

**Aus dem Institut für Bioinformatik
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Thomas Dandekar

**Malaria in Burkina Faso – Chancen für eine neue Strategie
mit Hilfe von Methylenblau**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Janina Zirkel

aus Züntersbach

Würzburg, November 2011

Referent:

Herr Prof. Dr. med. Thomas Dandekar

Koreferent:

Herr Priv.-Doz. Dr. med. August Stich

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2012

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Malaria.....	1
1.2 Malaria in Burkina Faso.....	3
1.3 Erreger und Vektoren der Malaria	4
1.4 Entwicklungszyklus von Plasmodien.....	6
1.5 Klinik und Immunologie der Malaria	8
1.5.1 Klinische Präsentation der Malaria.....	8
1.5.2 Immunität gegen Malaria.....	12
1.6 Generelle Prinzipien und Geschichte der Malaria-Kontrolle.....	13
1.6.1 Vektorkontrolle.....	14
1.6.2 Humane Faktoren.....	15
1.6.3 Impfung.....	16
1.6.4 Strategien zur Bekämpfung der Malaria	18
1.6.5 Malaria-Kontrolle in Burkina Faso.....	21
1.7 Probleme der Malaria-Kontrolle.....	23
1.8 Theoretische Grundlagen zum Redoxstoffwechsel von Plasmodien und zur extremen Pathway Analyse.....	25
1.8.1 Allgemeine Aspekte zum Redoxstoffwechsel.....	25
1.8.2 Oxidativer Stress im Malaria Parasiten.....	27
1.8.3 Die Rolle der oxidativen Protektion von <i>P. falciparum</i>	29
1.8.4 Die Rolle des Glutathion-Systems bei der oxidativen Protektion von <i>P. falciparum</i>	31
1.8.5 Methylenblau.....	33
1.8.6 Wirkung von Methylenblau auf Plasmodien	36
1.8.7 Metabolische Netzwerkmodellierung	38
1.9. Zielsetzung und Hintergrund der Arbeit.....	39
2. Material und Methoden.....	41
2.1 Umfrage in Burkina Faso.....	41
2.1.1 Studiengebiet.....	41
2.1.2 Durchführung der Befragung.....	42

2.1.3 Datenerhebung	42
2.2 Bioinformatische Analysen.....	43
2.2.1 Primäre Datenbanken.....	43
2.2.2 Sekundäre Datenbanken	45
2.2.3 Alignments.....	46
2.2.3.1 Substitutionsmatrizen.....	47
2.2.3.2 Datenbank-Suchalgorithmen.....	50
2.2.3.3 Multiples Sequenzalignment mit ClustalX.....	53
2.2.4 Strukturvorhersageprogramme.....	54
2.3 Metabolische Netzwerkmodellierung.....	55
2.3.1 Enzym- und Pathwaydatenbanken.....	56
2.3.2 Extreme Pathway Analyse	57
3. Ergebnisse.....	61
3.1 Bioinformatische Analyse von PfATP6, der wahrscheinlichsten Zielstruktur von Artemisinin.....	61
3.1.1 Generelle Überlegungen zur Resistenzentstehung.....	61
3.1.2 Molekulargenetik der Resistenz.....	62
3.1.3 Artemisinin und mögliche Zielproteine.....	64
3.1.4 Ähnlichkeit der SERCA Transporter in verschiedenen Plasmodien Spezies.....	70
3.1.5 Iterativer Sequenzvergleich der Artemisinin bindenden Domäne.....	74
3.1.6 Alignment, Homologiemodellierung und Vergleich von verschiedenen Sensibilität-modulierenden-Aminosäuren der SERCA-Transporter von Plasmodien	75
3.2 Modellierung des Einflusses von Methylenblau auf das Redoxstoffwechselnetzwerk von <i>P. falciparum</i>	82
3.2.1 Erstellung des Redoxnetzwerks.....	82
3.2.1.1 Das Glutathion-System.....	82
3.2.1.2 Das Thioredoxin-System.....	88
3.2.1.3 Weitere Redox Enzyme.....	91
3.2.2 Metabolische Netzwerkanalyse.....	96

3.2.3 Einfluss von Methylenblau auf das Redoxstoffwechselnetzwerk.....	105
3.3 Umfrage in Burkina Faso.....	113
3.3.1 Kenntnisse der Befragten über Malaria und deren Korrelation mit verschiedenen Faktoren.....	118
3.3.1.1 Ergebnisse der Einzelfragen.....	118
3.3.1.2 Verteilung der Gesamtpunktzahl und Analyse der Unterschiede zwischen Dörfern und Städten.....	122
3.3.1.3 Korrelation der Kenntnisse über Malaria mit Faktoren wie Schulbildung und Alter	124
3.3.2 Betroffenheit und Gesundheitsverhalten im Fieberfall.....	126
3.3.3 Teilnahmebereitschaft der Befragten an einem E-Day-artigen Projekt.....	129
3.3.4 Einstellung der Befragten zur modernen/westlichen Medizin im Vergleich zur traditionellen Medizin	131
4. Diskussion.....	133
4.1 Notwendigkeit neuer pharmazeutischer Strategien	133
4.2 Einsatz von Methylenblau als vielversprechendes Anti-Malaria Medikament.....	137
4.3 Multi-Hit Aspekt und antibiotischer Synergie Effekt von Methylenblau.....	139
4.4 Methylenblau als neue Strategie auch in Malaria Eradikationsprogrammen.....	141
4.5. Implementierungspunkte.....	145
5. Zusammenfassung.....	148
6. Anhang.....	152
6.1 Domänen des SERCA-Transporters.....	152
6.2 Blast-Analyse der Artemisinin bindenden Domäne E1-E2 des SERCA Transporters.....	153
6.3 Korrelation zwischen Kenntnissen über Malaria und Schulbildung.....	156
6.4 Korrelation zwischen Kenntnissen über Malaria und Alter.....	159

6.5 Forschungsbericht der Befragung in Französisch.....	163
7. Literaturverzeichnis.....	185
8. Abbildungsverzeichnis.....	209
9. Tabellenverzeichnis.....	212

1. Einleitung

Als schwere Infektionskrankheit bedroht Malaria weiterhin etwa die Hälfte der Weltbevölkerung und fordert besonders in den Entwicklungsländern beträchtliche Todesopfer. Die Behandlung der Malaria ist geprägt von zunehmenden und sich schnell ausbreitenden Resistenzen gegen Standardantibiotika. Diese Arbeit versucht einen Bogen zu spannen von sozial-medizinischen Befragungen vor Ort bis hin zur Medikamentenentwicklung, Resenzevaluierung des Erstlinienmedikaments Artemisinin und Bioinformatik, mit dem Ziel, die Durchführbarkeit einer lokalen Eradikationsstrategie in Burkina Faso unter Nutzung von Methylenblau zu evaluieren. Wir sehen eine große Bereitschaft in der Bevölkerung, neue Medikamente einzusetzen und zeigen u.a. die breite Wirkung von Methylenblau auf verschiedene Enzyme des Redoxstoffwechsels auf. Dies kann ein Baustein zu einer neuen Kombinationstherapie z.B. auch gegen Chloroquin oder Artemisinin resistente Plasmodien sein. Es folgen nun wichtige theoretische Grundlagen zu meiner Arbeit.

1.1 Malaria

Ungeachtet beträchtlicher Anstrengungen die Krankheit auszurotten oder zu kontrollieren, stellt Malaria weiterhin, als die häufigste und gefährlichste parasitäre Erkrankung, eine der wichtigsten Gesundheitsbedrohungen für die Weltbevölkerung dar [1]. Während Malaria bis zum 19. Jahrhundert noch in gemäßigten Breiten wie Nordeuropa, Nordamerika und Russland vorkam, ist die Malaria heute auf tropische und subtropische Regionen beschränkt und tritt in etwa 108 Ländern endemisch auf. 3,3 Milliarden Menschen, etwa die Hälfte der Weltbevölkerung, lebt heutzutage in Malaria Risikogebieten, ein Fünftel der Weltbevölkerung, 1,2 Milliarden Menschen, sogar in Hochrisikogebieten. Jährlich erkranken rund 300 bis 500 Millionen

Menschen an der Malaria und zwischen 0,7 bis 2,7 Millionen Todesfälle pro Jahr werden ihr angelastet [2], [1]. Abbildung 1 zeigt die geschätzte Inzidenz von Malaria Episoden im Landesdurchschnitt in 2004:

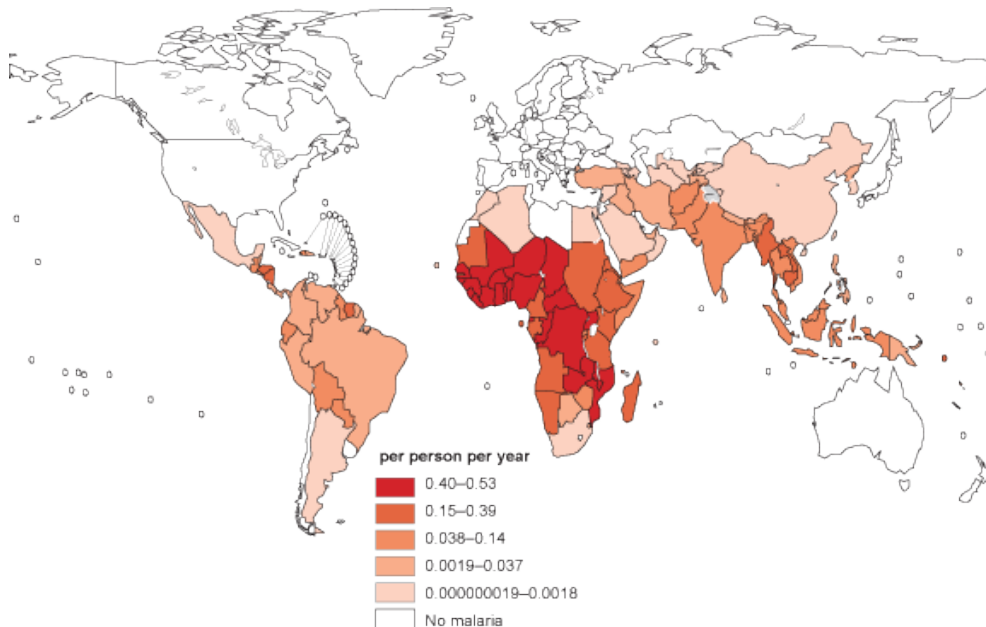


Abbildung 1: Geschätzte Inzidenz der Malaria-Episoden 2004. Quelle: WHO, World Malaria Report 2005, freigegeben.

Aktuell besteht auf Grund der globalen Erwärmung eine erneute Gefahr eines globalen Inzidenzanstiegs [3]. Afrika trägt die größte Bürde der Malaria-Morbidität und -letalität; über 60% der Malariaerkrankungen und über 90% der Malaria bedingten Todesfälle weltweit betreffen die afrikanische Bevölkerung südlich der Sahara [4]. Am stärksten von dieser Krankheit gefährdet sind Schwangere und Kinder unter fünf Jahren. Für etwa 20% aller kindlichen Todesfälle in Afrika südlich der Sahara ist Malaria verantwortlich zu machen und alle 30 Sekunden fordert Malaria dort ein Kinderleben. Es wird geschätzt, dass jedes afrikanische Kind zwischen 1,6 und 5,4 Malaria-Episoden pro Jahr erleidet. Überleben Kinder schwere Malaria-Attacken verbleiben häufig Lernschwächen und andere zerebrale Defizite. Bei Schwangeren führt Malaria zu Spontanaborten, Totgeburten, Frühgeburten, geringem Geburtsgewicht, erhöhter Säuglingssterblichkeit und Anämie [2]. Doch

nicht nur Lebenserwartung, schulische Ausbildung und soziale Entwicklung werden durch Malaria beeinträchtigt, auch die Wirtschaftskraft (Produktivitätsverlust, Verlust humaner Ressourcen) und die Gesundheitssysteme werden stark belastet. Die Weltbank berichtete, dass Malaria das wirtschaftliche Wachstum in Afrika jährlich um 1,3% verlangsamt und durchschnittlich für 25-45% der ambulanten Konsultationen verantwortlich ist. Malaria geplagte Länder sind also nicht nur ärmer, sondern weisen auch ein verringertes wirtschaftliches Wachstum auf, was über mehrere Jahre den Unterschied zwischen Malaria betroffenen und nicht betroffenen Ländern verschärft und das wirtschaftliche Wachstum der gesamten Region hindert [5].

1.2 Malaria in Burkina Faso

In Burkina Faso, einem der ärmsten Länder der Welt, dominieren übertragbare Infektionskrankheiten das epidemiologische Profil. Die endemische Malaria stellt hier als häufigster Grund für Todesfälle und Hospitalisierungen das größte Gesundheitsproblem für die öffentliche Gesundheit dar (Abbildung 2). 2005 verzeichneten die Statistiken des öffentlichen Gesundheitswesens, dass Malaria in 35,12% der Fälle der Grund für ambulante Konsultationen, in 40,83% der Grund für Hospitalisierungen und in 37,5% Todesursache war [6]. Insgesamt wurden in Burkina Faso 2005 1.818.818 Malaria-Fälle registriert, 924.838 davon bei Kindern unter 5 Jahren [4]. Malaria ist in Burkina Faso im ganzen Land stabil endemisch mit einer saisonalen Rekrudescenz von Mai bis Oktober. Man unterscheidet hierbei drei unterschiedliche Transmissionsniveaus: eine permanente Transmission in den südlichen und südöstlichen Regionen; eine lange Transmissionsphase im Zentrum (4-6 Monate) und eine kurze Transmissionsphase von 2-3 Monaten im Norden des Landes mit potenziellem Epidemie Risiko. In 90% der Malaria-Fälle ist *Plamsodium*

falciparum die auslösende Plasmodien-Spezies, gefolgt von *Plasmodium malariae* (3-8%) und *Plasmodium ovale* (0,5-2%). Der Hauptvektor der Malaria in Burkina Faso sind *Anopheles gambiae* S. I. und *Anopheles funestus* [6] [7].

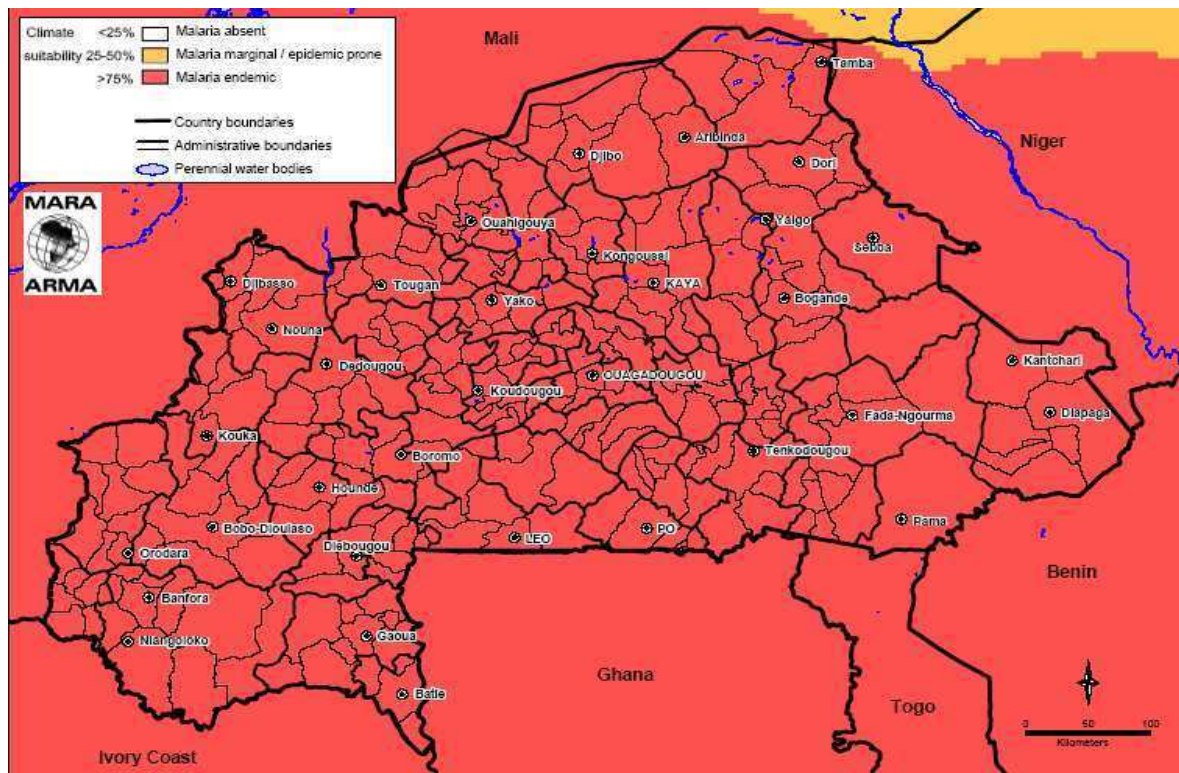


Abbildung 2: Malaria Verteilung in Burkina Faso 2005. Quelle: Mara/Arma Kollaboration (www.mara.org.za).

1.3 Erreger und Vektoren der Malaria

Malaria wird durch die Infektion mit Protozoen der Gattung *Plasmodium*, der Familie der Plasmodiidae hervorgerufen. Von den fast 120 bekannten Plasmodien-Arten, die im Blut von Säugetieren, Reptilien und Vögeln gefunden werden, können beim Menschen nur vier Malaria verursachen. Die 2-7 µm großen vier human pathogenen Plasmodien-Arten sind für drei verschiedenen Krankheitsbilder verantwortlich: Malaria tropica verursacht durch *P. falciparum*, Malaria tertiana verursacht durch *P. vivax* und *P. ovale* und Malaria quartana verursacht durch *P. malariae*.

P. falciparum kommt weltweit in den meisten Verbreitungsgebieten der

Malaria vor. Er ist der wichtigste und gefährlichste Malariaparasit, der nahezu ausschließlich für die Mortalität der Malaria verantwortlich ist und sich immer stärker auszubreiten scheint. Auf dem afrikanischen Kontinent werden etwa 90% aller Malaria-Fälle durch *P. falciparum* hervorgerufen [8], [9]. *P. vivax* überwiegt in Nordafrika, im vorderen Orient, in Pakistan, Indien, Nepal, Sri Lanka und in Mittelamerika. Die anderen humanen Malaria-Erreger sind seltener. *P. ovale* tritt vor allem in Westafrika auf und *P. malariae* in West- und Ostafrika sowie in Teilen Indiens [10].

Malaria wird durch den Stich der weiblichen *Anopheles*-Mücke übertragen. Von den weltweit etwa 350 verschiedenen *Anopheles*-Arten sind nur ca. 45 in der Lage, den Menschen mit Malaria zu infizieren. Die Charakteristika der jeweiligen *Anopheles*-Spezies hat Auswirkung auf die Verbreitung der Malaria, da aggressivere Mücken zu einer stärkeren Ausbreitung der Krankheit führen [11]. Die epidemiologisch wichtigen Verbreitungsregionen von *Anopheles*-Mücken decken sich im Wesentlichen mit der Verbreitung der Malaria. Aktuell begrenzt sich das Vorkommen der *Anopheles*-Mücke auf niedrige Meereshöhen (unter 2.500 m am Äquator und unter 1.500 m in den restlichen Gebieten). Durch die zunehmende Klimaerwärmung werden jedoch die polwärtsgerichteten Ausbreitungen der Überträgermücken wahrscheinlicher [3]. *Anopheles*-Mücken durchlaufen während ihres Lebenszyklus vier Entwicklungsstadien: ein Ei-, ein Larven-, ein Puppen- und ein Adultstadium. Nur die weibliche *Anopheles* saugt Blut und ist zum Stich befähigt. Die männlichen Mücken ernähren sich leckend bzw. saugend von Nektar und anderen Flüssigkeiten. Die Blutmahlzeit der Weibchen ist essentiell für die Entwicklung ihrer Eier. Ein Saugakt genügt für die Produktion von ca. 100 Eiern, die nach 2-3 Tagen abgelegt werden. Bei einer durchschnittlichen Lebensdauer von mehreren Wochen kann jede Mücke 1000 und sogar mehr Eier produzieren. Die Eiablage

aller Moskitos erfolgt in Wasser, in Sümpfen oder anderen stehenden oder leicht fließenden Gewässern. Hierbei hat jede Spezies ihre eigene Brutgewohnheit. Die Eier werden einzeln auf die Wasseroberfläche abgelegt und entwickeln sich über das charakteristische Larvenstadium in 10-14 Tagen zur flugfähigen Mücke. Die Entwicklungszeit vom Ei- zum Adultstadium wird vor allem durch die umgebende Temperatur bedingt. Obwohl *Anopheles*-Mücken zu kilometerweiten Flügen fähig sind, halten sie sich bevorzugt in einem relativ kleinen Bereich auf, zumeist in der Nähe menschlicher Behausungen. Die Weibchen der *Anopheles* stechen ausschließlich in der Dämmerung oder nachts und nehmen tagsüber eine typische Ruhestellung ein [10].

1.4 Entwicklungszyklus von Plasmodien

Im Entwicklungszyklus von Plasmodien fungiert der Mensch als Endwirt und die *Anopheles*-Mücken als Zwischenwirt und Überträger der Parasiten. Humanpathogene Plasmodien durchlaufen während ihrer Entwicklung eine sexuelle Phase im *Anopheles*-Vektor und eine asexuelle Phase im Menschen:

Bei der Infektion durch den Stich der Mücke, gelangen einige wenige Sporoziten aus den Speicheldrüsen der Mücke entweder direkt oder indirekt über Lymphwege in den menschlichen Blutkreislauf. Mit dem Blutstrom gelangen sie innerhalb von ca. 30 Minuten zur Leber, wo sie in Leberparenchymzellen eindringen und zum Leberschizont heranreifen. Während der präerythrozytären oder hepatischen Entwicklungsphase findet eine asexuelle Vermehrung (Gewebschizogonie) statt, in deren Verlauf bis zu 30.000 Merozoiten reifen. Die Dauer der hepatischen Phase variiert und reicht von 47-52 Stunden bei *P. berghei* bis zu 6-15 Tagen bei humanpathogenen Plasmodien-Arten. Bei einer *P. vivax* oder *P. ovale* Infektion verbleiben Dauerformen, sogenannte Hypnozoiten im Lebergewebe. Sie können Monate bis Jahre in einem Ruhezustand

verweilen, bis ein unbekannter Stimulus deren Reifung zu Schizonten auslöst und es zu einem charakteristischen Rückfall der Malaria kommt. Nach Ruptur des reifen hepatozytären Schizonten werden Merozoiten freigesetzt. Das erythrozytäre Stadium der Malaria beginnt mit dem Eindringen der freigesetzten Merozoiten in die Erythrozyten. Dort durchlaufen die Parasiten einen Reifungsprozess von der Ringform über den Trophozoiten zum Schizonten (erythrozytäre Schizogonie). Die Schizonten setzen ihrerseits wieder Merozoiten frei, die erneut Erythrozyten befallen (Abbildung 3).

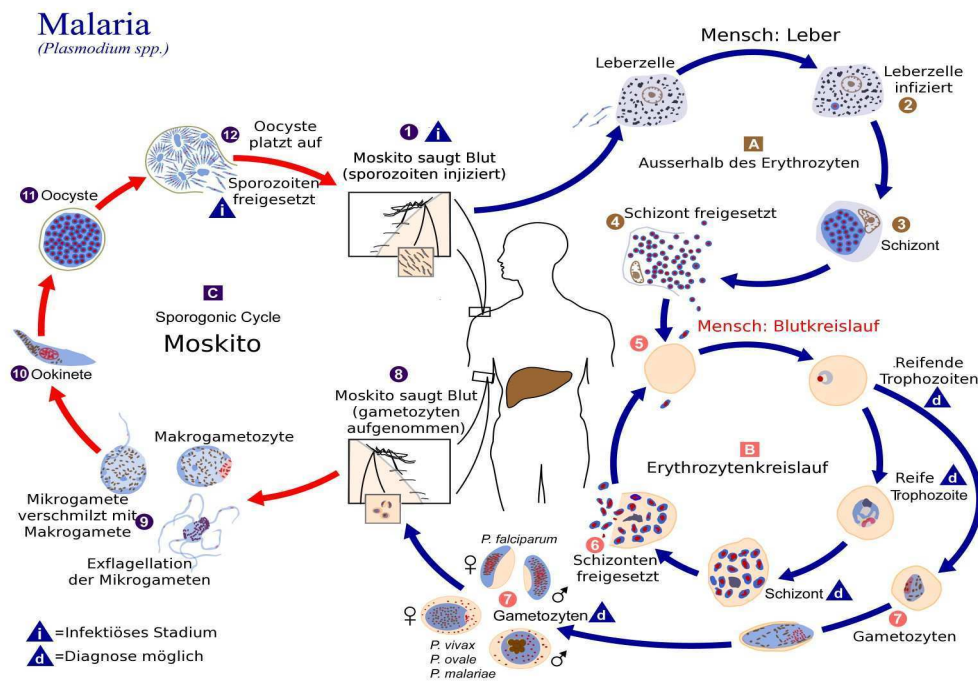


Abbildung 3: Entwicklungszyklus von Plasmodien. Quelle: Institut für Medizinische Biometrie, Universität Tübingen, modifiziert.

Die sich zyklisch wiederholende Erythrozyten-Invasion der Parasiten kann innerhalb einiger Tage bei Nichtimmunen zu Hyperparasitämien von über 10% parasitärer Erythrozyten führen, was bei einem unbehandelten Patienten rasch zum Tode führt. Ein Teil der Merozoiten wächst nicht zu Schizonten, sondern zu geschlechtsdifferenzierten Mikro- und Makrogametozyten heran. Diese werden beim Saugakt von der *Anopheles*-Mücke aufgenommen und leiten den sexuellen Zyklus

(Sporogonie) im Verdauungstrakt der Mücke ein. Die Gametozyten entwickeln sich zu Gameten. Nach der Befruchtung der Gameten bilden sich Ookineten, die in die Darmwand der Mücke einwandern und zu Oozysten werden. Nach weiteren asexuellen Teilungen entstehen Sporozoiten, die in die Speicheldrüsen der Mücke wandern und damit den Entwicklungszyklus vervollständigen. Der Zyklus in der *Anopheles*-Mücke dauert, abhängig von der Außentemperatur, 8-16 Tage. Hierbei ist, je nach Plasmodien-Art, eine Mindesttemperatur von ca. 15 °C nötig. Wird diese Temperaturgrenze unterschritten, kommt kein Zyklus mehr zustande [10].

1.5 Klinik und Immunologie der Malaria

1.5.1 Klinische Präsentation der Malaria

Malaria ist eine akute fieberhafte Erkrankung, deren klinische Manifestation sowohl von Faktoren des Parasiten, als auch von Faktoren des Patienten abhängig ist. Parasitär modulierende Faktoren sind Spezies und Stamm des Parasiten. Beim Patienten modulieren Alter, genetische Konstitution, Immunstatus, Allgemein- und Ernährungszustand sowie die medikamentöse Vorbehandlung den Schweregrad der Krankheit. Das klinische Bild der Malaria wird im Speziellen durch Vorgänge bei der Schizogonie und durch inflammatorische Zytokine, wie IFN- γ , IL-1, IL-6 und TNF α bestimmt. Niedrige Level der inflammatorischen Zytokine sind positiv für den Patienten, da sie Makrophagen zur Phagozytose infizierter Erythrozyten und zur Freisetzung von für den Parasiten toxischer Radikale stimulieren. Hohe Zytokinspiegel sind dagegen für die Symptomatik (Fieber, Hypoglykämie, Anämie, zerebrale Symptome) der Malaria verantwortlich [10], [12].

Von den durch die vier verschiedenen Malariaparasiten verursachten

Infektionen treten meist nur bei Malaria tropica, verursacht durch *P. falciparum*, potentiell lebensbedrohliche fulminante Verläufe auf. Die anderen Malaria-Formen, wie Malaria tertiana, verursacht durch *P. vivax* und *P. ovale*, und die Malaria quartana, verursacht durch *P. malariae*, verlaufen nur selten tödlich. *P. falciparum* verfügt im Vergleich zu den anderen Malariaparasiten über einige Charakteristika, die für die komplizierte Präsentationsform der Malaria verantwortlich sind. Das bedeutendste einzigartige Charakteristikum ist die Fähigkeit von *P. falciparum*, infizierte Erythrozyten an kleinen Blutgefäßen anhaften zu lassen. Dieser Prozess verursacht die charakteristischen pathologischen Veränderungen, die die Schwere des Krankheitsbildes ausmachen.

Die Inkubationszeit von Infektionen durch *P. falciparum* beträgt ca. 7-15 Tage, von Infektionen durch *P. ovale* und *P. vivax* ca. 12-18 Tage und von Infektionen durch *P. malariae* ca. 18-40 Tage. Längere Inkubationszeiten sind, besonders bei ineffektiver Prophylaxe, bei allen Formen möglich. *P. ovale* und *P. vivax* sind, wie bereits oben beschrieben, zur Bildung von Ruheformen, sogenannten Hypnozoiten, befähigt. Infektionen durch diese Parasiten können bei *P. vivax* Rezidive bis zu 2 Jahren, bei *P. ovale* bis zu 5 Jahren nach Infektion bewirken. Bei *P. malariae* sind Latenzzeiten von bis zu 52 Jahren beschrieben [9].

Die drei klinischen Manifestationsformen der Malaria sind im Einzelnen wie folgt charakterisiert:

Malaria tertiana: Sie wird durch *P. vivax* und *P. ovale* hervorgerufen und beginnt mit plötzlichen Symptomen wie Kopfschmerzen, Rückenschmerzen, Übelkeit und Abgeschlagenheit. In Rezidiven sind diese Prodromalsymptome in der Regel milder oder gar nicht ausgeprägt. Fieber tritt initial für ca. zwei bis vier Tage unregelmäßig auf, danach erfolgt meist eine Rhythmisierung der Fieberanfälle mit einer 48 Stunden Periodizität. Typischerweise kommt es in den späten Nachmittagsstunden zu Schüttelfrost, in dessen Verlauf das Fieber sehr

schnell auf Werte um 40°C ansteigt. Nach einer 3- bis 4-stündigen Fieberdauer fällt die Temperatur abrupt unter starken Schweißausbrüchen auf Normalwerte ab. Schwindel und transiente Bewusstseinsbeeinträchtigungen können mit den Fieberattacken einhergehen. Oft wird die Malaria tertiana von milder Anämie und Thrombozytopenie begleitet, selten von Gelbsucht und Hepatosplenomegalie. Die Malaria tertiana verläuft nur selten tödlich. Schwere Malaria tertiana wurden mehrfach beschrieben, sind jedoch vermutlich auf Unterernährung und/oder interkurrente Infektionen zurück zu führen. In Westafrika sind ein großer Teil der Bevölkerung durch die Seltenheit der Duffy-Blut-Gruppen Antigen Allele Fy^a und Fy^b, die zur Erythrozyteninvasion benötigt werden, gegen *P. vivax* Infektionen resistent [10], [9].

Malaria quartana: Sie wird durch *P. malariae* hervorgerufen und ist seltener als andere Malaria Arten. Das klinische Bild der ersten Attacke ähnelt der einer *P. vivax* Malaria, Prodromalsymptome treten jedoch häufiger ausgeprägter auf. Anämie und Hepatosplenomegalie kommen im Vergleich zur vivax Malaria seltener vor. Das Fieber ist durch einen 72-Stunden-Rhythmus charakterisiert. Hypnozoiten gibt es bei dieser Malaria Form nicht. Rückfälle können jedoch bis zu 52 Jahre nach der Erstinfektion auftreten [9], [10].

Malaria tropica: Es handelt sich um die gefährlichste Malaria-Art, die für fast alle der weltweiten Malaria bedingten Todesfälle verantwortlich ist. Bei Nicht-Immunen ist sie unbehandelt mit einer Letalität von bis zu 20% verbunden. Das klinische Krankheitsbild ist vielgestaltig. Häufige erste Anzeichen sind, wie bei den anderen Malaria-Formen, Abgeschlagenheit, Kopf- und Gliederschmerzen, Erbrechen, Übelkeit sowie unregelmäßige subfebrile Temperaturen. Diarrhö, Pneumonie und Muskelschmerzen können begleitend auftreten, so dass das klinische Bild leicht mit Influenza oder anderen systemischen Infektionen

verwechselt werden kann. Im weiteren Verlauf entwickelt sich Fieber, wobei es jedoch nur selten zum Auftreten eines rhythmischen Wechselfiebers kommt. Der Fiebertyp ist daher kein diagnostisches Kriterium für eine Malaria tropica.

Die Klinik der unkomplizierten Malaria tropica bei Kindern ähnelt der Klinik der Erwachsenen. Besonders bei Säuglingen und Kleinkindern kommt es jedoch häufiger zu fulminanten Verläufen mit einer hohen Komplikationsrate und Letalität [10]. Oft zeigt sich eine ausgeprägte Anämie (Abbildung 4 und 5), die wahrscheinlich für die Mehrzahl der Todesfälle bei Kindern in endemischen Malaria Gebieten verantwortlich ist [13]. Nach den Kriterien der WHO spricht man von einer komplizierten Malaria tropica, wenn bei Nachweis einer asexuellen Parasitämie eines oder mehrere der folgenden Symptome auftreten: schwere normozytäre Anämie (Hämoglobin < 5 g/dl), starke Schwäche, akutes Atemnotsyndrom mit metabolischer Azidose, multiple Krampfanfälle, Bewusstseinstörung, Ikterus, Hämoglobinurie, Kreislaufchock, disseminierte intravasale Gerinnung, abnormale Blutungen, Lungenödem, Hypoglykämie, Hyperlaktatämie und Nierenversagen [14]



Abbildung 4: Schwere Anämie eines 3-jährigen Malaria Patienten in der Kinderklinik in Ouagadougou. Quelle: Frauke Schäfer, Janina Zirkel mit Einverständnis der Erziehungsberechtigten.



