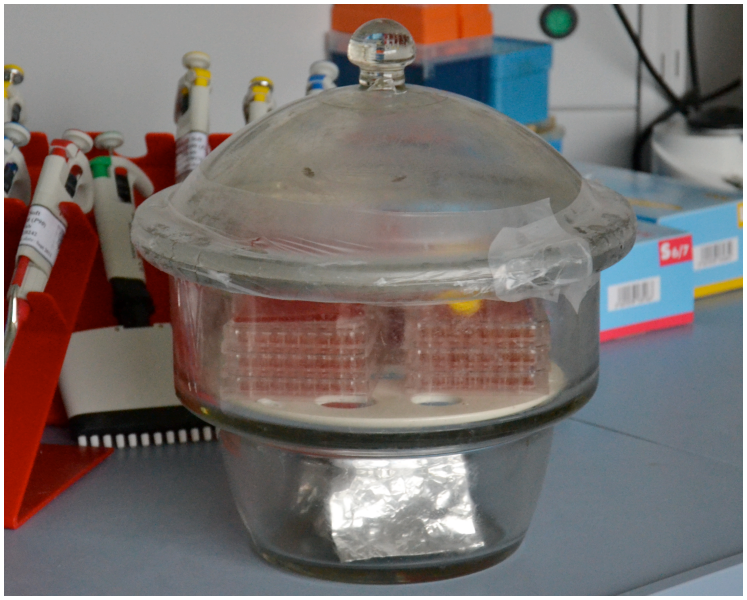

Abbildung 4: Glasglocke mit Kerze
In einer Glasglocke wurden die 96-Loch-Gewebekultur-platten innerhalb eines Inkubators für 72 Stunden inkubiert.

2.3.6. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Zur Bestimmung des Parasitenwachstums nach der Inkubation wurde ein von Noedl *et al.* beschriebener zweiseitiger Sandwich ELISA durchgeführt, um damit auf die Sensitivität der Parasiten gegen die zu untersuchenden Substanzen zu schließen (Noedl *et al.* 2005) (siehe 1.3.3).

Für die Durchführung des ELISAs wurden die eingefrorenen 96-Loch-Gewebekulturplatten bei Raumtemperatur innerhalb von zwei Stunden aufgetaut und wieder bei -20 °C eingefroren, um eine vollständige Hämolyse der verbliebenen Erythrozyten in den Platten zu erreichen. Des Weiteren wurde eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) aus jeweils einer PBS-Tablette und 500 ml destilliertem Wasser hergestellt. Als erster Antikörper wurde ein Immunglobulin M (Ig M) verwendet (MPFM-45A, Konzentration 9,4 mg/ml), das sich gegen *Pf*HRP2 richtete. Der Antikörper wurde in PBS zu einer Konzentration von 1,0 µg/ml verdünnt. 100 µl dieser ersten Antikörper-Lösung wurden in jede Vertiefung der 96-Loch-ELISA-Platten (Costar 3590) pipettiert. Die Platten wurden für ca. 16 Stunden in einem 4 °C-Kühlschrank inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden zuerst die 96-Loch-Gewebekulturplatten erneut bei Raumtemperatur aufgetaut und eine Blockierungslösung, 2 % bovines Serumalbumin (BSA) in PBS, hergestellt. Die erste Antikörper-Lösung wurde verworfen und die ELISA-Platten wurden trocken geklopft. Danach wurden 200 µl der Blockierungslösung in jede Vertiefung der ELISA-Platten pipettiert und bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Nun wurde ein Waschpuffer aus jeweils 0,5 ml Tween20 und einem Liter PBS hergestellt.

Nach der Inkubationszeit wurde die Blockierungslösung verworfen, die Platten wurden dreimal mit je ca. 200 µl Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen, am Schluss trocken geklopft und beschriftet. Nachdem man die Kulturlösung in der 96-Loch-Gewebekulturplatte durchmischt hatte, wurden 75 µl davon in jede Vertiefung der 96-Loch-ELISA-Platte übertragen und jeweils mit 25 µl destilliertem Wasser verdünnt. Die Platten wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Die Gewebekulturplatten wurden bei -20 °C eingefroren, um

gegebenenfalls die ELISA-Analyse der übriggebliebenen Kulturlösung zu wiederholen.

Als zweiter Antikörper wurde ein Immunglobulin G verwendet, das wiederum gegen *Pf*HRP2 gerichtet und mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert war (MPFG-45P, Konzentration 1 mg/ml). Zuerst wurde eine Lösung aus 2 % BSA und 1 % Tween20 in PBS hergestellt. Danach wurde der Antikörper in dieser Lösung zu einer Konzentration von 0,067 µg/ml verdünnt. Der Inhalt der inkubierten Platten wurde entsorgt und wie oben dreimal gewaschen. Danach wurden 100 µl der 2. Antikörper-Lösung in jede Vertiefung der ELISA-Platten pipettiert und die Platten bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die zweite Antikörper-Lösung verworfen und die Platte dreimal gewaschen. Als Substrat für die Meerrettichperoxidase wurden 100 µl TMBOne pro Vertiefung auf die Platte pipettiert und für etwa fünf Minuten inkubiert. Je mehr *Pf*HRP2 an die Platte gebunden war, desto mehr Substrat wurde umgesetzt und desto stärker verfärbte sich die Flüssigkeit blau. Zum Stoppen der Reaktion wurde in jede Vertiefung 50 µl Schwefelsäure (0,2 M) pipettiert, die einen gelben Farbumschlag nach sich zog. Eine spektrophotometrische Analyse mit Ermittlung der optischen Dichte wurde mit einem ELISA-Plattenlese-Gerät (ELISAreader Original Multiskan ID 064) bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt.

2.3.7. Definition des erfolgreichen Parasitenwachstums

Ein Patient wurde nur dann in die statistische Auswertung aufgenommen, wenn seine Parasitenkultur erfolgreich gewachsen war. Ein erfolgreiches Parasitenwachstum wurde definiert als Verdopplung der gemessenen optischen Dichte (siehe 2.3.6) in der Kontrollreihe H ohne Substanzzusatz im Vergleich mit der Reihe A mit maximaler Substanzkonzentration (siehe Abbildung 3). Betrachtet wurde jede untersuchte Substanz separat. Erfüllten mehr als die Hälfte (> 50 %) der untersuchten Substanzen einer Platte die Kriterien der Verdopplung nicht, wurde die gesamte Platte als erfolgloses Wachstum klassifiziert und nicht in die Auswertung eingeschlossen.

2.3.8. Inhibitorische Konzentrationen der untersuchten Substanzen

Für die Betrachtung der Wirksamkeit der Substanzen wurde die 50% bzw. für Chloroquin zusätzlich die 99% inhibitorische Konzentration (*engl. inhibitory concentration = IC*) bestimmt. Für Chloroquin wurde ein Resistenzschwellenwert in Anlehnung an das Protokoll der WHO festgelegt (Resistenzschwellenwert für Chloroquin: IC_{99} > 1 µmol/l Blut). Mit der verwendeten Methode ergab sich damit ein Schwellenwert für Chloroquin von IC_{99} > 30 nmol/l (Kreidenweiss *et al.* 2006).

Der IC_{50}- beziehungsweise IC_{99}-Wert gibt die Konzentration der untersuchten Substanz an, bei der die Parasiten so gehemmt werden, dass sie nur 50 % beziehungsweise 99 % *Pf*HRP2 produzieren, im Vergleich zur Kontrollreihe ohne Substanzzusatz (100 %).

2.3.9. Statistische Analyse

Mit Hilfe des drc-Paketes v0.9.0 (Ritz & Streibig 2005) von R v2.7.0 (R Development Core Team 2008) wurden die inhibitorischen Konzentrationen der untersuchten Substanzen jedes Patienten durch eine nichtlineare Regressionsanalyse einer logarithmischen Konzentrations-Wirkungs-Kurve bestimmt.

Mit Hilfe von JMP v9.0.0 (SAS Institut, Cary, NC) wurden die folgenden statistischen Analysen durchgeführt: Analyse der Patientencharakteristika, Verteilung der IC_{50}/IC_{99}-Werte, zehnerlogarithmische Transformierung der IC_{50}-Werte, Pearson-Korrelation zwischen den Substanzen, ANOVA *(engl. analysis of variance)*/ Bonferroni-Korrektur/ Tukey HSD Post-Hoc Test zur Testung von regionalen Unterschieden zwischen den Wirksamkeiten der Substanzen.

Die Signifikanzniveaus wurden mit Sternen gekennzeichnet: * signifikant ($p < 0,05$); ** sehr signifikant ($p < 0,01$); *** hoch signifikant ($p < 0,005$).

3. Ergebnisse

3.1. Basisparameter

3.1.1. Stichprobe

In die Studie, die zwischen November 2010 und August 2011 durchgeführt wurde, wurden 109 Patienten mit positivem Malariaschnelltest aufgenommen. Davon erfüllten 90 Patienten (83 %) die unter 2.2 genannten Einschlusskriterien. Die restlichen 19 Patienten (17 %) wurden aufgrund von zu geringer oder fehlender Parasitämie, trotz positivem Malariaschnelltest nach Malariadiagnostik anhand eines dicken Tropfens, ausgeschlossen. Bei 45 der 90 eingeschlossenen Patienten (50 %) konnte die durchgeführte Parasitenkultur als erfolgreiches Parasitenwachstum klassifiziert (siehe 2.3.7) und in die statistische Auswertung aufgenommen werden.

3.1.2. Patientencharakteristika

Am Tag der Aufnahme wurden von den eingeschlossenen Patienten demographische, laborchemische und klinische Daten sowie Daten über die Krankheitsgeschichte der Malariainfektion erhoben. Alle 45 eingeschlossenen Patienten sind in Gabun geboren, 17 davon im Albert-Schweitzer-Krankenhaus in Lambaréné. Der Median der Patienten lag bei einem Alter von vier Jahren, wobei das Geschlechterverhältnis fast ausgeglichen war (männlich:weiblich = 20:25). 42 der 45 Patienten gaben Fieber in den letzten 48 Stunden an. Der Median der tympanischen Körpertemperatur bei Aufnahme lag bei 38,4 °C, der der absoluten Parasitämie bei 42 719 Parasiten/µl Blut und der des Hämatokrits bei 31,6 %. 25 der 45 Patienten gaben an, eine Malariaprävention mit zum Beispiel Bettnetzen durchzuführen. Tabelle 12 gibt die Patientencharakteristika wieder.

Tabelle 12: Datenerhebung der Patienten am Tag der Aufnahme

Demographische Daten	
Geschlecht (Anzahl): männlich/weiblich	20/25
Geburtsort Gabun (Anzahl):	45
Alter* (Jahre)	4 (3-8)
Laborchemische und klinische Untersuchungen	
Tympanische Körpertemperatur* (°C)	38,4 (37,5-39,6)
Absolute Parasitämie* (/µl)	42 719 (10 077-120 095)
Hämatokrit* (%)	31,6 (28,3-34,8)
Daten über die Krankheitsgeschichte der Malariainfektion	
Malariaprävention (Anzahl): ja/nein	25/20
Fieber in den letzten 48 h (Anzahl): ja/nein	42/3

***** Median (unteres - oberes Quartil)

3.2. Inhibitorische Konzentrationen der untersuchten Substanzen

3.2.1. 50% inhibitorische Konzentrationen der untersuchten Substanzen

Der niedrigste Median der untersuchten Substanzen wurde für Dihydroartemisinin mit 1,04 nM ermittelt, gefolgt von Artesunat mit einem Median von 1,2 nM. Die weiteren Mediane lagen für Amodiaquin bei 6,18 nM, für Chloroquin bei 29,2 nM, für PW28 bei 34 nM und für Chinin bei 97,1 nM (Abbildung 5). Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die ermittelten IC_{50}-Werte. Neben dem Median (0,5-Quantil), dem unteren sowie dem oberen Quartil (0,25-Quantil bzw. 0,75-Quantil), wird der minimale und maximale Wert angegeben. Des Weiteren ist der Tabelle zu entnehmen, wie viele Kulturen (N) der jeweiligen Substanz die Kriterien des erfolgreichen Parasitenwachstums erfüllt haben (siehe 2.3.7) und in die Auswertung aufgenommen wurden. Für

die Substanz Chinin wurden zusätzlich alle Werte in der Auswertung erfasst, bei denen die *Pf*HRP2-Konzentration der Reihe mit maximaler Substanzkonzentration statt zweifach mindestens 1,8fach größer war als in der Kontrollreihe ohne Substanzzusatz. Die geringe Anzahl von 15 gegen Chloroquin getesteten Kulturen war bedingt durch die Anwendung von zwei inaktiven Chloroquin-Chargen. Auch gegen PW28 bzw. Dihydroartemisinin konnten wegen Wirksamkeitsverlust der Substanz nur 22 bzw. 30 Isolate getestet werden. Erst nach Ansetzen einer neuen Stocklösung konnten die Werte wieder in die Auswertung mit aufgenommen werden.

Tabelle 13: Übersicht über die IC_{50}-Werte der untersuchten Substanzen

Substanz	N	Median (unteres – oberes Quartil) [nM]	Minimum/ Maximum [nM]
Amodiaquin	40	6,18 (4,64-11,4)	2,19/40,4
Artesunat*	41	1,2 (0,47-3,7)	0,06/20
Chinin	34	97,1 (60,2-152)	17,8/333
Chloroquin	15	29,2 (16,3-58,6)	4,94/105
Dihydroartemisinin	30	1,04 (0,7-2,76)	0,16/9,77
PW28	22	34 (20,8-45)	8,64/65,5

N: Anzahl der Parasitenkulturen mit erfolgreichem Parasitenwachstum

***** Ein IC_{50}-Wert bei Artesunat befand sich über der maximal untersuchten Konzentration (> 20 nM) und wurde in der Auswertung mit 20 nM angegeben.

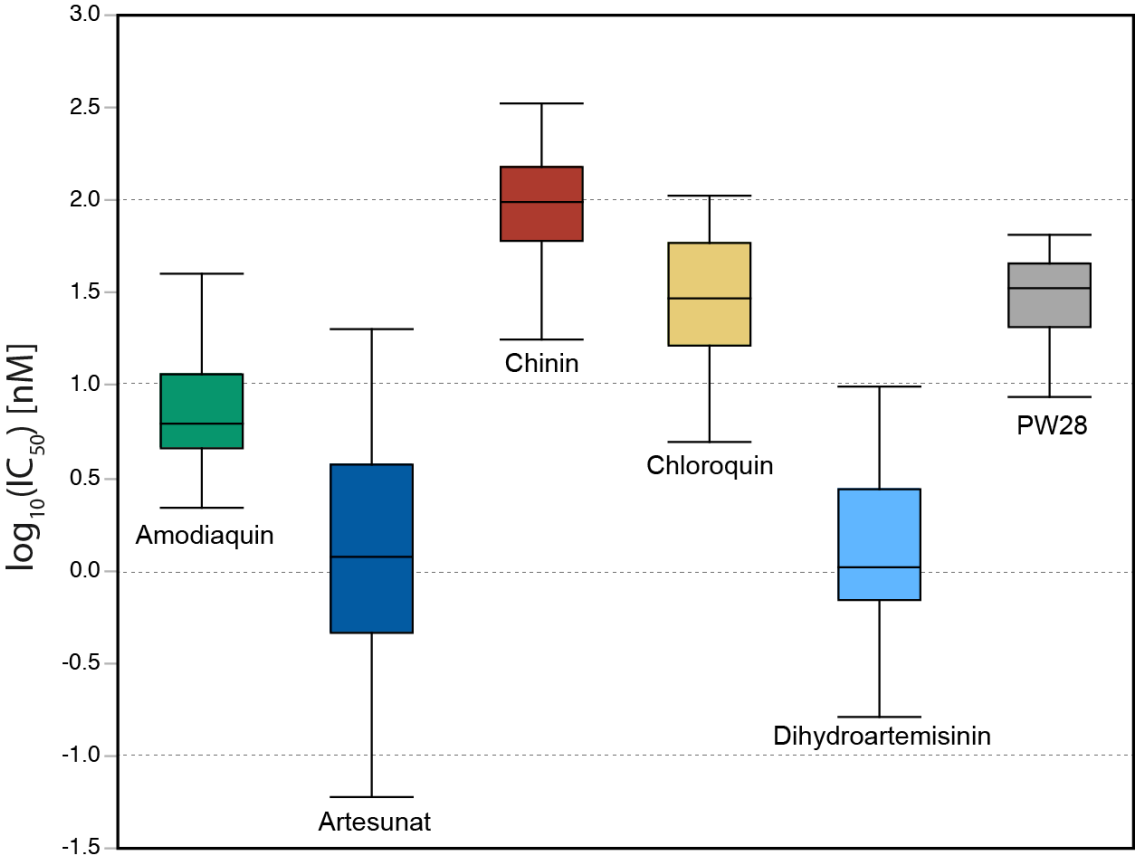

Abbildung 5: Verteilung der IC_{50}-Werte von Amodiaquin, Artesunat, Chloroquin, Dihydroartemisinin, PW28 und Chinin

Mit Hilfe eines Boxplots werden in Anlehnung an die Werte aus Tabelle 13 der Median (mittlerer Strich der Box) sowie das untere und obere Quartil (unteres und oberes Ende der Box) der IC_{50}-Werte einer Substanz dargestellt. Die Höhe der Box beschreibt somit den Interquartilabstand. Die Antennen reichen vom Ende der Box bis zu den Punkten, die eineinhalbmal die Länge des Interquartilabstandes entfernt liegen. Alle Datenpunkte befinden sich innerhalb der Antennenextrema.

3.2.2. 99% inhibitorische Konzentrationen von Chloroquin

Für die IC_{99}-Werte von Chloroquin ergab sich ein Median (unteres - oberes Quartil) von 403 nM (277-1 000 nM) mit einem Minimum von 23,1 nM und einem Maximum von 1 000 nM. Drei der fünfzehn Parasitenkulturen, die in die Auswertung mit eingeschlossen wurden, wiesen einen IC_{99}-Wert über der maximal untersuchten Konzentration (> 1 000 nM) auf. Diese Werte wurden in der Auswertung mit 1 000 nM angegeben. Eine Chloroquin-Resistenz

(IC_{99} > 30 nM) konnte in allen Proben, bis auf eine (IC_{99}-Wert von 23,1 nM), beobachtet werden (93,3 %) (siehe 2.3.8).

3.2.3. Verteilung des Datensatzes der IC_{50}-Werte

Zur Überprüfung, ob der Datensatz der ermittelten IC_{50}-Werte der verschiedenen untersuchten Substanzen für alle in die statistische Auswertung aufgenommenen Patienten annähernd normalverteilt ist, wurde ein Quantil-Quantil-Diagramm angelegt. Hierzu wurden für jede Substanz auf die y-Achse die empirisch ermittelten IC_{50}-Werte und auf die x-Achse Werte einer theoretischen Normalverteilung aufgetragen. Bei annähernd normalverteilten Werten lässt sich im Graphen eine Gerade erkennen. Wie erwartet, war dies nicht bei allen Substanzen der Fall. Deshalb wurde, wie in vorangehenden Studien, eine zehnerlogarithmische Transformation der Werte durchgeführt, was zu einer annähernden Gerade führte und die Normalverteilungsannahme der logarithmierten Werte plausibel erscheinen ließ. Abbildung 6 zeigt für jede Substanz ein Quantil-Quantil-Diagramm mit den Werten nach der zehnerlogarithmischen Transformation.

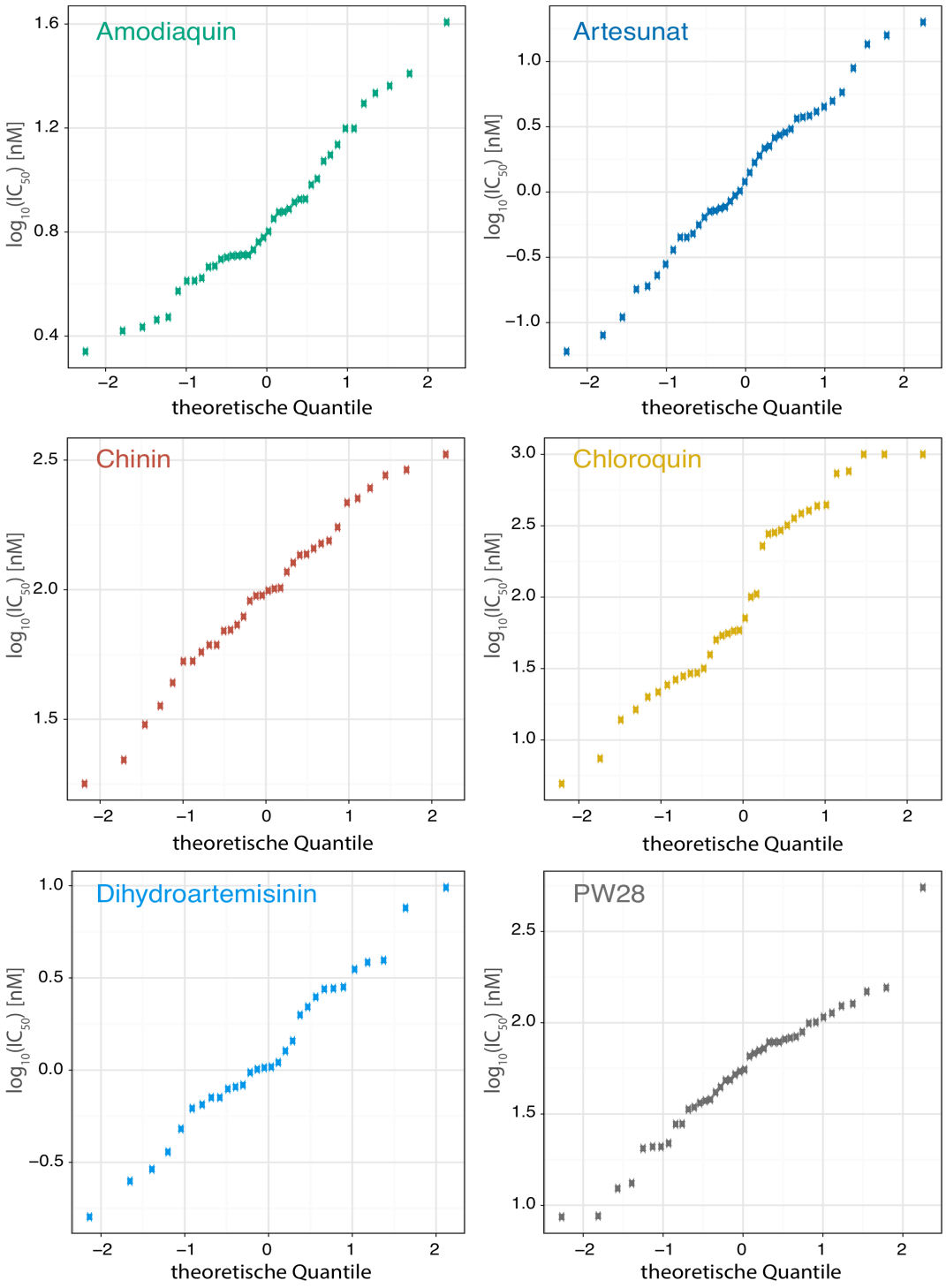

Abbildung 6: Quantil-Quantil-Diagramme der untersuchten Substanzen nach der log_{10}-Transformation

Ein Punkt entspricht einem IC_{50}-Wert der untersuchten Substanz eines Patienten. Auf der x-Achse werden Werte einer theoretischen Normalverteilung dargestellt. Auf der y-Achse wird die Skala der empirisch ermittelten log_{10}-transformierten IC_{50}-Werte angegeben.

3.3. Korrelationstestung

Die Korrelation wurde mit Hilfe des Pearson-Korrelationstests ausgerechnet, da die $\log_{10}$-transformierten Werte annähernd normalverteilt und annähernd linear abhängig waren. Die Streudiagrammmatrix in Abbildung 7 zeigt rechts von der Diagonalen den Korrelationskoeffizienten *r* mit dem entsprechenden Signifikanzniveau und links das korrespondierende Streudiagramm. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die gemeinsame Stichprobenzahl (N) der verschiedenen Paare stark variiert. So beträgt sie beispielsweise für Amodiaquin/Artesunat 37 und für Amodiaquin/Chloroquin 13. Handelt es sich um eine sehr geringe Stichprobenzahl, wie bei Amodiaquin/Chloroquin, dann muss die Korrelation sehr stark sein, um signifikant zu sein.

Es bestand

- eine hoch signifikante positive Korrelation zwischen
  Chinin/Artesunat ($r = 0{,}65$; $p < 0{,}0001$; $N = 31$),
- eine sehr signifikante positive Korrelation zwischen
  Dihydroartemisinin/Chloroquin ($r = 0{,}82$; $p = 0{,}0004$; $N = 14$),
  Dihydroartemisinin/Chinin ($r = 0{,}59$; $p = 0{,}006$; $N = 20$),
  Dihydroartemisinin/Artesunat ($r = 0{,}57$; $p = 0{,}0016$; $N = 28$) und
  Artesunat/Amodiaquin ($r = 0{,}51$; $p = 0{,}0014$; $N = 37$) sowie
- eine signifikante Korrelation zwischen
  Chinin/Amodiaquin ($r = 0{,}42$; $p = 0{,}0159$; $N = 32$).

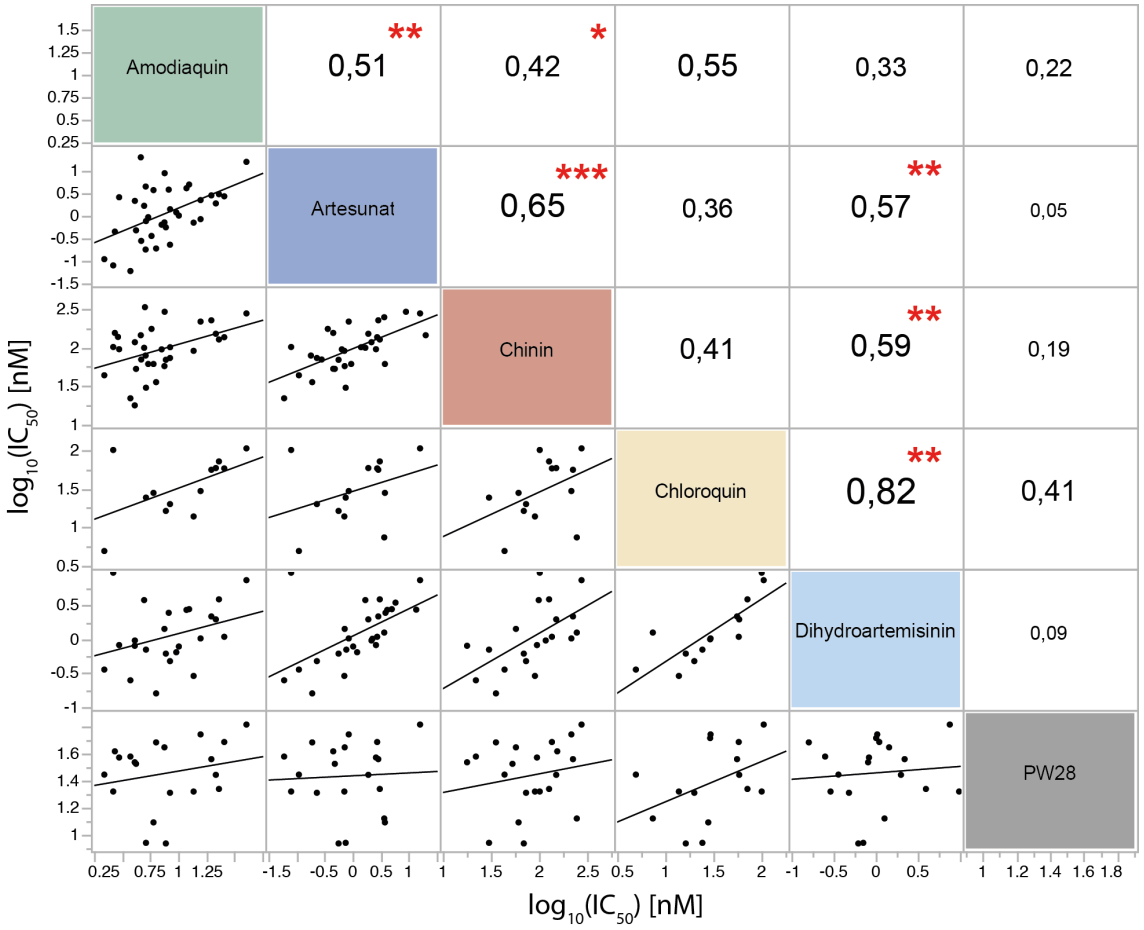

Abbildung 7: Streudiagrammmatrix der log_{10}-transformierten IC_{50}-Werte von Amodiaquin, Artesunat, Chinin, Chloroquin, Dihydroartemisinin und PW28

Der Pearson-Korrelationskoeffizient *r* wurde rechts der Diagonalen angegeben. Je größer die Schrift, desto größer der Korrelationskoeffizient. Des Weiteren wurde der entsprechende p-Wert wie folgt markiert: * signifikant ($p < 0,05$), ** sehr signifikant ($p < 0,01$), *** hoch signifikant ($p < 0,001$). Links von der Diagonalen befindet sich das korrespondierende Streudiagramm.