Abbildung 5: 2-jährige Patientin mit schwerer Anämie unter Behandlung mit Bluttransfusionen. Quelle: Frauke Schäfer , Janina Zirkel mit Einverständnis der Erziehungsberechtigten.

1.5.2 Immunität gegen Malaria

Die Intensität der Manifestation einer Plasmodien-Infektion hängt vom Grad der Immunität des Infizierten ab. Die mehrfache Infektion in einem Endemiegebiet bewirkt eine zeitlich begrenzte sogenannte Semi-Immunität, die eine schwere Erkrankung verhindert. Diese Semi-Immunität ist abhängig von altersabhängigen Veränderungen der Krankheitsvulnerabilität und von der unterschiedlichen Parasiten Prävalenz. In endemischen Regionen sind somit Kinder, Schwangere und ältere Menschen am stärksten gefährdet eine schwere Malaria zu entwickeln, während Erwachsene meist nur unter milden Symptomen leiden. Bewiesenermaßen ist die Entwicklung einer Immunität gegen schwere Malaria von vorangegangenen Infektionen abhängig, denn in Regionen mit niedrigen Malaria-Übertragungsraten und Regionen mit unregelmäßigen Malaria Epidemien sind Erwachsene und Kinder gleichermaßen von der Entwicklung einer schweren Malaria betroffen. Ebenso kann eine schwere Malaria alle betreffen, die nicht in

endemischen Gebieten leben und mit Malaria während Reisen in Kontakt kommen. Natürlich erworbene Immunität zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, Parasitämien in der peripheren Zirkulation zu kontrollieren und eine Malaria-Infektion zu erleiden, ohne schwere Symptome zu entwickeln. Auch wenn komplette Resistenzen sehr selten sind, erleiden klinisch immune Personen meist periodische asymptomatische Infektionen [10]. Obwohl die Mechanismen der Malaria-Immunität nicht vollständig verstanden sind, ist bekannt, dass sowohl humorale als auch zelluläre Immunmechanismen involviert sind, die gegen verschiedene Entwicklungsstadien der Plasmodien und verschiedene Antigene gerichtet sind. Manche Malaria Symptome, wie z. B. Anämie, sind direkt vom Malaria Parasiten verursacht, andere werden durch eine inadäquate Immunantwort des Wirts ausgelöst, welche durch hohe Zirkulationsraten inflammatorischer Zytokine charakterisiert ist. Parasitenprodukte die Glykopeptide und Phospholipoproteine enthalten, können Makrophagen direkt zur Produktion von Tumornekrosefaktor alpha, Interleukin 1 und Interleukin 6 anregen und dadurch eine inflammatorische Reaktion auslösen [15]. Aktuell sterben 10-50% der hospitalisierten Patienten mit schwerer Anämie oder zerebraler Malaria trotz effektiver Anti-Malaria-Therapie und adäquater supportiver Therapie. Das Verständnis der Malaria assoziierten Immunantwort ist nicht nur für die Entwicklung neuer Therapieansätze wichtig, sondern ist auch essentiell zur Entwicklung von Malaria Impfstoffen, die dauerhaft einen nachhaltigen Effekt auf Malaria Morbidität und Parasiten Prävalenz haben würden [10].

1.6 Generelle Prinzipien und Geschichte der Malaria-Kontrolle

Malaria-Kontrolle ist, global gesehen, eine der wichtigsten Prioritäten der öffentlichen Gesundheit. Prinzipiell gibt es drei Hauptansätze die Krankheit zu kontrollieren: Maßnahmen die zur Zerstörung bzw.

Verminderung des *Anopheles*-Wirts führen (Vektorkontrolle); Therapie zur Tötung des Parasiten (humane Faktoren) und Impfung, zur Verhinderung der Infektion [10].

1.6.1 Vektorkontrolle

Effektive Vektorkontrolle ist eine zentrale Säule im Kampf gegen Malaria. Das prinzipielle Ziel von Vektorkontrolle ist die Reduktion von Malaria Morbidität und Letalität durch Reduktion der Transmissionsraten von Malaria. Nach epidemiologischen Gesichtspunkten können Vektorkontrollmaßnahmen gegliedert werden in:

- Maßnahmen, die der Reduktion des Vektor-Wirt Kontakts dienen
- Maßnahmen, die der Reduktion der Vektordichte dienen und
- Maßnahmen, die auf die adulte Vektorletalität abzielen.

Zu den Vektor-Wirt Kontakt reduzierenden Maßnahmen zählen: (Insektizid-imprägnierte) Moskitonetze, Insektengitter an Hausöffnungen, der Gebrauch von Repellents und die Verwendung von insektiziden Räuchermitteln. Zu Maßnahmen zur Reduktion der Vektordichte zählen: Umweltmaßnahmen zur Reduktion von Brutstätten (z. B. Trockenlegung von Sumpfgebieten), Larvenkontrolle mit Hilfe larvizider Substanzen oder larvizider Organismen (*Bacillus thuringiensis israelensis*), biologische Kontrolle mit Raubfischen, das großflächige Versprühen von Insektiziden sowie evtl. zukünftig genetisch Kontrolle (z. B. Implantation von vor einer Infektion schützenden Genen in Wildpopulationen). Zu den auf die adulten Vektoren abzielenden Maßnahmen zählen: Sprühen von Insektiziden in Innenräumen und die gemeinschaftsweite Nutzung von Insektizid behandelten Moskitonetzen.

Die Auswahl der geeigneten Vektorkontrollmaßnahmen sollte von der Vektorendemie, der Vektorbionomie, den ökoepidemiologischen Gegebenheiten, dem vorhandenen Gesundheitssystem und der

Nachhaltigkeit des geplanten Programms abhängig gemacht werden [10].

1.6.2 Humane Faktoren

In den letzten Jahren lag der Hauptfokus der Malaria-Kontrollstrategien auf einer Reduktion der Morbidität und Letalität der Malaria durch prompte und effektive Behandlung. Der Erfolg dieser Strategie hängt zum einen stark von der Verfügbarkeit effektiver Medikamente, und zum anderen vom Verhalten der Patienten bzw. der Erziehungsmächtigen ab. So ist das Verständnis von Einflussfaktoren auf das Verhalten der Patienten und Erziehungsmächtigen essentiell für das Erstellen von adäquaten und nachhaltigen Interventionsprogrammen. In jeder Gesellschaft sind in der Regel eine Vielzahl von Behandlungsmethoden zur Behandlung der Malaria bekannt. Die Wahl der jeweiligen Behandlungsmethode, die Auswahl des Gesundheitsdienstleisters und der Zeitpunkt einer Konsultation eines Gesundheitsdienstleisters hängen von multiplen Faktoren ab und variieren mit dem sozialen und kulturellen Kontext. Lange ist bekannt, dass eine Vielzahl von Malaria Erkrankungen außerhalb des offiziellen Gesundheitssystems behandelt werden. Dennoch ist die generelle Nachfrage nach modernen Medikamenten hoch. Oft werden sie von Apotheken, Drogerien oder Medikamentenhändlern ohne adäquate Diagnose und korrekter Dosisinformation abgegeben. Die Mehrzahl der Malaria Betroffenen wählt irgendeine Art von Behandlung und multiple Behandlungen sind nicht selten. Die meisten Malaria-Episoden werden primär mit Selbstbehandlung, wie lokalen Kräutern oder mit modernen Malaria Medikamenten therapiert. Ein Literatur Review ergab, dass weniger als die Hälfte der Malaria Episoden von offiziellen Gesundheitsdienstleistern mit Verzögerungen von drei und mehr Tagen behandelt werden. Selten

verlassen sich die Betroffenen nur auf traditionelle Methoden, oft wird traditionelle Medizin mit moderner Medizin kombiniert [10], [16], [17].

1.6.3 Impfung

Seit mehr als 50 Jahren erforschen Wissenschaftler die Möglichkeit, die Malaria mit Hilfe eines Impfstoffs zu bekämpfen. Man musste jedoch feststellen, dass die Entwicklung eines effektiven Impfstoffs sich viel komplexer gestaltet als zuerst angenommen. Bislang zählen Impfstoffe nach wie vor nicht zu den Malaria-Kontrollmaßnahmen und auch trotz eines vielversprechenden Kandidaten ist eine tragende Rolle der Impfung in Zukunft anzuzweifeln [10], [18].

Idealerweise sollte ein Impfstoff eine starke, lang anhaltende Immunität bieten, die gegen alle Varianten der Parasiten-Spezies schützt. Generell sind folgende Impfstoffstrategien für Impfstoffen denkbar: Impfstoffe gegen präerythrozytäre Plasmodienstadien, Impfstoffe gegen erythrozytäre Stadien und Impfstoffe gegen sexuelle Stadien.

Impfstoffe gegen präerythrozytäre Stadien müssten hoch effektiv gegen Sporoziten wirken. Denn jeder Parasit, der durch die Impfung induzierten Stadien abhängigen Immunität entkommt, ist in der Lage sich normal zu entwickeln. Überlebende Malariaparasiten in der Leber müssten dann eher vom zellulären Immunsystem als vom humoralen lokalisiert und zerstört werden. Bei Impfstoffen gegen erythrozytäre Stadien ist das bedeutendste Problem die Antigendiversität vieler Zielproteine. Ein effektiver Impfstoff müsste sich also entweder gegen eine essentielle nicht variable Komponente oder gegen multiple Komponenten richten. Impfstoffe gegen sexuelle Stadien oder Transmission blockierende Impfstoffe induzieren Antikörper, die mit der Blutmahlzeit in die Moskitos aufgenommen werden und dort die weitere Entwicklung von Plasmodien hemmen. Diese Impfung würde der geimpften Person keinen sofortigen Schutz bieten, aber die Bevölkerung

als Ganzes schützen. Hierzu müsste jedoch die Durchimpfungsrate sehr hoch sein [10], [15], [18].

Betrachtet man den aktuellen Stand der Impfstoffentwicklung, befinden sich nach WHO Schätzungen aktuell mehr als 80 Impfstoffkandidaten in präklinischer Entwicklung. 30 Impfstoffe sind in Phase eins Studien in den USA oder Europa. Neun Impfstoffkandidaten befinden sich in Phase eins Studien in Endemiegebieten. Drei Impfstoffkandidaten wurden bereits in Phase zwei an Erwachsenen getestet, wovon nur ein Kandidat erfolgreich (RTS,S/AS02A) war. Zwei Kandidaten wurden bereits in Phase zwei Studien an Kindern in Endemiegebieten getestet. Diese waren RTS,S/AS02A und FMP1/AS02A, hiervon war nur ein Kandidat (RTS,S/AS02A) erfolgreich. Dieser aktuell am erfolgversprechendste Kandidat richtet sich gegen präerythrozytäre Stadien, im Speziellen gegen das circumsporozoite Protein (CS), was als Oberflächenprotein Ziel der protektiven Immunantwort ist [19], [20]. Der immundominierenste Teil dieses Proteins ist eine zentrale Region des Moleküls mit Aninosäurewiederholungssequenzen. Bei *P. falciparum* sind dies die Aminosäuren Asparagin-Alanin-Asparagin-Prolin (NANP). Das im Impfstoff enthaltenden RTS, S Molekül ist ein Fusionsprotein bestehend aus dem circumsporozoiten Protein (CS) mit repetitiver (R) und T-Zell Epitop (T) Sequenz sowie dem Hepatitis B Oberflächen Antigen (S). Dieser RTS/S Partikel ist gekoppelt an ein Adjuvanz System, bestehend aus einer Öl in Wasser Emulsion, welche die Freisetzung des Antigens verlangsamt, und den potenten Immunstimulatoren MPL und QS21. Das Adjuvanz System stimuliert sowohl die humorale, als auch die zelluläre Immunantwort, so dass der Impfstoff im Gesamten mittels Antikörperstimulation eine Infektion verhindert und eine T-Zell Antwort gegen infizierte Leberzellen und intrahepatische Parasiten induziert. Dieser vielversprechende Impfstoffkandidat wurde an ca. 2000 Kindern zwischen ein und vier Jahren in Mosambique getestet, wo eine Risiko

Reduktion von schwerer Malaria um fast 50% und eine Reduktion der klinischen Episoden von 35 % nach 18 Monaten zu verzeichnen war. Aktuell befindet sich der Kandidat seit Mai 2009 in Phase drei Studien (n:16 000) in elf Ländern Afrikas. Die Einreichung der Zulassung ist frühestens für 2012 geplant. Die Entwicklung diese Impfstoffes hat bis jetzt 20 Jahren gedauert und hat bei der Firma GalaxoSmithKlein (GSK) Kosten in Höhe von 300 Millionen Pfund verursacht, wobei weitere 200 Millionen Pfund von der Bill und Melinda Gates Stiftung übernommen wurden [21], [22], [23], [24].

Trotz erheblicher Fortschritte in der Impfstoffentwicklung und erstmaliger Zulassung eines Impfstoffkandidaten in Phase drei Studien bietet der aktuelle Impfstoff keinen ausreichenden Schutz vor einer Malariainfektion und ist deshalb allenfalls als Ergänzungsmaßnahme zu bestehenden Malaria-Kontrollprogrammen anzusehen [18], [25].

1.6.4 Strategien zur Bekämpfung der Malaria

Bereits seit mehr als 2000 Jahren sind unspezifische Malaria-Bekämpfungsmaßnahmen dokumentiert [10]. So legten schon die Griechen und Römer Sümpfe trocken, um Malaria einzudämmen. In China wurden bereits vor mehr als 2000 Jahren Extrakte der Pflanze *Artemesia annua* zur Behandlung der Malaria verwendet. Im 17. Jahrhundert entdeckten Jesuitenpater, dass die Rinde des Chinarindenbaums (*Cinchona pubescens*) effektiv gegen Malaria hilft und 1820 wurde die aktive Substanz der sogenannten Chinarinde, Chinin, in Frankreich isoliert [10]. Doch erst die Entdeckung des Malaria Parasiten 1880 durch Charles Laveran und die Beschreibung der Anophelesmücke als Malaria Vektor durch Ronald Ross 1897 ermöglichte die Entwicklung von rational begründeten Kontrollmaßnahmen. Als erste Initiative empfahl die Panamerikanische Gesundheitsorganisation gezielt Informationen über Malaria zu verbreiten und Chinin an Arme frei

abzugeben [26]. Die dramatischen Malaria Erfahrungen im ersten Weltkrieg, trieb die Medikamentenentwicklung in Deutschland an, wo 1924 Pamaquin, 1930 Mepacrin und 1934 Chloroquin entdeckt wurde. Weitere Meilensteine in der Entwicklung von synthetischen Anti-Malaria-Medikamenten war die Entdeckung von Proguanil 1944, Primaquin 1950 und Pyrimethamin 1952 in Frankreich, den USA und dem vereinigten Königreich (UK). Die großräumige Verwendung von Chloroquin begann erst nach dem 2. Weltkrieg. Einige Jahre später war es das Medikament der Wahl für die Behandlung fast aller Malaria-Episoden weltweit [10]. Hierzu parallel verlief die Entwicklung von Insektiziden gegen *Anopheles*. Die erfolgreiche Verwendung von natürlichen Pyrethroiden in Südafrika und in Indien zeigten zum ersten mal erfolgreiche Vektor Kontrollstrategien zur Malaria-Kontrolle. Während des zweiten Weltkrieges wurde von Müller die stark insektizide Wirkung von Dichlorodiphenyltrichlorethan (DDT) entdeckt. Nach ersten Feldversuchen in Italien wurde DDT erfolgreich flächendeckend in Ländern wie Venezuela, Guyana, USA, Italien und Griechenland verwendet [10]. Der frühe Erfolg der Malaria-Ausrottung in einigen Ländern führte zum Konzept der Malaria-Ausrottung, welches in der achten „World Health Assembly“ 1955 verabschiedet wurde. Für den afrikanischen Kontinent wurde das Konzept in Anbetracht der hohen Transmissionsraten bei fehlender Infrastruktur als unrealistisch angesehen und nur in ausgewählten Länder wie Südafrika, Äthiopien, Zimbabwe und in Form von Pilotprojekte in einigen anderen Gebieten durchgeführt. Zwei Jahre später startete die Weltgesundheitsorganisation eine weltweite Malaria-Ausrottungskampagne [26]. Die stark vertikal orientierten nationalen Eradikationsprogramme waren typischerweise basiert auf großflächige Verwendung von DDT, Verwendung von Larviziden zur Minimierung von *Anopheles* Populationen, präsumptive Behandlung aller Fieberepisoden und radikale

Behandlung bestätigter Malaria Infektionen. Die Ergebnisse der globalen Eradikationsprogramme waren gut in Europa, dem asiatischen Teil der UDSSR, einigen Ländern im mittleren Osten, in einigen Teilen der Karibik, in größeren Gebieten in Südamerika, in Nordamerika (inkl. USA) sowie in Ländern wie Australien, Japan, Singapur, Korea und Taiwan. Schlecht waren die Ergebnisse jedoch in den meisten tropischen, unterentwickelten Ländern [27]. Gründe hierfür waren unter anderem: das Fehlen von flächendeckender Gesundheitsversorgung, mangelhafte Kenntnissen zur Epidemiologie, unzureichende lokalen Daten, logistische Probleme (besonders in ländlichen Gegenden während der Regenzeit), mangelnde Teilnahme der lokalen Bevölkerung, die Entwicklung von Resistenzen gegen Insektizide, evasives Verhalten der Vektor Moskitos, Resistenzentstehung gegen Medikamente der ersten Wahl sowie sozioökonomische, finanzielle und politische Probleme [28]. In den frühen siebziger Jahren wurde das Konzept der Malaria-Ausrottung schließlich durch die Strategie der Malaria-Kontrolle als Teil des „Primary health care“ Konzepts ersetzt [27], [26]. Doch gestaltete sich sowohl die Integration des „Primary Health care“ Konzept, als auch die Umsetzung der Malaria-Maßnahmen als schwierig. Gesundheitsarbeiter waren u.a. oft schlecht ausgebildet und überlastet, zentrale Supervisionseinheiten fehlten und die Teilnahmebereitschaft der Bevölkerung sank. Hieraus resultierte eine erneute Verschlimmerung der Malaria Problematik während der achtziger und neunziger Jahre. In Anbetracht dieser Tatsachen wurden seit dem Ende der neunziger Jahre wieder vermehrte Anstrengungen zur Malaria-Bekämpfung betrieben. Eine große Anzahl internationaler Konferenzen wurden abgehalten und 1997 wurde die „Multilateral Initiative on Malaria (MIM)“ gegründet [26], [29]. Es folgte 1998 die von der WHO, UNICEF, UNDP und der Weltbank ins Leben gerufenen Roll-Back-Malaria-(RBM)-Initiative. Sie soll die verschiedenen Gruppen, welche an der Eindämmung der Malaria interessiert sind,

vernetzen, um gemeinsam Strategien gegen Malaria zu entwickeln und durchzuführen. Im globalen Malaria Aktionsplan der Mitgliedstaaten der „World health assembly“ und der RBM-Initiative hat man sich u.a. das Ziel gesetzt die „Bürde der Malaria“ bis zum Jahr 2010 auf die Hälfte und 2015 um 75% zu reduzieren. Neben dem Ziel der Malaria-Kontrolle forciert man in der globalen Anti-Malaria Strategie auch wieder das Ziel der Malaria-Elimination. Als Basis der beiden Komponenten Malaria-Kontrolle und Elimination dient als dritte Komponente eine kontinuierliche Forschung. Die UN äußert sich in ihren Millenniumszielen zurückhaltender: Bis 2015 soll eine weitere Ausbreitung der Malaria verhindert werden und ein beginnender Rückgang der Malaria Inzidenz angestrebt werden. Die regional adaptierten Kontrollstrategien, die zum Erreichen der Ziele verfolgt werden, umfassen u.a. eine prompte, effektive Diagnose und Behandlung; die Verfügbarkeit von Präventionsmaßnahmen, inklusive Vektorkontrolle; Epidemieprävention, sowie die Stärkung von lokalen Kapazitäten bzw. die Stärkung von Gesundheitssystemen [30], [31].

1.6.5 Malaria-Kontrolle in Burkina Faso

Malaria stellte in Burkina Faso schon immer, als eine endemische Krankheit, eines der Hauptgesundheitsprobleme für die Bevölkerung dar. Die ersten epidemiologischen Studien zur Malaria wurden bereits 1941 in der Region Bobo-Dioulasso eingeleitet. In 1947 wurde zum effizienteren Kampf gegen die Malaria im Kreise des „Service Général d'Hygiène Mobile et de Prophylaxie“ dem das Centre Muraz einverleibt wurde, eine Malaria Fachgruppe gegründet. Diese Fachgruppe initiierte ein Malaria-Ausrottungsprogramm in einer Pilotzone in Bobo-Dioulasso. Hauptaktionspunkt dieses Programmes war das Besprühen von Hausinnenwänden mit dem Insektizid DDT. Leider blieben diese Aktionen erfolglos und der Malaria-Zyklus konnte nicht unterbrochen werden. Man adaptierte daraufhin die Strategie der Ausrottung der Malaria und

versuchte mit der Applikation einer Massen Chemoprophylaxe in Kombination mit dem Besprühen von Hausinnenwänden mittels DDT die Malaria zu bekämpfen. Leider blieb diese Strategie ebenfalls erfolglos, da die Vektoren bzw. die Parasiten eine Resistenz gegen das Insektizid und das zur Prophylaxe verabreichte Pyrimethamin entwickelten. Auch die alle 15 Tage verabreichte Chemoprophylaxe mit Chloroquin blieb erfolglos. Seit 1972 wurde daraufhin Kindern unter 5 Jahren nur während der intensiven Transmissionsphase eine Chemoprophylaxe verabreicht, welche seit 1974 auch auf Schwangere ausgeweitet wurde. 1979 initiierte das Centre Muraz zahlreiche Forschungsprojekte zum Vergleich der Massen-Chemoprophylaxe mit der Chemotherapie aller Fieberzustände mit Chloroquin. Auf der Grundlage dieser Studienergebnisse wurde die Chemoprophylaxe auf Schwangere begrenzt. In den Jahren 1984 und 1985 wurde erneut ein erfolgloses Programm zur Vektorkontrolle mit Maßnahmen wie Besprühen von Hausinnenwänden und Larvenkontrolle in Ouagadougou durchgeführt. 1985 gründete man das Referenzzentrum zur Wirksamkeit der Malaria-Therapien (Centre de Référence de la Chimosensibilité du Paludisme) im Centre Muraz, wo neue Strategien im Kampf gegen Malaria erforscht wurden. Imprägnierte Moskitonetze zeigten vielversprechende Studienergebnisse, konnten sich jedoch bis heute nicht genügend durchsetzen. Das seit 1987 bestehende nationale Zentrum zum Kampf gegen die Malaria (Centre National de Lutte contre le Paludisme) wurde 1999 in das nationale Malaria Forschungs- und Ausbildungszentrum (Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme) umbenannt. Das Zentrum diente zu Beginn der Koordination der nationalen Anti-Malaria-Aktivitäten, später vermehrt der Ausbildung und Forschung. Seit 1991 wird das Therapieschema für Malaria in Burkina auf nationaler Ebene angepasst und regelmäßig adaptiert. In 1992 wurde erstmalig ein nationales Programm zum Kampf gegen Malaria von

der burkinischen Regierung ins Leben gerufen. Dieses Programm wird regelmäßig, angelehnt an WHO Empfehlungen, aktualisiert. Heutzutage profitiert man immer mehr auch von internationalen Initiativen und Organisationen, wie beispielsweise von der Afrikanischen Union initiierten Programmen (Programme d'Accélération de la Lutte Antipaludique), der Unterstützung durch zahlreiche Partner, inklusive Nichtregierungsorganisationen sowie seit 1998 von der oben beschriebenen Roll Back Malaria Initiative der WHO. Trotz aller Bemühungen ist die aktuelle Malaria-Situation in Burkina immer noch fatal. Bei einem Anstieg der Chloroquinresistenz auf 63,3% in 2005, wurde die nationale Behandlungspolitik von Chloroquin auf Artemisinin-Kombinationen und Sulfadoxine-Pyrimethamin geändert. Die größten Probleme bleiben eine unzureichende Verfügbarkeit von Artemisinin Kombinationspräparaten, unzureichende Umsetzung der Anti-Malaria-Maßnahmen auf Distriktebene, keine ausreichende Versorgung mit Moskitonetzen und Insektiziden, hohe Kosten für die Akutbehandlung der Malaria und mangelnde medikamentöse und personelle Versorgung der Kommunen [6].

1.7 Probleme der Malaria-Kontrolle

Obwohl die verschiedenen Initiativen einige Erfolge verzeichnen können, scheint es nicht möglich die hochgesteckten Ziele der RBM Initiative bzw. der World Health Assembly (WHA) zu verwirklichen. Die meisten afrikanische Länder nahmen zwar seit 2000 die durch die RBM-Partnerschaft empfohlen innovativen Prinzipien der Malaria-Bekämpfung in die Grundsätze ihrer Gesundheitspolitik formell auf, es besteht jedoch weiterhin eine bedauerliche Diskrepanz zwischen den Bedürfnissen der meist armen Hochendemiegebiete und der Versorgung mit effektiven Kontrollmaßnahmen (v. a. Kombinationsmedikamente, intermittierende präventive Behandlung [IPT] für schwangere Frauen und Kinder,

Insektizid-behandelte-Moskitonetze [ITNs], Insektizid-Einsatz in Innenräumen [IRS], Trockenlegung von Brutplätzen, Zugang zur Gesundheitsversorgung).

Immerhin konnte jedoch in mehr als einem Drittel (in 9 afrikanischen und 29 Länder außerhalb von Afrika) der 108 Malaria-Länder eine Reduktion der Malaria um mehr als 50% in 2008 im Vergleich zu 2000 erreichte werden. Die Malaria Fälle fielen allerdings am wenigsten in den Länder mit der höchsten Inzidenz. Der Gebrauch von Insektizid-behandelten-Moskitonetzen [ITN] bei afrikanischen Kindern unter 5 Jahren lag in 2008 bei geschätzten 24% und somit weit unter den angestrebten mehr als 80% der WHA. Nur in 13 afrikanischen Ländern besaßen 2008 mehr als die Hälfte der Haushalte Moskitonetze.

Der Grund der Mangelnden Umsetzung der Maßnahmen liegt vor allem in den finanziellen Aufwendungen, welche mit einer Implementierung der Vorgaben verbunden wären. Die geschätzten wirtschaftlichen Kosten für eine effiziente globale Umsetzung der Maßnahmen zur Malaria-Bekämpfung belaufen sich auf 5 Milliarden US-\$ pro Jahr. Derzeit bestehen noch deutliche Probleme mit der Finanzierung dieses Betrages, Die internationalen Aufwendungen belaufen sich, trotz stark gestiegener Finanzierungsbereitschaft durch u.a. den Global Fond, die US Regierung und die Weltbank, auf nur 0,65 Milliarden US-\$ pro Jahr (zuletzt verfügbare Daten aus 2007) und reichen damit bei weitem nicht zur Realisierung der WHA Ziele aus [30], [32].

Neben den ökonomischen Problemen ist die zunehmende Resistenzentwicklung von *Plasmodium falciparum* gegenüber herkömmlichen Malaria-Medikamenten, wie beispielsweise Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin als wichtigste Hürde für die Bekämpfung der Malaria anzusehen. Das Auftreten der Chloroquinresistenz bei *P. falciparum* hat wesentlich zu einem Anstieg der Malaria-spezifischen Letalität, insbesondere bei Kindern, beigetragen [30], [33].

Kombinationstherapien sind ein Erfolg versprechendes Prinzip zur Verlängerung der möglichen Anwendungsdauer der Malaria-Medikamente und zur Verzögerung von Resistenzentwicklung. Artemisinin basierte Kombinationstherapien stellen momentan die empfohlene Therapie der Wahl der WHO dar. Seit 2004 haben die meisten Länder in Afrika südlich der Sahara ihre Malaria-Politik auf Artemisinin basierte Kombinationstherapien umgestellt. Doch Therapiekosten zwischen 0,5 und 5\$ sind oft nicht tragbar für die ländliche Bevölkerung, so dass sich diese Therapie in der Praxis noch nicht ausreichend durchsetzen konnte. In 11 von 13 durch die WHO zwischen 2007 und 2008 überwachten Ländern erhielten nur 15% der Kinder unter fünf Jahren mit Fieber Artemisinin basierte Kombinationstherapien. Dies liegt weit unter den angestrebten über 80% der WHA. Ein weiteres Problem stellt die unzureichende Verfügbarkeit des Medikamentes dar [34], [32]. Neu aufgetretene Resistenzen gegen Artemisinine in West Kambodscha drohen ferner die Wirksamkeit des bisher einzigen resistenzfreien Medikamentes zu beeinträchtigen [35]. Hierfür werden vor allem die dort verwendete Artemisinin Monotherapien verantwortlich gemacht.

Neue effektive und vor allem kostengünstige Kombinationstherapien werden dringend benötigt [32].

1.8 Theoretische Grundlagen zum Redoxstoffwechsel von Plasmodien und zur Extremen Parthway Analyse

1.8.1 Allgemeine Aspekte zum Redoxstoffwechsel

Der Redoxstoffwechsel dient im Allgemeinen als antioxidativer zellulärer Schutzmechanismus. Während des Sauerstoff-Metabolismus und beim Ablauf oxidativer Prozesse in lebenden Zellen entstehen verschiedene, instabile und reaktive Sauerstoff-assoziierte freie Radikale und andere reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS), wie Singulett-Sauerstoff,

Superoxidanionen-Radikale (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikale (OH^\cdot) [36]. Diese ROS verursachen Schäden innerhalb der Zelle und können Enzyminaktivierungen, Veränderungen der Nukleinsäuren und Lipidmembranen durch Lipidperoxidation auslösen [37]. Die entstandenen Schäden können in der Regel durch zelleigene Reparatursysteme behoben werden. Ist das Fließgleichgewicht der Entstehung und Entgiftung der ROS jedoch gestört, kommt es zu einem vermehrten Auftreten von ROS-assoziierten Schäden, ein Zustand, der als oxidativer Stress bezeichnet wird. Dieser kann durch eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und/oder eine verminderte Detoxifizierung derselben entstehen [38]. Der Redoxstatus einer Zelle ist von den Verhältnissen reduzierter zu oxidiertes Pyridin Nukleotiden [$NAD(P)H/NAD(P)^+$] sowie vom Verhältnis zellulärer Thiole wie Glutathion/Glutathiondisulfid und Thioredoxin/Thioredoxindisulfid abhängig. Diese Verhältnisse sind eng mit dem zellulären Gehalt von reaktiven Sauerstoffverbindungen verknüpft und somit ist auch die Funktion vieler Enzyme an den Redoxstatus von Pyridin Nukleotide, Glutathion und Thioredoxin gebunden [39].

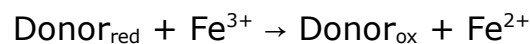
Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies besitzen allerdings auch physiologische Wirkungen als Mediatoren der Immunabwehr [40]. Stickstoffmonoxid (NO) wird durch eine eigene Synthese in vielen Zellen als auto- oder parakriner Mediator gebildet und löst Signaltransduktionsprozesse aus [41]. Bei Entzündungsprozessen oder durch Kontakt von Phagozyten mit Pathogenen werden vermehrt ROS gebildet, die deren Bekämpfung dienen. Der gesamte Redoxmetabolismus ist direkt mit der Pathologie der Malaria verknüpft und spielt eine essentielle Rolle für das Funktionieren bzw. die Resistenzentwicklung zahlreicher Anti-Malaria-Medikamente. Der Redoxstoffwechsel als Angriffspunkt neuer Medikamente ist ein vielversprechender Ansatz, nicht nur im Kampf gegen die Malaria. Der

Ansatz basiert auf der Überlegung, die parasitären Abwehrmechanismen gegen den oxidativen Angriff durch das wirtsspezifische angeborene Immunsystem zu schwächen. Dies kann durch die Entwicklung spezifischer Enzym-Inhibitoren erreicht werden, welche die antioxidative Abwehr der Parasiten lähmen [42]. Methyleneblau, welches am Redoxstoffwechsel der Plasmodien ansetzt und diesen Ansatz verfolgt, soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

1.8.2 Oxidativer Stress im Malaria Parasiten

Malaria Parasiten sind einem permanenten oxidativen und nitrosativen Stress ausgesetzt [43]. Besonders anfällig für diese Art von Stress sind Plasmodien während der erythrozytären Phase, wo ein pro-oxidatives Umfeld mit hohen Konzentrationen von Sauerstoff und Eisen herrscht. Oxidativer und nitrosativer Stress in Plasmodien wird zum einen exogen, durch die Immunantwort des Wirtes verbunden mit dessen Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen verursacht, und zum anderen endogen, durch die hohe parasitäre metabolische Aktivität und dem Abbau von Hämoglobin in der parasitären Nahrungsvakuole. Während ihrer intraerythrozytären Lebensphase verdauen Plasmodien 60-80% des erythrozytären Hämoglobins [44]. Der Hämoglobin-Abbau beginnt bereits im frühen Ringstadium und setzt sich bis zum Schizontenstadium fort, wobei das Aktivitätsmaximum im Trophozitenstadium (6-12 Stunden, bei *P. falciparum*) liegt [45]. Insgesamt verdaut *P. falciparum* 75% des erythrozytären Hämoglobins während der intraerythrozytären Wachstumsphase [46]. Der Hämoglobinabbau repräsentiert eine essentielle Bezugsquelle von Aminosäuren für den Parasiten (durch Hydrolyse des Globin-Anteils) und erzeugt gleichzeitig genügend Raum für deren Wachstum sowie zur Unterstützung der osmotische Integrität der infizierten Zelle [47]. Der Hämoglobin-Abbau beginnt mit dem Import erythrozytären Hämoglobins

des Zytosols in die parasitäre Nahrungsvakuole. Dort herrscht ein saures Milieu mit einem pH-Wert von ungefähr 5,2 [48]. Die dabei stattfindende Ansäuerung des Erythrozyten-Lysats führt zu einer drastischen Erhöhung der spontanen Oxidation von Hämoglobin (Fe^{2+}) zu toxischem freiem Häm (Fe^{3+} haltigem sogenannten Hämin) und Superoxid-Anionen [49]. Die meisten dieser Anionen können spontan zu H_2O_2 reagieren ($2 \text{O}_2^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). Diese Reaktion läuft zusätzlich Enzym-katalysiert durch die Superoxid-Dismutase (SOD) ab ($2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). H_2O_2 reagiert nach der Fenton-Gleichung in Anwesenheit katalytischer Mengen von nicht-proteingebundenem Fe^{2+} (ebenfalls freigesetzt durch angesäuertes Hämoglobin) zum sehr reaktiven Hydroxyl-Radikal OH^\cdot . Die Reaktionsgleichungen der Fenton-Reaktion *in vivo* unter Einbeziehung von Zellmembran oder Enzym-Schäden lauten:



Das beim Abbau von Hämoglobin gebildete toxisch freie Häm wird von den Parasiten zum größten Teil in einem Biomineralisationsprozess als kristallines Hämozoin abgesondert [50], [51] und/oder in alternativen, meist Glutathion abhängigen Stoffwechselwegen [52], [53] unschädlich gemacht. Beim Abbau mittels Glutathion abhängigen Stoffwechselwegen wird wiederum freies Eisen produziert, welches in der Fenton Reaktion zur Entwicklung von OH^\cdot Radikalen führt. Ein kleiner Teil des toxischen Hämins entkommt jedoch den parasitären Neutralisierungsprozessen, diffundiert ins parasitäre Zytosol und schädigt Wirtsproteine und Wirtsmembranen. Hierbei hemmt es parasitäre Enzyme und lysiert Erythrozyten [54], [55]. Ein zusätzlicher Schutzmechanismus des Parasiten basiert auf die Bindung von toxischem Hämin an Histidin reiche Proteine wie HRP2 und HRP3 [49].