3.4. Testung auf Unterschiede der IC_{50}-Werte zwischen einzelnen Regionen

Die erhobenen GPS-Daten der 45 in die Auswertung aufgenommenen Patienten wurden in vier verschiedene Regionen (*Nord, Lambaréné, Route Fougamou, Süd*) eingeteilt. Die Region *Nord* umfasste den Bereich der Straße „N1“ Lambaréné-Libreville Richtung Norden, bis zu einer Wegstrecke von ca. 77 km vom Albert-Schweitzer-Krankenhaus in Lambaréné entfernt. Die

Patientenzahl dieses Gebietes betrug sieben. Zur Region *Lambaréné* wurden alle Patienten gezählt, die innerhalb der Stadt Lambaréné wohnten. Dies waren zwölf Patienten. Die Region *Route Fougamou* beinhaltete die Straße „N1“ Lambaréné-Fougamou Richtung Süden, bis zu einer Wegstrecke von ca. 76 km vom Albert-Schweitzer-Krankenhaus in Lambaréné entfernt. Hier wurde die größte Patientenanzahl von 17 Patienten rekrutiert. Zur Region *Süd* wurden alle Patienten gezählt, die in den Gebieten südlich oder abseits der Region *Route Fougamou* lebten. Hierzu gehörten die Ortschaften Fougamou, Oyenano, Sindara und der See Ezanga. Diese Region umfasste eine Patientenzahl von neun. Abbildung 8 gibt einen Überblick über das Einschlussgebiet der Studie und die Verteilung der Patienten in den unterschiedlichen Regionen.

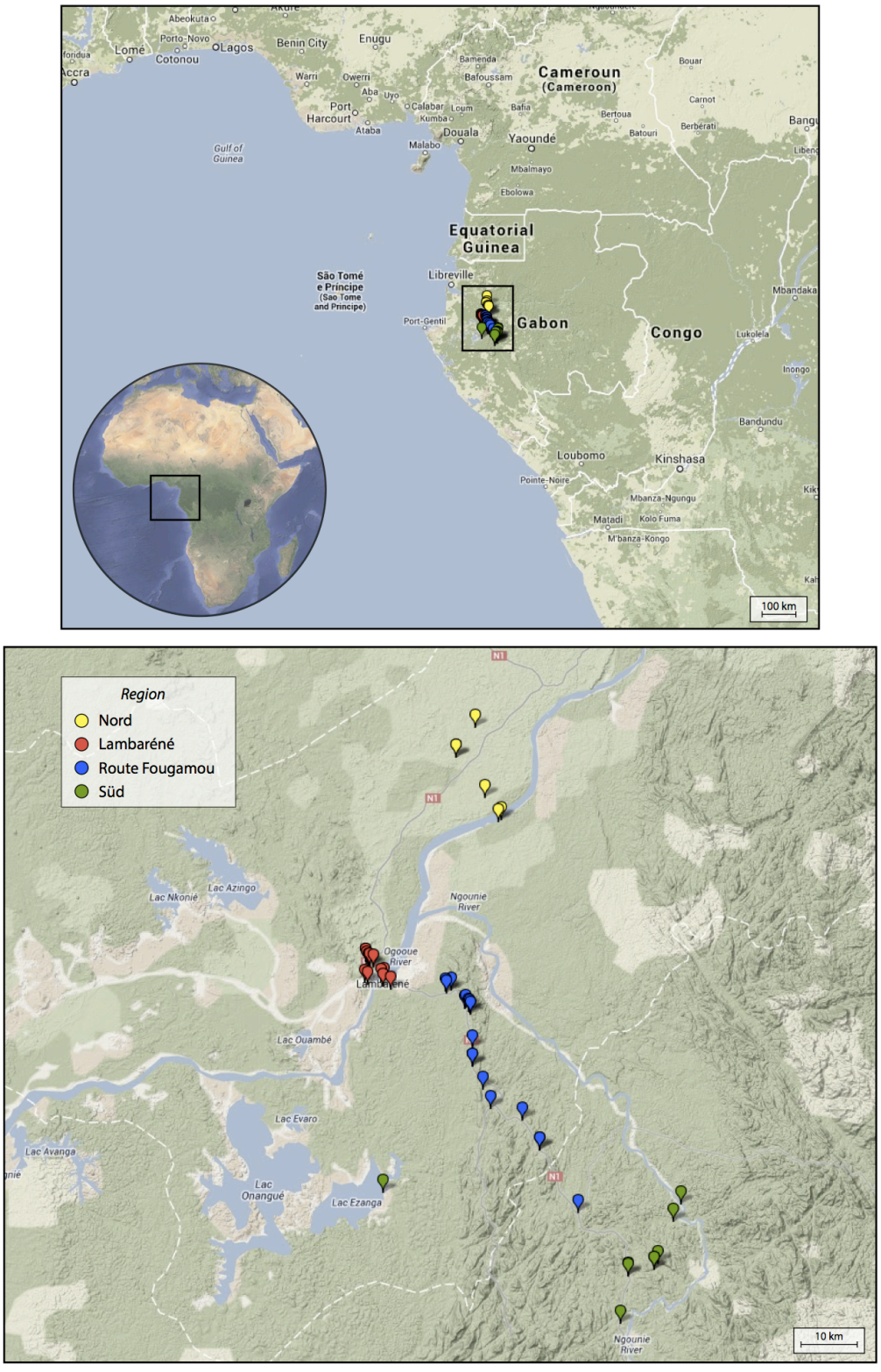

Abbildung 8: Karte des Einschlussgebietes der Studie in Moyen-Ogouué, Gabun (Quelle: Google Maps)

Die Studienpatienten wurden nach ihren Wohnorten, die mit GPS-Koordinaten bestimmt wurden, in vier regionale Gruppen eingeteilt.

Für jede Region wurde der Median der untersuchten Substanz bestimmt (siehe Tabelle 14). Es konnte eine deutliche Erhöhung der Mediane in der Region *Route Fougamou* für Dihydroartemisinin und Artesunat im Gegensatz zu den anderen drei Regionen beobachtet werden. Lediglich für diese beiden Substanzen war der Median der Region *Route Fougamou* mehr als dreifach größer als der Mittelwert der Mediane aus den anderen drei Regionen.

Tabelle 14: Mediane [nM] der IC_{50}-Werte der untersuchten Substanzen in den vier Regionen

Region	AQ	AS	QN	CQ	DHA	PW28
Nord	6,57	0,94	73,2	16,3	0,62	20,5
Lambaréné	5,1	0,76	61,2	27,9	0,81	36,3
Route Fougamou	7,66	2,73	137	58,6	2,66	27,8
Süd	9,02	0,85	65,9	17,2	0,84	48,3

Um zu testen, ob signifikante Unterschiede der log_{10}-transformierten IC_{50}-Werte einer Substanz zwischen den vier Regionen (*Nord, Lambaréné, Route Fougamou, Süd*) bestehen, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (*engl. analysis of variance = ANOVA*) durchgeführt. Es wurde somit getestet, ob ein Mittelwert der IC_{50}-Werte einer Region sich signifikant von den Mittelwerten der anderen Regionen unterscheidet. Die Paarvergleiche wurden für multiples Testen nach Bonferroni korrigiert. Bei Dihydroartemisinin zeigte die einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, dass mindestens ein Mittelwert einer Region signifikant unterschiedlich zu den Mittelwerten der anderen Regionen ist (p(korrigiert) = 0,018). Bei allen anderen Substanzen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen ermittelt.

Tabelle 15 gibt die p-Werte der einfaktoriellen ANOVA und die p-Werte nach der Bonferroni-Korrektur an.

Tabelle 15: Test auf Unterschiede der log_{10}-transformierten IC_{50}-Werte der untersuchten Substanzen zwischen den einzelnen Regionen
(Ergebnisse der einfaktoriellen ANOVA und der Bonferroni-Korrektur)

Substanz	p-Wert (ANOVA)	Korrigierter p-Wert (Bonferroni-Korrektur)
Amodiaquin	0,27	0,81
Artesunat	0,33	> 0,99
Chloroquin	0,15	0,45
Dihydroartemisinin	0,006**	0,018*
PW28	0,19	0,57
Chinin	0,18	0,53

* signifikant (p < 0,05), ** sehr signifikant (p < 0,01), *** hoch signifikant (p < 0,001)

Für Dihydroartemisinin wurde für jede Region der Median mit unterem und oberen Quartil sowie dem minimalen und maximalen Wert bestimmt (siehe Tabelle 16 und Abbildung 9). Die Region *Route Fougamou* weist mit einem Median von 2,66 nM höhere Werte als die anderen drei Regionen auf.

Tabelle 16: Übersicht über die IC_{50}-Werte der einzelnen Regionen von DHA

Region	N	Median (unteres – oberes Quartil) [nM]	Minimum/ Maximum [nM]
Nord	5	0,62 (0,39-1,87)	0,29/2,77
Lambaréné	7	0,81 (0,71-1,44)	0,25/2,2
Route Fougamou	12	2,66 (1,14-3,92)	0,79/9,77
Süd	6	0,84 (0,31-1,47)	0,16/2,75

N: Anzahl der gegen Dihydroartemisinin getesteten Parasitenkulturen in den einzelnen Regionen

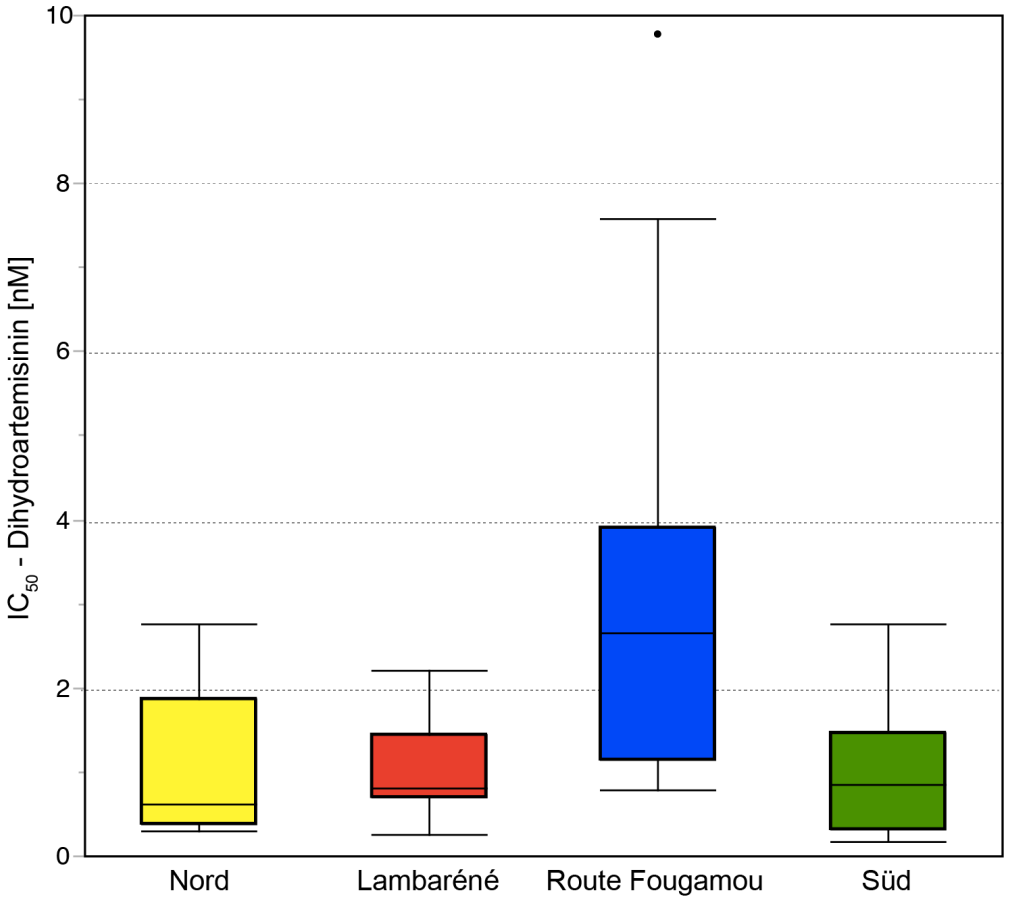

Abbildung 9: Verteilung der 50% inhibitorischen Konzentrationen von Dihydroartemisinin in den einzelnen Regionen

Mit Hilfe eines Boxplots werden die Werte aus Tabelle 16 dargestellt (Interpretation vergleiche Abbildung 5). Ermittelte Datenpunkte, die sich außerhalb der Box und der Antennen befinden, werden mit einem schwarzen Punkt markiert.

Mittels eines Tukey HSD Post-Hoc Tests wurde ein statistischer Paarvergleich der vier Regionen für Dihydroartemisinin durchgeführt. Dieser Test ergab signifikant höhere IC_{50}-Werte der Patienten aus der Region *Route Fougamou* als sie die Patienten in der Region *Süd* ($p = 0,02$), *Lambaréné* ($p = 0,04$) und *Nord* ($p = 0,046$) aufwiesen, mit einer mittleren Differenz von jeweils über drei Nanomolar. Tabelle 17 gibt neben der mittleren Differenz den p-Wert der untersuchten Paare an.

Tabelle 17: Paarvergleich der log_{10}-transformierten IC_{50}-Werte der verschiedenen Regionen für Dihydroartemisinin mit Hilfe des Tukey HSD Post-Hoc Tests

Regionen (untersuchte Paare)	Mittlere Differenz [nM]	p-Wert
Route Fougamou/Süd	3,62	0,02*
Route Fougamou/Nord	3,36	0,046*
Route Fougamou/Lambaréné	3,02	0,04*
Lambaréné/Süd	1,2	0,98
Lambaréné/Nord	1,11	> 0,99
Nord/Süd	1,08	> 0,99

* signifikant ($p < 0,05$), ** sehr signifikant ($p < 0,01$), *** hoch signifikant ($p < 0,001$)

4. Diskussion

4.1. Einführung

Plasmodium falciparum, der Erreger der Malaria tropica, stellt die hauptsächliche Ursache der komplizierten und letalen Verläufe der Malaria dar und ist fast ausschließlich für die Malariainfektionen in Lambaréné, Gabun, verantwortlich (WHO 2012). Beunruhigende Berichte über eine verringerte Sensitivität von Malariaparasiten nun auch gegen Artemisininverbindungen, die noch als wirksamste Antimalariasubstanzen gelten, unterstreichen die Wichtigkeit einer Überwachung der Parasitensensitivität gegen Antimalariamedikamente und der Entwicklung neuer antiplasmodialer Wirkstoffe (Noedl *et al.* 2008).

4.2. Interpretation von *in vitro* Daten aus Sensitivitätstests

Bei der Interpretation von *in vitro* Daten aus Sensitivitätstests müssen folgende Aspekte in Betracht gezogen werden:

Die Durchführung von *in vitro* Sensitivitätstests wird von der WHO zur Überwachung der Parasitensensitivität gegen Antimalariamedikamente empfohlen, es werden dafür jedoch keine einheitlichen Methoden verwendet. Ermittelte *in vitro* Daten von unterschiedlichen Methoden sind untereinander nicht immer vergleichbar (WHO 2010b). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode des HRP2-ELISAs wurde 2005 von Noedl *et al.* eingeführt (Noedl *et al.* 2005). Da sie zu den neueren Verfahren gehört, existiert bis zum heutigen Zeitpunkt nur eine begrenzte Anzahl von Vergleichsstudien.

Die Definition von Grenzwerten, bei deren Überschreitung das Risiko eines klinischen Behandlungsversagens erheblich steigt, würde die Interpretation von *in vitro* Daten aus Sensitivitätstests erleichtern. Um jedoch validierte Resistenzgrenzwerte zu etablieren, müssen klinische Studien, welche ein Behandlungsversagen durch das Medikament feststellen, mit *in vitro* Daten derselben Patienten verglichen werden. Zusätzlich sind detaillierte Studien über Pharmakokinetik und -dynamik des Antimalariamedikamentes im Patienten notwendig. Ein Therapieversagen, verursacht durch einen unzureichenden

Plasmaspiegel des Medikamentes, kann dadurch ausgeschlossen werden (Ekland & Fidock 2008). Ein validierter Grenzwert für *in vitro* Resistenz wurde bis jetzt nur für Chloroquin ermittelt (WHO 2007). Hierbei gelten Parasiten mit einem IC_{99}-Wert über einem Mikromol pro Liter Blut als resistent. Für die in dieser Arbeit verwendete Methode ergibt sich daraus ein Resistenzbereich für Chloroquin von IC_{99} > 30 nmol/l (Kreidenweiss *et al.* 2006).

Abschließend darf bei der Interpretation von *in vitro* Daten aus Sensitivitätstests nicht vergessen werden, dass diese Daten nicht unbedingt die klinische Wirksamkeit des Antimalariamedikamentes widerspiegeln, da diese von weiteren Faktoren, wie Pharmakokinetik und -dynamik oder Wirtsimmunität, abhängt, sondern dass vielmehr der Parasit isoliert untersucht wird (WHO 2007). Dabei muss beachtet werden, dass mehrere Parasitenpopulationen mit unterschiedlichen Medikamentensenitivitäten in einem Parasitenisolat vorhanden sein können, was die Bestimmung von weniger sensitiven Populationen in diesem Isolat erschwert (WHO 2010b).

4.3. *In vitro* Sensitivität von *P. falciparum* gegen Medikamente erster Wahl in Gabun

4.3.1. Artesunat

Die untersuchten klinischen *P. falciparum* Isolate zeigten mit einem Median der IC_{50}-Werte von 1,2 nM eine hohe Sensitivität gegen Artesunat. Dies korreliert mit früheren Datenerhebungen in dieser Region. Kreidenweiss *et al.* stellten im Jahr 2004 und Held *et al.* im Jahr 2009 eine hohe Aktivität von Artesunat gegen klinische *P. falciparum* Isolate fest. Diese Studien ermittelten in Lambaréné mit derselben Methode, wie in der vorliegenden Arbeit, einen Median für Artesunat aus 43 IC_{50}-Werten von 0,96 nM beziehungsweise einen Median aus 26 IC_{50}-Werten von 0,61 nM (Kreidenweiss *et al.* 2006, Held *et al.* 2011). Während in diesen beiden Studien von 2004 und 2009 keine Isolate mit verminderter Sensitivität detektiert wurden, enthielt die vorliegende Studie drei von 41 Isolaten mit IC_{50}-Werten über 10 nM – 15,9 nM, 13,6 nM und ein Isolat über der maximal untersuchten Konzentration von 20 nM. Jedoch wurde nur bei ersterem (15,9 nM) zusätzlich ein erhöhter korrespondierender IC_{50}-Wert für

Dihydroartemisinin (7,57 nM) ermittelt (siehe 4.3.2). Für das zweite Isolat (13,6 nM) lag der korrespondierende IC_{50}-Wert für Dihydroartemisinin bei 2,77 nM und beim dritten Isolat konnte wegen Wirksamkeitsverlust von Dihydroartemisinin kein IC_{50}-Wert ermittelt werden. Allgemein wurden für Artemisininverbindungen noch keine validierten Resistenzschwellen etabliert (WHO 2007). Außerdem liegen für die ermittelten IC_{50}-Werte keine *in vivo* Daten einer korrespondierenden klinischen Studie vor. Da nur sehr wenige Werte höher als erwartet waren, kann ein methodischer Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine Etablierung von Langzeitkulturen mit Referenzklonen in Lambaréné würde eine Qualitätskontrolle durch die zusätzliche Testung der verwendeten Medikamentenplatten mit den Referenzklonen ermöglichen, da die Messungen von anderen Untersuchern mit einer neuen Charge-Substanz reproduziert werden könnten. Stehen keine Langzeitkulturen zur Verfügung, wäre das Testen von alten und neuen Chargen der Medikamentenplatten mit ein und demselben eingefrorenen Isolat eine Alternative (WHO 2007).

Des Weiteren sei erwähnt, dass bis jetzt noch keine signifikante Korrelation zwischen der ermittelten verspäteten Parasiten-Clearance nach Artesunattherapie (siehe 1.3.2.5) und den korrespondierenden Werten der *in vitro* Sensitivitätstests gegen Artemisininverbindungen beobachtet werden konnte (Dondorp *et al.* 2009, Witkowski *et al.* 2013a). Demnach ist die Verwendung der gängigen *in vitro* Sensitivitätstests, unter anderem der in der vorliegenden Arbeit angewandte, für die Testung von Artemisininverbindungen umstritten. In den verwendeten *in vitro* Tests werden die Parasiten für 48 bzw. 72 Stunden durchgängig einer Verdünnungsreihe von verschiedenen Dihydroartemisininkonzentrationen ausgesetzt. *In vivo* ist der aktive Metabolit Dihydroartemisinin hingegen nur für ungefähr ein bis zwei Stunden und in einer hohen Konzentration wirksam (Witkowski *et al.* 2013a). Witkowski *et al.* konnten außerdem in *in vitro* Studien nachweisen, dass *P. falciparum* unter einem hohen Artesunat-Medikamentendruck im Ringstadium verbleibt und dies dem Parasiten zum Überleben hilft (Witkowski *et al.* 2010). Auch berechneten mathematische Modelle eine spezifisch verminderte Artemisininwirksamkeit

gegen Parasiten im Ringstadium (Saralamba *et al.* 2011). Daraufhin wurde ein neuer *in vitro* Test entworfen (*engl. Ring-Stage-Survival-Assay* = RSA), indem Parasiten im Ringstadium einer hohen Konzentration an Dihydroartemisinin (700 nM) für nur sechs Stunden ausgesetzt werden. Mit diesem Test konnte nun eine verminderte Sensitivität spezifisch im Ringstadium von kulturadaptierten Parasitenisolaten nachgewiesen werden (Witkowski *et al.* 2013b). Es ist jedoch umstritten, ob dieser Nachweis wirklich Rückschlüsse auf den resistenten Parasitenphänotyp *in vivo* zulässt. Krishna und Kremsner bezweifeln dies, da sich der Parasit vom weniger sensitiven Ringstadium in die sensitiveren Erwachsenenstadien entwickelt und dann durch das Medikament abgetötet wird – unter der Annahme, dass das Medikament während der Parasitenentwicklung ausreichend lang in einer therapeutischen Konzentration *in vivo* vorhanden ist (Krishna & Kremsner 2013). Weitere Forschung ist demnach notwendig, um die Frage zu klären, ob in Zukunft zur Sensitivitätsbestimmung gegen Artemisininverbindungen neue Methoden angewendet werden sollen.

Außerdem motivieren die Ergebnisse zu einer engen Überwachung der *in vivo* Wirksamkeit der weit verbreiteten Artemisininkombinationspräparate und der systematischen Messung der *in vitro* Wirksamkeit von Artemisininderivaten in Lambaréné und Umgebung.

4.3.2. Dihydroartemisinin

Es zeigte sich mit einem Median von 1,04 nM der 30 IC_{50}-Werte eine hohe Sensitivität der klinischen *P. falciparum* Isolate gegenüber Dihydroartemisinin. Dies war bei einer hohen Sensitivität gegen Artesunat (siehe 4.3.1) zu erwarten, da Dihydroartemisinin der aktive Metabolit von Artesunat ist (Hall *et al.* 2013). Auch Held *et al.* konnten 2009 eine hohe Aktivität von Dihydroartemisinin mit einem Median von 0,38 nM und einem Maximum von 2,63 nM der IC_{50}-Werte in Lambaréné feststellen. Sie wandten die gleiche Methode wie in der vorliegenden Arbeit an, jedoch wurde als Lösungsmittel für Dihydroartemisinin Methanol anstelle von 100% Ethanol verwendet (Held *et al.* 2011). Im Gegensatz zur Studie von Held *et al.* befanden sich in der

vorliegenden Studie unter den 30 untersuchten Isolaten zwei mit erhöhten IC_{50}-Werten über 5 nM (9,77 nM und 7,57 nM). Bei dem ersten Isolat ist jedoch von einem methodischen Fehler auszugehen, da der korrespondierende IC_{50}-Wert von Artesunat niedrig ist (0,08 nM). In der Parasitenkultur des zweiten Ausreißers konnte zusätzlich ein erhöhter IC_{50}-Wert für Artesunat von 15,9 nM festgestellt werden (siehe 4.3.1). In diesem Fall könnte die Ursache eine verminderte *in vitro* Sensitivität des Parasiten sein. So zeigt sich auch hier, wie unter 4.3.1 erwähnt, dass eine gleichzeitige Erhebung von *in vivo* Daten einer korrespondierenden klinischen Studie eine genauere Interpretation der Ergebnisse ermöglichen würde. Dies war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht realisierbar. Die Einführung von erweiterten Qualitätskontrollen der einzelnen Parasitenkulturen (z.B. Langzeitkulturen, siehe 4.3.1) ist jedoch eher durchführbar und wird zur Zeit angewendet. Außerdem gilt auch für Dihydroartemisinin in Zukunft die Frage zu klären, welcher *in vitro* Sensitivitätstest am ehesten geeignet ist Parasiten mit einer verminderten Sensitivität gegen Dihydroartemisinin zu detektieren (siehe 4.3.1).

Abschließend sei erwähnt: Unter der Annahme, dass eine in 41 gegen Artesunat getestete Probe eine verminderte *in vitro* Sensitivität aufweist, braucht man 374 weitere Proben, um mindestens fünf Proben mit einer verminderten *in vitro* Sensitivität mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zu finden.