Außerdem ist eine gesteigerte ROS-Produktion in parasitierten Erythrozyten auch noch auf andere Stoffwechselwege (z.B. Elektronen-Transport-Kette in Mitochondrien) zurückzuführen. Das schnelle Wachstum und die hohe Proliferationsrate der Plasmodien bedingen eine hohe Generierung von ROS. Auch der Stoffwechsel der erythrozytären Wirtszelle ist davon betroffen; so ist der Glucoseverbrauch – und damit die Methylglyoxal-Produktion – in parasitierten im Vergleich zu nichtparasitierten roten Blutkörperchen bis zu 78fach erhöht [56].

1.8.3 Die Rolle der oxidativen Protektion von *P. falciparum*

Im späten Ring- bzw. frühen Trophozoitenstadium, wenn der Parasit mit der intensiven Verdauung des Wirtshämoglobins beginnt und die Oberflächenstrukturen der befallenen Erythrozyten vom retikuloendothelialen System als fremd erkannt werden können, muss das parasitäre antioxidative Verteidigungssystem komplett funktionsfähig sein. Plasmodien verfügen deswegen über vielfältige antioxidative und redoxregulierende Stoffwechselwege, die ein Redoxnetzwerk bilden, welches grob in zwei Hauptkomponenten unterteilt werden kann: das Glutathion- und das Thioredoxin-System (Abb. 1). Das Glutathion-System, besteht aus der NADPH abhängigen Glutathionreduktase, dem Tripeptid Glutathion, dem redox aktiven Protein Glutaredoxin, Glutathion-S-Transferase, zwei Glutathionsynthasen und den Glyoxalasen I und II [44]. Es wird ergänzt durch ein Thioredoxin-System, was aus dem Elektronendonator NADPH, dem Flavoprotein Thioredoxinreduktase, seinem Substrat Thioredoxin, Thioredoxin-abhängigen Peroxidasen sowie weiteren Redoxpartnern (z. B. 1-cys-Peroxiredoxin) besteht [57], [36]. Das relativ neu entdeckte Redoxprotein Plasmoredoxin stellte eine Verbindung zwischen den beiden Systemen dar.

Die beiden beschriebenen Systeme nehmen bezüglich der antioxidativen

Verteidigung, dem Aufrechterhalten der Redox-Homöostase und der DNA-Synthese komplementäre Funktionen ein [57], [42]. In Abbildung 6 sind die zellulären Redoxsysteme schematisch darstellt:

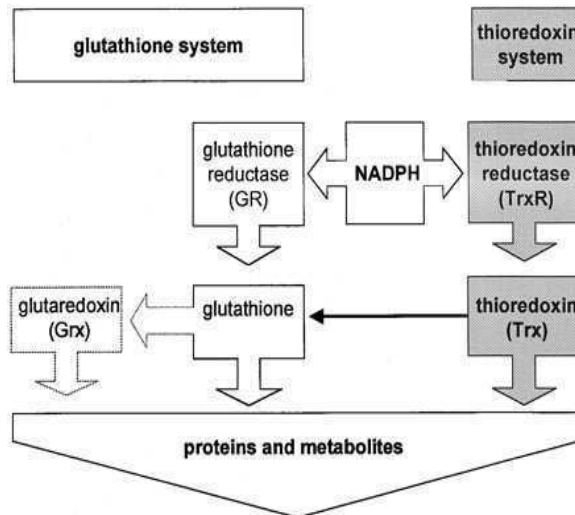


Abbildung 6: Intrazelluläre Disulfid-reduzierende Redoxsysteme. Das Glutathion-System ist links und das Thioredoxin-System rechts dargestellt. Die Pfeile stellen den Fluss der reduzierten Äquivalente ausgehend von NADPH dar. Plasmoredoxin, was wie NADPH eine Verbindung zwischen beiden Systemen bildet, ist nicht dargestellt.

Außerdem spielen zwei Superoxid-Dismutasen, die Superoxid-Anionen neutralisieren, eine weitere Rolle für das oxidative Verteidigungssystem.

Interessanterweise scheinen dem Malaria-Parasiten zwei wichtige antioxidative Enzyme zu fehlen: Katalase, welche typischerweise Wasserstoffperoxide abbaut und Glutathionperoxidase, welche Lipid-Hydroperoxide zu Alkoholen reduziert. Es scheint als würde der Hauptteil der Peroxid-Abbaukapazität von Peroxiredoxinen übernommen werden [44], [36].

Wie schon oben beschrieben schaffen es einige der reaktiven oxidativen-Spezies dem antioxidativen Verteidigungssystem des Parasiten zu entkommen und den Wirtserythrozyten zu erreichen. Dort üben sie oxidativen Stress aus und werden zum Teil von dessen Katalase und Glutathionperoxidase verstoffwechselt [56]. Dies lässt auf eine Interaktion der Parasitären und der Wirts-Redoxstoffwechselnetzwerke schließen. Doch scheinen sowohl der Malaria Parasit als auch die mit Plasmodien infizierte Wirtszelle nicht in der Lage zu sein, alle reaktiven oxidativen Spezies zu deaktivieren. Die Spuren des oxidativem Stress

zeigen sich auf der Oberflächenmembran infizierter roter Blutzelle u. a. in Form von veränderter Membraneigenschaften mit verstärktem Auftreten von Lipidperoxiden [58], Haemichrom und geclustertem Band 3 [59]. Durch vermehrte Band 3 Expression an infizierten Erythrozyten wird die humorale und zelluläre Immunabwehr stimuliert [60]. Das Auftreten dieser Membranveränderungen und die gesteigerte Phagozytose korreliert direkt mit der Reifung der Parasiten und ansteigendem oxidativen Stress [57].

1.8.4 Die Rolle des Glutathion-Systems bei der oxidativen Protektion von *Plasmodium falciparum*

Glutathion spielt eine essentielle Rolle für den gesamten Lebenszyklus des Malaria Parasiten. Es ist sowohl zentrales Element des parasitären antioxidativen Verteidigungsmechanismus als auch ein Element zur Aufrechterhaltung des reduzierten Milieus im Zytosol [43]. Des weiteren hat Glutathion auch direkt mit dem Lebenszyklus von Parasiten verknüpfte Funktionen:

- In reduzierter Form unterstützt Glutathion schnelles Zellwachstum indem es Elektronen für die Desoxyribonukleinsynthese zur Verfügung stellt.
- Es spielt eine Rolle bei der Detoxifizierung von Häm, einem Produkt der Hämoglobin Verdauung.
- Freie Radikale sowie schädliche Wasserstoff- und Lipidperoxide, die im Parasiten entstehen, können mit einer Reaktionssequenz bereinigt werden, die Glutathion als essentieller Bestandteil involviert.
- Als Substrat der Glutathion-S-Transferase wird Glutathion an nicht abbaubare Komponenten, einschließlich an Anti-Malaria-Medikamente konjugiert.

- Es ist an der Entstehung von Medikamenten Resistenzen, beispielsweise der Chloroquinresistenz beteiligt. Hierbei ist Glutathion sowohl als Cofactor für enzymatische Reaktionen (GST) als auch als Resistenzmediator bei der Entgiftung von toxischen Hämoglobin Abbauprodukten involviert.
- Glutathion ist Koenzym im Glyoxalase System, was Methylglyoxal detoxifiziert, ein Beiprodukt der intensiven Glycolyse, die in den Trophozyten stattfindet.

Um ein adäquates intrazelluläres Redoxgleichgewicht aufrecht zu erhalten, muss, wie schon oben beschrieben, ein angemessenes Verhältnis zwischen Glutathion (GSH) und dem in vielen Oxidationen zahlreicher Stoffwechselprozesse entstehenden reduzierten Glutathion (GSSG) vorherrschen. Hauptsächlich wird dieses Gleichgewicht durch die Aktivität des Enzyms Glutathionreduktase und durch GSSG-Efflux-Pumpen erreicht [61]. Auch die Glutathion Neusynthese trägt maßgeblich zu Erhaltung des hohen intrazellulären Glutathionspiegels bei [62].

Der Malaria Parasit verfügt über eine große Glutathion-Synthese Kapazität. Ein Teil davon wird mittels GSSG-Efflux Pumpen ins Wirtskompartiment abgegeben, wo es reduziert und genutzt wird. Experimentelle Daten konnten zeigen, dass die Glutathionsynthese Aktivität im Wirtserythrozyten vermindert ist. Bei der Inkubation von infizierten Erythrozyten mit gamma-Glutamat-Cystein und Glycin kam es zu Anreicherungen von Glutamat-Cystein im Wirtszytosol bei gleich bleibenden Glutathionspiegeln in Wirtszelle und Parasit. Man nimmt daher an, dass der Parasit der Wirtszelle Glutathion zu Verfügung stellt. Da weder Glutathion noch gamma-Glutamat-Cystein die parasitäre Membran durchdringen können, geht man von einer parasitären GSSG Abgabe an die Wirtszelle aus, was diese mittels GR zu Glutathion umsetzt und somit das reduzierte Milieu im Wirtszytosol aufrechterhält

und hierdurch zum Überleben des Parasiten beiträgt [63]. Im Wirtszell-Kompartiment von infizierten Erythrozyten liegt der GSH/GSSG Quotient bei ca. 28, während nicht infizierte Erythrozyten einen Quotient von ca. 320 aufweisen. Im parasitären Kompartiment liegt ein Quotient von ca. 285 vor, was auf eine adäquate oxidative Protektion schließen lässt.

Interessanterweise enthalten Plasmodien infizierte rote Blutzellen nur ca. die Hälfte der Glutathionkonzentration von nicht infizierten Erythrozyten [64], [65], was sich vermutlich mit den hohen Effluxraten von GSSG via einer bereits oben beschriebenen GSSG Efflux Pumpe [63] erklären lässt. Experimentelle Daten haben gezeigt, dass man Glutathion eher im Kulturmedium als im Erythrozyten Kompartiment Plasmodien infizierter Zellen findet, was darauf schließen lässt, dass GSSG gänzlich der Malaria infizierten Zelle verloren geht und trotz parasitärer und Wirts-Glutathionreductase GSSG nicht suffizient reduziert werden kann [64], [65]. Man geht daher davon aus, dass der verstärkte oxidative Stress, der durch die Plasmodien-Infektion verursacht wird, die Oxidation solch großer Mengen von Glutathion verursacht, dass ein GSSG Efflux erforderlich wird, um einen adäquaten GSH/GSSG Redox Status aufrecht zu halten.

1.8.5 Methyleneblau

Das Phenothiazonium Salz Methyleneblau ist das erste synthetische Chemotherapeutikum der Geschichte. Es wurde 1876 von Heinrich Caro in der heutigen Firma BASF synthetisiert und von Paul Ehrlich und Paul Guttman 1891 erstmalig als Malaria-Medikament eingesetzt [66], [67]. In Abbildung 7 ist die Struktur von Methyleneblau dargestellt.

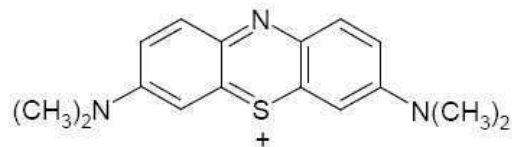


Abbildung 7: Struktur von Methyleneblau

Im Laufe der Zeit wurde das Chromophor und die Seitenketten von Methyleneblau chemisch modifiziert, was zur Entwicklung von Anti-Malaria-Medikamenten wie 8-Aminoquinolinen und 4-Aminoquinolinen führte. In Abbildung 8 ist die Entwicklung von Anti-Malaria-Medikamenten ausgehend von Methyleneblau dargestellt.

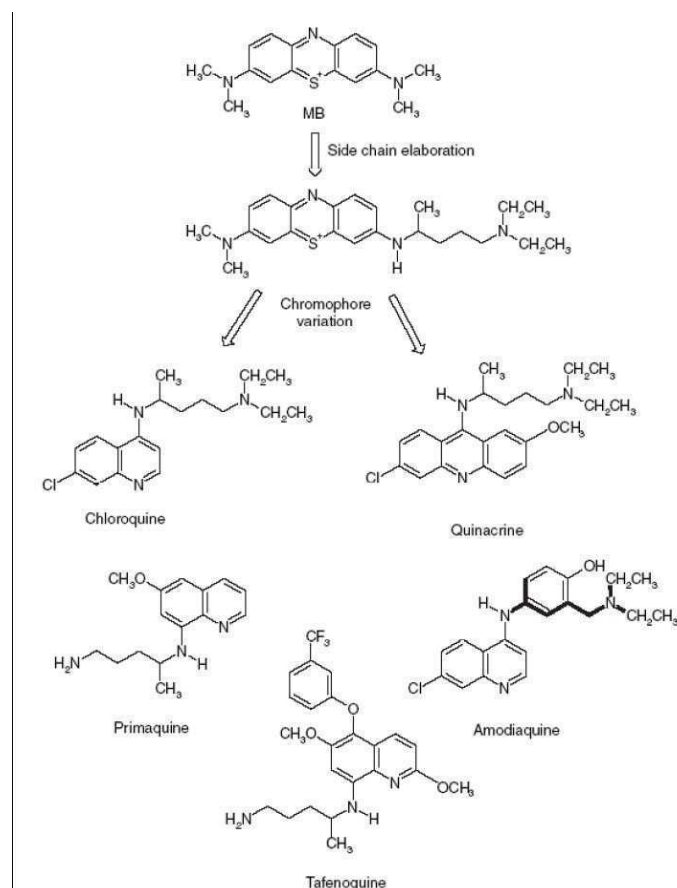


Abbildung 8: Chemische Entwicklung von Anti-Malaria-Medikamenten ausgehend von Methyleneblau. Quelle: Wainwright and Amaral, 2005, freigegeben.

Heutzutage sind die Hauptindikation für Methylenblau akute oder chronische Methämoglobinämien wegen der Fähigkeit von MB Methämoglobin zu reduzieren [68], [69]. Es gehört mittlerweile zur Standardausrüstung von Notfallambulanzen, wo es bei Vergiftungen mit Nitrit oder Anilinfarben und bei seltenen Nebenwirkungen lokaler Betäubungsmittel eingesetzt wird. Außerdem wird Methylenblau beim septischen und anaphylaktischen Schock oder zur Prävention neurotoxischer Nebenwirkungen von Ifosfamid in der Krebsbehandlung [70] verwendet. Neuste Studien konnten auch eine Wirkung von Methylenblau gegen Alzheimer nachweisen [71]. Als Anti-Malaria-Medikament geriet Methylenblau seit den sechziger Jahren in Vergessenheit, da neuere effektive Aminoquine zur Behandlung von Malaria zur Verfügung standen. In Anbetracht der Ausbreitung von *P. falciparum*-Resistenzen gegen die wichtigsten Anti-Malaria-Mittel wie Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin wird MB heute wieder verstärkt als Wirkstoff gegen Malaria untersucht [72], [73]. In den letzten Jahren konnten *in vitro* und *in vivo* Studien die starke Wirksamkeit von Methylenblau gegen Malaria bestätigen. In einer aktuellen Studie konnte sogar nachgewiesen werden, dass Methylenblau einen stark gametoziden Effekt aufweist und in diesem Aspekt sogar Artemisininen überlegen ist [74].

In der Zusammenschau der Eigenschaften von Methylenblau, kann man von einem Medikament mit starker BONARIA Qualitäten ausgehen. Unter BONARIA versteht man, dass MB:

- Sicher, effektiv und kombinierbar eingesetzt werden kann (ausgedrückt in dem Wortteil **BON**, was für beneficial steht).
- Für die Ärmsten der Welt zu bezahlen ist (**A** steht für *affordable*),
- in den meisten Ländern bereits als Arzneimittel – für die oben genannte Indikation – registriert ist (**R** steht für *registered*) und

- international in ausreichenden Mengen zur Verfügung steht (**IA** steht für *internationally available*) [176].

Der Preis der Behandlung eines Malaria-Ausbruchs bei einem Kind mit einer MB enthaltenden Arzneimittel-Kombination liegt unter 50 Cent [75]. Im Vergleich zu anderen verfügbaren effektiven anti-Malaria Medikamenten ist Methylenblau sehr preisgünstig, wie in folgende Tabelle dargestellt:

Medikament	Preis pro Behandlung	
	CFA	Euro
Chloroquin	96 - 414	0,15 - 0,63
Amodiaquin	156 - 223	0,24 - 0,34
Sulfadoxine/Pyrimethamin	68 - 182	0,10 - 0,28
Quinin	933 - 2597	1,42 - 3,96
Halofantrin	605 - 1008	0,92 - 1,54
Artemether	975 - 3099	1,49 - 4,72
Artesunat	347 - 1739	0,53 - 2,65
Dihydroartemisinin	884 - 3174	1,35 - 4,84
Artesunat + Mefloquin (Artequin®)	3099	4,72
Artesunat + S/P (Coarinate®)	882	1,34
Artesunat + Amodiaquin (Arsucam®)	873 - 2182	1,33 - 3,33
Artemether + Lumefantrin (Coartem®, Coartesiane®)	1085 - 2764	1,65 - 4,19
Methylenblau, in Abhängigkeit vom Kombinationspartner	96 - 328	0,15 - 0,50

Tabelle 1: Medikamenten Preise von Anti-Malaria-Medikamenten in Burkina Faso in 2009, Daten erhoben von Frauke Schäfer.

Methylenblau ist kostengünstig, zeigt hohe Effektivität gegen Plasmodien und wirkt gleichzeitig wenig toxisch auf menschliche Zellen. Somit ist es auch besonders zur Behandlung von Malaria geeignet.

1.8.6 Wirkung von Methylenblau auf Plasmodien

Methylenblau hemmt die Reifung des Parasiten zum Schizonten, ähnlich wie Chloroquin und andere Quinine. Es wirkt an multiple Zielstrukturen in Plasmodien, wobei zwei davon, Methämoglobin und β -Hämatin nicht vom Genom des Parasiten kontrollierbar sind. Methylenblau hemmt zum einen die Polymerisation von Häm zu Hämozoin in der Nahrungsvakuole des Parasiten und zum anderen beeinflusst es das Wachstum der Parasiten durch Inhibition des (Met)hämoglobin-Abbaus.

Resistenzentwicklungen werden durch diese zwei nicht von Plasmodien regulierten Angriffspunkte sehr unwahrscheinlich [44].

Neben den beschriebenen Wirkweisen ist MB ein subversives Substrat und ein spezifischer Inhibitor von Disulfid-Reduktasen von *P. falciparum* [42]. Es hemmt das Redox-Protein Glutathionreduktase, welche, wie oben beschrieben, eine Schlüsselrolle in der oxidativen Protektion des Parasiten einnimmt. Dabei kommt es indirekt zu einer Depletion von Glutathion im Zytosol der Parasiten. Als prooxidatives Agens erhöht Methyleneblau somit den oxidativen Stress des Parasiten und hat daher parasitozide Eigenschaften.

Es konnte gezeigt werden, dass niedrige Glutathion-Spiegel die Wirkung von Chloroquin begünstigen [76]. Diese Beobachtung war der Ausgangspunkt für einen Einsatz von MB mit dem Ziel, die Parasiten für Chloroquin sensitiver zu machen und somit vorhandene Chloroquin-Resistenzen abzuschwächen. Die Kombination von MB und Chloroquin wurde in klinischen Studien in Nouna, Burkina Faso getestet [75], [77]. In dieser Studie konnten zwar keine gravierende toxischen Zwischenfälle oder Unverträglichkeiten beobachtet werden, es konnte jedoch auch keine klare Überlegenheit der Kombinationstherapie gegenüber einer Chloroquin-Monotherapie nachgewiesen werden. Für diese Ergebnisse wurden eine zu niedrige Dosierung von MB, eine antagonistische Wirkung der beiden Kombinations-Partner und/oder ein bisher unbekannt hoher Grad an Chloroquin-Resistenz in Burkina Faso [75], [78] verantwortlich gemacht. Akoachere *et al.* konnten in weiterführende Untersuchungen eine antagonistische Wirkung von MB und Chloroquin im Zellkultur-Assay *in vitro* nachweisen [79]. Als synergistischer Partner für MB erwiesen sich in derselben Studie Artemisinin-Derivate. Die oben erwähnte pleiotrope Wirkung von MB scheint mit der Wirkung des Artemisinins nicht zu interferieren. Somit erscheint Artemisinin als ein perfekter Kombinationspartner, der eine

Resistenzentwicklung dieser Arzneimittel-Kombination unwahrscheinlich werden lässt.

In der aktuellen Studie in Burkina Faso mit 160 an Malaria erkrankten Kindern zwischen sechs und zehn Jahren wurde getestet, wie Kombinationstherapien von Artemisininen und Methylenblau auf die Gametozyten im Blut wirken. Eine Gruppe der Kinder erhielt die Standardtherapie, bestehend aus einer Kombination der Wirkstoffe Artesunat und Amodiaquin, zwei weitere Gruppen jeweils Methylenblau kombiniert mit einem der beiden Medikamente. Drei, sieben und 14 Tage nach Therapiebeginn wurden in Blutproben die Anzahl der Gametozyten kontrolliert. Es zeigte sich, dass beide Kombinationstherapien mit Methylenblau doppelt so gut gegen Gametozyten wie die Standardtherapie wirkten; schon in den ersten Tagen waren diese Parasiten-Formen fast vollständig verschwunden [74].

1.8.7 Metabolische Netzwerkmodellierung

Biologische Netzwerke sind komplexe Systeme, in der eine große Anzahl von Enzymen interagieren und dadurch aus einfachen Molekülen hochkomplexe Verbindungen herstellen. Forschung im 20. Jahrhundert war bisher geprägt vom reduktionistischen Ansätzen wie der Erforschung von Eigenschaften und Funktionen einzelner Zellkomponenten. Um jedoch komplexe zelluläre Prozesse zu modellieren und zu verstehen sind System-basierende Ansätze nötig. Metabolische Stoffwechselwege bzw. Netzwerke sind ein essentieller Schlüssel zur Erforschung des systemischen Verhaltens biologischer Zellen.

Ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung dieser metabolischer Netzwerke ist die Elementarmodenanalyse bzw. die Extreme Pathway Analyse, die in der Vergangenheit erfolgreich zur Analyse metabolischer Netzwerke von *Saccharomyces cerevisiae* [80], [81] und *Escherichia coli* [82], [83] eingesetzt wurde. Bei der Elementarmodenanalyse bzw.

Extreme Pathway Analyse werden alle Reaktionen eines Netzwerkes erfasst, auch die, die Reaktionskraft oder Energie zur Verfügung stellen. Für die einzelnen Elementarmoden kann man dadurch direkt die Produktausbeute berechnen. Ferner werden durch die ganzheitliche Betrachtung des Netzwerkes auch Reaktionen mit einbezogen, die zwar nicht direkt im klassischen Stoffwechselweg eines Zielprodukts vorhanden sind, aber gleiche Reaktionspartner besitzen, was die Identifizierung alternativer Wege mit höheren Ausbeuten ermöglicht. Die genannten Analysen leisten damit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der komplexen Architektur der Zellphysiologie.

1.9. Zielsetzung und Hintergrund der Arbeit

Hintergrund dieser Arbeit ist die Idee einer großangelegten Malaria Eradikationsaktion, der sogenannten Operation E-Day, von Colin Orth (Walter Reed Army Insitut) und Heiner Schirmer (Universität Heidelberg). Analog zum D-Day in der Normandie ist die Idee durch gleichzeitige zehnwöchige Medikamenteneinnahme ab einem bestimmten Stichtag der gesamten Bevölkerung einer Region, eine Parasitenfreiheit der Vektormücken zu erreichen und somit einen entscheidenden Schlag gegen Malaria zu bewirken bzw. sie zu eradizieren. Hierzu ist eine hochwirksame Medikamentenkombination nötig. Im Anbetracht der sich stark ausbreitenden Resistenzen werden neue effektive Medikamentenkombination dringend benötigt. Methylenblau als neues altes Anti-Malaria-Medikament stellt eine vielversprechende Alternative dar. Ziel dieser Arbeit ist es die Durchführbarkeit einer lokalen Eradikationsaktion in Burkina Faso unter Nutzung von Methylenblau zu evaluieren. Hierbei sollen vor allem sozialmedizinische Aspekte (Teilnahmebereitschaft, Kenntnisse, Vertrauen in die moderne Medizin) untersucht werden, die Grundvoraussetzungen für die Durchführung jeglicher Malaria Programme darstellen und deren Fehlen in der Vergangenheit maßgeblich zum Scheitern von Anti-Malaria-

Programmen beigetragen haben. Des Weiteren soll der Wirkmechanismus sowie mögliche Resistenzmechanismen des aktuell wirksamsten Medikaments Artemisinin mittels Bioinformatik näher beleuchtet werden und somit ein Beitrag zur weiteren Aufklärung der Zielstruktur von Artemisinin und zur Resistenzevaluierung geleistet werden.

Methylenblau als vielversprechendes neues Agens im Kampf gegen Malaria soll hier in seiner Wirkung auf das Redoxstoffwechselnetzwerk von Plasmodien erstmals systembiologisch mittels metabolischer Netzwerkmodellierung analysiert werden. Einige Schlüsselenzyme werden in ihrer Funktion durch Methylenblau beeinträchtigt und auch die Transkriptionsraten dieser Enzyme ändern sich unter Einfluss von Methylenblau. Ziel dieser Arbeit ist es, wichtige metabolische Stoffwechselwege im Redoxsystem zu identifizieren und den Einfluss von Methylenblau auf die metabolischen Stoffwechselwege des Redoxsystems unter Verwendung von experimentellen Real-time PCR Daten zu berechnen. Hiermit kann durch die Identifizierung essentieller Moden ein Beitrag zur rationalen Medikamentenentwicklung geleistet werden sowie ein Modell geliefert werden, was auch die Erforschung des Einflusses anderer Medikamente auf den Redoxstoffwechsel ermöglicht.

2. Material und Methoden

2.1 Umfrage in Burkina Faso

2.1.1 Studiengebiet

Die Umfrage wurde mit Unterstützung des „Centre de Recherche en Santé“ in Nouna im Gesundheitsbezirk Nouna, den angrenzenden Dörfern Bagala und Tonkoroni sowie in der Hauptstadt von Burkina Faso, Ouagadougou, durchgeführt. Das westafrikanische Land Burkina Faso verfügt über eine Fläche von 274.200 m² und 13.730.258 Einwohner im Jahre 2006. Mit einem Human Development Index (HDI) von 0,389 nimmt Burkina Faso aktuell Rang 177 des HDI ein und gilt somit unter den gelisteten Ländern als sechst-ärmstes Land der Welt [6], [84].

Der Gesundheitsbezirk Nouna ist Teil der Kossi Provinz, einer der 45 administrativen Provinzen von Burkina Faso 300 Kilometer nordwestlich der Hauptstadt Ouagadougou gelegen. Die Stadt ist in 7 Sektoren gegliedert und hat ungefähr 25.000 Einwohner. Die Gesamtpopulation des Gesundheitsbezirks beträgt ca. 296000 mit ca. 274 umliegenden Dörfern [32]. Die Dörfer Tonkoroni und Bagala sind 7 bzw. 15km westlich von Nouna gelegen.

Das sudanosahelische Klima in dieser Region ist geprägt von einer kurzen Regenzeit von Juni bis Oktober und einer Trockenzeit von November bis Mai. Die Trockenzeit ist gegliedert in eine trockene kalte und staubige Periode von November bis Februar und eine trockene heiße Periode von März bis Mai. Der jährliche Niederschlag beträgt etwa durchschnittlich 700mm. In den vergangenen 35 Jahren konnten einige klimatische Veränderungen festgestellt werden, darunter ein Sinken der Niederschlagswerte sowie die Zunahme der Temperaturen. Extreme Klimaerscheinungen wie große Trockenheit und Überschwemmungen haben in den vergangenen Jahrzehnten ebenfalls zugenommen[6].

2.1.2 Durchführung der Befragung

In den Dörfern Bagala (1213 Einwohner, davon 629 über 15 Jahre, 189 Haushalte) und Tonkoroni (287 Einwohner, 170 über 15 Jahre, 42 Haushalte) wurden im Zeitraum zwischen 22. August und 09. September 2005 14 % der Dorfbevölkerung befragt. Die Anzahl-mäßig größte ethnische Gruppe in Bagala ist Bwaba, die Bwamu und teilweise Französisch sprechen. Ca. 10% der Bevölkerung in Bagala sind Peulh, die meist nur Peulh sprechen. In Tonkoroni sind die vorherrschenden ethnischen Gruppen Bwaba, Mossi und Fulani, die Bwamu, Mooré und Ffulde sprechen. Beide Dörfer gehören zum Nouna Verwaltungsbezirk. Das Gebiet zählt zu der klimatisch trockenen Savannen Region. Die ökonomische Hauptaktivität ist subsistenzielle Landwirtschaft und Baumwollanbau. Malaria ist in der Region holoendemisch aber stark saisonal abhängig und stellt die Haupttodesursache bei Kindern unter 5 Jahre dar. Fließendes Wasser und Elektrizität sind in beiden Dörfern nicht verfügbar.

2.1.3 Datenerhebung

In beiden Dörfern wurden mehr als 14% der Dorfbevölkerung über 15 Jahren befragt. Die Befragung wurde zu Hause bei den Teilnehmern mit Hilfe eines lokalen, eingeborenen erfahrenen Interviewers durchgeführt. Nach den lokalen geographischen Bedingungen wurde das Dorf Bagala in 7 Sektoren mit jeweils 27 Haushalten unterteilt, das Dorf Tonkoroni in 6 Sektoren zu jeweils 7 Haushalten. Nach randomisierter Stichprobenwahl wurden in jedem Sektor 5 Haushalte zufällig ausgewählt, so dass mindestens 14% der Population befragt werden konnte. Zum Vergleich wurden 100 Teilnehmer in den Städten Ouagadougou und Nouna befragt (radomisiertes Sampling bei Durchführung der Umfrage in verschiedenen sozioökonomischen Viertel in Ouagadougou und Nouna) Die Befragung wurde mit Hilfe eines semi-strukturierten Fragebogen (18

Fragen) durchgeführt und mit Hilfe des Statistik-Programms R und SPSS ausgewertet.

2.2 Bioinformatische Analysen

2.2.1 Primäre Datenbanken

GenBank (NCBI)

Die GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) in den USA ist ein Teil des NCBI (National Center for Biotechnology Information) und stellt eine der drei großen primären Datenbanken für Protein- und Nukleotidsequenzen dar [85]. Gegenwärtig sind etwa 85.759.586.764 Basen in 82.853.685 aufgezeichneten Sequenzen in der traditionellen GenBank enthalten. GenBank ist ein Teil der internationalen Nukleotidsequenz Datenbank Kollaboration, die aus den drei großen primären Datenbanken, der DNA DataBank aus Japan (DDBJ), dem European Molecular Biology Laboratory (EMBL) und der GenBank des NCBI besteht. Die Daten dieser drei großen Datenbanken werden täglich miteinander abgeglichen. Das Entrez-System ermöglicht eine einfache Suche innerhalb der Datenbank nach verschiedenen Kategorien wie z. B. Zugangsnummer der Sequenz, des Gens oder des Organismus. Ein Sequenzeintrag in GenBank liefert neben der gesuchten Sequenz eine ausführliche Annotation derselben [86].

EMBL

Die EMBL Nukleotidsequenz Datenbank (www.ebi.ac.uk/embl/) vom europäischen Bioinformatik Institut (EBI) in Großbritannien ist das europäische Pendant zur Genbank. Das EBI ist eine nicht profitorientierte akademische Organisation des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) und verwaltet biologische Datenbanken. Die EMBL Nukleotidsequenz Datenbank ist ein Teil des europäischen

Nukleotid-Archivs und gehört der Protein und Nukleotid Datenbankgruppe PANDA an [87].

PlasmoDB

PlasmoDB (www.plasmodb.org) ist eine funktionelle Genom Datenbank, die annotierten Genome von *Plasmodium falciparum* (strain 3D7), *Plasmodium vivax*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium knowlesi* beinhaltet [88]. PlasmoDB gehört zur Familie der Genom Ressourcen, die unter der Schirmherrschaft der EuPathDB (<http://EuPathDB.org>) des „Bioinformatics Resource Center (BRC)“ stehen. Zur Sequenzsuche wurde in der vorliegenden Arbeit noch die vorangegangene Version von PlasmoDB verwendet [89], die *P. knowlesi* noch nicht umfasste.