4.3.3. Amodiaquin

Amodiaquin ist für Lambaréné insofern ein wichtiges Antimalariamedikament, als es als Partnerdroge von Artesunat zur Therapie der ersten Wahl von *P. falciparum* Malaria gehört. Jedoch wurde für Amodiaquin noch kein validierter Resistenzschwellenwert für Daten von *in vitro* Sensitivitätstests etabliert. In der bisherigen Literatur wurden zur leichteren Darstellung der Sensitivität von Amodiaquin willkürlich festgelegte Schwellenwerte verwendet. Echeverry *et al.* geben einen Überblick über die verwendeten Schwellenwerte einzelner Veröffentlichungen und ermitteln starke Abweichungen zwischen den verschiedenen Studien (WHO 2007, Echeverry *et al.* 2006). Darüber hinaus

wurden bis jetzt keine mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode vergleichbaren *in vitro* Daten für Amodiaquin in Lambaréné ermittelt. In Libreville, der Hauptstadt von Gabun, wurde 1998 mit Hilfe des isotopischen Mikrotests ein IC_{50}-Mittelwert für Amodiaquin von 10,3 nM mit einem 95%-Konfidenzintervall von 8,5 bis 12,2 nM bestimmt und alle 63 untersuchten Parasitenisolate wurden als hoch sensitiv gegen Amodiaquin eingestuft (Pradines *et al.* 1998). Vernachlässigt man den Aspekt der Verwendung von zwei unterschiedlichen Methoden und den willkürlich festgelegten Schwellenwert in der angeführten Veröffentlichung aus Gabun, liegt der Median von 6,18 nM bei 40 in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolaten im Bereich der Wirksamkeit. Lediglich bei einem Isolat wurde ein IC_{50}-Wert über 30 nM festgestellt. Dieser Wert von 40,4 nM könnte auf eine verminderte Sensitivität des Parasitenisolates hinweisen. Der korrespondierende Chloroquin IC_{99}-Median dieses Isolates beträgt 966 nM und liegt weit über dem Resistenzschwellenwert für Chloroquin von IC_{99} > 30 nM. Dies ist ein Hinweis auf eine Kreuzresistenz des untersuchten Isolates gegen Amodiaquin und Chloroquin. Um jedoch eine genauere Einschätzung der *in vitro* Wirksamkeit von Amodiaquin durchführen zu können, ist die Etablierung eines validierten Resistenzschwellenwertes und eine Vereinheitlichung der Methoden für *in vitro* Sensitivitätstests zur besseren Vergleichbarkeit untereinander essentiell. Zum jetzigen Zeitpunkt dienen die hier ermittelten IC_{50}-Werte als Ausgangsdaten für eine Verlaufskontrolle. Im Vergleich mit neu erhobenen *in vitro* Daten der gleichen Methode könnte somit die zeitliche Entwicklung der Parasitensensitivität gegen Amodiaquin in dieser Region besser beurteilt werden.

4.4. *In vitro* Sensitivität von *P. falciparum* gegen Chinin

Chinin wird seit dem 19. Jahrhundert als Antimalariamedikament eingesetzt und spielt noch heute als Alternative zu Artesunat in der Behandlung der komplizierten *P. falciparum* Malaria eine wichtige Rolle (WHO 2010a). Trotz des jahrelangen Gebrauchs von Chinin wurden bis heute nur vereinzelt Resistenzen beobachtet (siehe 1.3.2.4). Auch für Chinin existiert kein validierter *in vitro* Resistenzschwellenwert. Chinin wurde in Lambaréné in der Vergangenheit

bereits in *in vitro* Sensitivitästests untersucht, jedoch wurden andere Methoden oder eine modifizierte Methode des HRP2-ELISAs angewandt. Kurth *et al.* verwendeten 2006 den HRP2-ELISA wie in der vorliegenden Arbeit, verdünnten aber das Patientenblut mit Parasitenkulturmedium auf einen Hämatokrit von 3 % (Kurth *et al.* 2009). In der vorliegenden Methode wurde die Parasitämie auf 0,02-0,05 % verdünnt und ein Hämatokrit von 1,5 % hergestellt. Somit sind die beiden *in vitro* Studien methodisch leicht unterschiedlich. Kurth *et al.* ermittelten aus 14 gegen Chinin untersuchte Isolate ein geometrisches Mittel der IC_{50}-Werte von 204 nM mit einem 95%-Konfidenzintervall von 167 bis 250 nM und führten gleichzeitig bei 32 Isolaten den WHO *in vitro* Mikrotest durch, mit dem sie vergleichbare Resultate erzielten (geometrisches Mittel der IC_{50}–Werte von 272 nM) (Kurth *et al.* 2009). Diese Ergebnisse waren kongruent mit den von Ramharter *et al.* ermittelten *in vitro* Daten im Jahre 2002. Für 43 Parasitenisolate aus Lambaréné verwendeten sie den WHO *in vitro* Mikrotest und erhielten einen IC_{50}-Mittelwert von 286 nM (Ramharter *et al.* 2004). Beide Studien stuften alle untersuchten Isolate als sensibel gegen Chinin ein. Die 34 in der vorliegenden Arbeit gegen Chinin getesteten Isolate zeigten einen Median der IC_{50}-Werte von 97,1 nM mit einem Minimum von 17,8 nM und einem Maximum von 333 nM. Es kann also kein Wirkungsverlust von Chinin in den letzten Jahren in Lambaréné beobachtet werden und die Bestimmung der *in vitro* Wirksamkeit von Chinin scheint unabhängig von der Methode robuste Resultate zu zeigen. Die erhobenen IC_{50}-Werte können als Ausgangsdaten für zukünftige *in vitro* Studien mit derselben Methode und somit zur Verlaufskontrolle der Wirksamkeit von Chinin verwendet werden.

4.5. *In vitro* Sensitivität von *P. falciparum* gegen Chloroquin

Es zeigte sich, dass 14 der 15 gegen Chloroquin getesteten Isolate über dem validierten Resistenzschwellenwert von IC_{99} > 30 nM lagen und somit als resistent eingestuft wurden. Ein Isolat reagierte grenzwertig sensitiv auf Chloroquin mit einem IC_{99}-Wert von 23,1 nM. Diese Ergebnisse korrelieren mit früheren Untersuchungen in der gleichen Region. Nachdem 1992 in Lambaréné eine Resistenzrate von 100 % gegen Chloroquin festgestellt und in der Folge Chloroquin als Therapeutikum der ersten Wahl am Albert-Scheitzer-

Krankenhaus 1994 abgesetzt wurde, ergaben darauffolgende *in vitro* Untersuchungen einen vermeintlichen Abfall der Resistenzrate gegen Chloroquin (Winkler *et al.* 1994, Philipps *et al.* 1998, Brandts *et al.* 2000, Schwenke *et al.* 2001). Dieser Trend wurde jedoch durch *in vivo* und *in vitro* Daten von Borrmann *et al.* revidiert. Nach Borrmann *et al.* zeigte sich eine vollständige Resistenz der untersuchten Parasiten gegen Chloroquin (Borrmann *et al.* 2002). Aber auch spätere *in vitro* Sensitivitätstests bestätigten die von Borrmann *et al.* festgestellte persistierende Chloroquin-Resistenz in Lambaréné (Ramharter *et al.* 2004, Kreidenweiss *et al.* 2006, Kurth *et al.* 2009). Kreidenweiss *et al.* verwendeten 2004 eine mit der vorliegenden Arbeit identische Methode. Für alle 43 der in 2004 untersuchten Isolate wurde ein IC_{99}-Wert von über 30 nM ermittelt und diese damit als resistent eingestuft (Kreidenweiss *et al.* 2006). Die persistierende Chloroquin-Resistenz kann durch einen stetigen Medikamentendruck auf die Parasiten verursacht werden. Möglicherweise wird dieser durch eine weiterhin verbreitete Einnahme von Chloroquin in der Region, trotz gegenteiliger Empfehlungen in Gabun als Therapie der ersten Wahl für *P. falciparum* Malaria in 2003, ausgeübt. Des Weiteren könnte der verbreitete Einsatz von Arsucam® (Artesunat/Amodiaquin) als Therapeutikum der ersten Wahl in Gabun eine Rolle spielen. Frank *et al.* konnten vier Jahre nach dem Absetzen von Chloroquin als Therapie der ersten Wahl in Gabun eine weiterhin hohe Prävalenz des mutierten *Pf*CRT-Gens, welches für chloroquinresistente Parasiten verantwortlich ist, in Lambaréné nachweisen. Als mögliche Erklärung hierfür wurde die bestehende Selektion des mutierten *Pf*CRT-Gens auf Grund des verbreiteten Amodiaquin-Einsatzes durch Arsucam® gesehen (Frank *et al.* 2011). In Ländern wie Malawi, in denen ein Wiederanstieg der Chloroquin-Sensitivität nach Absetzen von Chloroquin beobachtet wird, ist als Therapie der ersten Wahl eine Kombination aus Arthemeter und Lumefantrin empfohlen (WHO 2012).

Die geringe Anzahl von 15 gegen Chloroquin getesteten Kulturen war bedingt durch die Anwendung von zwei unwirksamen Chloroquin-Chargen. Eine Qualitätskontrolle wie unter 4.3.1 beschrieben, in der alte und neue Chargen

mit ein und demselben Isolat überprüft werden, sollte in Zukunft solche Probleme früher erkennen lassen.

4.6. Antiplasmodiale Wirksamkeit von PW28 gegen *P. falciparum*

Mit einem IC_{50}-Median von 34 nM zeigte PW28 eine gute antiplasmodiale Wirksamkeit gegen 22 klinische *P. falciparum* Isolate aus Lambaréné. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit ermittelten *in vitro* Daten von *P. falciparum* Laborstämmen. Tschan *et al.* bestimmten einen IC_{50}-Median für die Chloroquin-empfindlichen Laborstämme 3D7 und D10 von 19,1 nM bzw. 16,2 nM und 20,2 nM für den chloroquinresistenten Stamm Dd2. PW28 wurde daraufhin *in vivo* gegen *P. berghei* in einem Mausmodell getestet. Hierfür wurden neun Versuchsmäuse mit *P. berghei* infizierten Erythrozyten intravenös geimpft und erhielten nach 2, 24, 48 und 72 Stunden jeweils 10 mg/kg Körpergewicht von PW28, verdünnt mit einer Injektionslösung (7% Tween80, 3% Ethanol), intraperitoneal verabreicht. Neun Kontrollmäusen wurde das gleiche Volumen als reine Injektionslösung injiziert. Die Überwachung der Mäuse erfolgte für insgesamt vier Tage. Es zeigte sich eine hohe antiplasmodiale Wirksamkeit von PW28. Am dritten Tag betrug die mittlere Parasitämie 1,9 %, im Gegensatz zu 9,6 % der Kontrollgruppe. Tschan *et al.* beschrieben jedoch, dass die verabreichte Menge an PW28 nicht gut von den Mäusen toleriert wurde und am vierten Tag fünf der neun Versuchsmäuse gestorben waren. Somit sind weitere Untersuchungen und Modifikationen der Gruppe der Proteasom-Inhibitoren notwendig, bevor diese in die klinischen Phasen übertreten könnten (Tschan *et al.* 2013).

In der vorliegenden Arbeit konnten nur 22 Parasitenisolate gegen PW28 getestet werden, da die Substanz nach vier Monaten allmählich ihre Wirksamkeit verlor. Dies könnte durch den Zyklus des Einfrierens und wieder Auftauens während der Studiendurchführung verursacht worden sein. Eine Instabilität durch häufiges Einfrieren und Auftauen wurde bereits bei anderen Proteasom-Inhibitoren beobachtet (Tschan *et al.* 2013). Daraus folgt, dass bei zukünftigen Versuchen mit PW28, die Substanz nach einiger Zeit wieder neu angesetzt und häufiges Einfrieren und Auftauen vermieden werden sollte. Im

Vergleich könnte die gleichzeitige Durchführung einer Testreihe mit PW28, welches nicht neu angesetzt, jedoch häufig eingefroren und aufgetaut wird, Aufschluss über die Stabilität von PW28 geben.

4.7. Korrelationen

Der Pearson-Korrelationstest ergab keine signifikante Korrelation zwischen PW28 und den anderen untersuchten Substanzen. Gerade in Regionen mit hoher Chloroquin-Resistenz, wie dem Studienort, ist es wichtig einen neuen Wirkstoff auf mögliche Kreuzresistenzen, vor allem gegen Chloroquin, zu testen. Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen von Kreidenweiss *et al.* überein, die in derselben Region keine signifikanten Korrelationen zwischen Chloroquin und verschiedenen anderen Vertretern der Proteasom-Inhibitoren feststellen konnten (Kreidenweiss *et al.* 2008). Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass es sich um unterschiedliche Resistenzmuster von Chloroquin und den Proteasom-Inhibitoren handelt. Es muss jedoch beachtet werden, dass die gemeinsame Stichprobenzahl bei der vorliegenden Korrelationstestung zwischen PW28 und Chloroquin bei 15 lag. Es wäre somit sinnvoll, diese Ergebnisse in einer weiteren Studie mit höherer Stichprobenzahl zu überprüfen.

Des Weiteren konnte eine sehr signifikante positive Korrelation zwischen Artesunat und Dihydroartemisinin gezeigt werden. Dies war zu erwarten, da Dihydroartemisinin den aktiven Metaboliten von Artesunat darstellt (Hall *et al.* 2013). Wohingegen die hoch signifikante Korrelation von Artesunat zu Chinin und die sehr signifikanten Korrelationen von Artesunat zu Amodiaquin bzw. Dihydroartemisinin zu Chinin und Chloroquin nicht über eine strukturelle Ähnlichkeit der Wirkstoffpaare erklärbar sind. Pradines *et al.* wiesen jedoch auch in Libreville, Gabun, signifikante Korrelationen zwischen einem Artemisinin-Derivat, in diesem Fall Arthemeter, und den Chinolinderviaten Chinin (r^2 = Determinationskoeffizient = 0,31; $p < 0,001$), Chloroquin (r^2= 0,36; $p < 0,001$) und Amodiaquin (r^2 = 0,45; $p < 0,001$) nach (Pradines *et al.* 1998). Dagegen konnten Kreidenweiss *et al.* keine signifikante Korrelation zwischen Artesunat und Chloroquin feststellen (r = 0,28; p = 0,08) (Kreidenweiss *et al.* 2006). Die genaue Bestimmung des Wirkmechanismus der

Artemisininverbindungen könnte bei der Interpretation der hier beobachteten Korrelationen zwischen den Artemisininverbindungen und den Chinolinderivaten, welche möglicherweise durch gemeinsame Angriffspunkte bedingt sind, hilfreich sein.

Die geringe, jedoch signifikante Korrelation zwischen Chinin und Amodiaquin kann durch die entfernte strukturelle Ähnlichkeit der beiden Chinolinderivate erklärt werden. Jedoch würde man eine höhere signifikante Korrelation zwischen Amodiaquin und Chloroquin, den beiden 4-Aminochinolinen (siehe 1.2.1.1), erwarten. Eine positive Korrelation zwischen Amodiaquin und Chloroquin ist in der vorliegenden Studie zu beobachten (r = 0,55; p = 0,053). Sie liegt jedoch knapp unter dem Signifikanzniveau von 0,05. Dies kann wiederum durch die geringe Schnittmenge der beiden Substanzen von 13 Stichproben bedingt sein und sollte durch eine weitere Studie mit größerer Stichprobenzahl überprüft werden.