Swiss-Prot

Die nicht redundante primäre Datenbank Swiss-Prot (www.expasy.ch/sprot/) des Schweizerischen Instituts für Bioinformatik in Zusammenarbeit mit der EMBL Data Library ist eine Sequenzdatenbank für annotierte Aminosäuren [90]. Hierbei handelt es sich um eine manuell bearbeitete Datenbank, bei der jeder Datenbankeintrag von Spezialisten überprüft wird. Kennzeichnend ist deshalb eine hohe Qualität der Daten sowie eine hohe Anzahl von Querverweisen zu anderen Datenbanken.

UniProtKB

Die UniProt Knowledge Datenbank, bietet eine Kollektion aus reich annotierten Proteininformationen [91]. Man unterscheidet hierbei zwischen manuell annotierten überprüften Datensätzen in "UniProtKB/Swiss-Prot" und rechnerisch analysierten unüberprüften Datensätzen in "UniProtKB/TrEMBL", die noch nicht in „UniProtKB/Swiss-Prot“ aufgenommen wurden. TrEMBL steht für translated EMBL und umfasst proteincodierende Sequenzen aus EMBL, die automatisch translatiert und annotiert werden.

2.2.2 Sekundäre Datenbanken

Generell interpretieren und filtern sekundäre Datenbanken die Informationen aus primären Datenbanken, beispielsweise nach Proteindomäne oder Zugehörigkeit zu Stoffwechselwegen.

Domänen- und Motiv-Datenbanken:

Pfam (Protein Families Database of Alignments and HMMs)

Pfam (pfam.sanger.ac.uk/) ist eine Sammlung von multiplen Alignments und den dazugehörigen Hidden Markov Modellen (HMMs) der wichtigsten Proteindomänen und Proteinfamilien. Pfam basiert auf der UniProtKB Datenbank, auf NCBI GenPep sowie auf Sequenzen ausgewählter Genomprojekte. Mit Hilfe von Pfam kann die Domänenstruktur eines Proteins ermittelt werden. Pfam besteht aus zwei Teilen: Pfam-A , welches gut charakterisierte Domänen aus multiplen Alignments enthält und Pfam-B, welches automatisch generierte Domänen mit meist unbekannter Funktion beinhaltet [92].

SMART (Simple Modular Architecture Research Tool)

Diese Datenbank (smart.embl-heidelberg.de) erlaubt ebenfalls die Domänenanalyse von Proteinen. Sie besteht aus den manuell erstellten Alignments und zugeordneten Hidden Markov Modellen (HMMs) von Domänen, welche in extrazellulären, signaltransduzierenden und chromatin-assoziierten Proteinen enthalten sind. Diese Domänen sind ausführlich bezüglich phylogenetischen Verteilung, Funktionseinheiten, Tertiärstruktur und funktionell wichtigen Reste annotiert [93].

Strukturdatenbank:

PDB (Protein Data Bank)

In der Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb) sind Gruppen von räumlichen Atomkoordinaten mit den dazugehörigen Annotationen bzw. räumliche Strukturdaten von Proteinen, Nukleinsäuren und einigen Kohlenhydraten niedergelegt (mehrere tausend Strukturen). Über die

Koordinaten der einzelnen Atome eines Proteins kann dessen räumliche Struktur konstruiert werden. Für die meisten Proteine ist keine experimentell ermittelte Struktur bekannt. Darum können homologe (genug Ähnlichkeit aufweisende) Proteine aus der 3D-Datenbank für Strukturvorhersagen/ Homologiemodellierungen genutzt werden [94].

2.2.3 Alignments

Sequenzalignments dienen dem Vergleich zweier oder mehrerer Sequenzpositionen (Strings) und stellen damit eine fundamentale Methode in der Bioinformatik und der molekularen Phylogenie dar. Hintergrund ist die Analyse funktioneller oder evolutionärer Verwandtschaften von DNA- oder Proteinsequenzen. Um zwei oder mehrere Sequenzen miteinander vergleichen zu können, werden diese auf Grund der Position ihrer Nukleotide bzw. Aminosäuren aneinander ausgerichtet. Übereinstimmende Positionen werden als Match bezeichnet, nicht übereinstimmende als Mismatch. Neben diesen beiden Zuständen gibt es noch einen dritten Zustand: die Lücke (Gap).

Diese Lücken entstehen durch Insertionen oder Deletionen in der Nukleotidsequenz, welche auf Mutationen auf DNA-Ebene zurückzuführen sind [95].

Bezüglich des Sequenzvergleichs sind anschließende Begriffe wie folgt definiert:

- Ähnlichkeit:

Dieser Begriff beschreibt die Anzahl der Positionen in den zu vergleichenden Sequenzen und ist von der verwendeten Ähnlichkeitsmatrix (auch Substitutionsmatrix genannt) abhängig.

- Identität:

Diese Größe gibt an, wie viele Positionen im Alignment übereinstimmen.

Sie lässt sich genau berechnen und in (z. B.) Prozent angeben.

- Homologie:

Zwei oder mehrere Sequenzen sind dann homolog, wenn sie auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen. Dabei muss beachtet werden, dass man von Orthologie spricht, wenn homologe Sequenzen aus verschiedenen Spezies stammen, von Paralogie, wenn die homologen Sequenzen aus einer Spezies stammen. Die Homologie lässt sich nicht berechnen.

2.2.3.1 Substitutionsmatrizen

Um die Homologie zweier oder mehrerer Sequenzen bestimmen zu können, müssen die Identität berechnet und die Ähnlichkeit bestimmt werden. Die Identität lässt sich einfach in Prozent angeben, die Ähnlichkeit hängt von den verwendeten Substitutionsmatrizen ab. Die Wahl der Substitutionsmatrix hängt direkt von der zu untersuchenden Problematik und der Similarität der vergleichenden Sequenzen ab. Es werden folgende bekannte Matrizen unterschieden:

Identitätsmatrizen

Die Bewertung der Ähnlichkeit erfolgt hier nur über zwei Zustände: identisch und nicht-identisch.

Identische Positionen werden mit „+“ angezeigt, nicht-identische mit „-“.

Sequenz	a	b	c	d	e
a	+	-	-	-	-
b	-	+	-	-	-
c	-	-	+	-	-
d	-	-	-	+	-
e	-	-	-	-	+

Tabelle 2: Schematische Darstellung einer Identitätsmatrize.

Mit Identitätsmatrizen arbeiten nur sehr wenige Programme, da hier zwei wichtige Aspekte nicht beachtet werden:

- Aminosäuren können gegen andere, vom räumlichen Aufbau her

ähnliche Aminosäuren ausgetauscht werden, ohne dass es zu einer (sich auf die Proteinstruktur auswirkenden) Veränderung kommt.

- Der genetische Code ist degeneriert, d. h. für ein und dieselbe Aminosäure können mehrere Basentriplets codieren (z. B. Alanin kann durch GCT, GCC, GCA und GCG codiert werden).

Diese beiden Aspekte werden in den PAM- und BLOSUM-Matrizen abgedeckt.

PAM-Matrizen

Die PAM-Matrix wurde 1978 von Margaret Dayhoff aus ca. 100 verschiedenen Aminosäuresequenzen berechnet, welche zu 85 % miteinander identisch waren [96]. Um diesen Wert zu bestimmen, wurde ein globales Alignment, also ein Alignment über die volle Länge der Sequenzen aller Proteine, erstellt. Mit Hilfe dieses Alignments wurde anschließend ausgezählt, welche Aminosäuren wie oft ausgetauscht wurden. Eingetragen wurde das Ergebnis in eine Matrix aus 20x20 Feldern, da es theoretisch möglich war, dass jede Aminosäure mit jeder anderen ausgetauscht werden konnte. Auf Grund des degenerierten Codes ist es für manche Aminosäuren wahrscheinlicher, dass ein Austausch auftritt als für andere. So würde z. B. eine Veränderung des Triplets GCT zu GCC keine Änderung in der Aminosäure bewirken, da beide Triplets für Alanin codieren.

Dayhoff bezeichnete die Unterschiede in den Sequenzen als „accepted point mutations“. Voraussetzung für diese Bezeichnung ist, dass die einzelnen Punktmutationen in einer Sequenz sich voneinander unabhängig entwickelt haben und keinen Funktionsverlust des Enzyms nach sich ziehen. Je höher der evolutionäre Abstand von verschiedenen Sequenzen, desto geringer ist die Ähnlichkeit und desto höher ist die Anzahl der Punktmutationen.

Aus diesem Grund definierte Dayhoff über die Anzahl der

Punktmutationen pro 100 Aminosäuren („percent accepted mutation“, PAM) den evolutionären Abstand zweier oder mehrerer Sequenzen:

- PAM1 = ein Austausch pro 100 Aminosäuren
- PAM2 = zwei Austausche pro 100 Aminosäuren
- usw.

PAM-Matrizen werden in verschiedenen Varianten eingesetzt:

- PAM40 wird eingesetzt, wenn relativ nah verwandte Sequenzen global miteinander verglichen werden sollen.
- PAM250 wird eingesetzt, wenn relativ entfernt verwandte Sequenzen global miteinander verglichen werden sollen.

Eine Matrix mit mehr als 250 Aminosäureaustauschen kommt daher zustande, dass eine Aminosäure auch mehrmals ausgetauscht werden kann.

BLOSUM-Matrizen

Die „**blocks substitutions matrix**“ von Jorja und Steven Henikoff geht nach einem ähnlichen Prinzip vor wie die PAM-Matrix. Allerdings werden hier eine oder mehrere verwandte Sequenzen lokal miteinander aligniert. Die verwendeten Sequenzen mussten gewisse Kriterien erfüllen, um als Ausgangspunkt für die Berechnung der verschiedenen BLOSUM-Matrizen fungieren zu können [97].

Für die BLOSUM62-Matrix mussten die Sequenzen zum Beispiel zu 62 % identisch sein. Je höher die Nummer hinter der Matrixbezeichnung, desto höher die Identität bei den für die Berechnung dieser Matrix verwendeten Sequenzen. Abschließend kann man sagen, dass beide, PAM und BLOSUM-Matrizen, die gleiche Funktion für verschiedene Aufgaben übernehmen.

Ihre Funktion ist es, für BLAST eine Grundlage zu bieten, auf welcher dieses Programm entscheiden kann (auf Grund seines Algorithmus und

verschiedener Benutzereinstellungen), ob eine Sequenz noch als verwandt erkannt wird oder nicht.

Benutzereinstellungen wären in diesem Falle zum Beispiel eine Erhöhung der Kosten einer Lücke in der Sequenz oder eine Veränderung in der Substitutionsmatrix, indem man die Wahrscheinlichkeit für einen Aminosäureaustausch von Hand ändert.

2.2.3.2 Datenbank-Suchalgorithmen

BLAST(Basic Local Alignment Search Tool): BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ist ein von Altschul et al. entwickelte heuristische Verfahren zur Suche nach ähnlichen Sequenzen in Sequenzdatenbanken [98], [99]. BLAST bietet verschiedene Möglichkeiten der Sequenzsuche:

BLASTN: vergleicht eine Nukleotidsequenz mit einer Datenbank aus Nukleotidsequenzen

BLASTP: vergleicht eine Aminosäuresequenz mit einer Datenbank aus Proteinsequenzen

BLASTX: vergleicht eine Nukleotidsequenz (in allen Leserastern translatiert) mit einer Datenbank aus Proteinsequenzen

TBLASTN: vergleicht eine Proteinsequenz mit einer Datenbank aus Nukleotidsequenzen (in allen Leserastern translatiert)

TBLASTX: vergleicht die six-frame Translation einer Nukleotidsequenz mit der six-frame Translation einer Datenbank aus Nukleotidsequenzen

PSI-BLAST: Es handelt sich um eine iterative Erweiterung einer normalen BLAST Suche, bei dem in einem profilähnlichen Ansatz iterativ eine positionsspezifische Bewertungsmatrix (PSSM) erstellt wird. Dabei werden nicht statische Gewichtungen für den Ersatz einer Position gegen eine andere gewählt, sondern an Hand einer Auswahl von Ergebnissen

für jede Position in der Anfragesequenz eigene Ersetzungsgewichtungen abgelegt. Diese werden in der nächsten Iteration für die Bewertung der Ergebnisse herangezogen. Nach einer einfachen BLAST-Suche wird also aus den Treffern ein multiples Alignment gebildet und damit eine Konsensussequenz ermittelt. Mit dieser errechnet das Programm eine positionsspezifische Matrix, welche die Grundlage einer neuerlichen Suche bildet. Die Iteration kann erneut durchgeführt werden, wobei die neuen Treffer immer wieder in das multiple Alignment und somit auch in die neue positionsspezifische Matrix einbezogen werden. Schließlich konvergiert das Verfahren: keine neuen Sequenzen werden aufgedeckt, alle Sequenzen in der Datenbank sind gefunden. Durch diesen Such-Modus lassen sich im Besonderen evolutionär entfernte Verwandte eines Proteins ermitteln.

Der BLAST Algorithmus besteht aus zwei Komponenten, einem Suchalgorithmus und einer statistischen Bewertung der gefundenen Ergebnisse. Der Suchalgorithmus besteht aus drei Einzelschritten:

1. Zunächst wird die Suchsequenz in kurze Fragmente (Index) zerlegt, mit deren Hilfe in den Sequenzen der Datenbank ähnliche Fragmente gleicher Länge (Treffer/Hits) gesucht werden. Die Länge ω der Fragmente beträgt für DNA-Sequenzen üblicherweise 11 Nukleotide und für Proteine 3 Aminosäuren. Gesucht wird nach lokalen Alignments ohne Lücken, deren Bewertung über einem Stellenwert T liegt. Der Stellenwert T hängt dabei von der verwendeten Bewertungsmatrix ab. Ein Treffer ist definiert durch einen Score (Ähnlichkeitsmaß), welcher einen bestimmten Schwellenwert T übersteigt.
2. Im zweiten Schritt sucht man alle Paare von Hits, die in direkter Nachbarschaft mit höchstens einem Abstand d voneinander liegen. Der Wert d ist hierbei abhängig von der Länge ω der Hits.

3. Nun werden die Paare von Hits solange bidirektional durch Hinzunahme weiterer Alignmentsspalten an beiden Enden der Hits verlängert, bis sich der Score nicht mehr erhöhen lässt. Ab einem definierten Schwellenwert werden die Treffer als high scoring pairs (HSPs) bezeichnet. Bei entsprechender Ähnlichkeit der Sequenzen können zwei HSPs durch Verlängerung auch verknüpft werden. Standardmäßig wird meist BLOSUM62 als Substitutionsmatrix für das oben erwähnte Ähnlichkeitsmaß gewählt. (Annahme: Proteine mit durchschnittlich 62% Ähnlichkeit werden verglichen.)[95], [100].

Bit-Score und Erwartungswert E (E-value):

Um die Scores der HSPs vergleichbar zu machen, werden diese normiert und nunmehr als Bit Scores bezeichnet. Der Bit Score des BLAST-Ergebnisses wird, unter Zuhilfenahme des Karlin-Altschul-Parameters λ und K zur Normalisierung des Scores [101], abhängig von der verwendeten Substitutionsmatrix und der Höhe der Strafpunkte (diese werden angerechnet, wenn über ein Gap hinaus verlängert werden musste) berechnet. Es gilt:

$$S^* = \frac{\lambda S - \ln K}{\ln 2}$$

S = „raw Score“, S* = Bit-Score

Die Qualität des Alignments ist umso besser, je höher der Bit Score ist. Da der Bit Score jedoch keine Aussage über die Signifikanz des Alignments erlaubt, wird ein weiterer Parameter bestimmt, der Erwartungswert E.

Der Erwartungswert E (E-Value) berechnet sich aus:

$$E = mn2^{-S^*}$$

Hierbei sind m und n die Länge der Anfrage- und der Datenbanksequenz und S' entspricht dem Bitscore des Alignments. Für Datenbanken, die mehrere Einzelsequenzen enthalten, ist es zulässig für n die Summe aller Einzelsequenzen zu verwenden. Der Erwartungswert E stellt einen Wert da, der statistisch die Wahrscheinlichkeit ausdrückt den Treffer zufällig in der gegebenen Datenbank zu finden.

Je kleiner E , umso geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Alignment zwischen Such- und Datenbanksequenz auf reinem Zufall beruht. Die Ergebnisse der BLAST-Suche (Treffer) werden nach aufsteigendem E -Wert sortiert und bei niedrigen E -Werten als Treffer akzeptiert. Ein Wert ab 10^{-6} liefert sehr gute Hinweise. Die Validität der E -Werte ist generell im biologischen Kontext zu interpretieren.

2.2.3.3 Multiples Sequenzalignment mit ClustalX

Das multiple Sequenzalignment ist die natürliche Erweiterung des Alignments zweier Sequenzen. Dies heißt im Speziellen, dass man eine Bewertungsfunktion sucht, die sich nicht auf zwei Sequenzen, sondern auf n Sequenzen bezieht. Die dynamische Programmierungsmatrix wird dabei bei n Sequenzen auf n Dimensionen erweitert. Dies wirkt sich auf die Komplexität aus, die mit der Zahl der Sequenzen für die optimale Lösung exponentiell ansteigt. Ein möglicher Lösungsansatz besteht hierbei in einer heuristischen Herangehensweise, bei der man auf Kosten der Genauigkeit die Komplexität des Problems herabsetzt. Ein Verfahren, was beispielsweise einen solchen Ansatz verfolgt ist sind ClustalW und sein Pendant mit graphischer Benutzeroberfläche ClustalX. Multiple Sequenzalignments geben beispielsweise Aufschlüsse über die Phylogenie zur Bestimmung von Zugehörigkeiten zu Proteinfamilien und -superfamilien. So können Verwandtschaftsverhältnisse von Proteinen für entfernte Verwandte über multiple Sequenzalignments dargestellt werden, in dem Proteine hinzugefügt werden, die Zwischenstufen

darstellen. Weiterhin können in der Proteomik multiple Sequenzalignments dazu verwendet werden, konservierte Regionen und somit die biologisch relevanten Teile einer Proteinfamilie zu identifizieren. Werden Proteine mit bekannter Funktion zu einem multiplen Sequenzalignment hinzugefügt, können Rückschlüsse auf die Funktion der restlichen Sequenzen gezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Programm ClustalX für das multiple Sequenzalignment verwendet. Clustal führt drei Hauptschritte durch: ein paarweises Alignment wobei eine Distanzmatrix erstellt wird, eine Erstellung eines phylogenetischen Baums aus der Distanzmatrix und ein progressives Alignment mit Hilfe des phylogenetischen Baums [102].

2.2.4 Strukturvorhersageprogramme

Homologiemodellierung mit SWISS-MODEL

Die Konstruktion von Modellen auf Grund von Homologien ist ein effizientes Verfahren zur Strukturvorhersage eines Proteins, dessen Sequenz bekannt ist. Für die Modellierung ist ein verwandtes Protein als Modell (Template) notwendig, wobei die Qualität der Vorhersage vom Ausmaß der Ähnlichkeit der Sequenz von dem zu konstruierendem Protein und seinem verwandten Protein abhängt. Die Homologiemodellierung umfasst folgende Schritte:

- Globales Alignment von Aminosäuren des zu untersuchenden Proteins mit einem verwandten Protein, dessen Struktur bekannt ist.
- Aufbau eines Modells für das Target, durch Alignment der Target Sequenz an die Modellstruktur
- Konstruktion eines groben Peptidrückrad-Modells durch Hinzufügen von divergenten Schleifenregionen.

- Hinzufügen von Seitenketten zum Erhalt einer vollständigen, physikalischen Struktur.
- Überprüfung des Modells auf offensichtliche Kollisionen mit Atomen.
- Verfeinern des Modells durch begrenzte Energieminimierung.

Für die Homologiemodellierung steht die Software SWISS-MODEL zur Verfügung (swissmodel.expasy.org). SWISS-MODEL geht nach Identifizierung einer geeigneten Template-Sequenz nach oben beschriebener Methode vor und kreiert ein Homologie-Modell unter Anwendung von Energieminimierung (Gromos96) und WhatCheck (Test auf Qualität und Ausschluß sich überlappender Proteinstrukturen). Kern des SWISS-MODEL Servers bildet ProMod II, das eine Sequenz auf einen Satz von Strukturen modelliert [103], [104], [105].

2.3 Metabolische Netzwerkmodellierung

Die Grundlage für metabolische Netzwerkmodellierung sind Enzym- und Pathway-Datenbanken. Sie geben darüber Auskunft, welche Enzyme in welchem Teilnetzwerk eine Rolle spielen und welche Moleküle miteinander interagieren, um eine chemische und physikalische Veränderung des Systems zu bewirken. Als Pathway bezeichnet man hierbei im biologischen Kontext, die Menge von zusammenhängenden biochemischen Reaktionen. Biochemische Reaktionsnetze, wie das Redoxstoffwechselnetzwerk, bilden einen Ausschnitt aus der Gesamtheit aller Reaktionswege. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzym- und Pathway-Datenbanken, die zur Aufstellung und Modellierung des Redoxstoffwechselnetzwerks verwendet wurden, sind im Folgenden aufgelistet. Nicht aufgelistet ist die Datenbank PlasmoDB, die schon unter Materialien und Methoden zur Sequenz- und Strukturanalysen beschrieben wurde.

2.3.1 Enzym- und Pathwaydatenbanken

Expasy

Die Enzymdatenbank (Bairoch, 2000; www.expasy.org/cgi-bin/enzyme-search-de) enthält vor allem Informationen bezüglich der Nomenklatur von Enzymen und basiert auf den Empfehlungen des Nomenklatur Komitees der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)“. Zu den Enzymen werden in den über 4000 Einträgen die jeweilige E.C.-Nummer (*Enzyme Commission*) und die katalysierte Reaktion vermerkt. Des Weiteren finden sich Querverweise zu Sequenzeinträgen in SWISS-PROT und anderen Pathway- bzw. Motiv-Datenbanken [106].

BRENDA

Die Brenda- Datenbank (www.brenda-enzymes.org) des Instituts für Biochemie und Bioinformatik der technischen Universität Braunschweig enthält funktionelle Daten von Enzymen. Die darin enthaltenden Daten zur Enzym Funktion werden direkt aus primär Literatur von Chemikern oder Biologen extrahiert. Die Überprüfung der Daten erfolgt sowohl manuell als auch mit Hilfe von Computersystemen. Die aufgelisteten Enzyme sind nach der Enzymliste der „Enzyme Commission“ klassifiziert und mit Enzymexpressions- und Regulationsinformationen verlinkt [107].

Malaria Transkriptom Database DeRisi

Die Malaria Transkriptom Database DeRisi (malaria.ucsf.edu/) der Universität von Californien, San Fransisco, enthält Transkriptionsdaten der intraerythrozytären Ring-, Trophozoid- und Schizontenstadien von Plasmodien basierend auf experimentellen Daten. Die Datenbank erhält Daten zur relativen mRNA Menge für jede Stunde des intraerythrozytären Zyklus, basierend auf einen 70-mer Oligonukleotid

Microarray. Diese Transkriptom Daten werden gleichzeitig auch auf der PlamoDB Database zur Verfügung gestellt [108].

Malaria Parasite Metabolic Pathways

Diese Homepage von Hagai Ginsburg stellt Informationen über Enzyme-Pathways zu Verfügung, die auf der Basis von metabolischen Datenbanken entwickelt wurden. Diese Pathways dienen dazu, die exprimierten Enzyme in einen biochemischen Kontext einzuordnen und verschiedenen Kofaktoren und Metabolite darzustellen die in die Enzymaktivität involviert sind. Hierbei wurden sachbezogene Informationen von universellen Datenbanken extrahiert und in einer anschaulichen Form dargestellt.

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

KEGG (www.genome.ad.jp/kegg) ist eine umfangreiche, öffentlich zugängliche Datenbanksammlung zu Pathway relevanten Informationen, die zu den Angeboten des japanischen GenomeNet Datenbanken Services zählt. Die Datenobjekte werden in graphischer Auflösung präsentiert und enthalten alle bekannten metabolischen und regulativen Prozesse der Zelle. Zu jedem Eintrag werden sowohl ein Referenz-Pathway als auch verschiedene Spezies-spezifische Pathways aufgelistet. Hierbei finden sich Verknüpfungen zu den beteiligten Genen, Substraten und Kofaktoren [109].

2.3.2 Extreme Pathway Analyse

Um eine System-basierte Netzwerkanalyse vorzunehmen, ist es notwendig, sämtliche denkbaren Stoffwechselwege auf ihre thermodynamische und stöchiometrische Realisierbarkeit zu überprüfen. Dazu wird zunächst das Stoffwechselnetz in Form einer stöchiometrischen Matrix S ausgedrückt. Die Matrix S stellt die stöchiometrischen Koeffizienten der Metabolite (Anzahl der Metabolite = m) in den einzelnen Reaktionen (Anzahl der Reaktionen = r) dar $S=m \cdot r$.

Ausgehend von der vereinfachten Annahme, dass die Konzentrationen der internen Metabolite sich zwar kurzfristig ändern aber integriert über die Zeit konstant bleiben, kann dann die Steady-State Bedingung über folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$S * x = 0$$

Hierbei ist x der Vektor mit den Flußkoeffizienten der Reaktionen. Biochemisch ist dies mit dem Prinzip der Massenerhaltung zu rechtfertigen, sowie mit der Tatsache, dass hohe Metabolitenkonzentrationen über einen längeren Zeitraum die Zelle schädigen würden. Hierbei würde der osmotische Druck Zellkomponenten beschädigen und das ungünstige thermodynamische Reaktionsgleichgewicht der beteiligten Reaktionen würde den Stoffwechsel an dieser Stelle zum Erliegen bringen. Bei der Modellannahme geht jedoch der Informationsgehalt der kurzfristigen Metabolitkonzentrationen der Zelle völlig verloren, so dass Signaltransduktionswege, in denen oftmals zeitabhängige Veränderungen von Transmitterkonzentrationen eine entscheidende Rolle spielen, dann mit diesen Verfahren nicht mehr adäquat modelliert werden können. Zusätzlich zur stöchiometrischen Matrix des Systems und dem Status der Metabolite (intern oder extern) müssen zu den Reaktionen noch Reversibilitätseigenschaften angegeben werden um die Einschränkungen des Koeffizientenvektors x festzulegen. Das resultierende homogene Gleichungssystem ist fast immer unterbestimmt, da die Anzahl der Reaktionen die Anzahl der Metabolite meist bei weitem übertrifft, und wird mit Verfahren aus der Konvexen Analysis gelöst. Durch die Nichtnegativitätsbedingungen ist der resultierende Lösungsraum ein gerichteter konvexer vielfächiger Kegel, dessen Basisvektoren die sogenannten Extreme Pathways darstellen. Ein jeder unter der Steady-Sate Bedingung und der zusätzlichen Irreversibilitätsbedingungen zulässige Zustand des Systems, also jeder

zulässige Vektor x , lässt sich dann als Linearkombination dieser Basisvektoren darstellen, wobei auch hier die Irreversibilitätsbedingungen gelten, d.h. die Linearkombinationskoeffizienten müssen ≥ 0 sein wenn nicht jede beteiligte Reaktion des Extreme Pathways reversibel ist. Die Basisvektoren werden für weitere Berechnungen als Spaltenvektoren in einer $r \times e$ Matrix E zusammengefasst, wobei e die Anzahl der Basisvektoren beschreibt. Dieses Grundprinzip der Steady-State-Analysen liefert eine neuartige Beschreibung des metabolischen Netzwerks [110], [111]. Der Satz von Extreme Pathways ist alleine ausreichend um das Netzwerk vollständig zu beschreiben und Ausgangsbasis für alle weiteren Untersuchungen. Die Elementarmodenanalyse liefert darüber hinaus noch mittels eines Verfahrens der ganzzahligen linearen Optimierung alle weiteren möglichen stöchiometrisch ganzzahligen Stoffwechselwege durch das Netzwerk und eine vollständige Aufzählung der metabolischen Kapazitäten eines Netzwerkes .

Extreme Pathway Analyse mit Yana Square

Das Programm YANA bietet eine integrierte Modellierungsumgebung für metabolische Netzwerke mit Ein- und Ausgabe in standardisierten Datenaustauschformaten wie der XML basierten Systems Biology Markup Language [112]. Es integriert Algorithmen zur Analyse metabolischer Netzwerke, zu denen neben den obligatorischen Steady-State Analysen Algorithmen zur Zerlegung großer Netzwerke, die Robusheitsanalyse und die Berechnung von Flussverteilungen aus Pathwayaktivitäten und vice versa gehören. Dazu integriert das Softwarepaket eine Visualisierung metabolischer Netzwerke in Graphenform inklusive entsprechender etablierter. Layoutroutinen wie dem Force Directed Layout und ist in der Lage durch eine direkte Abfrage der KEGG Datenbank in kurzer Zeit genomweite metabolische Netzwerke aufzustellen [113]. In der

vorliegenden Arbeit erfolgte die Netzwerkerstellung mit Hilfe von Kegg sowie aktuellen Veröffentlichungen.

Berechnung der Extreme Pathway Fluxes mit dem Statistikprogramm R

R ist eine freie Programmiersprache und Statistik-Software, die als GNU Projekt (freies Betriebssystem) veröffentlicht wurde. Die Entwicklung von R orientierte sich an den in den Bell Laboratories entwickelten Sprache zur Verarbeitung statistischer Daten S. In der vorliegenden Arbeit wurde das Programm zur Berechnung der Extreme Pathway Fluxes verwendet [114].

3. Ergebnisse

3.1 Bioinformatische Analyse von PfATP6, der wahrscheinlichsten Zielstruktur von Artemisinin

3.1.1 Generelle Überlegungen zur Resistenz Entstehung

Eines der größten Hürden im Kampf gegen Malaria bleiben die sich schnell ausbreitenden Resistenzen gegen gängige Malaria Medikamente [30], [33]. Die Resistenzmechanismen sind vielseitig und sollen in folgendem Absatz näher beleuchtet werden.

Generell ist Resistenz definiert als Fähigkeit einer Plasmodienpopulation, zu überleben und sich zu vermehren, obwohl die Einnahme und Aufnahme einer ausreichenden Wirkstoffmenge vorliegen. Dabei muss für den Zeitraum, der für eine normale antiparasitäre Wirkung notwendig ist, der Wirkstoff in adäquater Menge am richtigen Ort vorliegen. Als multidrug resistance (MDR) werden Stämme definiert, die gegen mehr als zwei Medikamente verschiedener Wirkstoffklassen eine Resistenz besitzen [115].

Auslöser für Resistenzen sind meist Spontanmutationen im Erregergenom. Zeigt dieser mutierte Stamm einen Selektionsvorteil gegenüber dem Wildtyp, so kann er sich teilweise oder vollständig durchsetzen. Generell kommt es je nach Wirkmechanismus zu einer unterschiedlich schnellen Selektion der Resistenz. Bei redundante Transportsysteme, die von mehreren Genen codiert werden, kommt es eher zu einer langsamen Selektion, während beispielsweise veränderte Bindungsaffinitäten, die nur von einem Gen codiert werden, eher schnell selektioniert werden. Entwicklung und Ausbreitung von resistenten Erregern werden u.a. von Einnahmegewohnheiten, Wirkstoffeigenschaften, Immunstatus und Vektoreigenschaften beeinflusst.

3.1.2 Molekulargenetik der Resistenz

Für Dekaden war Chloroquin (CQ), als effektives und verfügbares Medikament mit wenigen toxischen Nebenwirkungen, das Mittel der Wahl gegen Malaria. Chloroquinresistenzen (CQR) wurden erstmals in den späten 50er Jahren in der thailändisch-kambodschanischen Grenzregion beobachtet [115], [116]. Die Verbreitung der Chloroquinresistenz in Afrika, führte zu einem erneuten starken Anstieg der Krankheits- und Todesfälle in den Achtzigern. Die Wirkung von Chloroquin beruht in der Hemmung des Abbaus von Häm, einem toxisches Beiprodukt der Hämoglobinverdauung in der parasitären Nahrungsvakuole. Bei Chloroquin resistenten Parasiten ist die Akkumulation von Chloroquin in der Nahrungsvakuole vermindert [117]. Genetische Analysen unterstreichen die Rolle des *P. falciparum* Chloroquin Resistenz Transporter Gens, PfCRT, auf Chromosom 7, welches für ein Transportprotein in der Nahrungsvakuole codiert [118]. In mutierter Form ist dieser Transporter mit einer verminderten Akkumulation von Chloroquin in der Nahrungsvakuole assoziiert. Viele Polymorphismen in diesem Gen scheinen mit einer Chloroquinresistenz in vitro und in vivo assoziiert zu sein. Eine zentrale Rolle scheint der Austausch von Lysin zu Threonin in Codon 76 zu spielen [119]. Durch diesen Aminosäurenwechsel kommt es zu einer verstärkten Ausschleusung von Chloroquin aus der Vakuole. Das Vorliegen eines resistenten Phänotyps bei einem Drittel der Erkrankten mit der Thr 76 Mutation, und die langsame Entwicklung von Chloroquinresistenz sind möglicherweise Hinweise auf einen multifaktoriellen Prozess [120].

Eine weitere Mutation, die mit Chloroquinresistenz in Verbindung gebracht wird, ist die Mutation im „multi drug resistance“ Gen 1, pfMDR1, einem Ortholog des P-Glykoproteins von Säugetieren, welches eine Verapamil reversible multi Medikamenten Resistenz in Krebszellen von Säugetieren vermittelt. Dieses „multi drug resistance“ Gen auf

Chromosom 5 verschlüsselt einen transmembranen ABC (ATP-binding-casette) Transporter der Nahrungsvakuole. Mutationen im „multi drug resistance“ Gen scheinen auch das Ausmaß der Chloroquinresistenz durch Mutationen in PfCRT zu modulieren. In vitro Studien konnten zeigen, dass der genetische Ursprung der Stämme das Ausmaß der Chloroquinresistenz durch Mutationen von PfCRT und PfMDR beeinflusst [121]. Studien an Feldisolaten und genetischen Kreuzungen konnten einen Zusammenhang zwischen pfMDR Punktmutationen und dem Ausmaß der in vitro Empfindlichkeit des Parasits auch auf andere Malaria Medikamente, wie Mefloquine, Halofantrin, Chinin und Artemisinin nachweisen [122]. Diese Daten konnten von weiteren genetischen Studien bestätigt werden und scheinen Stamm abhängig zu sein [123]. Ferner konnten Studien zeigen, dass ein Anstieg der pfMDR Kopien, die in vitro Empfindlichkeit für Mefloquine, Halofantrin, Chinin und Artemisinin senkt [124]. Wie genau pfMDR1 moduliert wird, bleibt weiterhin unklar, obwohl in neueren Studien durch eine pfMDR Punktmutation oder durch eine Änderung der *pfmdr1* Kopien, Änderungen der Medikament Akkumulation in der Nahrungsvakuole nachgewiesen werden konnte [125].

Wegen der sich immer weiter ausbreitenden Resistenz gegen CQ führten viele Länder Sulfadoxin/Pyrimethamin (SP) als Mittel der Wahl zur Behandlung der unkomplizierten Malaria tropica in den neunziger Jahren ein. Diese zwei Folsäureantagonisten greifen an zwei Enzymen der Folsäuresynthese an. Die Sulfonamide sind Antimetabolite der p-Aminobenzoessäure, welche für Plasmodien essentiell ist. Sie verdrängen die p-Aminobenzoessäure an der Dihydropteroatsynthetase (DHPS) und blockieren kompetitiv die Folsäuresynthese. Pyrimethamin (ebenso wie Proguanil) hemmt die Folsäuresynthese erst zu einem späteren Zeitpunkt durch die Inhibition der Dihydrofolatreduktase (DHFR). Auch hier entwickelten sich rasch Resistenzen. Die Pyrimethaminresistenz

wird mit spezifischen Punktmutationen im Dhfr Gen assoziiert. Eine dadurch bedingte Veränderung des aktiven Zentrums des Enzyms, führt zu einer verminderten Affinität gegenüber Pyrimethamin. Der Polymorphismus des DHPS Gens ist verantwortlich für die Ausbildung von Resistenzen gegen Sulfadoxin. Kombinationen verschiedener Mutationen begünstigen die Ausbildung eines resistenten Phänotyps . Viele der aufgedeckten Mutationen befinden sich nahe des aktiven Zentrums des Enzyms und vermindern somit die Substratbindungsfähigkeit [117].

Die weite Verbreitung von Resistenzen gegen Sufadoxin/Pyrimethamin und andere herkömmlichen Malaria Medikamente, führte zur Einführung von Artemisinin basierten Kombinationstherapien als Erstlinienmedikamente gegen Malaria [126]. Im folgenden soll exemplarisch detailliert auf die wahrscheinlichste Zielstruktur von Artemisinin eingegangen werden und möglich Folgen einer Punktmutation mittels Homologiemodellierung untersucht werden.

3:1.3 **Artemisinin und mögliche Zielproteine**

Artemisia annua (einjähriger Beifuß) wird in der chinesischen Medizin schon seit Jahrtausenden zur Behandlung der Malaria verwendet. In den Sechziger Jahren starteten Wissenschaftler des chinesischen Militärs mit dem Screening hunderter traditionellen Heilpflanzen, darunter auch *Artemisia annua*. Ziel des Screenings war es, ein geeignetes Medikament für die chinesische Armee zu finden, was Soldaten effektiv vor Malaria schützen sollte. In 1972 gelang es chinesischen Forschern das Sesquiterpenen Lactone mit der Formel $C_{15}H_{22}O_5$, genannt Artemisinin aus den Blättern der Beifußpflanze zu extrahieren und zu charakterisieren. Seit dem entwickeln Wissenschaftler immer potentere chemische Prozesse um den Wirkstoff in geeignete Derivate zu konvertieren. Artemisinin, Arthemether, Artesunat Arteether u.a. werden

heutzutage vor allem in Südost-Asien und Teilen von Afrika genutzt und stellen aktuell das Mittel der Wahl nach WHO Empfehlungen dar. Lange Zeit war Artemisinin das einzige wirksame Malaria Medikament ohne Resistenzen. Seit Kurzem sind auch gegen Artemisinin erste *in vivo* Resistenzen in West Kambodscha aufgetreten [35]. Trotzdem ist Artemisinin weiterhin eines der wirksamsten Malaria-Medikament auf dem globalen Markt.

Die zelluläre Zielstruktur und der genaue Wirkmechanismus von Artemisinin bleiben weiterhin unvollständig aufgeklärt. Das Verständnis des Wirkmechanismus ist jedoch von großer Wichtigkeit im Anbetracht der drohenden aufkommenden Artemisinin Resistenzen. Eine Aufklärung des genauen Wirkmechanismus könnte zum einen dazu beitragen, Resistenzen mit molekularen Techniken d. h. ohne aufwendige phänotypische Beobachtungen zu monitoren, und zum anderen, ein Derivat zu entwickeln, was die Resistenz auslösenden Effekte der Mutation im Zielprotein umgeht. Auch die WHO hat die Gefahr der Resistenzentwicklung unterstrichen und forderte Pharmafirmen auf, Artemisinin nicht mehr als Monotherapeutika zu vertreiben, sondern nur noch in Kombination mit anderen Malariamedikamenten [127].

Im Allgemeinen werden Resistenzen gegen Malaria Medikamente durch zwei mögliche Mechanismen verursacht: Änderungen der Medikamenten Disposition, gewöhnlich steigender Medikamenten Efflux aus dem Parasiten sowie Änderungen der Medikamenten-Empfindlichkeit der Zielproteine. Da bei Artemisinin Derivaten lange keine Resistenzen auftraten, wurde angenommen, Artemisinine würden an multiple Zielproteinen wirken. In diesem Fall wäre eine Resistenzentwicklung unwahrscheinlicher als bei nur einem Zielprotein als Angriffspunkt, da für eine Resistenz alle Zielproteine mutieren müssten [128]. Die Wirkweise von Artemisinin und die möglichen parasitären Zielstrukturen wurden in der Vergangenheit eingehend erforscht und diskutiert. Im

folgenden sollen die wichtigsten Ansatzpunkte und Thesen zur Artemisininwirkung dargestellt werden:

Studien konnten zeigen, dass die Endoperoxid-Brücke das Schlüsselpharmakophor in Semi-synthetischen und syntethischen Artemisininpräperaten ist. Deoxyartemisinin, welchem diese Endoperoxidbrücke fehlt weist beispielsweise keine Wirkung gegen Malaria auf.

Annahme von Häm als Zielstruktur: Studien weisen darauf hin, dass möglicherweise der zytotoxische Effekt von Artemisinin durch Wechselwirkungen des Medikaments mit dem Eisen des Häm Moleküls verursacht wird, welches während des Hämoglobinabbaus in der Verdauungsvakuole entsteht [129]. Diese Hypothese wurde unterstützt von anderen Beobachtungen in Studien, die Häm als Zielstruktur von Quinolinen identifizierten und zeigten, dass Artemisinin sowohl *in vitro* als auch im Tiermodell mit Häm reagieren kann [130], [131]. Obwohl im Mäusemodell markiertes Artemisinin an Häm assoziiert nachgewiesen werden konnte, zeigte der Rane Test, bei dem eine einzige hohe Dosis eines Antimalariamedikament zur Therapie verabreicht wird, bei intraperitonealer Injektion von 100mg/kg Artemisinin nur weniger als 3% an Häm assoziiertes Artemisinin. Da Erythrozyten hämolysieren und Hämozoin freisetzen, kann man nicht davon ausgehen, dass Interaktionen zwischen Artemisinin und Häm nur in der intraerythrozytären Phase ablaufen, jedoch eher als nach Parasiten Freisetzung. Konfokale und Elektronenmikroskopie mit fluoreszierendem bzw. radioaktiv markiertem Artemisinin konnten Artemisinin nicht in der Häm enthaltenden Verdauungsvakuole nachweisen sondern an intraparasitären membrangebundenen Strukturen [132], [133].

Eine weitere Häm-Hypothese ist, dass frei gewordene Häm-Eisen freie C-zentrierte Radikale generiert, die Proteine und Lipide im infizierten Erythrozyten oxidiert und alkyliert [134]. Die Erkenntnis, die Wirkung

von Artemisinin könne durch Sauerstoff und Oxidationsmittel potenziert werden und durch Reduktionsmittel abgeschwächt werden ist vereinbar mit der oben dargestellten Hypothese [135]. Dies wurde jedoch von andern Studien wiederum in Frage gestellt. Eine weitere Annahme ist, dass Artemisinin durch die reduzierende Spaltung der Endoperoxidbrücke mittels intrazellulären Eisen-Sulfur-Redox-Zentren aktiviert wird, welche in Enzymen von Plasmodien gewöhnlich vorkommen. Die Alkylierung dieser Enzyme könnte dann den Tod der Parasiten verursachen [136]. Gegen die Häm-Theorie sprechen, neben den oben aufgeführten Argumenten, dass Artemisinine auch gegen Ring Stadien wirken, die keine hohe Häm Konzentration aufweisen. Außerdem wirken einige Artemisinin-Präparate effektiv gegen Malaria, obwohl sie in konventionellen chemischen Experimenten nicht mit Häm reagieren können. Die Häm Theorie erscheint also eher unwahrscheinlich [137], [138].

Eine weitere Hypothese geht davon aus, dass die Elektronentransportkette von *P. falciparum* die Zielstruktur von Artemisinen sein könne. Diese Annahme stützt sich auf experimentelle Ergebnisse, die zeigen, dass die Sensitivität für Artemisinin um einige Zehnerpotenzen bei der Anzucht von Hefe in nicht fermentierbaren Medium (also in Abhängigkeit von der Atmungskette) steigt. Die Mutanten *ndeΔ* und *ndi1Δ* denen die Hefe NADH-Dehydrogenase NDE1 und NDE2 fehlte, zeigten in experimentellen Studien eine relative Resistenz gegenüber Artemisinen und wuchsen in fermentierbarem Medium, welches Artemisinin enthielt. Hefe mit einer Überexpression von NDE1 und NDE2 war hingegen sensitiver für Artemisinin [139]. Daraus schloss man, dass die Enzyme der Elektronentransportkette die Sensitivität bzw. Aktivität von Artemisinin modulieren könnten und dass aktiviertes Artemisinin die mitochondriale Funktion behindere indem es das mitochondriale Membranpotenzial depolarisiere. Allerdings sind die

Ergebnisse dieses Hefe Modells nicht ohne weiteres auf Plasmodien übertragbar. Plasmodien sind im Gegensatz zur Hefe unfähig zur anaeroben Glycolyse während der asexuellen Stadien. Des Weiteren ist nicht bekannt, dass Artemisinin sich in Mitochondrien anreichert, so dass diese Hypothese ebenfalls eher unwahrscheinlich erscheint.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Artemisinin das Potential der inneren Mitochondrienmembran in neuronalen Zellkulturen beeinflusst, wo eine Interferenz der Elektronen Transportkette mit der Atmungskette assoziiert zu sein scheint. Es konnte ferner gezeigt werden, dass Artemisinin und Primaquin die Atmungskette der sexuellen und asexuellen Parasitenstadien hemmen. Der genaue Hemmmechanismus ist weitgehend unklar. Artemisinin hingegen ist nach Studienergebnissen nicht neurotoxisch, was dafür spricht, dass Artemisinin nicht das innere Mitochondrienpotential beeinflusst und deswegen die Wirkung von Artemisinin nicht von der Elektronen Transportkette abzuhängen scheint.

Seit längerer Zeit werden P-Typ ATPasen als Zielstruktur von Artemisinen angenommen. Diese Annahme begründet sich vor allem darauf, dass selektive Inhibitoren von SERCA P-Typ ATPasen wie beispielsweise Thapsigargin chemische Ähnlichkeit mit Artemisinin aufweisen. Mehrere unabhängige Studien konnten diese Annahme bestätigen. Es konnte gezeigt werden, dass Artemisinin im Gegensatz zu allen anderen Malaria Medikamenten in transfizierten *Xenopus laevis* Oozyten die PfATP6 Aktivität hemmt. Das inaktive Präparat Desoxyartemisinin, dem die Endoperoxidbrücke fehlt, war erst in sehr hohen Dosen im Stande PfATP6 zu hemmen [132]. Zusätzliche Studien an *X. laevis* ergaben eine Aufhebung der Artemisinin Wirkung im Falle einer Punktmutation von L263E im SERCA Transporter (PfATP6). Daraus schloss man, dass eine einzige Aminosäure im Stande ist, die Sensitivität von SERCAs auf Artemisinin zu modulieren [140]. Feldstudien konnten diese Annahme bestätigen und die Rolle von PfATP6 im Zuge einer

aufkommenden Artemisinin Resistenz unterstreichen [128]. Bei diesen Feldstudien wiesen einige Hundert Isolate von Patienten mit *P. falciparum* Malaria in Französisch Guayana eine stark (>20 Fold) erhöhte mittlere inhibitorische Konzentration von Arthemeter in *in vitro* Tests auf, die nicht bei anderen Anti-Malaria Präparaten nachweisbar war. Die genetische Sequenzierung von PfATP 6 ergab eine S769N Substitution die mit dem Anstieg der mittlere inhibitorische Konzentration assoziiert war. Das Auftreten dieser Resistenz gerade in französisch Guayana könnte mit der genetischen Komposition der Parasiten in Südamerika zusammen hängen, die sich in vielen Medikamenten Resistenz Allelen von der in Südostasien und Afrika unterscheidet. Um die Rolle der parasitären Antwort auf Artemisinine bei einer L263E Mutationen zu testen wurden mehrere Allel-Austausch Experimente durchgeführt. Krishna konnte bei Parasiten mit einer L263 Mutation eine Verzögerung der Artemisinin und Dihydroartemisinin Antwort nachweisen. Dabei zeigten die Mutanten höhere IC₅₀ Werte bei der Normalisierung mit Wild-Typ Kontrollen. Die Analyse dieser Daten dauert weiterhin an [141].

Die genaue Wirkungsweise von Artemisinin ist immer noch nicht vollständig verstanden. Doch sprechen die vorliegenden Studienergebnisse für PfATP6 als Zielstruktur. PfATP6 gehört zu den P-Typ ATPasen, die generell in bakteriellen und eukaryotischen Plasmamembranen und Organellen vorkommen und unter Energieaufwand in Plasmodien als Ca²⁺ Transporter des Endoplasmatischen Retiklums fungiert. Wenn man davon ausgeht, dass Artemisinin nur eine Zielstruktur hat, ist eine Entwicklung von multiple Resistenzen sehr wahrscheinlich. Erste Resistenzen konnten mittlerweile bereits verzeichnet werden und scheinen sich immer mehr auszubreiten. Mit Hilfe von bioinformatischen Methoden wurde von mir das Resistenzpotential von Artemisinen illustriert. Hierbei wurde die wahrscheinlichste Zielstruktur, der *P. falciparum* SERCA Transporter, in

den verschiedenen Plasmodien-Spezies analysiert und nach ähnlichen Domänen an anderen Stellen im *P. falciparum* Parasiten bzw. in anderen Spezies gefahndet. Vier Hauptfragen wurden im Rahmen der Analyse untersucht:

1. Wie ähnlich sind die SERCA Transporter in verschiedenen Plasmodien Spezies?
2. Wie sind die SERCA-Transporter in den verschiedenen Spezies verteilt?
3. Gibt es eventuell andere Zielstrukturen für Artemisinine (z.B. MDR Transporter, andere Proteine mit Artemisinin bindender Domäne) und wie sehen die aus?
4. Wie sehen die Strukturen der SERCAs für die einzelnen Spezies aus und wie ist die Verteilung Sensibilität modulierender Aminosäuren?.

Für die Plasmodien-Spezies *P. ovale* und *P. malariae* liegen keine ausreichenden Sequenzierungsdaten vor. Sie wurden deshalb in der nachfolgenden Analyse nicht berücksichtigt.

3.1.4 Ähnlichkeit der SERCA Transporter in verschiedenen Plasmodien Spezies

Die Aminosäure Sequenzen der SERCA Transporter der verschiedenen Plasmodienarten wurden von NCBI und PlasmoDB, der offiziellen Datenbank des „Malaria parasite genome project“ erhalten und mit Hilfe des Programms ClustalX analysiert. In dem phylogenetischen Stammbaum in Abbildung 9, ist die genetische Ähnlichkeit der verschiedenen SERCA Transporter dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die SERCA Transporter von *P. chabaudi*, *P. berghei* und *P. yoeli*, sowie die SERCA Transporter von *P. vivax* und *P. falciparum* ähnlich zueinander sind. Insgesamt sind die Transporter von *P. chabaudi* und *P. berghei*

ähnlicher zueinander als zu dem von *P. yoeli*. Die Transporter von *P. berghei*, *P. chabaudi* und *P. yoeli* sind ähnlicher zueinander als zu den SERCA Transportern von *P. falciparum* und *P. vivax* und nicht ähnlich zur der Drosophila Calcium ATPase.

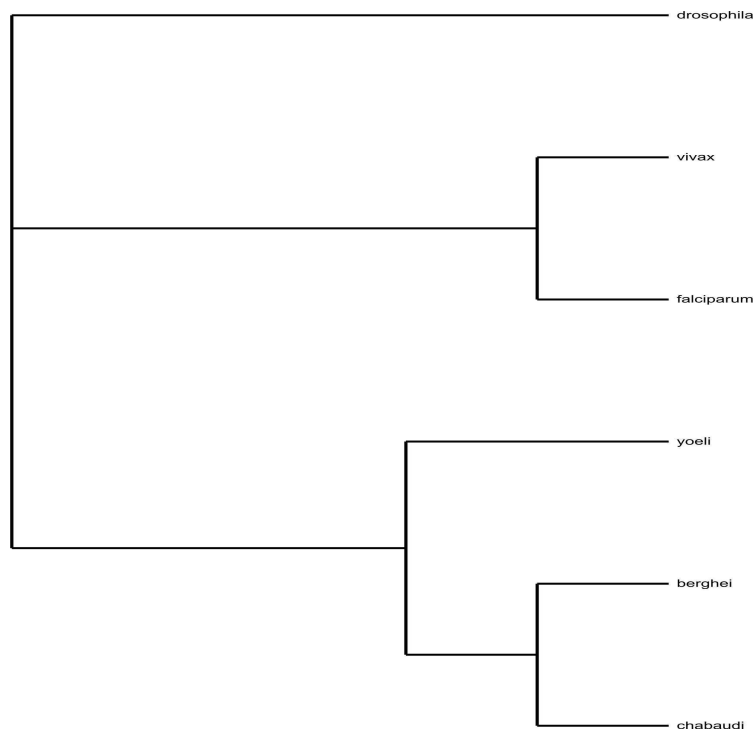


Abbildung 9: Phylogenetischer Stammbaum der SERCA Transporter verschiedener Plasmodien Spezies im Vergleich zu einer Calcium ATPase von Drosophila konstruiert mit dem Bootstrapping Verfahren. Bootstrap-Werte für *P. falciparum*: 0,34, *P. vivax*: 0,34, *P. berghei*: 0,30, *P. chabaudi*: 0,30, *P. yoeli yoeli*: 0,31, Drosophila: 0,61.

Die Domänen der SERCA Transporter wurden zunächst mit Domänen und Motiv-Datenbanken Pfam und SMART analysiert. Für den SERCA Transporter von *P. falciparum*, der von Gen PFA0310c in Chromosom 1 codiert wird, sowie für den SERCA Transporter von *P. berghei* ergaben sich 4 verschieden signifikante Domänen. Für den SERCA Transporter von *P. vivax*, *P. chabaudi chabaudi* und *P. yoeli yoeli* konnten 5 verschieden signifikante Domänen identifiziert werden. Die generelle

Funktion der einzelnen Domänen sind:

Kationen_ATPase:

Kationen ATPasen verfügen über eine konservierte N-terminal Region, die in verschiedenen Klassen von Kationen transportierenden P-Type ATPasen vorkommt, auch in denen, die H^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Na^+/K^+ , and H^+/K^+ transportieren. In den H^+/K^+ - und Na^+/K^+ -Austausch P-ATPasen ist diese Domäne in der katalysierenden alpha Kette zu finden. In gastralen H^+/K^+ -ATPasen unterliegt diese Domäne reversibler sequentieller Phosphorylierung sowie Konformationsänderungen, die für die Regulierung und die Funktion dieser ATPasen wichtig sein könnten.

E1-E2_ATPase:

P-Type (oder E1-E2-Type) ATPasen formen eine Superfamilie von Kationen transportierenden Enzymen, die in Prokaryoten und Eukaryoten vorkommen. Sie vermitteln den Membranfluß aller biologisch relevanten Kationen. Die Enzyme die während der ATP Hydrolyse einen Aspartylphosphate Zwischenprodukt bilden, können in vier verschiedene Hauptgruppen eingeteilt werden: (1) Ca^{2+} -transportierende ATPasen; (2) Na^+/K^+ - und gastrische H^+/K^+ -transportierende ATPases; (3) Plasmamembrane H^+ -transportierende ATPases (Protonpumpen) von Pflanzen, Pilzen und niederen Eukaryonten; und (4) alle bakteriellen P-type ATPasen, außer die Mg^{2+} - ATPase von *Salmonella typhimurium*, die eukaryotischen Sequenzen ähnlicher ist.

Hydrolase:

Diese Gruppe von Hydrolasen ist strukturell unterschiedlich von der alpha/betha Hydrolasen Familie (abhydrolase). Diese Gruppe schließt die L-2-Halosäure-Dehalogenase, Epoxid-Hydrolasen und Phosphatasen mit ein. Die Struktur von Hydrolasen besteht aus zwei Domänen. Eine ist ein eingefügtes vier Helix Bündel, welches die am wenigsten gut konservierte Region des Alignments zwischen den Resten 16 und 96 der Haloalkanonsäure-Dehalogenase I ist. Der Rest der Falte ist aus einer

alpha/beta-Kern Domäne zusammengesetzt.

Kationen-ATPase_C:

Kationen-ATPasen_C besitzen eine konservierte C-terminale Region, die in verschiedenen Klassen von Kation-transportierenden P-type ATPasen zu finden ist. Eingeschlossen sind hier auch H^+ transportierende- (EC 3.6.3.6), Na^+ (EC 3.6.3.7) transportierende-, Ca^{2+} transportierende- (EC 3.6.3.8), Na^+/K^+ transportierende- (EC 3.6.3.9), und H^+/K^+ (EC 3.6.3.10) transportierende ATPasen. In der H^+/K^+ - und Na^+/K^+ -Austausch P-ATPasen, ist diese Domäne in der katalysierenden alpha Kette lokalisiert. In Abbildung 10 sind diese Domänen dargestellt:

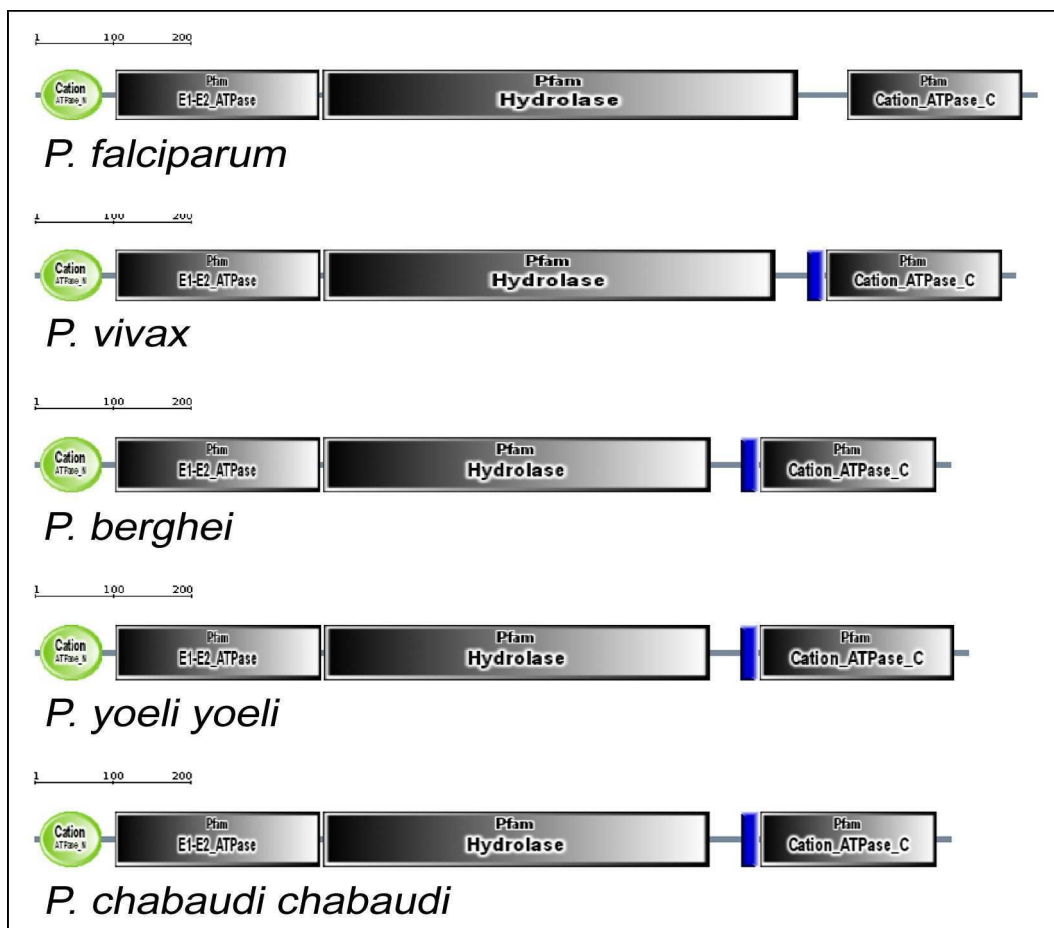


Abbildung 10: Verschiedene Domänen des SERCA Transporters unterschiedlicher Plasmodien-Spezies. Insgesamt sind die SERCAS der unterschiedlichen Spezies sehr ähnlich aufgebaut und verfügen über gleiche Domänen. Die Hydrolasen Domäne variiert in den unterschiedlichen Spezies in der Länge.

Es ist zu erkennen, dass die SERCA Transporter in den unterschiedlichen Plasmodien-Spezies über die gleichen funktionellen Domänen verfügen. Insgesamt sind sie relativ ähnlich. Die Ähnlichkeit der ATPase6 von *Plasmodium falciparum* zu den anderen graphisch dargestellten ATPasen der Plasmodien Spezies wurde durch Alignments analysiert und ist in folgender Tabelle dargestellt:

Organismus	Gen Identität	Funktion/Gen Produkt	Identität mit der eingegebenen Sequenz
<i>P. chabaudi chabaudi</i>	PCAS020540	Calcium-transportierende ATPase, putativ	456/546 (83%)
<i>P. berghei</i>	PB000675.00.0	Calcium-transportierende ATPase, putativ	453/546 (82%)
<i>P. vivax</i>	PVX_081455	Calcium-transportierende ATPase, putativ	405/611 (66%)
<i>P. yoelii yoelii</i>	PY05776	Calcium-translokalisierende P-Typ ATPase vom SERCA-Typ	330/457 (72%)

Tabelle 3: Ähnlichkeit der einzelnen ATPasen untereinander.

Es zeigt sich, dass die SERCAs der einzelnen Spezies insgesamt sehr ähnlich sind. Am ähnlichsten ist die SERCA von *P. chabaudi chabaudi* zu der von *P. falciparum*. Die SERCA des humanpathogenen *P. vivax* weist eine 66% Identität zur *P. falciparum* SERCA auf.

3.1.5 Iterativer Sequenzvergleich der Artemisinin bindenden Domäne

Um zu untersuchen ob die sakroendoplasmotische-Retikulum-Calcium-ATPase SERCA das einzige Zielprotein von Artemisininen ist, wurde durch iterativen Sequenzvergleich nach ähnlichen Aminosäuresequenzen in anderen Proteinen in verschiedenen Datenbanken gesucht. Hierbei konzentrierten wir uns auf die Artemisinin bindende Domäne (SERCA Domäne E1-E2). Exemplarisch sind die detaillierten Ergebnisse der Analyse mit Hilfe der Datenbank Uniprot im Anhang dargestellt.

Wie in der Beispielsuche im Anhang zu erkennen ist, wurden E1-E2-Domäne des ATP abhängigen sarkoendoplasmatischen Ca^{2+} Transporters SERCA nur in diesen ATPasen identifiziert. Generell sind ATPasen weit verbreitet und kommen auch in zahlreichen anderen Spezies vor. Interessanterweise kommen ähnliche Domänen auch in SERCA Transportern von Toxoplasmen vor, was eine Wirkung von Artemisinin auch auf Toxoplasmen vermuten lässt. Tatsächlich konnte eine Wirkung von Artemisinin auf Toxoplasmen *in vitro* und nach aktuellen Studienergebnissen auch *in vivo* im Mäusemodell nachgewiesen werden [142]. Als negativer Aspekt ist jedoch anzumerken, dass unsere bioinformatischen Ergebnisse die Theorie von Krishna und seinen Kollegen bestätigen, dass PfATP6 die einzige Zielstruktur von Artemisinen ist. Es besteht also somit eine hohe Gefahr von Resistenzentstehung und -ausbreitung. Gegen SERCA als einzige Zielstruktur sprechen neueste Studien aus Kambodscha, wo erste Resistenzen gegen Artemisinine auftraten. Diese Resistenzen scheinen nicht mit einzelnen PfATP6 Polymorphismen assoziiert zu sein. Hierzu sind jedoch weitere Studien nötig. Bisher konnte keine weitere eindeutige weitere Zielstruktur identifiziert werden. Bekannt ist außerdem, dass der „Multi drug resistance“ Transporter eine Rolle in der Entstehung von Artemisinin Resistenzen spielen könnte.

3.1.6 Alignment, Homologiemodellierung und Vergleich von verschiedenen die Sensibilität modulierender Aminosäuren der SERCA-Transporter von Plasmodien

Jung et al. (2005) konnten mit Hilfe von Homologiemodellierung und Docking Analysen *in silicio* zeigen, dass Artemisinin an spezifische Aminosäuren der E1-E2-ATPase Domäne bindet. Die LigandFit Docking und konsequenten LUDI Scores zeigten hierbei einen guten Zusammenhang mit *in vitro* Aktivitäten. Die Hauptbindungen zwischen Artemisinin und PfATP6 waren hydrophobe Wechselwirkungen und

biologisch relevante Peroxid Bindungen konnten außerhalb der Bindungstasche lokalisiert werden. Insbesondere konnte man zeigen, dass hydrophobe Wechselwirkungen mit den hydrophoben Resten von PfATP6 LEU263, ILE272 und PHE273 stark zur Bindung an die Seitenketten in der C-12 β -Position beitragen [143]. Zusätzliche Studien an *X. laevis* ergaben eine Aufhebung der Artemisinin Wirkung im Falle einer Punktmutation von L263E im SERCA Transporter (PfATP6). Daraus schloss man, dass eine einzige Aminosäure im Stande ist, die Sensitivität von SERCAs auf Artemisinin zu modulieren [140]. Um zu analysieren wie diese Aminosäuren in den verschiedenen Spezies verteilt sind wurden die SERCAs der verschiedenen Spezies in einem Alignment unter Nutzung der Software CLUSTALX analysiert [144]. Das Alignment ist in Abbildung 11 dargestellt. Insgesamt ist zu erkennen, dass die Aminosäuresequenzen der SERCAs der einzelnen Spezies bis zu Aminosäure (AS) 400 relativ konserviert sind. Die Sensibilität modulierende Aminosäuren sind in Tabelle 4 nochmals dargestellt.

Spezies	Aminosäure 263	Aminosäure 272	Aminosäure 273
<i>P. falciparum</i>	Leucin	Isoleucin	Phenylalanin
<i>P. vivax</i>	Alanin	Isoleucin	Phenylalanin
<i>P. berghei</i>	Serin	Isoleucin	Phenylalanin
<i>P. yoeli yoeli</i>	Serin	Isoleucin	Phenylalanin
<i>P. chabaudi</i>	Serin	Isoleucin	Phenylalanin

Tabelle 4: Sensibilität modulierende Aminosäuren in den verschiedenen Plasmodienspezies.

Man kann erkennen, dass die für die Bindung wichtigen Aminosäuren ILE272 und PHE273 in den verschiedenen Spezies gleich sind, LEU263 jedoch in den verschiedenen Spezies variiert. Von Aminosäure 40 bis zur Aminosäure 400 sind die SERCA der verschiedenen Plasmodien Spezies hoch konserviert. Eine Ausnahme bilden die Positionen 86-89, 200, 226, 263 und 293 der SERCA von *P. falciparum* und *P. vivax*. Es konnte gezeigt werden, dass ein Austausch von L263A bei *P. vivax* die Artemisinin Sensitivität erhöht (3 Fold), wohingegen ein Austausch von

3. Ergebnisse

L263S bei *P. berghei* die Sensitivität erniedrigt (3 Fold). Wie im Alignment gezeigt, ist *P. berghei* im Vergleich zu *P.vivax* zwischen den AS 40 bis 400 stärker konserviert. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die oben beschriebenen Ausnahmen der Konservierung dabei eine Rolle spielen.