4.8. Regionale Unterschiede

Dihydroartemisinin zeigte mit einem Median der IC_{50}-Werte von 2,66 nM in der Region *Route Fougamou* eine deutlich verminderte *in vitro* Sensitivität der Parasiten gegen den Wirkstoff, im Vergleich zu den anderen Regionen. Diese Beobachtung konnte mit einer ANOVA signifikant bestätigt werden. Die beiden unter 4.3.2 erwähnten Ausreißer gehören auch zu der Region *Route Fougamou*. Für den strukturell ähnlichen Wirkstoff Artesunat ergab die ANOVA (siehe 3.4) unerwarteterweise keinen signifikanten Unterschied. Bei Betrachtung der Mediane von Artesunat fällt jedoch eine ähnliche Differenz zwischen den Regionen, wie für Dihydroartemisinin, auf. Der Median der IC_{50}-Werte in der Region *Route Fougamou* lag auch für Artesunat mit 2,73 nM deutlich höher als in den anderen Regionen (*Nord* 0,94 nM/ *Lambaréné* 0,76 nM/ *Süd* 0,85 nM). Zwei der drei unter 4.3.1 erwähnten Ausreißer bei Artesunat befinden sich außerdem in dieser Region (15,9 nM/ 20 nM). Die verminderte *in vitro* Sensitivität der Parasiten gegen die zwei untersuchten Artemisininverbindungen in der Region *Route Fougamou* könnten Vorboten einer Resistenzentwicklung der Parasiten gegen diese Wirkstoffgruppe

darstellen. Da bis jetzt noch keine weitere *in vitro* Studie zusätzliche detaillierte Wohnortbestimmungen der Patienten in dieser Region durchgeführt hat, gibt es keine vergleichbaren Daten. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss in Betracht gezogen werden, dass die Angabe über den Wohnort, der als Schlafplatz im letzten Monat definiert wurde, nicht immer identisch mit dem Ort sein muss, an dem der Patient sich mit Malaria infiziert hat. Um genauere Aussagen treffen zu können, ob die beobachtete verminderte *in vitro* Sensitivität der Parasiten gegen Artemisininverbindungen in dieser Region Auswirkungen auf den klinischen Behandlungserfolg des Medikamentes hat, sollten weitere Studien durchgeführt werden. Neben einer erneuten *in vitro* Studie mit größerer Stichprobenzahl, einem genauer festgestellten Infektionsort sowie einer Genotypisierung der Parasiten, sollten zusätzlich *in vivo* Daten einer korrespondierenden klinischen Studie erhoben werden.

5. Zusammenfassung

Plasmodium falciparum, der Erreger der Malaria tropica, ist fast ausschließlich für Malariainfektionen in der Region Lambaréné, Gabun, verantwortlich. Resistenzentwicklungen dieser Malariaparasiten gegen Antimalaria-medikamente stellen immer wieder ein Problem bei der Bekämpfung der Malaria weltweit dar. Berichte aus dem Grenzgebiet zwischen Thailand und Kambodscha über eine verringerte Sensitivität von Malariaparasiten nun auch gegen Artemisininverbindungen, die momentan noch als wirksamste Antimalariasubstanzen gelten, zeigen die Wichtigkeit einer Überwachung der Parasitensensitivität gegen Antimalariamedikamente und die Entwicklung neuer antiplasmodialer Wirkstoffe. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden von November 2010 bis August 2011 *in vitro* Sensitivitätstestungen von klinischen *P. falciparum* Isolaten aus Lambaréné, Gabun, gegen die Antimalariawirkstoffe Artesunat, Amodiaquin, Chinin, Chloroquin und Dihydroartemisinin durchgeführt. Gleichzeitig wurde der Proteasom-Inhibitor PW28 auf seine *in vitro* Wirksamkeit gegen die klinischen *P. falciparum* Isolate getestet.

Die Bestimmung des Parasitenwachstums erfolgte durch die Quantifizierung des „*P. falciparum*-Histidin-Rich-Proteins-2“ (*Pf*HRP2) mittels eines zweiseitigen Sandwich ELISAs. Inhibitorische Konzentrationen (50% bzw. 99%) der untersuchten Substanzen jedes Patienten bestimmte man durch eine nichtlineare Regressionsanalyse einer logarithmischen Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Neben Pearson-Korrelationen wurden regionale Unterschiede zwischen den Wirksamkeiten der untersuchten Chemotherapeutika herausgearbeitet. Hierbei wurden die Patientenwohnorte mittels GPS-Daten erhoben und die Patienten vier Regionen zugeteilt.

Mit einem Median der IC_{50}-Werte von 1,2 nM bzw. 1,04 nM zeigten die Artemisininverbindungen Artesunat (N = 41) bzw. Dihydroartemisinin (N = 30) eine hohe Sensitivität.

Für Amodiaquin (N = 40), der Partnerdroge von Artesunat zur Therapie der ersten Wahl bei *P. falciparum* Malaria, lag der IC_{50}-Median von 6,18 nM im Bereich der Wirksamkeit.

Für Chinin (N = 34), der Alternativmedikation zu Artesunat bei komplizierten *P. falciparum* Malariafällen, konnte mit einem IC_{50}-Median von 97,1 nM kein Wirkungsverlust in den letzten Jahren in Lambaréné beobachtet werden.

14 der 15 gegen Chloroquin getesteten Isolate lagen über dem Resistenzschwellenwert von IC_{99} > 30 nM und wurden als resistent eingestuft. Der IC_{50}-Median für Chloroquin betrug 29,2 nM.

Mit einem IC_{50}-Median von 34 nM zeigte PW28 (N = 22) eine gute antiplasmodiale Wirksamkeit und es konnten keine signifikanten Korrelationen von PW28 zu den anderen untersuchten Substanzen festgestellt werden.

Dihydroartemisinin und Artesunat zeigten mit einem IC_{50}-Median von 2,66 nM bzw. 2,73 nM in der Region *Route Fougamou* eine deutlich verminderte *in vitro* Sensitivität der Parasiten gegen den Wirkstoff im Vergleich zu den anderen drei Regionen (*Nord* 0,62 bzw. 0,94 nM/*Lambaréné* 0,81 bzw 0,76 nM/*Süd* 0,84 bzw. 0,85 nM). Eine ANOVA konnte für Dihydroartemisinin einen signifikanten Unterschied bestätigen, für Artesunat jedoch nicht. Die verminderte *in vitro* Sensitivität der Parasiten in der Region *Route Fougamou* gegen die zwei untersuchten Artemisininverbindungen könnte sich als Vorbote einer Resistenzentwicklung der Parasiten gegen diese Wirkstoffgruppe darstellen. Um herauszufinden, ob die beobachtete verminderte *in vitro* Sensitivität Auswirkungen auf den klinischen Behandlungserfolg des Medikamentes hat, sollten weitere Studien in dieser Region durchgeführt werden. Neben einer größeren Stichprobenzahl sollten zusätzlich *in vivo* Daten einer korrespondierenden klinischen Studie erhoben werden.

Literaturverzeichnis

Agnandji, S.T., Lell, B., Fernandes, J.F., Abossolo, B.P., Methogo, B.G., Kabwende, A.L., Adegnika, A.A., Mordmüller, B., Issifou, S., Kremsner, P.G., Sacarlal, J., Aide, P., Lanaspa, M., Aponte, J.J., Machevo, S., Acacio, S., Bulo, H., Sigauque, B., Macete, E., Alonso, P., Abdulla, S., Salim, N., Minja, R., Mpina, M., Ahmed, S., Ali, A.M., Mtoro, A.T., Hamad, A.S., Mutani, P., Tanner, M., Tinto, H., D'Alessandro, U., Sorgho, H., Valea, I., Bihoun, B., Guiraud, I., Kaboré, B., Sombié, O., Guiguemdé, R.T., Ouédraogo, J.B., Hamel, M.J., Kariuki, S., Oneko, M., Odero, C., Otieno, K., Awino, N., McMorrow, M., Muturi-Kioi, V., Laserson, K.F., Slutsker, L., Otieno, W., Otieno, L., Otsyula, N., Gondi, S., Otieno, A., Owira, V., Oguk, E., Odongo, G., Woods, J.B., Ogutu, B., Njuguna, P., Chilengi, R., Akoo, P., Kerubo, C., Maingi, C., Lang, T., Olotu, A., Bejon, P., Marsh, K., Mwambingu, G., Owusu-Agyei, S., Asante, K.P., Osei-Kwakye, K., Boahen, O., Dosoo, D., Asante, I., Adjei, G., Kwara, E., Chandramohan, D., Greenwood, B., Lusingu, J., Gesase, S., Malabeja, A., Abdul, O., Mahende, C., Liheluka, E., Malle, L., Lemnge, M., Theander, T.G., Drakeley, C., Ansong, D., Agbenyega, T., Adjei, S., Boateng, H.O., Rettig, T., Bawa, J., Sylverken, J., Sambian, D., Sarfo, A., Agyekum, A., Martinson, F., Hoffman, I., Mvalo, T., Kamthunzi, P., Nkomo, R., Tembo, T., Tegha, G., Tsidya, M., Kilembe, J., Chawinga, C., Ballou, W.R., Cohen, J., Guerra, Y., Jongert, E., Lapierre, D., Leach, A., Lievens, M., Ofori-Anyinam, O., Olivier, A., Vekemans, J., Carter, T., Kaslow, D., Leboulleux, D., Loucq, C., Radford, A., Savarese, B., Schellenberg, D., Sillman, M., Vansadia, P., 2012. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. N. Engl. J. Med. 367, 2284–2295.

Agnandji, S.T., Lell, B., Soulanoudjingar, S.S., Fernandes, J.F., Abossolo, B.P., Conzelmann, C., Methogo, B.G., Doucka, Y., Flamen, A., Mordmüller, B., Issifou, S., Kremsner, P.G., Sacarlal, J., Aide, P., Lanaspa, M., Aponte, J.J., Nhamuave, A., Quelhas, D., Bassat, Q., Mandjate, S., Macete, E., Alonso, P., Abdulla, S., Salim, N., Juma, O., Shomari, M., Shubis, K., Machera, F., Hamad, A.S., Minja, R., Mtoro, A., Sykes, A., Ahmed, S., Urassa, A.M., Ali, A.M., Mwangoka, G., Tanner, M., Tinto, H., D'Alessandro, U., Sorgho, H., Valea, I., Tahita, M.C., Kaboré, W., Ouédraogo, S., Sandrine, Y., Guiguemdé, R.T., Ouédraogo, J.B., Hamel, M.J., Kariuki, S., Odero, C., Oneko, M., Otieno, K., Awino, N., Omoto, J., Williamson, J., Muturi-Kioi, V., Laserson, K.F., Slutsker, L., Otieno, W., Otieno, L., Nekoye, O., Gondi, S., Otieno, A., Ogutu, B., Wasuna, R., Owira, V., Jones, D., Onyango, A.A., Njuguna, P., Chilengi, R., Akoo, P., Kerubo, C., Gitaka, J., Maingi, C., Lang, T., Olotu, A., Tsofa, B., Bejon, P., Peshu, N., Marsh, K., Owusu-Agyei, S., Asante, K.P., Osei-Kwakye, K., Boahen, O., Ayamba, S., Kayan, K., Owusu-Ofori, R., Dosoo, D., Asante, I., Adjei, G., Adjei, G., Chandramohan, D., Greenwood, B., Lusingu, J., Gesase, S., Malabeja, A., Abdul, O., Kilavo, H., Mahende, C., Liheluka, E., Lemnge, M., Theander, T., Drakeley, C., Ansong, D., Agbenyega, T., Adjei S, Boateng, H.O., Rettig, T., Bawa, J., Sylverken, J., Sambian, D., Agyekum, A., Owusu, L., Martinson, F., Hoffman, I., Mvalo, T., Kamthunzi, P., Nkomo, R., Msika, A., Jumbe, A., Chome, N., Nyakuipa, D., Chintedza, J., Ballou, W.R., Bruls, M., Cohen, J., Guerra, Y., Jongert, E., Lapierre, D., Leach, A., Lievens, M., Ofori-Anyinam, O., Vekemans, J., Carter, T., Leboulleux, D., Loucq, C., Radford, A., Savarese, B., Schellenberg, D., Sillman, M., Vansadia, P., RTS,S Clinical Trials Partnership, 2011. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. N. Engl. J. Med. 365, 1863–1875.

Amaratunga, C., Sreng, S., Suon, S., Phelps, E.S., Stepniewska, K., Lim, P., Zhou, C., Mao, S., Anderson, J.M., Lindegardh, N., Jiang, H., Song, J., Su, X.Z., White, N.J., Dondorp, A.M., Anderson, T.J., Fay, M.P., Mu, J., Duong, S., Fairhurst, R.M., 2012. Artemisinin-resistant Plasmodium falciparum in Pursat province, western Cambodia: a parasite clearance rate study. Lancet Infect. Dis. 12, 851–858.

Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A.-C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., Lim, P., Leang, R., Duong, S., Sreng, S., Suon, S., Chuor, C.M., Bout, D.M., Ménard, S., Rogers, W.O., Genton, B., Fandeur, T., Miotto, O., Ringwald, P., Le Bras, J., Berry, A., Barale, J.-C., Fairhurst, R.M., Benoit-Vical, F., Mercereau-Puijalon, O., Ménard, D., 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria. Nature 505, 50–55.

Baird, J.K., 2005. Effectiveness of antimalarial drugs. N. Engl. J. Med. 352, 1565–1577.

Boggild, A.K., Parise, M.E., Lewis, L.S., Kain, K.C., 2007. Atovaquone-proguanil: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis (II). Am. J. Trop. Med. Hyg. 76, 208–223.

Borrmann, S., Binder, R.K., Adegnika, A.A., Missinou, M.A., Issifou, S., Ramharter, M., Wernsdorfer, W.H., Kremsner, P.G., 2002. Reassessment of the resistance of Plasmodium falciparum to chloroquine in Gabon: implications for the validity of tests in vitro vs. in vivo. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 96, 660–663.