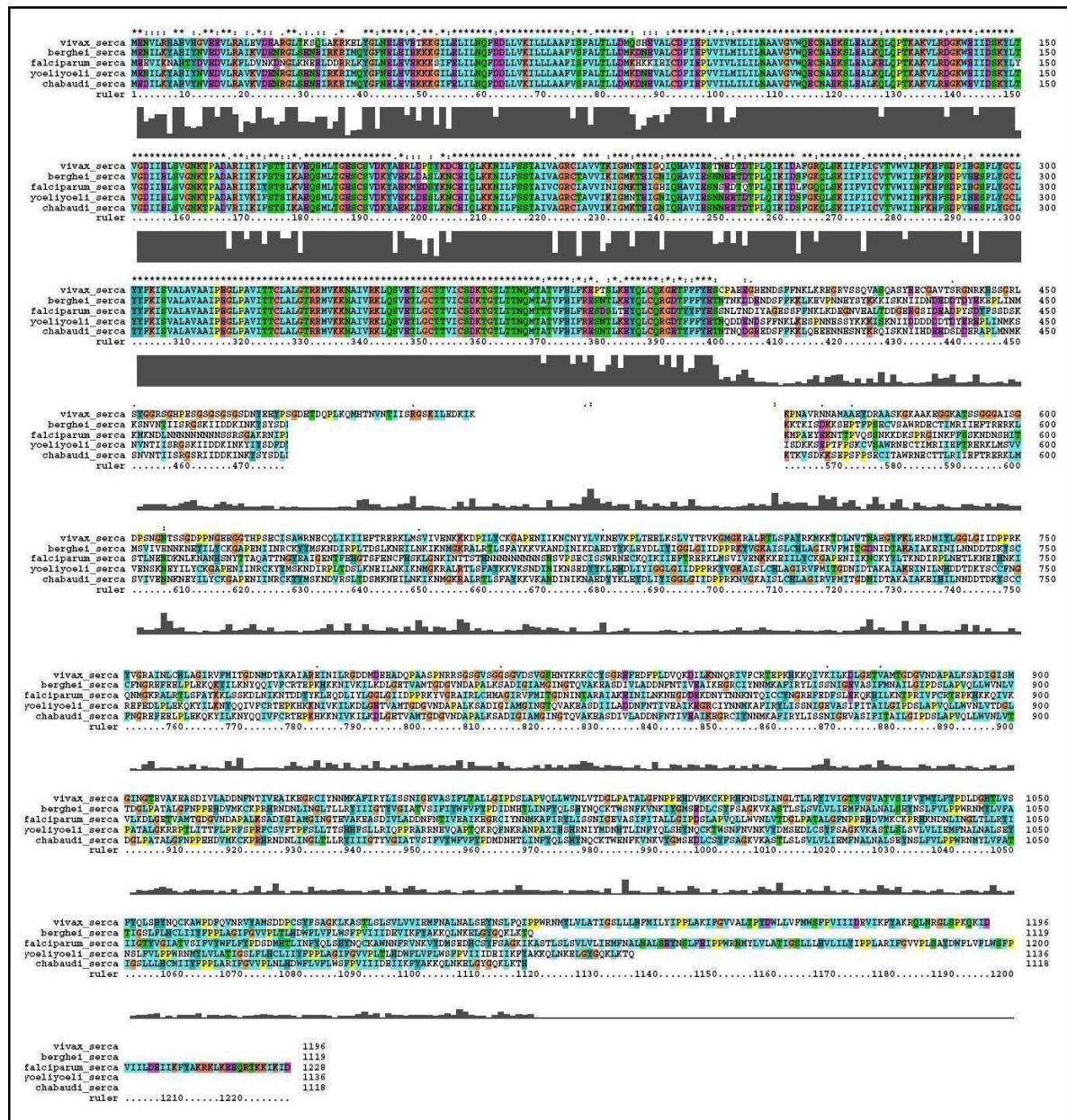


Abbildung 11: Alignment der SERCA-Transporter verschiedener Plasmodium Spezies mit Hilfe von CLUSTALX. Gleiche Aminosäuren sind in gleichen Farben dargestellt.

Zur Untersuchung der dreidimensionalen Struktur der SERCAs der verschiedenen Spezies wurde eine Homologiemodellierung durchgeführt und insbesondere die Lage der die Sensitivität modulierenden Aminosäuren betrachtet. Für die Homologiemodellierung von SERCA von *P. falciparum* und der anderen Plasmodien-Spezies wurde das 43.5% identische drei dimensionale Modell 1iwoA, eine Kaninchen Calcium ATPase, als Grundmodell benutzt. Die Modell Struktur ist festgelegt mit einer 3.1Å Auflösung und enthält den hoch spezifischen Inhibitor Thapsigargin. Die SERCA Transporter der verschiedenen Plasmodien-Spezies wurden mit SWISS-MODEL modelliert und untereinander verglichen. Hierfür wurden die Reste 7 bis 360 der ATPsen6 mit den Resten des Templates (1iwoA) gegenüber gestellt (56,62 % identische Reste). Die verschiedenen Domänen der modellierten Proteine wurden gefärbt, markiert und mit RASWIN (Sayle et al. 1995) in Abbildung 12 dargestellt. In den Homologiemodellierungen der verschiedenen SERCAs ist zu erkennen, dass genau am Übergang zwischen Membran und zytoplasmatischer Struktur die kritischen, für eine Resistenzentwicklung relevanten Reste lokalisiert sind und dass diese in in den verschiedenen SERCAs (wie bereits oben beschrieben) leicht variieren. Diese Strukturmodell Daten sowie die TP-Blast Daten unterstützen die These von Krishna und seinen Kollegen, die SERCA als die Hauptzielstruktur von Artemisinin ansehen. Die Gefahr von sich ausbreitenden Resistenzen erscheint somit sehr wahrscheinlich.

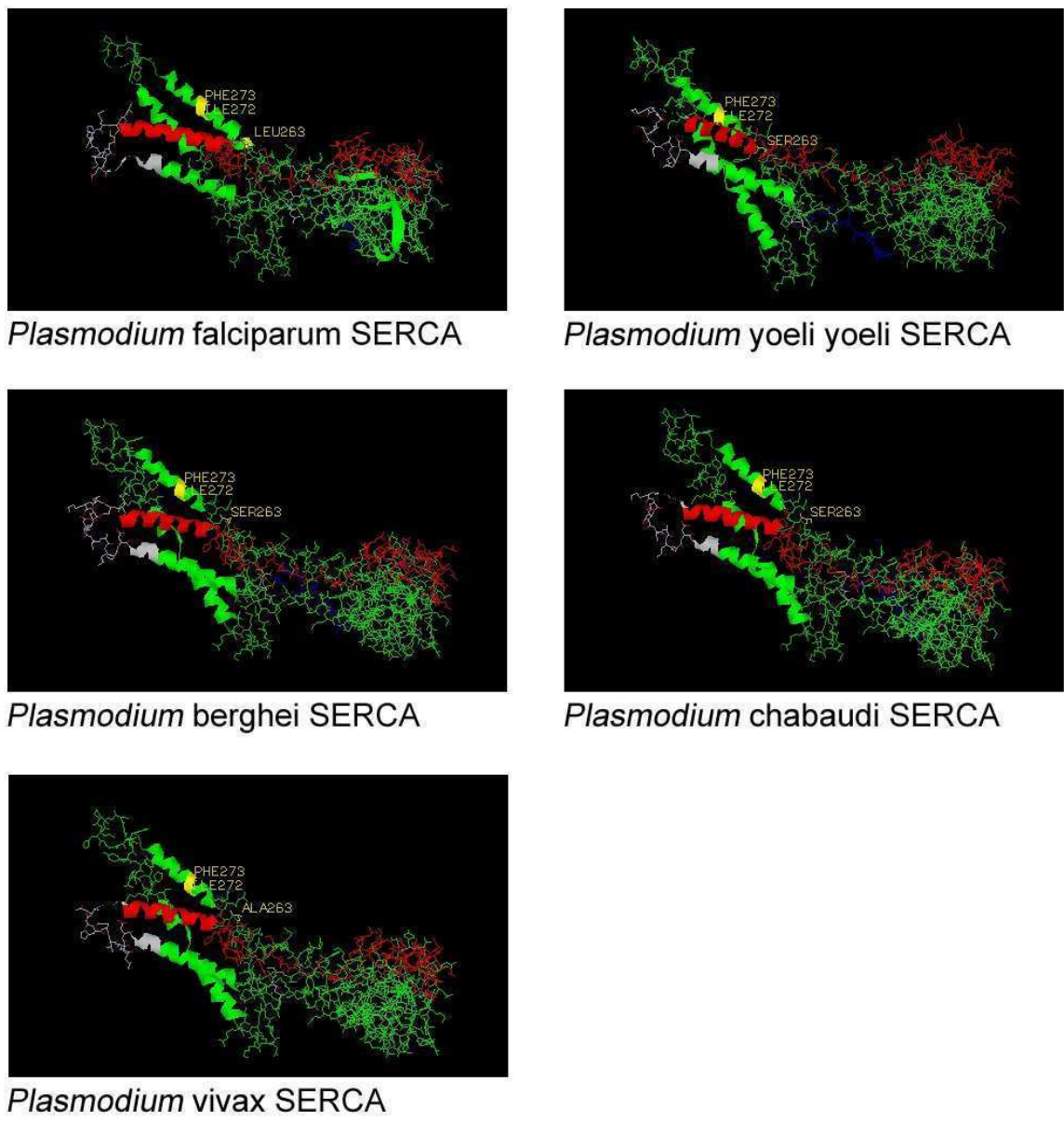


Abbildung 12: Dreidimensionale Struktur der SERCA-Transporter verschiedener Plasmodien-Spezies. Die Kationen-Domäne sind rot, die E1-E2-ATPase Domäne grün und die Hydrolase Domäne blau dargestellt. Die für die Bindung relevanten Aminosäuren sind mit gelb hervorgehoben. Die Betahelices in Cartoon repräsentiert die Transmembrandomäne. Die übrigen Reste sind in wire frame Darstellung zu sehen.

Es wäre interessant zu untersuchen, ob auch andere wenig konservierte Aminosäuren des SERCA Transporters, ähnlich wie L263 im Stande sind, die Sensibilität für Artemisinine zu modulieren. In der folgenden

Graphiken sind exemplarisch die wenig konservierten Aminosäuren 226 und 293 von *P. falciparum* und *P. vivax* dargestellt:

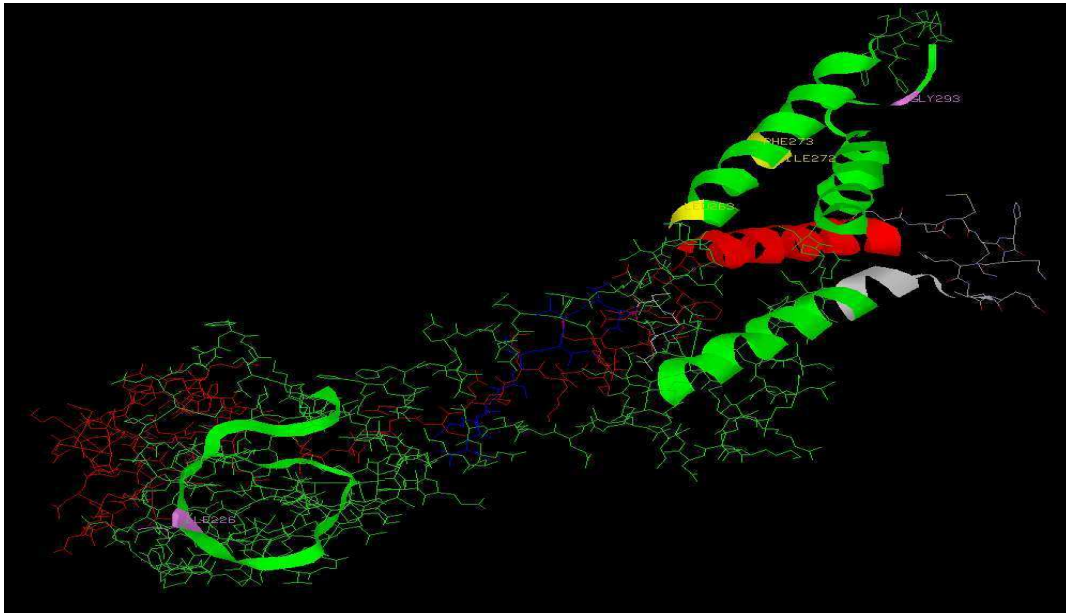


Abbildung 13: SERCA von *P. falciparum*. Aminosäuren 226 und 293 sind violett markiert. Restliche Darstellung wie in Abb. 12 beschrieben.

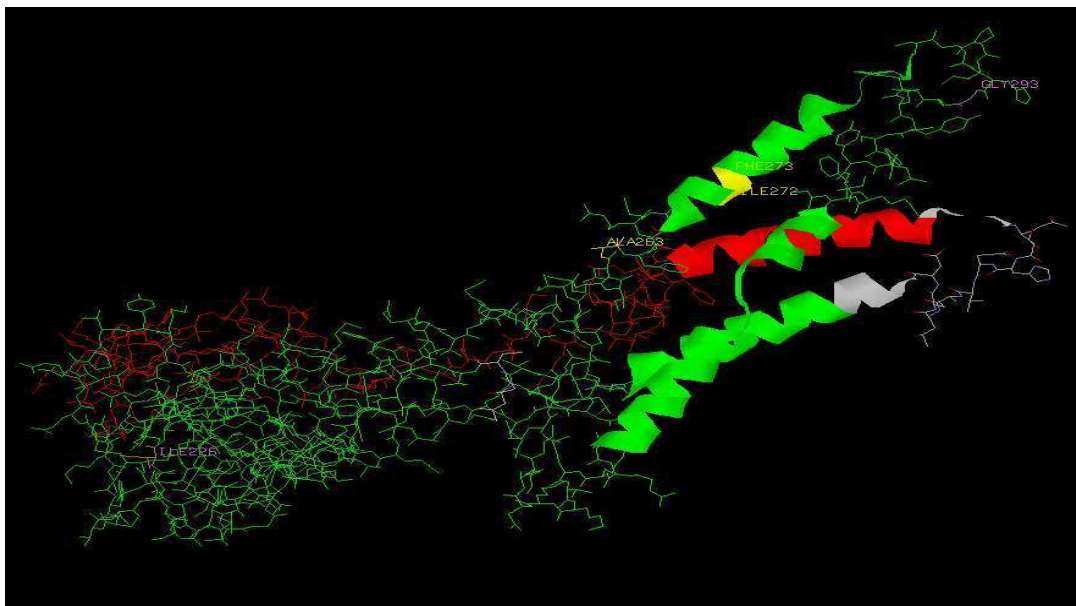


Abbildung 14: SERCA von *P. vivax*. Aminosäuren 226 und 293 sind violett markiert. Restliche Darstellung wie in Abb. 12 beschrieben.

Man kann in der räumlichen Modellierung von SERCA erkennen, dass die Aminosäure in Position 293 nahe der Bindungsstelle lokalisiert ist, wohingegen die Aminosäure in Positionen 226 räumlich entfernter von der Bindungsstelle liegt. Man könnte aus unserem Modell heraus annehmen, dass auch die Aminosäure in Position 293 im Stande ist die Sensibilität für Artemisinin zu modifizieren und in vivo Resistenzen verursachen könnten. Dies müsste jedoch in weiteren experimentellen Studien untersucht werden.

3.2 Modellierung des Einflusses von Methylenblau auf das Redoxstoffwechselnetzwerk von *P. falciparum*

3.2.1 Erstellung des Redoxnetzwerks

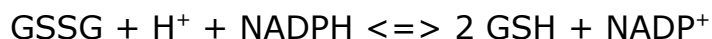
Die metabolische Netzwerkmodellierung beginnt mit der Erstellung des zu untersuchenden Netzwerkes. Hierzu sind die oben beschriebenen Enzym-Datenbanken nötig, die darüber Auskunft geben, welche Enzyme in welchem Teilnetzwerk eine Rolle spielen und welche Reaktionen durch die jeweiligen Enzyme katalysiert werden. Die Informationen zur Enzymfunktion wurden aus den oben aufgelisteten Datenbanken erhalten und durch Primärliteratur ergänzt bzw. überprüft.

Wie oben beschrieben besteht das Redoxstoffwechselnetzwerk von Plasmodien hauptsächlich aus einem Glutathion und einem Thioredoxinsystem, sowie daran assoziierte Enzyme. Die einzelnen Enzyme dieser Systeme, die in das erstellte Redoxnetzwerk integriert wurden, werden nachfolgend detailliert beschrieben.

3.2.1.1 Das Glutathion-System

Glutathionreduktase

Die Glutathionreduktase gehört zur Gruppe der Flavo-Disulfid-Oxidoreduktasen und reduziert mit Hilfe des Elektronendonors NADPH⁺ Glutathiondisulfid (GSSG) zu Glutathion nach folgender Reaktionsgleichung:



Das bei dieser Reaktion entstehende NADP⁺ wird mit Hilfe von Enzymen aus dem Pentosephosphatweg, der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase

und der 6-Phosphat-Glukonatdehydrogenase wieder zu NADPH^+ reduziert (Abbildung 15).

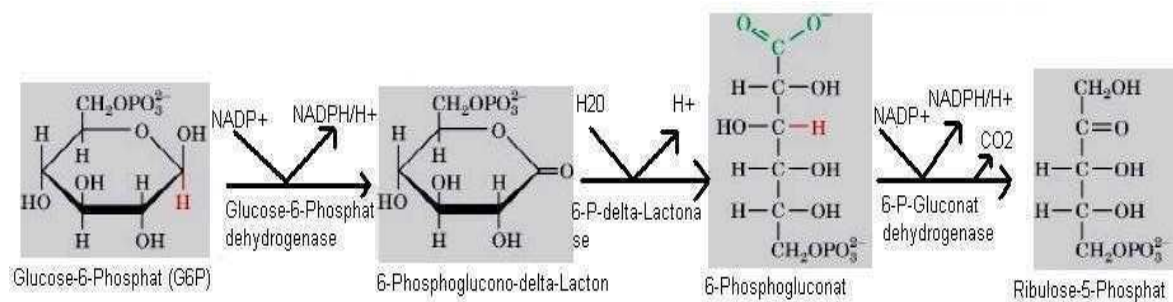


Abbildung 15: Ausschnitt aus dem Pentosephosphatzyklus (integriert in das modellierte Netzwerk).

Über die Glutathionreduktase von *P. falciparum* existieren zahlreiche biochemische und enzymkinetische Studien [145], [146], die als Basis für die Entwicklung von Inhibitoren dienen. Die Kristallstruktur der *P. falciparum* GR wurde gelöst und mit der Struktur des humanen Orthologs verglichen [147]. Obwohl sich die aktiven Zentren der beiden Enzyme nur geringfügig unterscheiden, konnten spezifische Merkmale charakterisiert werden, die als Ausgangspunkt für die Entwicklung *Plasmodium*-spezifischer Hemmstoffe genutzt werden [148], [149], [150].

Glutathionsynthese

Der Malaria Parasit ist zur de novo Synthese von Glutathion befähigt; die entsprechenden Gene konnten im Plasmodiengenom isoliert werden [64], [65]. Die Glutathionsynthese geht von L-Glutamat und L-Cystein aus, welche unter ATP Verbrauch und Katalyse durch das Enzym γ -Glutamyl-Cystein Synthetase (GCS, EC 6.3.2.2), zu γ -L-Glutamyl-L-Cystein umgesetzt werden. γ -L-Glutamyl-L-Cystein wird wiederum zusammen mit Glycin, aus der Hämoglobinverdauung bzw. aus dem Extrazellulärraum, unter ATP Verbrauch und Katalyse durch die Glutathion-Synthase (EC 6.3.2.3) zu dem Tripeptid γ -L-Glutamyl-L-Cystein-Gycin, dem so genannten Glutathion, umgesetzt (Abbildung 16).

Hierbei katalysiert die GCS die schrittmachende Reaktion. Spezifische Inhibitoren der GCS, wie beispielsweise D/L-Buthionin-S, R-Sulphoximin, sind in der Lage den Malaria Parasiten zu töten. Hierbei kommt es zu einer Ausschöpfung des zellulären Glutathion Vorrates, wobei die Hälfte des zellulären Glutathion Vorrates innerhalb von zwei Stunden verloren geht und somit das GSH/GSSG Verhältnis nicht aufrecht erhalten werden kann [63], [52], [64], [151] Für Malaria Parasiten ist also eine Glutathion de novo Synthese essentiell überlebenswichtig.

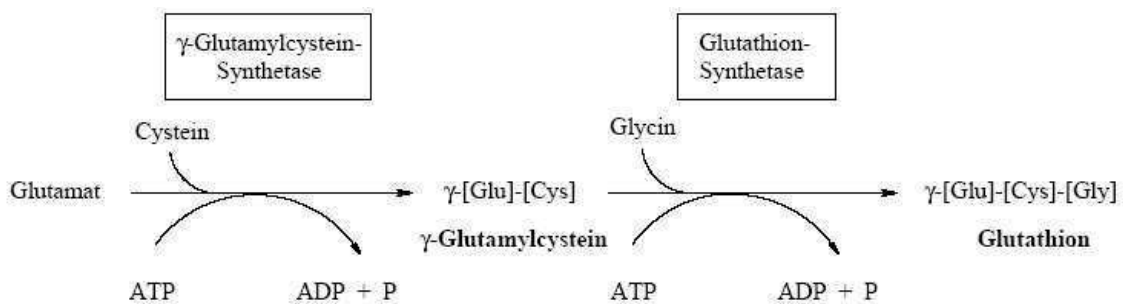


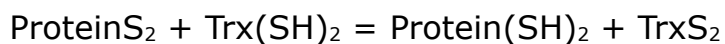
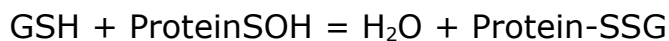
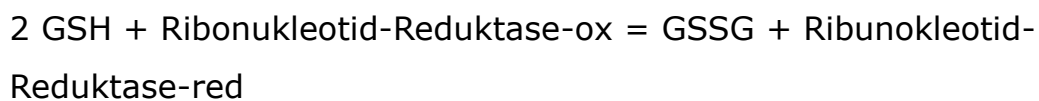
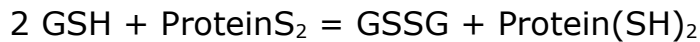
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Biosynthese von Glutathion.

Glutaredoxin

Das hitzestabile Dithiol-Disulfid Glutaredoxin gehört zur Familie der Oxidoreduktasen und wird strukturell der Thioredoxin Superfamilie zugeordnet. Im aktiven Zentrum hat Glutaredoxin eine typische CPYC Redoxdomäne mit zwei Cystein Resten, welche Glutaredoxinen ermöglicht Sulphydryl-Gruppen haltige Proteine zu reduzieren bzw. zu oxidieren. Glutaredoxin schützt Zellen vor oxidativem Stress [152] und ist höchstwahrscheinlich maßgeblich an der Kontrolle von Transkription und Apoptose beteiligt [153], [154]. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Glutaredoxin direkt als Glutathionperoxidase agieren kann und die S-Glutathionylation von Proteinen durch GSSG katalysiert [155]. Des Weiteren ist Glutaredoxin zusammen mit Dihydrolipoamiden in der Lage, GSSG NADPH unabhängig zu reduzieren [156]. Glutaredoxin von Plasmodien weist ebenfalls Glutathion abhängige Glutaredoxin

Eigenschaften auf: Es reduziert das vermutlich für Plasmodien einzigartige Plasmoredoxin, ein weiteres Mitglied der Thioredoxin Familie, sowie die Ribonukleotid Reduktase, vermutlich als wichtigster Reduzent [157], [57], [158].

Folgende Reaktionen werden durch Glutaredoxine katalysiert:

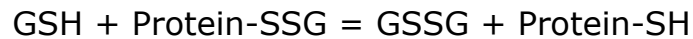


Glutaredoxin ähnliche Proteine

Neben den klassischen Glutaredoxinen wurden in Plasmodien auch Glutathion ähnliche Proteine (PfGLP-1;2;3) identifiziert, die im Vergleich zu den klassischen Glutaredoxinen nur einen Cysteinrest im aktiven Zentrum besitzen (PxCG/AFS/P) [159], [160]. Wahrscheinlich interagieren sie, wie für humane Glutaredoxin ähnliche Proteine nachgewiesen, mit Protein Kinase C und werden deswegen auch PICOT Proteine (Protein kinase C interacting cousin of thioredoxin) genannt [161]. Sie besitzen eine PICOT Homologie Domäne, die bereits in Bakterien, Parasiten, höher und einzelligen Eukaryoten sowie in Pflanzen identifiziert wurde [162].

Die genaue Funktion dieser Enzyme ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Man nimmt an, dass sie in die Synthese von Fe/S Cluster Proteine und in die Deglutathionylation von Proteinen involviert sind [163], [164]. Die durch Glutaredoxin ähnliche Proteine höchstwahrscheinlich katalysierten

Reaktionen können durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben werden:



Glyoxalasen:

Das parasitäre Glyoxalase-System besteht aus Glyoxalase I (Lactoylglutathion-Lyase), Glyoxalase II (Hydroxyacylglutathion-Hydrolase) und dem Koenzym Glutathion, was toxische 2-Oxoaldehyde wie Methylglyoxal in nicht toxische 2-Hydroxycarboxylsäuren wie D-Lactat umsetzt. Hierbei katalysiert Glyoxalase I die Bildung von S-2-Hydroxyacylglutathion, einem Thioester von Glutathion. Glyoxalase II hydrolysiert diesen wiederum zu Glutathion und freier 2-Hydroxycarboxylsäure [57]. 2-Oxoaldehyde reagieren mit Guanin-Resten in DNA und RNA, sowie mit Cystein-, Lysin- und Arginin-Resten in Proteinen. Die Veränderungen der DNA induzieren Mutagenese und Apoptose, während Proteinveränderungen zum Proteinabbau und zur Aktivierung einer Zytokin vermittelten Immunantwort führt [165]. Zu den natürlichen Substraten des Glyoxalase-Systems zählen Glyoxal und Methylglyoxal [166].

Folgende Reaktionen werden durch Glyoxalasen katalysiert:



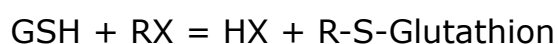
Malaria infizierte Erythrozyten sind im Vergleich zu nicht infizierten Erythrozyten einem höheren Anfall von Methylglyoxal ausgesetzt. Dieses entsteht durch eine nicht enzymatische Konversion von Triose Phosphaten, die während der Glykolyse gebildet werden. Es konnte eine um 100-fach gesteigerte Glykolyseaktivität von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten im Vergleich zu nicht infizierten Blutzellen nachgewiesen

werden. Dies lässt sich durch das Fehlen eines Zitronensäurezyklus und einer verminderten Elektronen Transportkapazität in der Atmungskette erklären. Es konnte gezeigt werden, dass in Malaria infizierten Erythrozyten die D-Laktat-Bildung aus Methylglyoxal um den Faktor 30 gesteigert ist [166] und dass die Aktivität von Glyoxalasen im Vergleich zu nicht infizierten Erythrozyten stark erhöht ist [167].

Glutathion-S-Transferase

Glutathion-S-transferase (GST) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, welches klassischerweise chemischer Noxen, wie beispielsweise pharmakologisch aktive Moleküle und Beiprodukte des oxidativen Stresses, durch Konjugation an Glutathion entgiftet. Ferner fungiert GST als Ligand (Carrier Protein) verschiedener organischer Moleküle, die zur Inaktivierung und Immobilisierung von Lipid-Peroxidations-Produkten führen und diese somit entgiften [152], [168]. Glutathion-S-Transferase Aktivität konnte für Malaria Parasiten nachgewiesen werden, die im Vergleich zu vielen anderen Organismen nur eine GST besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass in Chloroquin resistenten Malaria Parasiten die GST Aktivität direkt positiv vom Medikamenten Druck abhängt [169]. Die Hauptrolle dieses Enzym besteht in der Konjugation seines Substrates Glutathion an verschiedenste toxische Substanzen, um diese für den Zellexport vorzubereiten. GST ist somit direkt an der Entgiftung elektrophiler Verbindungen beteiligt [57]. Ebenfalls geht man davon aus, dass GST als effizienter *in vivo* Puffer des parasitotoxischen Hämins fungiert, welches nicht kompetitiv an GST bindet [170]. Man konnte ferner eine geringe GSH abhängige Alkylhydroxid-Peroxidase Aktivität der GST nachweisen [170].

Im Allgemeinen kann man die von Glutathion-S-Transferase katalysierten Reaktionen mit folgender Reaktionsgleichung beschreiben:



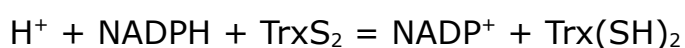
3.2.1.2 Das Thioredoxin-System

Neben einem funktionierenden Glutathion-Redoxsystem, besitzen Plasmodien ein Thioredoxin-Redoxsystem, welches aus dem Elektronendonator NADH, dem Flavoprotein Thioredoxinreduktase, dem Substrat Thioredoxin und Thioredoxin abhängigen Peroxidasen besteht. Im Folgenden werden die Bestandteile des Thioredoxin-Systems im Einzelnen beschrieben:

Thioredoxinreduktase

Die Thioredoxinreduktase (TrxR) ist ähnlich wie die Glutathionreduktase eine NADPH abhängige Disulfid-Oxidoreduktase, die FAD als Kofaktor benutzt [171]. Bei Redox-Reaktionen katalysiert sie im Allgemeinen den Elektronentransfer zwischen Pyridinnukleotiden (z.B. NADPH) und Disulfidsubstraten (z.B. Thioredoxin). Im Gegensatz zur Glutathionreduktase, die spezifisch Glutathiondisulfid reduziert, ist die Thioredoxinreduktase im Stande ein breites Spektrum von Substraten, einschließlich niedermolekulare Verbindungen und Proteine zu reduzieren. Interessanterweise wird Glutathiondisulfid nicht als Substrat akzeptiert, weshalb man annimmt, dass das Glutathion- und das Thioredoxin-System unabhängig voneinander agieren [172]. Im Unterschied zu der menschlichen Thioredoxinreduktase ist die Thioredoxinreduktase von Plasmodien nicht Selen abhängig und unterscheidet sich im aktiven Zentrum von der Humanen. Diese Besonderheit macht die parasitäre TrxR als vielversprechenden neuen Medikamentenansatz attraktiv [173], [174]. Knock-out Studien konnte eine essentielle Funktion der Thioredoxinreduktase für die erythrozytären Stadien von Plasmodium belegen [175].

Folgende Reaktion wird durch Thioredoxinreduktase katalysiert:

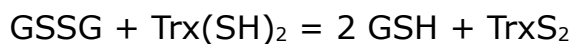
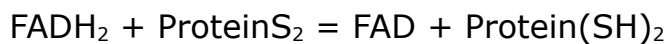


Thioredoxin

Thioredoxine sind, wie Glutathion, redox aktive Proteine, die eine wichtige Rolle in der antioxidativen Verteidigung spielen und von der Thioredoxinreduktase reduziert werden. Sie sind an der Entgiftung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Metabolite involviert, kontrollieren Proteinfaltung, übertragen Elektronen auf die Ribonukleotidreduktase und tragen zur Redox-Regulierung von Enzymen (Peroxidasen) und Transkriptionsfaktoren bei [176]. Für *P. falciparum* wurde ein klassisches Thioredoxin charakterisiert, dass interessanterweise eine höher Affinität zur humanen Thioredoxinreduktase als zur parasitären aufweist [176]. Dies lässt auf eine Interaktion zwischen parasitärem und Wirts-Thioredoxinsystem schließen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Thioredoxine im Stande sind Glutathiondisulfid nicht enzymatisch zu reduzieren. In Anwesenheit von NADPH und Pf Thioredoxinreduktase, fungiert Thioredoxin als Elektronenshuttel zwischen reduzierter Thioredoxinreduktase und Glutathiondisulfid [172].

Neben dem klassischen Thioredoxinen wurden in *Plasmodium falciparum* drei Thioredoxin like Proteine gefunden, deren genaue Charakterisierung noch aussteht [157].

Die von Thioredoxin katalysierten Reaktionen können durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben werden:



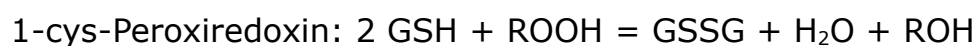
Thioredoxin abhängige Peroxidase und Peroxiredoxine

In die Proteinfamilie der Peroxidasen, zu denen auch die Peroxiredoxine gehören, unterscheidet man drei Untergruppen je nach Cystein-Rest im aktiven Zentrum: typische 2-cys-Peroxiredoxine, atypische 2-cys-Peroxiredoxine und 1-cys-Peroxiredoxin [177]. Peroxiredoxine katalysieren als antioxidative Enzyme, die Umwandlung von

Wasserstoffperoxid und Alkyl-Hydroperoxid in Wasser und in den jeweils korrespondierenden Alkohol unter Verbrauch von reduziertem Thioredoxin [178]. Peroxiredoxine können ihrerseits, je nach konservierten Cystein Motiven, nochmal in zwei Subgruppen unterteilt werden: 1-Cys-Peroxiredoxine und 2-Cys-Peroxiredoxine. Plasmodien besitzen drei Gene, die für Peroxiredoxine codieren, zwei davon für typische 2-cys-Peroxiredoxine und eins für 1-cys-Peroxiredoxin [177], [179]. Eines der zwei typischen 2-cys-Peroxiredoxinen ist mitochondrial, wohingegen die anderen beiden Proteine im Cytosol vorkommen. Dies lässt auf einen funktionierenden cytosolen und mitochondrialen Thioredoxinredoxzyklus der Plasmodien schließen. Die im Zytosol vorkommende 2-Cys-Peroxiredoxine verwenden von Thioredoxin bereitgestellte Elektronen, weshalb sie auch als Thioredoxin-Peroxidasen bezeichnet werden. 2-cys-Peroxiredoxine können Wasserstoffperoxide in vitro reduzieren, was auf eine Wasserstoffperoxid Peroxidase Aktivität in vivo schließen lässt [180]. 1-cys-Peroxiredoxin scheint eine ähnliche Rolle im Thioredoxinsystem einzunehmen. Es ist für die Peroxidation von Wasserstoffperoxid und organischen Hydroperoxiden verantwortlich und akzeptiert Glutathion als Kofaktor. Es wurde allerdings auch ein zu 92% identisches Protein beschrieben, welches Thioredoxin als Kofaktor verwendet. In Anbetracht des Fehlens einer Glutathion Peroxidase und Katalase scheinen die beschriebenen Peroxidasen eine sehr wichtige Rolle für die Reduktion von ROS einzunehmen.

Zusätzlich zu Peroxiredoxinen besitzen Plasmodien Glutathionperoxidase-ähnliche-Proteine, die durch Peroxidase Eigenschaften charakterisiert sind und Thioredoxin als Kofaktor verwenden [181].

Folgende Reaktionen werden durch die beschriebenen Enzyme katalysiert:



2-cys-Peroxiredoxin: $\text{ROOH} + \text{Trx}(\text{SH})_2 = \text{H}_2\text{O} + \text{ROH} + \text{TrxS}_2$

Glutathionperoxidase-ähnliche-Tpx: $2 \text{ROOH} + \text{Trx}(\text{SH})_2 = 2 \text{H}_2\text{O} + \text{ROH} + \text{TrxS}_2$

3.2.1.3 Weitere Redox Enzyme

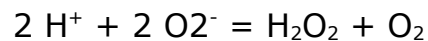
Plasmoredoxin

Plasmoredoxin ist ein hoch konserviertes redox-aktives Protein, was der Thioredoxin Superfamilie angehört. Nach derzeitigen Kenntnissen scheint dieses Protein exklusiv in Malaria Parasiten vorzukommen und über eine einzigartige WCKYC-Sequenz im aktiven Zentrum zu verfügen. Ebenso wie Thioredoxin und Glutaredoxin kann Plasmoredoxin als Elektronendonator für Ribonukleotidreduktase fungieren. Plasmoredoxin selbst kann weder von der Glutathionreduktase, noch von der Thioredoxinreduktase, jedoch sowohl von Trx als auch von GSH und Glutaredoxin reduziert werden [57]. Hierdurch ergibt sich eine weitere Verbindung zwischen den Glutathion- und Thioredoxin-Systemen. Außerdem wurde gezeigt, dass Plasmoredoxin, die Thioredoxin Peroxidase 1 reduziert [182]. Das für Plasmoredoxin codierende Gen von *Plasmodium berghei* konnte identifiziert werden. Knock out Studien haben jedoch gezeigt, dass dieses Protein nicht essentiell für Plasmodien zu sein scheint. In knock out Parasiten konnte keine spezifische phänotypische Veränderung festgestellt werden [183].

Superoxid-Dismutasen

Die Aktivität von Superoxid-Dismutasen (SOD) steigt nachweislich während der *Plasmodium falciparum* Infektion. Plasmodien besitzen zwei verschiedene Gene, die für Superoxid-Dismutasen codieren. Eine ist eisenhaltig und kommt im Zytosol vor, während die andere Mangan enthält und in Mitochondrien vorkommt. Die Transkription dieser beiden Gene zeigt ein Maximum im Trophozoitenstadium [184]. Des Weiteren

scheint es möglich, dass der Parasit auch die Superoxiddismutase des Wirts benutzt [185] [186]. Bei der Entgiftung von ROS scheint dieses Wirtsenzym jedoch nur eine unbedeutende Rolle zu spielen, da der saure pH der Organelle anscheinend entscheidend zur spontanen Dismutation von Superoxid Anion beiträgt [187]. Die mitochondriale SOD entgiftet Superoxid Anionen, die während der Atmungskette entstehen [188]. Folgende Reaktion wird durch Superoxiddismutasen katalysiert:



Ribonukleotid-Reduktasen

Ribonukleotid-Reduktasen katalysieren die Desoxygenierung von Ribose-Ringen zu 2'-Desoxyribose in Nukleotiden und ermöglichen dadurch den ersten Schritt der DNA-Biosynthese. Die erforderlichen Elektronen werden von Dithiolen, wie z. B. Thioredoxin bereit gestellt. Die von den Ribonukleotidreduktasen katalysierten Reaktionen können durch folgende Reaktionsgleichungen beschrieben werden:

2-Desoxyribonukleosid-Diphosphat + H₂O + Ribonukleotid-Reduktase-ox + Thioredoxindisulfid = Ribonukleotid-Reduktase-red + Thioredoxin + Ribonukleosid-Disphosphat

H₂O + Ribonukleotid-Reduktase-ox + Thioredoxindisulfid + dADP = ADP + Ribonukleotid-Reduktase-red + Thioredoxin

H₂O + Ribonukleotid-Reduktase-ox + Thioredoxindisulfid + dUDP = Ribonukleotid-Reduktase-red + Thioredoxin + UDP

H₂O + Ribonukleotid-Reduktase-ox + Thioredoxindisulfid + dGDP = GDP + Ribonucleotid-Reduktase-red + Thioredoxin

H₂O + Ribonukleotid-Reduktase-ox + Thioredoxindisulfid + dCDP = CDP + Ribonukleotid-Reduktase-red + Thioredoxin.

In das modellierte Redoxstoffwecheslnetzwerk wurden die energieliefernden Stoffwechselwege Pentosephosphatweg (Abbildung

17) und Glykolyse (Abbildung 18) integriert. Die Reaktionen des Pentose-Phosphatzyklus, der der NADPH Bereitstellung dient und der Glykolyse, bei der ATP und NADH gewonnen wird, sind in folgenden Graphiken dargestellt:

Pentose Phosphate Cycle

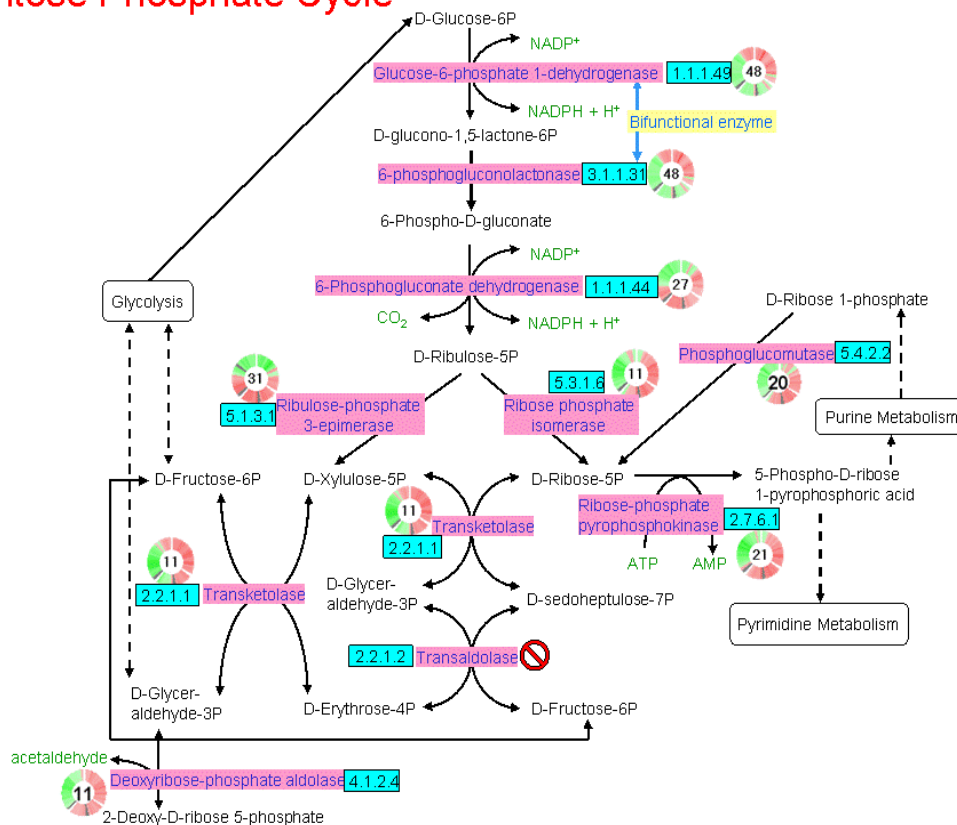


Abbildung 17: Pentosephosphat-Zyklus von *Plasmodium falciparum*. Er dient der Bereitstellung von Redox-Äquivalenten in Form von NADPH, die beispielsweise für die Reduktion von Thiodisulfiden benötigt werden. Des Weiteren dient der Pentosephosphat-Zyklus der Generation von Pentosephosphaten zur Nukleotidsynthese. Quelle: Ginsburg, Hagai. "Malaria Parasite Metabolic Pathways" <http://sites.huji.ac.il/malaria/>, freigegeben.

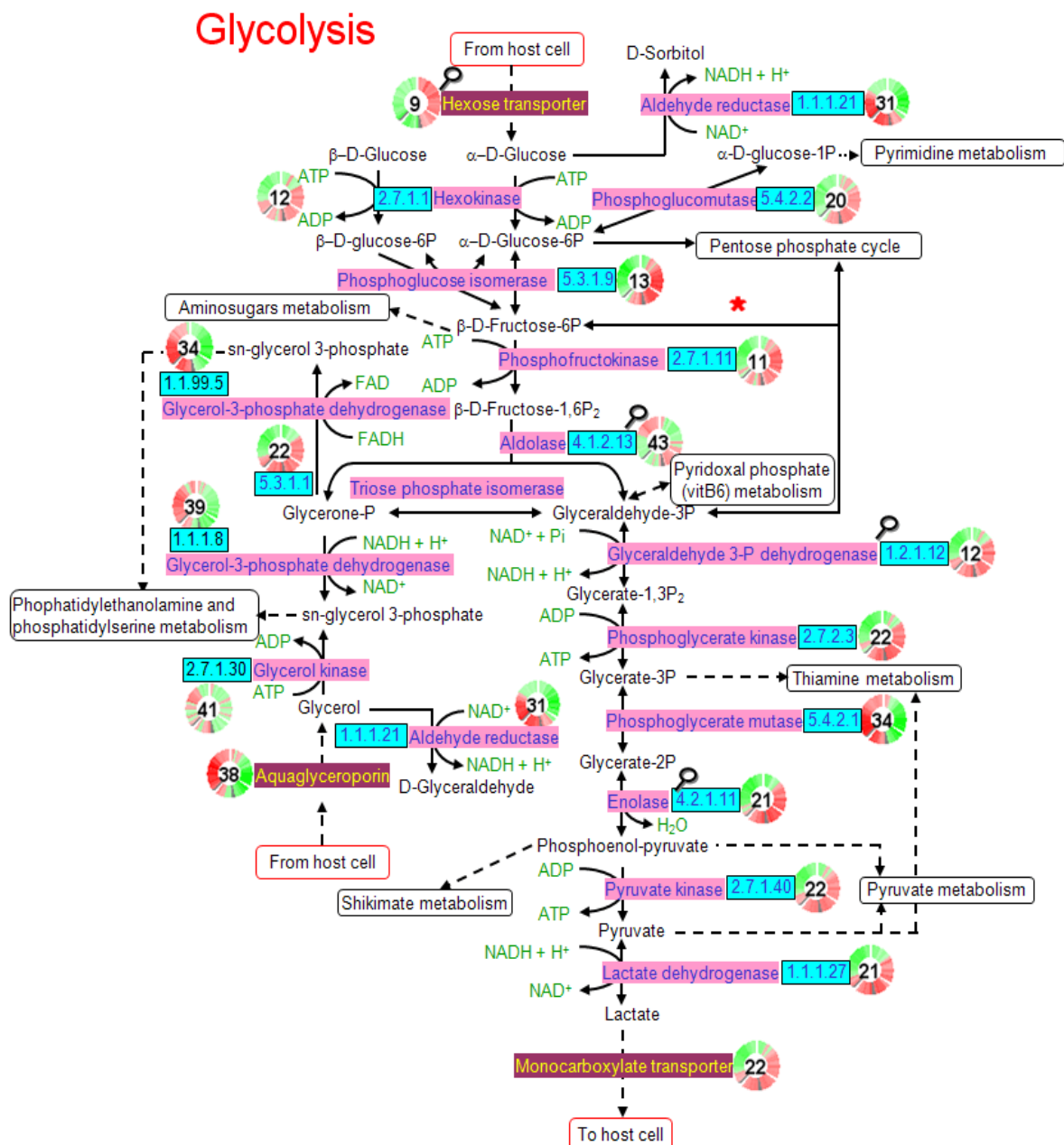


Abbildung 18: Glykolyse von *Plasmodium falciparum*. Sie kann in zwei Phasen eingeteilt werden: Die erste Phase ist eine Vorbereitungsphase, bei der zunächst Energie in Form von ATP investiert wird. Sie resultiert in der Spaltung der Hexose D-Glucose in zwei Triosephosphate. In der zweiten Phase werden zwei Moleküle G3P über mehrere Zwischenschritte in zwei Moleküle Pyruvat umgesetzt. Dabei werden zwei Moleküle NADH sowie vier Moleküle ATP generiert. Diese Phase liefert somit Energie und Reduktionsäquivalente in Form von NADH. Quelle: Ginsburg, Hagai. "Malaria Parasite Metabolic Pathways" <http://sites.huji.ac.il/malaria/>, freigegeben.

Der gesamte Redoxstoffwechsel-Metabolismus von *Plasmodium falciparum* ist in folgendem Schema dargestellt. Die hier dargestellten Reaktionen wurde in das modellierte Netzwerk integriert.

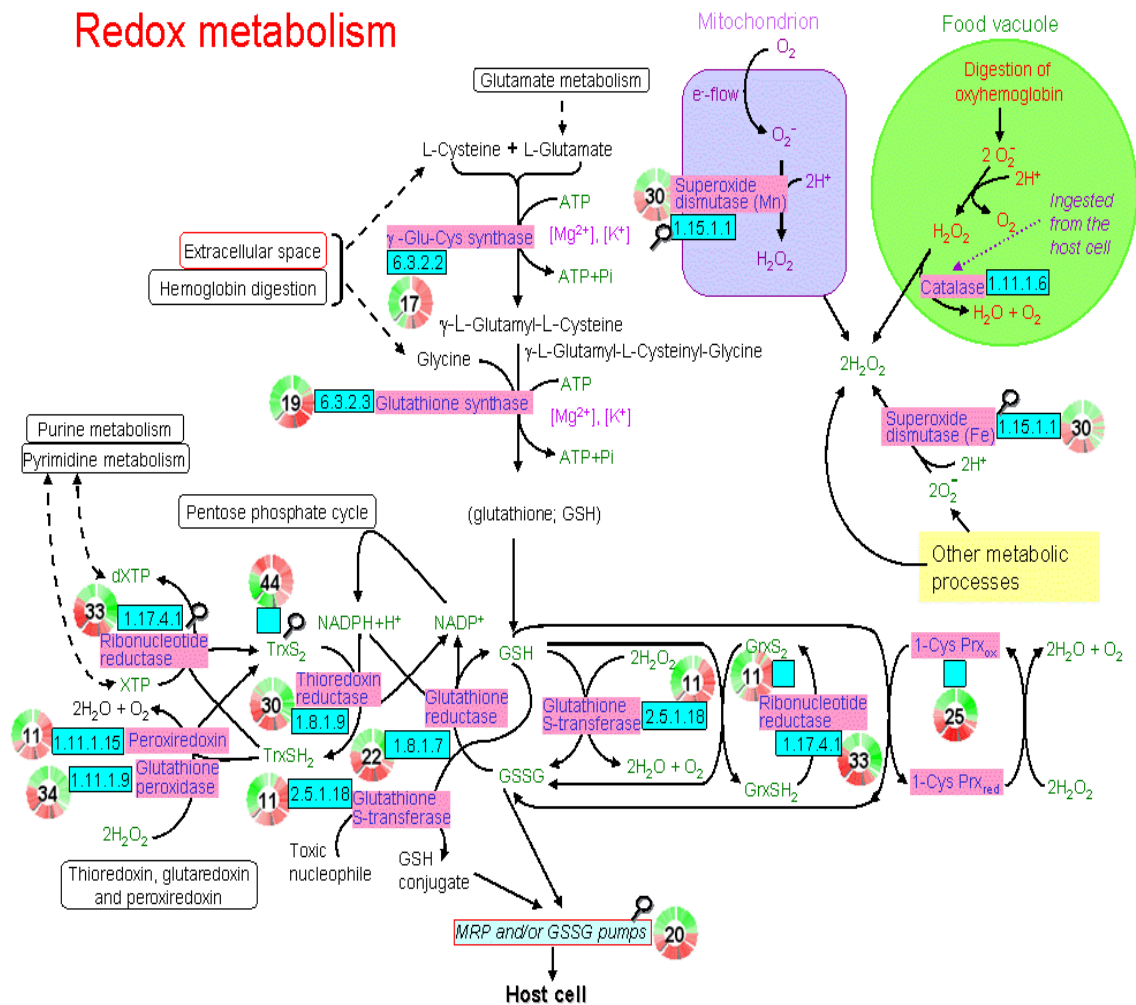


Abbildung 19: Redoxstoffwechsel von *Plasmodium falciparum*. Quelle: Ginsburg, Hagai. "Malaria Parasite Metabolic Pathways", <http://sites.huji.ac.il/malaria/>, freigegeben.

3.2.2 Metabolische Netzwerkanalyse

Die extreme Pathway (EP) Berechnung wurde zur Analyse des Plasmodien spezifischen Redoxnetzwerks mit allen integrierten Stoffwechselwegen genutzt. Hierzu wurde eine stöchiometrische Matrix (S: r·m) erstellt. Spalten und Zeilen korrespondieren hierbei mit den Enzymen im Netzwerk und den beteiligten internen Metaboliten (im Netzwerk produzierte oder verbrauchte Metabolite). Alle internen Metaboliten müssen hierbei im Gleichgewicht sein, was durch eine Kombination verschiedener enzymatischer Reaktionen erreicht wird, die eine Ansammlung oder einen Verbrauch interner Metabolite über die Zeit verhindern. Hier gilt die Gleichung: $S \cdot v = 0$. Hierbei ist v der Vektor mit dem Flusskoeffizienten der Reaktionen. Bezogen auf die extreme Pathway Berechnung, wurde eine Nullsummen Matrix berechnet, die in der Lage ist die Gleichung zu erfüllen. Die dargestellten und oben beschriebenen Reaktionen wurden in Yana integriert, um das Redoxstoffwechselnetzwerk von *P. falciparum* zu generieren. Die Integration wurde ergänzt durch KEGG, oben beschriebenen Enzymdatenbanken und mit Hilfe von Literatur. In Abbildung 20 ist das modellierte Redoxstoffwechselnetzwerk gezeigt. In dem dargestellten Netzwerk ist die Aktivität aller Enzyme gleich gewichtet.

Zur Netzwerkanalyse wurde das oben beschriebene Redoxstoffwechselnetzwerk mit Yana analysiert [113]. Hierzu wurden aus der Transkriptions Datenbank erhaltende mRNA Transkriptionsdaten 25h nach Invasion in den Erythrozyten (Malariaparasit im Trophozoitenstadium) verwendet und auf die Enzym Expression bzw. hiervon auf die Enzym Aktivitäten geschlossen. Dies ist natürlich eine starke Vereinfachung, da Enzym Aktivität u.a. allosterisch, durch mRNA Stabilität und durch Translationsregulationsmechanismen moduliert wird. Ohne Genexpressionsraten sind alle Pathways folglich gleich gewichtet (flux=1) Abbildung 20.

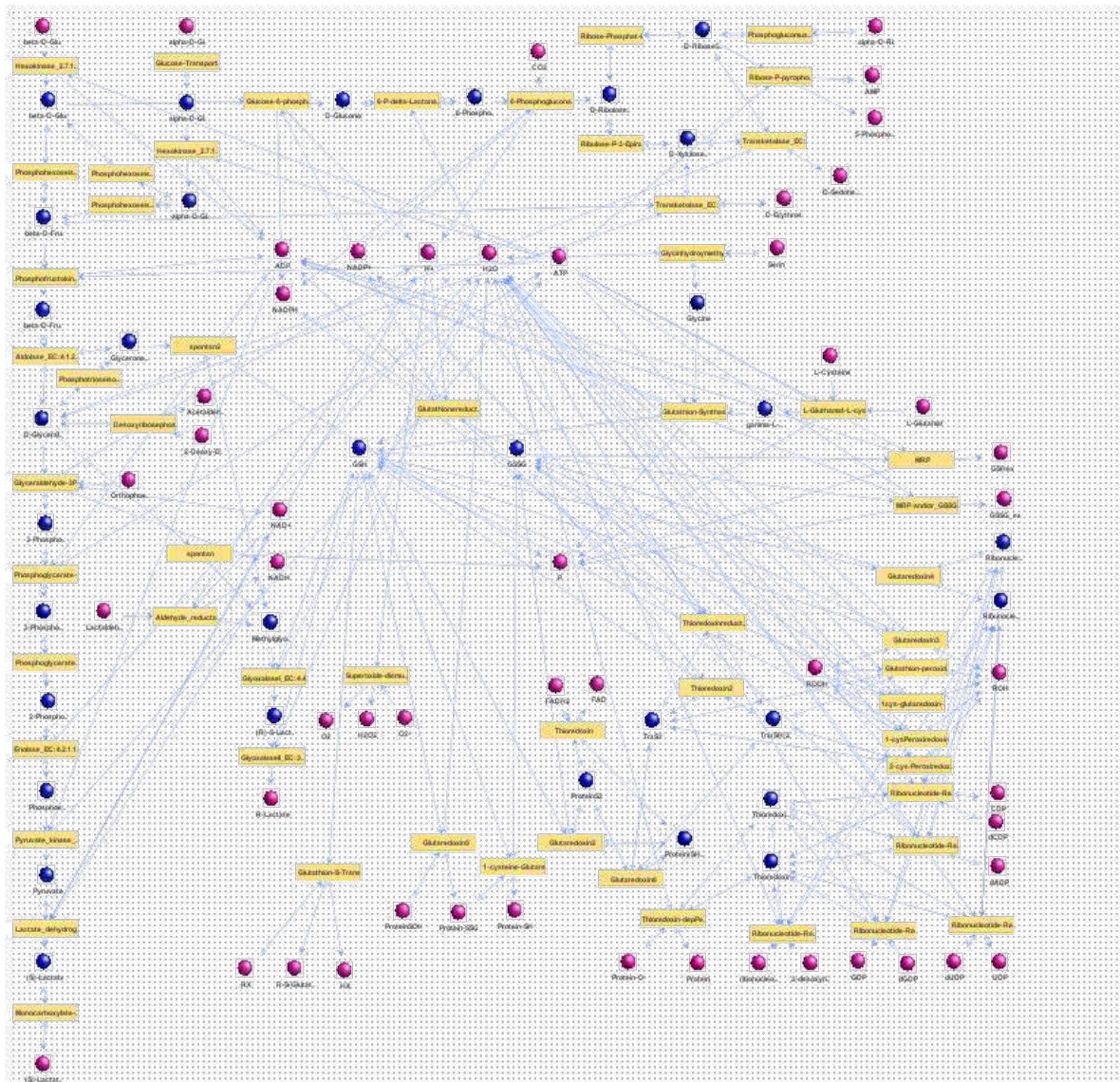


Abbildung 20: Modelliertes Stoffwechselnetzwerk von *P. falciparum*. Rote Kugeln stehen für externe Metabolite, blaue für interne Metabolite. Die Enzyme sind in den hellbraunen Kästchen benannt.

Die Änderungen der Genexpression wurden auf die Enzymexpression übertragen und umgekehrt. Im Anbetracht des gesamten Netzwerks und der Einschränkungen bezüglich der signifikant höher oder niedrigeren Genexpressionsdaten, werden diese kombinierten Fehler jedoch stark reduziert. Jede Enzym Aktivität E_{pred} wurde durch Aufsummieren der vorhergesagten Aktivität A jedes extremen Pathways A_i , der dieses

spezifische Enzym in seinem extremen Pathway enthält, berechnet:

$$E_{\text{pred}} = \sum A_i$$

Für das gesamte Enzymsystem mit signifikanten Genexpressionsänderungen wird die quadratische Abweichung zwischen der vorhergesagten Enzymaktivität und der beobachteten Enzymaktivität (geschätzt an Hand der Genexpressionsdaten) minimiert:

$$\min (\sum (E_{\text{pred}} - E_{\text{obs}})^2)$$

Diese quadratische Fehler Minimierung kann durch verschiedene Strategien erreicht werden [110], [111]. Um die besten Ergebnisse zu erhalten wurde für die Minimierung erst der genetischen Algorithmus in YANASquare und danach die R Routine benutzt.

In folgender Tabelle sind die konvexen Basismoden dargestellt:

Konvexe-Basis-Moden aller Reaktionen inklusive der darin involvierten Enzyme
1. Ausgeglichene Reaktion (-1 Phosphohexoseisomerase, EC:5.3.1.9, rn:R02739)(1 Phosphohexoseisomerase EC:5.3.1.9, rn:R02740) (-1 Phosphohexoseisomerase, EC:5.3.1.9, rn:R03321)
2. $H^+ + NADPH + ROOH \rightleftharpoons H_2O + NADP^+ + ROH$ (1 2-cys-Peroxiredoxin, EC:1.11.1.15, r2) (1 Thioredoxinreduktase, EC:1.6.4.5.)
3. $H^+ + NADPH + 2 ROOH \rightleftharpoons 2 H_2O + NADP^+ + ROH$ (1 Glutathion-Peroxidase-ähnliche-Tpx, EC:1.11.1.9) (1 Thioredoxinreduktase, EC:1.6.4.5.)
4. $FAD + H^+ + NADPH = FADH_2 + NADP^+$ (-1 2-cys-Peroxiredoxin, EC:1.11.1.15) (1 Glutaredoxin) (-1 Thioredoxin)
5. Ausgeglichene Reaktion (-1 Glutaredoxin) (1 Glutaredoxin) (-1 Thioredoxin)
6. $dADP + \text{Ribonukleosid-Diphosphat} \rightleftharpoons 2\text{-Desoxyribonukleosid-Diphosphat} + ADP$ (-1 Ribonukleotid-Reduktase, EC:1.17.4.1, R04294)(1 Ribonukleotid-Reduktase EC:1.17.4.1, Rn:R02017)

7. $dUDP + \text{Ribonukleosid-Diphosphat} = 2\text{-Desoxyribonukleosid-Diphosphat} + UDP$
(-1 Ribonukleotid-Reduktase, EC:1.17.4.1, R04294) (1 Ribonukleotid-Reduktase, EC:1.17.4.1, Rn:R02018)
8. $dGDP + \text{Ribonukleosid-Diphosphat} = 2\text{-Desoxyribonukleosid-Diphosphat} + GDP$
(-1 Ribonukleotid-Reduktase, EC:1.17.4.1, R04294) (1 Ribonukleotid-Reduktase, EC:1.17.4.1, Rn:R02019)
9. $dCDP + \text{Ribonukleosid-Diphosphat} = 2\text{-Desoxyribonukleosid-Diphosphat} + CDP$
(-1 Ribonukleotid-Reduktase, EC:1.17.4.1, R04294) (1 Ribonukleotid-Reduktase, EC:1.17.4.1, Rn:R02024)
10. $2\text{-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphat} + D\text{-Sedoheptulose-7-Phosphat} \rightleftharpoons \text{Acetaldehyd} + 2 \alpha\text{-D-Ribose-1-Phosphat}$
(1 Desoxyribose-Phosphataldolase, EC:4.1.2.4, Rn:R01066) (-2 Phosphoglukomustase, EC:5.4.2.2, Rn:R01057) (-1 Ribose-Phosphat-Isomerase, EC:5.3.1.6, Rn:R01056) (-1 Ribulose-P-3-Epimerase, EC:5.1.3.1, Rn:R01529) (-1 Transketolase, EC:2.2.1.1, Rn:R01641)
11. Ausgegliche Reaktion
(1 1-cys-Peroxiredoxin) (-1 1cys-Glutaredoxin-ähnliches-Protein, EC:1.11.1.15)
12. Ausgegliche Reaktion
(1 1-cys-Peroxiredoxin) (-1 Glutaredoxin)
13. $FADH_2 + ROOH \rightleftharpoons FAD + H_2O + ROH$
(1 1-cys-Peroxiredoxin) (-1 Glutaredoxin) (1 Thioredoxin)
14. $2\text{-Desoxyribonukleosid-Diphosphat} + \text{Protein-O}^- + ROOH \rightleftharpoons H_2O + \text{Protein} + ROH + \text{Ribonukleosid-Diphosphat}$
(1 1-cys-Peroxiredoxin) (-1 Glutaredoxin)(1 Ribonukleotid-Reduktase, EC:1.17.4.1, R04294) (1 Thioredoxin-abhängige Peroxidase)
15. $H_2O + \text{Protein-SSG} + RX \rightleftharpoons HX + \text{ProteinSOH} + R\text{-S-Glutathion}$
(-1 Glutaredoxin) (1 Glutathion-S-Transferase, EC:2.5.1.18)
16. $\text{Protein-SH} + ROOH \rightleftharpoons \text{ProteinSOH} + ROH$
(1 1-cys-Peroxiredoxin) (-1 1-cys-Glutaredoxin) (-1 Glutaredoxin)
17. $2 H^+ + 2 O_2^- = H_2O_2 + O_2$
(1 Superoxid-Dismutase, EC:1.15.1.1)

18. Lactaldehyd + NAD⁺ \rightleftharpoons H⁺ + NADH + R-Lactat
 (1 Aldehyd-Reduktase, EC:1.1.1.21) (1 Glyoxalase I, EC:4.4.1.5) (1 Glyoxalase II, EC:3.1.2.6)
19. ATP + alpha-D-Ribose-1-Phosphat \rightleftharpoons 5-Phospho-alpha-D-Ribose-1-Diphosphat + AMP
 (1 Phosphoglukomustase, EC:5.4.2.2, Rn:R01057) (1 Ribose-P-Pyrophosphokinase, EC:2.7.6.1, Rn:R01049)
20. ATP + alpha-D-Glukose_ex + alpha-D-Ribose-1-Phosphat \rightleftharpoons ADP + D-Erythrose-4-Phosphat + D-Sedoheptulose-7-Phosphat
 (1 Glukose-Transporter) (1 Hexokinase, EC: 2.7.1.1, Rn:R01786) (1 Phosphoglukomustase, EC:5.4.2.2, Rn:R01057) (1 Phosphohexoseisomerase, EC:5.3.1.9, Rn:R02740) (1 Transketolase, EC:2.2.1.1, Rn:R01641) (1 Transketolase, EC:2.2.1.1, Rn:R01830)
21. ATP + alpha-D-Ribose-1-Phosphat + beta-D-Glukose \rightleftharpoons ADP + D-Erythrose-4-Phosphat + D-Sedoheptulose-7-Phosphat
 (1 Hexokinase, EC:2.7.1.1, Rn:R01600) (1 Phosphoglukomustase, EC:5.4.2.2, Rn:R01057) (-1 Phosphohexoseisomerase, EC:5.3.1.9, Rn:R02739) (1 Phosphohexoseisomerase, EC:5.3.1.9, Rn:R02740) (1 Transketolase, EC:2.2.1.1, Rn:R01641) (1 Transketolase, EC:2.2.1.1, Rn:R01830)
22. D-Erythrose-4-Phosphat + D-Sedoheptulose-7-Phosphat + H₂O + 2 NADP⁺ \rightleftharpoons CO₂ + 2 H⁺ + 2 NADPH + 2 alpha-D-Ribose-1-Phosphat
 (1 6-P-delta-Lactonase, EC:3.1.1.31) (1 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, Rn:R01528) (1 Glukose-6-Phosphat-1-Dehydrogenase, EC:1.1.1.49_Rn:R02736) (-2 Phosphoglukomustase, EC:5.4.2.2, Rn:R01057) (1 Phosphohexoseisomerase, EC:5.3.1.9, Rn:R02739) (-1 Phosphohexoseisomerase, EC:5.3.1.9, Rn:R02740) (-1 Ribose-Phosphat-Isomerase EC:5.3.1.6, Rn:R01056) (-1 Transketolase, EC:2.2.1.1, Rn:R01641) (-1 Transketolase, EC:2.2.1.1, Rn:R01830)
23. 2-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphat + 2 ADP + Orthophosphat = (S)-Lactat_ex + 2 ATP + Acetaldehyd + H₂O
 (1 Desoxyribosephosphataldolase, EC:4.1.2.4, Rn:R01066) (1 Enolase, EC:4.2.1.11, Rn:R00658) (1 Glyceraldehyd-3P-Dehydrogenase, EC:1.2.1.12, Rn:R01061) (1 Lactat-Dehydrogenase, EC:1.1.1.27, Rn:R00703) (1 Monocarboxylat-Transporter) (1 Phosphoglyceratkinase, EC:2.7.2.3, Rn:R01512) (1 Phosphoglyceratmutase, EC:5.4.2.1, Rn:R01518) (1 Pyruvatkinase, EC:2.7.1.40, Rn:R00200)

24. 2-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphat \rightleftharpoons Acetaldehyd + P + R-Lactat
(1 Desoxyribosephosphataldolase, EC:4.1.2.4, Rn:R01066) (1 Glyoxalase I, EC:4.4.1.5) (1 Glyoxalase II, EC:3.1.2.6) (1 spontan)
25. 2 alpha-D-Ribose-1-Phosphat = D-Sedoheptulose-7-Phosphat + P + R-Lactat
(1 Glyoxalase I, EC:4.4.1.5) (1 Glyoxalase II, EC:3.1.2.6) (2 Phosphoglukomustase, EC:5.4.2.2, Rn:R01057) (1 Phosphotrioseisomerase, EC:5.3.1.1, Rn:R01015) (1 Ribose-Phosphat-Isomerase, EC:5.3.1.6, Rn:R01056) (1 Ribulose-P-3-Epimerase, EC:5.1.3.1, Rn:R01529) (1 spontan²) (1 Transketolase, EC:2.2.1.1, Rn:R01641)
26. ATP + 2 Acetaldehyd + D-Erythrose-4-Phosphat + D-Sedoheptulose-7-Phosphat \rightleftharpoons 2 2-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphat + ADP + alpha-D-Ribose-1-Phosphat
(1 Aldolase, EC:4.1.2.13, rn:R01070) (-2 Desoxyribosephosphataldolase, EC:4.1.2.4, rn:R01066) (1 Phosphofruktokinase, EC:2.7.1.11, rn:R04779) (-1 Phosphoglucumustase, EC:5.4.2.2, rn:R01057) (-1 Phosphotrioseisomerase, EC:5.3.1.1, rn:R01015)
(-1 Transketolase, EC:2.2.1.1, rn:R01641) (-1 Transketolase, EC:2.2.1.1, rn:R01830)
27. H⁺ + NADPH + ROOH \rightleftharpoons H₂O + NADP⁺ + ROH
(1 1cys-Glutaredoxin-ähnliches-Protein, EC:1.11.1.15) (1 Glutathionreduktase, EC:1.8.1.7, Rn:00115)
28. ATP + H₂O + Protein-SSG \rightleftharpoons ADP + GSHex + P + ProteinSOH
(-1 Glutaredoxin) (1 MRP)
29. ATP + H₂O + 2 Protein-SSG \rightleftharpoons ADP + GSSG_{ex} + P + Protein-SH + ProteinSOH
(1 1-cys-Glutaredoxin) (-1 Glutaredoxin) (1 MRP- und/oder GSSG-Pumpen)
30. 2 ATP + L-Cystein + L-Glutamat + RX + Serin \rightleftharpoons 2 ADP + H₂O + HX + 2 P + R-S-Glutathion
(1 Glutathion-S-Transferase, EC:2.5.1.18) (1 Glutathion-Synthase, EC:6.3.2.3) (1 Glycinhydroxymethyltransferase) (1 L-Glutamat-L-Cystein-Synthase, EC:6.3.2.2)

Tabelle 5: Extreme Pathway Analyse des Redoxstoffwechsels (Kaleta 2006). Die extremen Pathway Moden des Redoxstoffwechsels von *P. falciparum* sind im Output-Format des Programms Yana dargestellt. Die in Klammern stehenden Enzyme stehen für die Enzyme, die in den verschiedenen Moden partizipieren. Rn gibt die in KEGG gelistete Reaktionsnummer an; EC die in Expasy gelistete Enzym Nummer. Das negativ Zeichen vor den Enzyme indiziert, dass das Reaktionsgleichgewicht auf der linken Seite liegt.