Bousema, J.T., Schneider, P., Gouagna, L.C., Drakeley, C.J., Tostmann, A., Houben, R., Githure, J.I., Ord, R., Sutherland, C.J., Omar, S.A., Sauerwein, R.W., 2006. Moderate effect of artemisinin-based combination therapy on transmission of Plasmodium falciparum. J. Infect. Dis. 193, 1151–1159.

Bouyou-Akotet, M.K., Mawili-Mboumba, D.P., Kendjo, E., Mabika-Mamfoumbi, M., Ngoungou, E.B., Dzeing-Ella, A., Pemba-Mihindou, M., Ibinga, E., Efame-Eya, E., Planche, T., Kremsner, P.G., Kombila, M., 2009. Evidence of decline of malaria in the general hospital of Libreville, Gabon from 2000 to 2008. Malar. J. 8, 300.

Brandts, C.H., Wernsdorfer, W.H., Kremsner, P.G., 2000. Decreasing chloroquine resistance in Plasmodium falciparum isolates from Gabon. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94, 554–556.

Brasseur, P., Guiguemde, R., Diallo, S., Guiyedi, V., Kombila, M., Ringwald, P., Olliaro, P., 1999. Amodiaquine remains effective for treating uncomplicated malaria in west and central Africa. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 93, 645–650.

Brouwer, A.J., Jonker, A., Werkhoven, P., Kuo, E., Li, N., Gallastegui, N., Kemmink, J., Florea, B.I., Groll, M., Overkleeft, H.S., Liskamp, R.M., 2012. Peptido sulfonyl fluorides as new powerful proteasome inhibitors. J. Med. Chem. 55, 10995–11003.

Bruce-Chwatt, L.J., 1988. Three hundred and fifty years of the Peruvian fever bark. Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.) 296, 1486–1487.

Desakorn, V., Dondorp, A.M., Silamut, K., Pongtavornpinyo, W., Sahassananda, D., Chotivanich, K., Pitisuttithum, P., Smithyman, A.M., Day, N.P., White, N.J., 2005. Stage-dependent production and release of histidine-rich protein 2 by Plasmodium falciparum. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 99, 517–524.

Desakorn, V., Silamut, K., Angus, B., Sahassananda, D., Chotivanich, K., Suntharasamai, P., Simpson, J., White, N.J., 1997. Semi-quantitative measurement of Plasmodium falciparum antigen PfHRP2 in blood and plasma. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 91, 479–483.

Dondorp, A.M., Fanello, C.I., Hendriksen, I.C.E., Gomes, E., Seni, A., Chhaganlal, K.D., Bojang, K., Olaosebikan, R., Anunobi, N., Maitland, K., Kivaya, E., Agbenyega, T., Nguah, S.B., Evans, J., Gesase, S., Kahabuka, C., Mtove, G., Nadjm, B., Deen, J., Mwanga-Amumpaire, J., Nansumba, M., Karema, C., Umulisa, N., Uwimana, A., Mokuolu, O.A., Adedoyin, O.T., Johnson, W.B., Tshefu, A.K., Onyamboko, M.A., Sakulthaew, T., Ngum, W.P., Silamut, K., Stepniewska, K., Woodrow, C.J., Bethell, D., Wills, B., Oneko, M., Peto, T.E., von Seidlein, L., Day, N.P., White, N.J., AQUAMAT group, 2010. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. Lancet 376, 1647–1657.

Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyo, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S.J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S.S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N.P., Lindegardh, N., Socheat, D., White, N.J., 2009. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. N. Engl. J. Med. 361, 455–467.

DTG. Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit e.V. Empfehlungen und Leitlininen, Malariaempfehlungen, Medikamente. http://www.dtg.org/7.html (Stand 14.10.2013)

Echeverry, D.F., Murillo, C., Piedad, R.P., Osorio, L., 2006. Susceptibility of Colombian Plasmodium falciparum isolates to 4-aminoquinolines and the definition of amodiaquine resistance in vitro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101, 341–344.

Eckstein-Ludwig, U., Webb, R.J., Van Goethem, I.D., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M., O'Neill,

P.M., Bray, P.G., Ward, S.A., Krishna, S., 2003. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. Nature 424, 957–961.

Ekland, E.H., Fidock, D.A., 2008. In vitro evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes. Int. J. Parasitol. 38, 743–747.

Eyase, F.L., Akala, H.M., Ingasia, L., Cheruiyot, A., Omondi, A., Okudo, C., Juma, D., Yeda, R., Andagalu, B., Wanja, E., Kamau, E., Schnabel, D., Bulimo, W., Waters, N.C., Walsh, D.S., Johnson, J.D., 2013. The role of Pfmdr1 and Pfcrt in changing chloroquine, amodiaquine, mefloquine and lumefantrine susceptibility in western-Kenya P. falciparum samples during 2008-2011. PLoS ONE 8, e64299.

Fidock, D.A., Nomura, T., Talley, A.K., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T., Ursos, L.M., Sidhu, A.B., Naudé, B., Deitsch, K.W., Su, X.Z., Wootton, J.C., Roepe, P.D., Wellems, T.E., 2000. Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. Mol. Cell 6, 861–871.

Fidock, D.A., Rosenthal, P.J., Croft, S.L., Brun, R., Nwaka, S., 2004. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. Nat. Rev. Drug Discov. 3, 509–520.

Fontanet, A.L., Johnston, D.B., Walker, A.M., Rooney, W., Thimasarn, K., Sturchler, D., Macdonald, M., Hours, M., Wirth, D.F., 1993. High prevalence of mefloquine-resistant falciparum malaria in eastern Thailand. Bull. World Health Organ. 71, 377–383.

Frank, M., Lehners, N., Mayengue, P.I., Gabor, J., Dal-Bianco, M., Kombila, D.U., Ngoma, G.M., Supan, C., Lell, B., Ntoumi, F., Grobusch, M.P., Dietz, K., Kremsner, P.G., 2011. A thirteen-year analysis of Plasmodium falciparum populations reveals high conservation of the mutant pfcrt haplotype despite the withdrawal of chloroquine from national treatment guidelines in Gabon. Malar. J. 10, 304.

Giles, J., 2004. Chemistry Nobel for trio who revealed molecular death-tag. Nature 431, 729.

Ginsburg, H., Ward, S.A., Bray, P.G., 1999. An integrated model of chloroquine action. Parasitol. Today (Regul. Ed.) 15, 357–360.

Gorka, A.P., de Dios, A., Roepe, P.D., 2013. Quinoline Drug-Heme Interactions and Implications for Antimalarial Cytostatic versus Cytocidal Activities. J. Med. Chem. 56, 5231-46.

Hall, A.J., Chappell, M.J., Aston, J.A., Ward, S.A., 2013. Pharmacokinetic modelling of the anti-malarial drug artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin. Comput. Methods Programs Biomed. 112, 1–15.

Harinasuta, T., Suntharasamai, P., Viravan, C., 1965. Chloroquine-resistant falciparum malaria in Thailand. Lancet 2, 657–660.

Held, J., Soomro, S.A., Kremsner, P.G., Jansen, F.H., Mordmüller, B., 2011. In vitro activity of new artemisinin derivatives against Plasmodium falciparum clinical isolates from Gabon. Int. J. Antimicrob. Agents 37, 485–488.

Hill, A.V., 2011. Vaccines against malaria. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 366, 2806–2814.

Hill, D.R., Baird, J.K., Parise, M.E., Lewis, L.S., Ryan, E.T., Magill, A.J., 2006. Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. Am. J. Trop. Med. Hyg. 75, 402–415.

Hyde, J.E., 2002. Mechanisms of resistance of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs. Microbes Infect. 4, 165–174.

Jongwutiwes S., Buppan P., Kosuvin R., Seethamchai S., Pattanawong U., Sirichaisinthop J., Putaporntip C., 2011. Plasmodium knowlesi malaria in humans and macaques, Thailand. Emerg. Infect. Dis. 17, 1799-1806.

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

Kreidenweiss, A., Kremsner, P.G., Dietz, K., Mordmüller, B., 2006. In vitro activity of ferroquine (SAR97193) is independent of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum. Am. J. Trop. Med. Hyg. 75, 1178–1181.

Kreidenweiss, A., Kremsner, P.G., Mordmüller, B., 2008. Comprehensive study of proteasome

inhibitors against Plasmodium falciparum laboratory strains and field isolates from Gabon. Malar. J. 7, 187.

Kremsner, P.G., Krishna, S., 2004. Antimalarial combinations. Lancet 364, 285–294.

Krishna, S., Kremsner, P.G., 2013. Antidogmatic approaches to artemisinin resistance: reappraisal as treatment failure with artemisinin combination therapy. Trends Parasitol. 29, 313–317.

Kurth, F., Pongratz, P., Bélard, S., Mordmüller, B., Kremsner, P.G., Ramharter, M., 2009. In vitro activity of pyronaridine against Plasmodium falciparum and comparative evaluation of anti-malarial drug susceptibility assays. Malar. J. 8, 79.

Lesi, A., Meremikwu, M., 2004. High first dose quinine regimen for treating severe malaria. Cochrane Database Syst. Rev. CD003341.

Maberti, S., 1960. [The development of resistance to pyrimethamine. Presentation of 15 cases studied in Trujillo, Venezuela]. Arch. Venez. Med. Trop. Parasitol. Med. 3, 239–259.

Mawili-Mboumba, D.P., Bouyou Akotet, M.K., Kendjo, E., Nzamba, J., Medang, M.O., Mbina, J.-R.M., Kombila, M., MCORU team, 2013. Increase in malaria prevalence and age of at risk population in different areas of Gabon. Malar. J. 12, 3.

Mawili-Mboumba, D.P., Bouyou Akotet, M.K., Ngoungou, E.B., Kombila, M., 2010. Evaluation of rapid diagnostic tests for malaria case management in Gabon. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 66, 162–168.

Meshnick, S.R., Thomas, A., Ranz, A., Xu, C.M., Pan, H.Z., 1991. Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular hemin in its mechanism of antimalarial action. Mol. Biochem. Parasitol. 49, 181–189.

Meshnick, S.R., Yang, Y.Z., Lima, V., Kuypers, F., Kamchonwongpaisan, S., Yuthavong, Y., 1993. Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). Antimicrob. Agents Chemother. 37, 1108–1114.

Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique chargé de la Famille et de la promotion de la Femme, Secrétariat Général, Direction Générale de la Santé, Direction Générale adjointe chargée des Programmes et Services Nationaux, 2008. Programme national de lutte contre le paludisme. Directives nationales de prise en charge du paludisme au Gabon. Libreville, 1-20.

Mordmüller, B., 2010. New medicines for malaria. Wien. Klin. Wochenschr. 122 Suppl 1, 19–22.

Mordmüller, B., Fendel, R., Kreidenweiss, A., Gille, C., Hurwitz, R., Metzger, W.G., Kun, J.F., Lamkemeyer, T., Nordheim, A., Kremsner, P.G., 2006. Plasmodia express two threonine-peptidase complexes during asexual development. Mol. Biochem. Parasitol. 148, 79–85.

Mordmüller, B., Kremsner, P.G., 2006. Malarial parasites vs. antimalarials: never-ending rumble in the jungle. Curr. Mol. Med. 6, 247–251.

Murray, C.J., Rosenfeld, L.C., Lim, S.S., Andrews, K.G., Foreman, K.J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R., Lopez, A.D., 2012. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. Lancet 379, 413–431.

Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., Chandu, D., 2006. The ubiquitin-proteasome system. J. Biosci. 31, 137–155.

Noedl, H., Bronnert, J., Yingyuen, K., Attlmayr, B., Kollaritsch, H., Fukuda, M., 2005. Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 3575–3577.

Noedl, H., Se, Y., Schaecher, K., Smith, B.L., Socheat, D., Fukuda, M.M., Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium, 2008. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. N. Engl. J. Med. 359, 2619–2620.

Nosten, F., ter Kuile, F., Chongsuphajaisiddhi, T., Luxemburger, C., Webster, H.K., Edstein, M., Phaipun, L., Thew, K.L., White, N.J., 1991. Mefloquine-resistant falciparum malaria on the Thai-Burmese border. Lancet 337, 1140–1143.

Olliaro, P., Mussano, P., 2003. Amodiaquine for treating malaria. Cochrane Database Syst. Rev. CD000016.

Olliaro, P., Wells, T.N., 2009. The global portfolio of new antimalarial medicines under

development. Clin. Pharmacol. Ther. 85, 584–595.

Olliaro, P.L., Haynes, R.K., Meunier, B., Yuthavong, Y., 2001. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. Trends Parasitol. 17, 122–126.

Peterson, D.S., Walliker, D., Wellems, T.E., 1988. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 9114–9118.

Philipps, J., Radloff, P.D., Wernsdorfer, W., Kremsner, P.G., 1998. Follow-up of the susceptibility of Plasmodium falciparum to antimalarials in Gabon. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58, 612–618.

Phillips-Howard, P.A., Nahlen, B.L., Kolczak, M.S., Hightower, A.W., ter Kuile, F.O., Alaii, J.A., Gimnig, J.E., Arudo, J., Vulule, J.M., Odhacha, A., Kachur, S.P., Schoute, E., Rosen, D.H., Sexton, J.D., Oloo, A.J., Hawley, W.A., 2003. Efficacy of permethrin-treated bed nets in the prevention of mortality in young children in an area of high perennial malaria transmission in western Kenya. Am. J. Trop. Med. Hyg. 68, 23–29.

Phyo, A.P., Nkhoma, S., Stepniewska, K., Ashley, E.A., Nair, S., McGready, R., Ier Moo, C., Al-Saai, S., Dondorp, A.M., Lwin, K.M., Singhasivanon, P., Day, N.P., White, N.J., Anderson, T.J., Nosten, F., 2012. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. Lancet 379, 1960–1966.

Planche, T., Krishna, S., Kombila, M., Engel, K., Faucher, J.F., Ngou-Milama, E., Kremsner, P.G., 2001. Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65, 599–602.

Pradines, B., Mabika Mamfoumbi, M., Parzy, D., Owono Medang, M., Lebeau, C., Mourou Mbina, J.R., Doury, J.C., Kombila, M., 1998. In vitro susceptibility of Gabonese wild isolates of Plasmodium falciparum to artemether, and comparison with chloroquine, quinine, halofantrine and amodiaquine. Parasitology 117 (Pt 6), 541–545.

Price, R.N., Uhlemann, A.-C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., Patel, R., Laing, K., Looareesuwan, S., White, N.J., Nosten, F., Krishna, S., 2004. Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number. Lancet 364, 438–447.

Ramharter, M., Wernsdorfer, W.H., Kremsner, P.G., 2004. In vitro activity of quinolines against Plasmodium falciparum in Gabon. Acta Trop. 90, 55–60.

R Develpoment Core Team, 2008. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. http://www.R-project.org.

Ribeiro, I.R., Olliaro, P., 1998. Safety of artemisinin and its derivatives. A review of published and unpublished clinical trials. Med. Trop. (Mars) 58, 50–53.

Ritz, C., Streibig, J.C., 2005. Bioassay Analysis using R. J. Statist. Software 12.

Rosenberg, R., Wirtz, R.A., Schneider, I., Burge, R., 1990. An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84, 209–212.

Saralamba, S., Pan-Ngum, W., Maude, R.J., Lee, S.J., Tarning, J., Lindegårdh, N., Chotivanich, K., Nosten, F., Day, N.P., Socheat, D., White, N.J., Dondorp, A.M., White, L.J., 2011. Intrahost modeling of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 397–402.

Schwenke, A., Brandts, C., Philipps, J., Winkler, S., Wernsdorfer, W.H., Kremsner, P.G., 2001. Declining chloroquine resistance of Plasmodium falciparum in Lambaréné, Gabon from 1992 to 1998. Wien. Klin. Wochenschr. 113, 63–64.

Shah, N.K., Schapira, A., Juliano, J.J., Srivastava, B., MacDonald, P.D., Poole, C., Anvikar, A., Meshnick, S.R., Valecha, N., Mishra, N., 2013. Nonrandomized controlled trial of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine with or without primaquine for preventing posttreatment circulation of Plasmodium falciparum gametocytes. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 2948–2954.

Shekalaghe, S., Drakeley, C., Gosling, R., Ndaro, A., van Meegeren, M., Enevold, A., Alifrangis, M., Mosha, F., Sauerwein, R., Bousema, T., 2007. Primaquine clears submicroscopic

Plasmodium falciparum gametocytes that persist after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine and artesunate. PLoS ONE 2, e1023.

Sinclair, D., Donegan, S., Isba, R., Lalloo, D.G., 2012. Artesunate versus quinine for treating severe malaria. Cochrane Database Syst. Rev. 6, CD005967.

Slater, A.F., 1993. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in Plasmodium falciparum. Pharmacol. Ther. 57, 203–235.

Takechi, M., Matsuo, M., Ziba, C., MacHeso, A., Butao, D., Zungu, I.L., Chakanika, I., Bustos, M.D., 2001. Therapeutic efficacy of sulphadoxine/pyrimethamine and susceptibility in vitro of P. falciparum isolates to sulphadoxine-pyremethamine and other antimalarial drugs in Malawian children. Trop. Med. Int. Health 6, 429–434.

Tan, K.R., Magill, A.J., Parise, M.E., Arguin, P.M., Centers for Disease Control and Prevention, 2011. Doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 84, 517–531.

Tschan, S., Brouwer, A.J., Werkhoven, P.R., Jonker, A.M., Wagner, L., Knittel, S., Aminake, M.N., Pradel, G., Joanny, F., Liskamp, R.M., Mordmüller, B., 2013. Broad-spectrum antimalarial activity of peptido sulfonyl fluorides, a new class of proteasome inhibitors. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 3576–3584.

Tschan, S., Mordmüller, B., Kun, J.F., 2011. Threonine peptidases as drug targets against malaria. Expert Opin. Ther. Targets 15, 365–378.

Tsukamoto, S., Yokosawa, H., 2009. Targeting the proteasome pathway. Expert Opin. Ther. Targets 13, 605–621.

Valderramos, S.G., Fidock, D.A., 2006. Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. Trends Pharmacol. Sci. 27, 594–601.

Wernsdorfer, W.H., Payne, D., 1991. The dynamics of drug resistance in Plasmodium falciparum. Pharmacol. Ther. 50, 95–121.

White, N.J., 2008. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. Clin. Infect. Dis. 46, 172–173.

White N.J., 2009. Malaria. In Manson's Tropical Diseases. 22nd Edition, herausgegeben von Cook GC, Zumla AI, Weir J. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1201-1300.

WHO, 1997. Vector Control. Methods for use by individuals and communitites. Geneva: World Health Organization, 1997. http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/who/vertol.pdf (Stand 14.10.2013).

WHO, 2007. Field application of in vitro assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. Geneva: World Health Organization. http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241595155/en/ (Stand 17.01.2014).

WHO, 2008. Malaria rapid diagnostic test performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 1 (2008). Geneva: World Health Organization.

WHO, 2010a. Guidelines for the treatment of malaria. Second edition. Geneva: World Health Organization. http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241547925/en/index.html (Stand 17.01.2014).

WHO, 2010b. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. Geneva: World Health Organization. http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241500470/en/ (Stand: 17.01.2014).

WHO, 2010c. Basic malaria microscopy: Part I. Learner's guide, Second edition. Geneva: World Health Organization.

WHO, 2012. World malaria report 2012. Geneva: World Health Organization. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/ (Stand 23.09.2013).

Winkler, S., Brandts, C., Wernsdorfer, W.H., Graninger, W., Bienzle, U., Kremsner, P.G., 1994. Drug sensitivity of Plasmodium falciparum in Gabon. Activity correlations between various antimalarials. Trop. Med. Parasitol. 45, 214–218.

Witkowski, B., Amaratunga, C., Khim, N., Sreng, S., Chim, P., Kim, S., Lim, P., Mao, S., Sopha, C., Sam, B., Anderson, J.M., Duong, S., Chuor, C.M., Taylor, W.R.J., Suon, S., Mercereau-Puijalon, O., Fairhurst, R.M., Menard, D., 2013a. Novel phenotypic assays for the detection

of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. Lancet Infect. Dis. 13, 1043–1049.

Witkowski, B., Khim, N., Chim, P., Kim, S., Ke, S., Kloeung, N., Chy, S., Duong, S., Leang, R., Ringwald, P., Dondorp, A.M., Tripura, R., Benoit-Vical, F., Berry, A., Gorgette, O., Ariey, F., Barale, J.-C., Mercereau-Puijalon, O., Menard, D., 2013b. Reduced artemisinin susceptibility of Plasmodium falciparum ring stages in western Cambodia. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 914–923.

Witkowski, B., Lelièvre, J., Barragán, M.J., Laurent, V., Su, X., Berry, A., Benoit-Vical, F., 2010. Increased tolerance to artemisinin in Plasmodium falciparum is mediated by a quiescence mechanism. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 1872–1877.

Yeka, A., Achan, J., D'Alessandro, U., Talisuna, A.O., 2009. Quinine monotherapy for treating uncomplicated malaria in the era of artemisinin-based combination therapy: an appropriate public health policy? Lancet Infect. Dis. 9, 448–452.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus der Malariaparasiten 5

Abbildung 2: Positives Testergebnis eines Malariaschnelltests *Paracheck Pf*® 24

Abbildung 3: Verdünnungsschema der 96-Well-Gewebekulturplatte. 29

Abbildung 4: Glasglocke mit Kerze 32

Abbildung 5: Verteilung der IC_{50}-Werte von Amodiaquin, Artesunat, Chloroquin, Dihydroartemisinin, PW28 und Chinin 39

Abbildung 6: Quantil-Quantil-Diagramme der untersuchten Substanzen nach der log_{10}-Transformation 41

Abbildung 7: Streudiagrammmatrix der log_{10}-transformierten IC_{50}-Werte von Amodiaquin, Artesunat, Chinin, Chloroquin, Dihydroartemisinin und PW28 43

Abbildung 8: Karte des Einschlussgebietes der Studie in Moyen-Ogouué, Gabun 45

Abbildung 9: Verteilung der 50% inhibitorischen Konzentrationen von Dihydroartemisinin in den einzelnen Regionen 48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wirkstoffklassen der Antimalariatherapie und ihre klinisch verwendeten Vertreter 7

Tabelle 2: Chemikalien, Reagenzien und Puffer 18

Tabelle 3: Nährmedien und Seren 19

Tabelle 4: Antikörper 19

Tabelle 5: Medikamente 19

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien 20

Tabelle 7: Geräte 21

Tabelle 8: Ein- und Ausschlusskriterien der Studie 22

Tabelle 9: Im Dokumentationsbogen erfasste Daten eines Studienpatienten 23

Tabelle 10: Untersuchte Substanzen 27

Tabelle 11: Reagenzien für eine 500 ml Albumaxlösung 28

Tabelle 12: Datenerhebung der Patienten am Tag der Aufnahme 37

Tabelle 13: Übersicht über die IC_{50}-Werte der untersuchten Substanzen 38

Tabelle 14: Mediane [nM] der IC_{50}-Werte der untersuchten Substanzen in den vier Regionen 46

Tabelle 15: Test auf Unterschiede der log_{10}-transformierten IC_{50}-Werte der untersuchten Substanzen zwischen den einzelnen Regionen (Ergebnisse der einfaktoriellen ANOVA und der Bonferroni-Korrektur) 47

Tabelle 16: Übersicht über die IC_{50}-Werte der einzelnen Regionen von DHA . 47

Tabelle 17: Paarvergleich der log_{10}-transformierten IC_{50}-Werte der verschiedenen Regionen für Dihydroartemisinin mit Hilfe des Tukey HSD Post-Hoc Tests 49

Eigenanteil

Frau Dr. S. Tschan und Frau Dr. J. Held haben die Stammlösungen von Amodiaquin, Artesunat, Chinin, Chloroquin, Dihydroartemsinin und PW28 angefertigt und SAG-Mannitol sowie Albumax hergestellt. Sie haben die Arbeit mitbetreut und Frau Dr. J. Held hat die Arbeit Korrektur gelesen.

Die Patienten wurden in Ausnahmefällen von Frau A. Selzer, als Mitarbeiterin der GMZ2-Malariaimpfstoffstudie am CERMEL rekrutiert. Die Malariadiagnostik, Blutabnahme sowie Patientenbehandlung wurden in seltenen Fällen von den Mitarbeitern der GMZ2-Malariaimpfstoffstudie am CERMEL durchgeführt.

Herr T. Engleitner hat mir bei der Auswahl der statistischen Tests geholfen.

Herr Dr. B. Mordmüller war an der Konzeption der Studie beteiligt, hat bei der Erstellung des Quantil-Quantil-Diagramms geholfen und hat die Arbeit betreut sowie Korrektur gelesen.

Die folgenden Arbeiten wurden von mir eigenständig durchgeführt:

- Rekrutierung, Malariadiagnostik, Blutabnahme sowie Patientenbehandlung bei dem Großteil der Patienten
- Erhebung der demographischen Daten und GPS-Daten
- Durchführung der Experimente
- Auswertung und statistische Analyse
- Anfertigung der Arbeit

Danksagungen

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter G. Kremsner für die Möglichkeit danken, diese Doktorarbeit in seinem Institut durchführen zu können sowie für die Ermöglichung des Aufenthalts und die Mitarbeit am Forschungslabor des Albert-Schweitzer-Krankenhauses in Lambaréné.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Benjamin Mordmüller für die intensive Betreuung meiner Arbeit während des Aufenthalts in Gabun und anschließend in Deutschland.

Dr. Jana Held und Dr. Serena Tschan möchte ich für ihre geduldige und engagierte Ausbildung, die Einführung in die verwendeten Methoden sowie für ihre Hilfe bei Planung, Durchführung, Auswertung und Verfassung der Arbeit danken.

Herzlich danke ich Aline Selzer für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe bei der Durchführung der Arbeit in Lambaréné.

Thomas Engleitner möchte ich für die Diskussion über die Auswertung der Daten danken.

Ich danke allen Mitarbeitern und Doktoranten des Forschungslabors in Lambaréné für die gute Zusammenarbeit, insbesondere Anne-Marie Nkoma, Fanny Joanny, Malte Witte, Eva Zettlmeissl, Dominik Seynstahl und Anthony Ajua. Ebenso bedanke ich mich bei allen Kindern und ihren Eltern sowie den Erwachsenen aus Lambaréné und Umgebung für die Studienteilnahme.

Dem „Deutschen Akademischen Austauschdienst“ möchte ich für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsaufenthaltes in Lambaréné danken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Till.

Lebenslauf

2005	Abitur am Gymnasium Schrobenhausen
2006 – 2008	Studium der Humanmedizin, Eberhard Karls Universität Tübingen
18/03/2008	Abschluss des Ersten Staatsexamens, Humanmedizin Eberhard Karls Universität Tübingen
2008	Universitätswechsel an die Charité – Universitätsmedizin Berlin
2010/2011	Forschungsaufenthalt „Unité de Recherches Médicales“ des Albert-Schweitzer-Hospitals in Lambaréné/Gabun Stipendiatin des Deutschen Akademischen Austauschdienstes
2011	Wiederaufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Charité – Universitätsmedizin Berlin
2012 – 2013	Absolvierung des Praktischen Jahres Charité – Universitätsmedizin Berlin Harvard Medical School – Massachusetts General Hospital, Boston/USA
24/05/2013	Abschluss des Zweiten Staatsexamens, Humanmedizin Charité – Universitätsmedizin Berlin
25/07/2013	Approbation als Ärztin
2014	Assistenzärztin für Kinder- und Jugendpsychiatrie und -psychotherapie am Heckscher-Klinikum in München

Publikationen

Tschan, S., Brouwer, A.J., Werkhoven, P.R., Jonker, A.M., Wagner, L., Knittel, S., Aminake, M.N., Pradel, G., Joanny, F., Liskamp, R.M., Mordmüller, B., 2013. Broad-spectrum antimalarial activity of peptido sulfonyl fluorides, a new class of proteasome inhibitors. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 3576–3584.