Die dargestellten extremen Pathway Moden entsprechen folgenden metabolischen Pathways: Mode 1 entspricht der Konversion von Glukose-6-Phosphat; Mode 2, 3 und 4 entsprechen der Protein Protektion unter Verwendung von Thioredoxinreduktasen; Mode 5 entspricht der Protein Protektion; Mode 6, 7, 8, und 9 entsprechen der Desoxyribonukleotid Produktion; Mode 10 und 22, entsprechen der Ribose-1-Phosphat Generation für den Purin und Pyrimidin Metabolismus; Mode 11, 12 und 13 entsprechen der Protein Protektion; Mode 14 entspricht der Protein Protektion und der Nukleotid Konversion; Mode 15 und 16 entsprechen der Protein Protektion; Mode 17 entspricht der Protektion gegen reaktive oxidative Spezies; Mode 18 entspricht der Entgiftung von toxischen 2-Oxoaldehyden; Mode 19 entspricht der Konversion von Keto-Zuckern für den Nukleotid Metabolismus; Mode 20 und 21 entsprechen der Bildung von Keto Zuckern unter Verwendung von Glycin-Aldehyd-3-Phosphat, was aus Glukose metabolisiert wird; Mode 23 entspricht dem unteren Teil der Glykolyse, die zur Herstellung von ATP dient; Mode 24 entspricht der Entgiftung von 2-Oxoaldehyden; Mode 25 entspricht der Entgiftung von 2-Oxoaldehyden sowie der Keto-Zucker Produktion; Mode 26 entspricht der Keto Zucker Transformation; Mode 27 entspricht der Glutathion Protektion; Mode 28 entspricht der Protein Protektion und dem Export von GSH; Mode 29 entspricht der Protein Protektion und dem Export von GSSG; Mode 30 entspricht der Glutathion Synthese.

In der folgenden Tabelle ist der mit R berechnete Flux der konvexen Basis Moden dargestellt. Hierbei wurde eine Flux Modus Aktivität von 10% zur Berechnung der Enzymaktivität an Hand der mRNA Expression angenommen.

Aktivität der Moden relativ zur Genexpression der involvierten Enzyme.		
Extreme Pathway Moden		Flux der extremem Pathway Moden berechnet mit R.
1.	Glukose-6-Phosphat Konversion	0.09940445
2.	Protein Protektion unter Verwendung von Thioredoxinreduktase	0.15065065
3.	Protein Protektion unter Verwendung von Thioredoxinreduktase	0.20965028
4.	Protein Protektion unter Verwendung von Thioredoxinreduktase	- 0.56995906
5.	Protein Protektion	0.39301516
6.	Desoxyribonukleotid Produktion	0.03318532
7.	Desoxyribonukleotid Produktion	0.03318532
8.	Desoxyribonukleotid Produktion	0.03318532
9.	Desoxyribonukleotid Produktion	0.03318532
10.	Ribose-1-Phosphat Generation für den Purin und Pyrimidin Metabolismus	0.04497088
11.	Protein Protektion	0.45901932
12.	Protein Protektion	0.17696656
13.	Protein Protektion	- 0.58924539
14.	Protein Protektion und Nukleotid Konversion	0.16593386
15.	Protein Protektion	- 0.22518394
16.	Protein Protektion	- 0.19694403
17.	Protektion gegen ROS	0.14102805
18.	Entgiftung von toxischen 2-Oxoaldehyden	0.19293256
19.	Konversion von Keto-Zuckern	0.1205442
20.	Generation von Keto-Zuckern unter Verwendung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat hergestellt aus Glukose	0.06576149
21.	Generation von Keto-Zuckern unter Verwendung von Glycerinaldehyd-3- Phosphat hergestellt aus Glukose	0.09101076
22.	Ribose-1-Phosphat Generation für den Purin und Pyrimidin Metabolismus	0.08849594
23.	Unterer Teil der Glykolyse zur Generation von ATP	0.17043627
24.	Entgiftung von 2-Oxoaldehyden	0.0
25.	Entgiftung von 2-Oxoaldehyden und	0.0

Produktion von Keto-Zuckern		
26.	Keto-Zucker Transformation	0.14632814
27.	Glutathion Protektion	0.20473006
28.	Protein Protektion und Export von GSH	0.10261671
29.	Protein Protektion und Export von GSSG	0.10261671
30.	Glutathion Synthese	0.158995

Tabelle 6: Flux der extremem Pathway Moden berechnet mit R.

25 Stunden nach der Invasion der Plasmodien in den humanen Erythrozyten, wenn sich *Plasmodium falciparum* im schnell wachsenden Trophozoitenstadium befindet, kann man starke Pathwayfluxe in folgenden extremen Pathway Moden feststellen: Protein Protektion (Moden 5, 11, 12, 13, 14, 15 und 16), Protein Protektion unter Verwendung von Thioredoxinreduktase (Modus 2, 3 und 4), Glutathion Protektion (Modus 27), Entgiftung von toxischen 2-Oxoaldehyden (Modus 18), dem letzten Teil der Glykolyse, die der ATP Gewinnung dient (Modus 23) und der Glutathion Synthese (Modus 30).

In Abbildung 21 ist der Flux der extremen Pathways relativ zur mRNA Expression dargestellt.

Man kann schlussfolgern, dass die Hauptaktivität des Parasiten im Trophozoiden Stadium in der Protein Protektion vor oxidativem und nitrosativem Stress und der dazu nötigen Energieproduktion liegt. Diese Prozesse stellen somit eine wichtige Funktion für das Überleben des Parasiten dar.

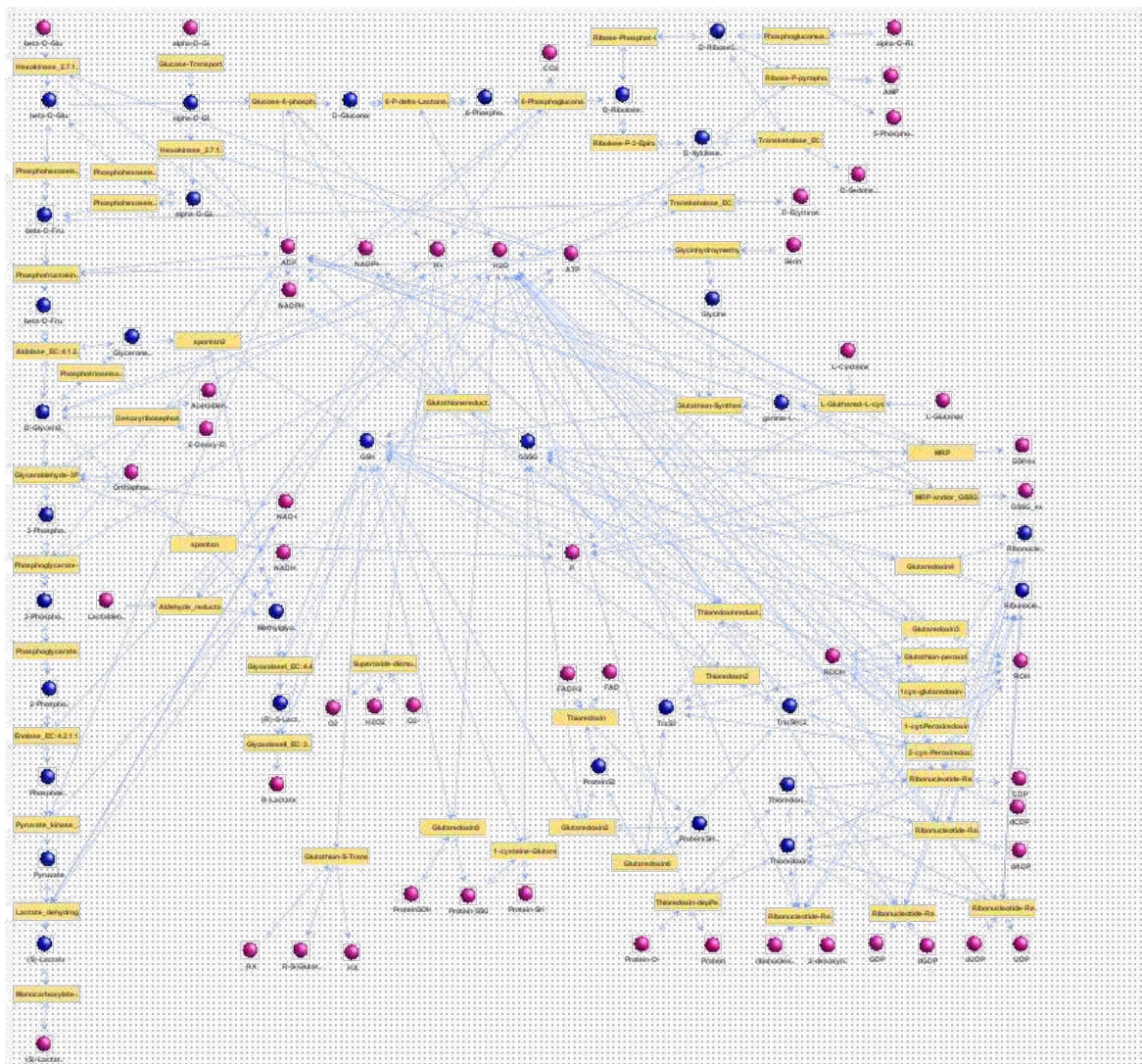


Abbildung 21: Netzwerk-Graphik der extremen Pathway Analyse relativ zu mRNA Expressionsdaten. Rote Kugeln stehen für externe Metaboliten, blaue Kugeln für interne Metabolite. Die Enzyme sind in den hellbraunen Kästchen benannt. Eine Flux Modus Aktivität von 10% wurde zur Berechnung der Enzymaktivität an Hand der mRNA Expression angenommen. Dickere Pfeile repräsentieren einen stärkeren Pathway Flux.

3.2.3 Einfluß von Methylenblau auf das Redoxstoffwechselnetzwerk

Um den Einfluss von Methylenblau auf die Schlüsselenzyme des Redoxstoffwechselnetzwerkes zu untersuchen, wurde die mRNA Expression dieser Enzyme nach Inkubation mit Methylenblau mittels

Real-Time-PCR von der Forschungsgruppe von Prof. Katja Becker der Universität Gießen gemessen. Hierzu wurden *P. falciparum* Trophozoiten des Stranges 3D7 15nM Methylenblau ausgesetzt, was ungefähr einer fünffachen mittleren Hemmkonzentration entspricht. Nach 9, 12 und 18 Stunden wurden die Parasiten der mit MB versetzten und nicht versetzten Kontrolle freigesetzt, indem man die Erythrozyten für 10min bei 37°C in einer 29-Fold Saponin Suspension lysierte. Diese Suspension bestand aus folgendem Erythrozyten lösenden Puffer mit einem pH von 7.4: 7 mM K_2HPO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 11 mM $NaHCO_3$, 58 mM KCl, 56 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 14 mM Glukose und 0.02% Saponin. Danach wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand wurde abgeschöpft. Die Parasiten wurden nochmals in Saponin Puffer und in PBS gewaschen und danach in Pellet Form in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren. Eine Spaltung der Parasiten wurde durch dreimaliges Gefrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff erreicht.

Um die gesamte RNA zu extrahieren wurde der NucleoSpin RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) verwendet. Die RNA Extrakte wurden konzentrierter DNase I (RNase-free; MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) nach den Herstelleranweisungen ausgesetzt um parasitäre DNA Kontaminanten zu separieren, die zusätzlich mit PCR überprüft und bestätigt wurden. Unter Verwendung eines oligo-dT Primers (Reverse-iT MAX 1st Strand Synthesis Kit, Abgene, Hamburg, Germany) wurden Aliquots von 450 ng DNA jeder Probe revers in cDNA umgeschrieben.

Für die quantitative Real-Time PCR wurde der SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich) im Rotor-Gene 3000 real time PCR Cyler (Corbett Research, Sydney, Australia) verwendet. Die benötigten Primer wurden selbst hergestellt und vor Verwendung auf Zielgen Spezifität mittels normaler PCR überprüft. Mit Hilfe der Rotor-Gene 6.0 Software wurden die PCR Ergebnisse analysiert und der Schwellenwert-Zyklus

bestimmt. Die dargestellten Daten basieren auf dem Schwellenwert-Zyklus und der Reaktionseffizienz der Zielgene und Referenzgene von MB versetzten - und MB freien Kontrollzellen. Als Referenzgen wurde bei den Experimenten 18S rRNA verwendet. Die Spezifität der PCR Ergebnisse wurde mit Hilfe einer Kurven Analyse bestätigt. In allen Experimenten wurde die Real-Time PCR vierfach ausgeführt.

Die Ergebnisse der Real-Time PCR sind in folgender Tabelle dargestellt:

Enzyme	Relative mRNA Expression nach 9 h RT/18S	Relative mRNA Expression nach 12h RT/18S	Relative mRNA Expression nach 18h RT/18S
Thioredoxinreduktase	0,55	0,74	0,61
Glutathionreduktase	0,73	1,49	1,2
Glyoxalase I	1	0,51	0,48
Glyoxalase II	0,9	0,36	0,38
Lactatdehydrogenase	0,7	0,93	1,93
1-Cys-Peroxiredoxin	0,59	0,79	1,27
Glutaredoxin	0,88	0,63	0,7
Glutamat-Cystein-Ligase	0,61	0,55	0,54
Thioredoxin abhängige Peroxidase 1	0,45	0,49	0,39
Glutaredoxin ähnliches Protein 1	0,51	0,76	0,66

Tabelle 7: Relative mRNA Expression unter Inkubation von *P. falciparum* mit Methylenblau nach 9, 12 und 18 Stunden.

Die Real-Time PCR Ergebnisse zeigen eine verminderte Expression der mRNA der meisten Schlüsselenzyme des Redoxstoffwechselnetzwerks. Glutathionreduktase wird im Gegensatz dazu, nach initialer Downregulation, hochreguliert und zeigt eine m-RNA Expression von ca. 150% nach 12 Stunden, die jedoch nach 18 Stunden wieder leicht

abfällt. Auch die 1-cys-Peroxiredoxin Expression und die Lactat Dehydrogenase Expression weisen nach einer anfänglichen verminderten Expression eine Hochregulierung über 100% nach 18h auf. Die kompensatorische Hochregulierung von Glutathionreduktase scheint wahrscheinlich jedoch auch negative Effekte für den Parasiten zu haben, da Methylenblau als subversives Substrat der Glutathionreduktase diese in eine prooxidatives Enzym umzuwandeln vermag.

Die mit Real-time PCR gemessenen mRNA Expressionsdaten, wurden als Verhältniswerte an die oben beschriebenen Expressionsdaten der DeRisi Datenbank des Malaria Parasiten im Trophozoiten Stadium 25h nach Invasion in den Erythrozyten angepasst. Mit einer extremen Pathway Analyse und R wurden dann die gemessenen Effekte von Methylenblau auf das Redoxstoffwechsel-Netzwerk analysiert bzw. berechnet. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt:

Extreme Pathway Moden	Flux der Moden	Flux der Moden, adaptiert an die in vitro mRNA Expression nach neunständiger Inkubation mit Methylenblau.	Flux der Moden, adaptiert an die in vitro mRNA Expression nach zwölfständiger Inkubation mit Methylenblau.	Flux der Moden, adaptiert an die in vitro mRNA Expression nach 18- stündiger Inkubation mit Methylenblau.
1. Glukose-6- -Phosohat Konversion	0.09940445	-0.11033237	-0.12398950	0.11341765
2. Protein Protektion unter Verwendung von Thioredoxinreduktase	0.15065065	0.16936105	0.20251532	0.20463381
3. Protein Protektion unter Verwendung von Thioredoxinreduktase	0.20965028	0.11836105	0.15951533	0.14163381
4. Protein Protektion unter Verwendung von Thioredoxinreduktase	-0.5699591	-0.42608919	-0.57154580	-0.53190911
5. Protein Protektion	0.39301516	0.61866525	0.75061269	0.72616096
6. Desoxyribonukleotid Produktion	0.03318532	0.05307590	0.04582178	0.04680929
7. Desoxyribonukleotid Produktion	0.03318532	0.05307590	0.04582178	0.04680929
8. Desoxyribonukleotid Produktion	0.03318532	0.05307590	0.04582178	0.04680929
9. Desoxyribonukleotid	0.03318532	0.05307590	0.04582178	0.04680929

3. Ergebnisse

	Produktion				
10.	Ribose-1-Phosphat Generation für den Purin und Pyrimidin Metabolismus	0.04497088	-0.04123051	-0.13816488	-0.10998642
11.	Protein Protektion	0.45901932	0.23431783	0.39690837	0.30402417
12.	Protein Protektion	0.17696656	0.13583262	0.05602760	0.06694087
13.	Protein Protektion	-0.5892454	-0.48283488	-0.69458593	-0.65920972
14.	Protein Protektion und Nukleotid Konversion	0.16593386	0.13542123	0.09914423	0.10409823
15.	Protein Protektion	-0.2251839	-0.18719452	-0.14097233	0.01376369
16.	Protein Protektion	-0.1969440	-0.24807981	-0.11197774	-0.26017497
17.	Protektion gegen ROS	0.14102805	0.14101792	0.14100725	0.14100726
18.	Entgiftung von toxischen 2- Oxoaldehyden	0.19293256	0.18626525	0.12723609	0.12719114
19.	Konversion von Keto-Zuckern	0.1205442	0.07366536	0.06044316	0.09662861
20.	Generation von Keto-Zuckern unter Verwendung von Glycerinaldehyd-3- Phosphat hergestellt aus Glukose	0.06576149	0.05367914	0.05501018	0.06988848
21.	Generation von Keto-Zuckern unter Verwendung von Glycerinaldehyd-3- Phosphat hergestellt aus Glukose	0.09101076	0.07893620	0.07542533	0.10831132
22.	Ribose-1-Phosphat Generation für den Purin und Pyrimidin Metabolismus	0.0884959	0.12478180	0.10145000	0.12888646
23.	Unterer Teil der Glykolyse zur Generation von ATP	0.17043627	0.16919188	0.18058791	0.20428645
24.	Entgiftung von 2-Oxoaldehyden	0.0	0.0	0.0	0.0
25.	Entgiftung von 2-Oxoaldehyden und Produktion von Keto-Zuckern	0.0	0.0	0.0	0.0
26.	Keto-Zucker	0.14632814	0.12825075	0.10235881	0.11126199

Transformation				
27. Glutathion Protektion	0.20473006	0.12809834	0.25787098	0.19353706
28. Protein Protektion und Export von GSH	0.10261671	0.12135852	0.15449540	0.15667472
29. Protein Protektion und Export von GSSG	0.10261671	0.12135852	0.15449540	0.15667472
30. Glutathion Synthese	0.158995	0.13974968	0.12669244	0.12566706

Tabelle 8: Flux der konvexen Basis Moden unter Einfluss von Methylenblau nach 9, 12 und 18 Stunden berechnet mit R.

Wie schon oben beschrieben ist für den Parasiten im Trophozoiten Stadium die Bekämpfung von oxidativem und nitrosativem Stress essentiell. Man kann erkennen, dass Methylenblau nahezu alle an diesen Prozessen beteiligten extremen Pathway Moden modifiziert.

Unter Einfluss von Methylenblau wird der berechnete Flux von Modus 27, der der Glutathionprotektion dient, nach neun Stunden um 37% reduziert. Nach 12 Stunden wird die Glutathionreduktase Expression verstärkt und der daraus resultierende Flux desselben Modus wird mit einem um 26% stärkeren Flux fortgesetzt. Dies dient wahrscheinlich zum Erreichen einer effektiveren Protektion gegen reaktive oxidative Spezies. Nach 18 Stunden wird der Flux des Modus erneut runter reguliert und nähert sich wieder seiner initialen Aktivität an.

Der Flux der Moden zur Protein Protektion 12, 14 und 15 werden konstant bis 12 nach Inkubation mit Methylenblau nach unten reguliert. Moden 12 und 14 regenerieren minimal nach 18h, verbleiben jedoch auch 18h nach Inkubation weit unter ihrem Ausgangsflux. Modus 15 wird konstant nach unten reguliert und weist 18 Stunden nach Inkubation nur noch einen sehr minimalen Flux auf. Die Moden 3, 4 und 11, die ebenfalls der Protein Protektion dienen, werden maximal nach neun Stunden nach unten reguliert, regenerieren jedoch nach 12 und 18 Stunden leicht mit abgeschwächtem Flux. Die Protein Protektion Moden 2, der von der Thioredoxinreduktase katalysiert wird, 5 und 28 steigern

ihre Aktivität unter Einfluss von Metylenblau, was auf einen Kompensationsmechanismus hindeuten könnte. Moden 13 und 16 verlangsamten ihren Flux nach 9 bzw. 12 Stunden und setzten ihn nach 18 Stunden mit gesteigertem Ausgangsflux fort. Modus 18, der der Entgiftung von 2-Oxoaldehyden dient, wird konstant nach unten reguliert und agiert mit um 34% reduziertem Flux nach 18 Stunden.

Der Flux der Moden 20 und 21, die der Generation von Keto-Zuckern unter Verwendung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat dienen, wird maximal nach 9 Stunden verlangsamt und regeneriert leicht über den Ausgangsflux nach 18 Stunden. Die für die Transformation der Ketozucker verantwortlichen Moden 19 und 26 werden konstant nach unten reguliert ohne zu regenerieren.

Die Ribose-1-Phosphat Generation für den Purin und Pyrimidin Metabolismus, Modus 22, wird konstant hoch reguliert, was ebenfalls auf einen Kompensationsmechanismus schließen lässt.

Modus 23, der untere Teil der Glykolyse zur ATP Generation, wird unter Einfluss von Metylenblau primär nach 9 Stunden nach unten reguliert, steigert jedoch konstant nach 12 und 18 Stunden den Flux mit einem um 20% gesteigerten Ausgangsflux nach 18 Stunden.

Modus 30, die Glutathion Synthese, wird ebenfalls unter Einfluss von Metylenblau konstant nach unten reguliert mit einem um 20% reduzierten Flux nach 12 und 18 Stunden.

In der Abbildung 22 sind die Ergebnisse der konvexen Basis Analyse unter Einfluss von Metylenblau nach neun Stunden dargestellt.

Unter Einfluss von Metylenblau wird die Expression der Schlüsselenzyme der Redoxprotektion nach unten reguliert und der berechnete Flux der für die Redoxprotektion relevanten extremen Pathway Moden nimmt ab. Man kann schlussfolgern, dass die Redoxprotektion der Parasiten stark eingeschränkt wird. Es ist

anzumerken, dass in den durchgeführten Experimenten und Analysen subletale Konzentrationen zum Monitoring von darauf folgenden Genexpressions Veränderungen verwendet wurden (was anders nicht möglich wäre). Um eine optimale Wirkung von Methyleneblau zu erhalten, würde man höhere Konzentrationen ($>20\text{nM}$) und längere Inkubationszeiten verwenden.

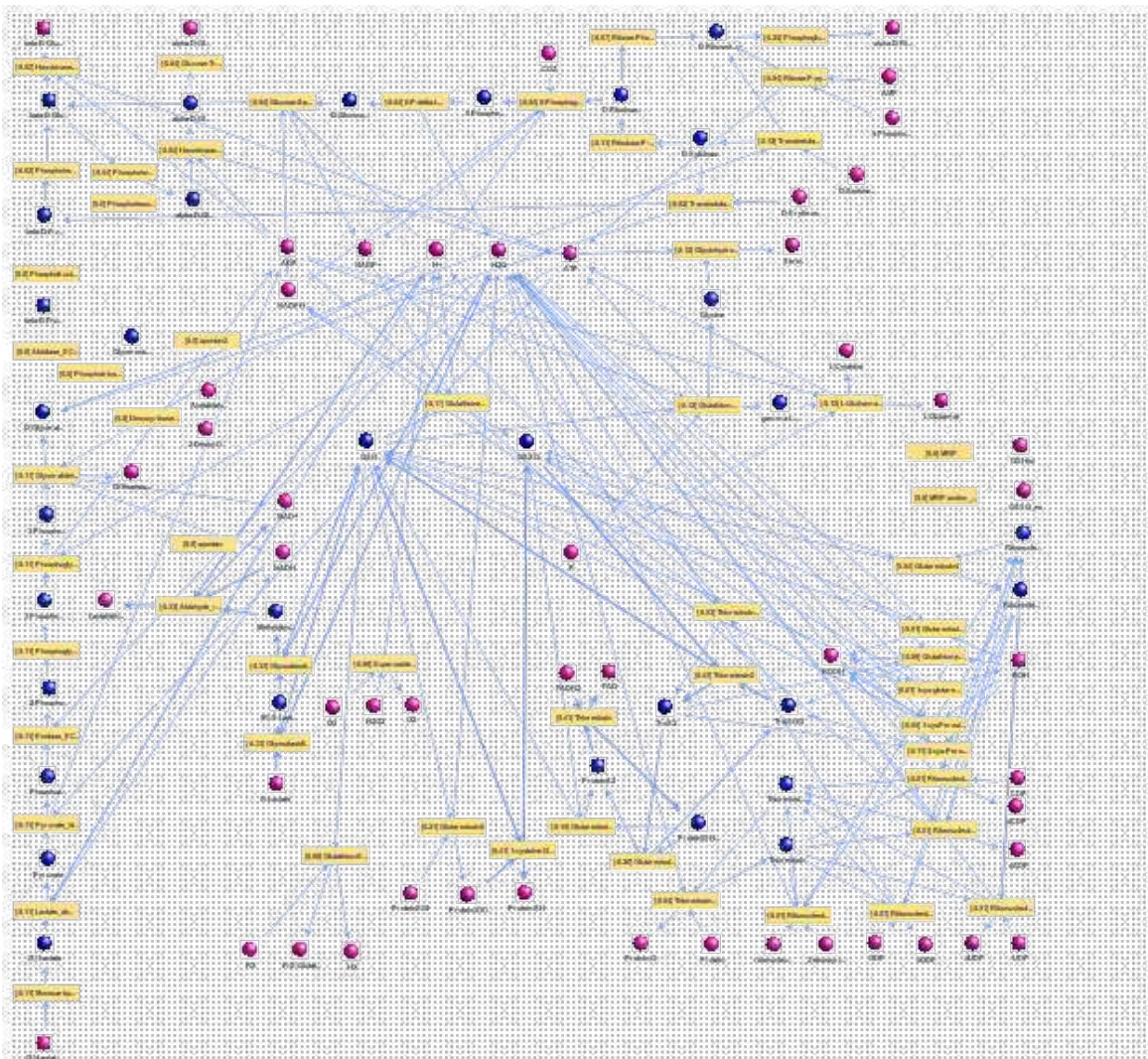


Abbildung 22: Netzwerk-Graphik der extremen Pathway Analyse relativ zu mRNA Expressionsdaten und zur experimentellen mRNA Expressionsdaten unter Inkubation mit Methyleneblau nach neun Stunden. Rote Kugeln stehen für externe Metaboliten, blaue für interne Metabolite. Die Enzyme sind in den hellbraunen Kästchen benannt. Dickere Pfeile repräsentieren einen stärkeren Pathway Flux.

3.3 Umfrage in Burkina Faso

Allgemeines Ziel der Umfrage war es, sozialmedizinische Aspekte (Teilnahmebereitschaft an einem E-Day-artigen Projekt, Kenntnisse, Vertrauen in die moderne Medizin etc.) zu untersuchen, die Grundvoraussetzungen für die Durchführung jeglicher Malaria Programme darstellen. Für zukünftige Malaria-Programme in Afrika ist es notwendig, dass die Betroffenen die Bürde der Malaria für das persönliche, sozioökonomische und soziodemographische Umfeld realisieren und bereit sind, im Kampf gegen die Malaria auch mit westlichen Partnern zu kooperieren.

Im Einzelnen sind die Ziele der Umfrage Aussagen zu treffen über:

- Kooperationsbereitschaft der Befragten an einem E-Day-artigen Malaria-Eradikationsversuch. Im Speziellen soll ermittelt werden, ob die Betroffenen bereit wären, an einem Malaria Eradikationsprogramm teilzunehmen und ob sie im Rahmen eines solchen Projekts bereit wären, Medikamente ohne Krankheitssymptome über einen längeren Zeitraum zu nehmen und Nebenwirkungen zu tolerieren
- Kenntnisse der Befragten über Malaria. Zur Durchführung von Eradikationsmaßnahmen und selbstverständlich auch zur Durchführung jeglicher Präventivmaßnahmen ist ein Grundverständnis der Transmission und der Pathologie der Malaria nötig. Hierbei soll ermittelt werden, ob eine direkte Korrelation zwischen Kenntnissen zu Malaria und Schulbildung bzw. Alter und Geschlecht in ländlichem und urbanem Umfeld besteht.
- die subjektive Betroffenheit durch Malaria, die persönlichen Einschränkungen und deren Gesundheitsverhalten der Befragten im Fall von Fieber bzw. Malaria.
- Einstellung und Kontakt der Befragten zur modernen Medizin. Die Kooperation mit der westlichen Medizin stellt eine

Grundvoraussetzung für die Kooperationsbereitschaft und somit für die Durchführbarkeit jeglicher Anti-Malaria Maßnahmen dar. Es soll ferner das Vertrauen in die westliche Medizin mit dem Vertrauen in die weit verbreitete traditionelle Medizin verglichen werden

Insgesamt nahmen 319 Personen an der Befragung nach Einholen des mündlichen Einverständnisses teil. Hiervon waren 94 aus Bagala, 25 aus Tonkoroni und 100 jeweils von Ouagadougou und Nouna. In der Analyse wurden jeweils die beiden Städte und die beiden Dörfer zusammengefasst.

Von den 94 Teilnehmern aus Bagala war das mittlere Alter 34,3 Jahre. 13 der Teilnehmer hatten die Grundschule (ecole primaire) beendet. 64 von ihnen waren nie in der Schule gewesen. Das Dorf Bagala liegt ca. 15km westlich der Stadt Nouna. Weitere Details zur Soziodemographie der Befragten aus Bagala sind in Tabelle 9 dargestellt:

Soziodemografische Charakteristika der Befragten in Bagala	
Anzahl der Befragten: 94	
davon männlich: 48	
davon weiblich: 46	
Alter der Befragten:	Altersverteilung der Dorfbevölkerung in 2005:
15-24 Jahre: 29	15-24 Jahre: 166
25-34 Jahre: 31	25-34 Jahre: 167
35-44 Jahre: 12	35-44 Jahre: 96
45-54 Jahre: 10	45-54 Jahre: 84
55-74 Jahre: 12	55-74 Jahre: 99
Mittleres Alter der Befragten: 34,28 Jahre	
Standardabweichung: 14,55	
Varianz: 211,78	
Standardfehler des Mittelwerts: 1,5	
Mittleres Alter der Dorfbevölkerung von 15-74 Jahren: 37,17 Jahre	
Standardabweichung: 15,15	
Varianz: 229,75	
Standardfehler des Mittelwertes: 0,6	

Soziodemografische Charakteristika der Befragten in Bagala
t= -1,73, p-value=0,25
Schulbildung der Befragten: Keine Schulbildung: 64 Grundschule (Ecole primaire) CI: 1 CP: 3 CE1: 1 CE2: 3 CM1: 9 CM2: 13 Weiterführende Schule (Etudes secondaires): 5 Abitur: 1
Mittlere Anzahl von Jahren an Schulbildung: 1,77 Jahre Standardabweichung: 3,11
Beschäftigung der Befragten: Hausfrauen: 43 Bauern: 36 Kleinhändler: 6 Schneider: 3 Sonstiges: 6
Region: ländlich, ohne Elektrizität und fließendes Wasser.

Tabelle 9: Soziodemographische Daten zu Bagala. Die Grundschulausbildung gliedert sich nach dem französischen System in: 1. Jahr: „Cours D’Initiation“ =CI; 2. Jahr: „Cours Préparatoire“= CP; 3. Jahr: „Cours Elémentaire 1ère année“=CE1; 4. Jahr: „Cours Elémentaire 2ième année“= CE2; 5. Jahr: „Cours Moyens 1ère année“= CM1; 6. Jahr: „Cours Moyens 2ième année“=CM2.

In Tonkoroni nahmen 25 Teilnehmer an der Befragung teil, was 14,7% der Dorfbevölkerung über 15 Jahren entspricht. Das mittlere Alter war der Befragten war 38,9 Jahre. Die mittlere Schulbildung der Befragten lag bei durchschnittlich nur 0,48 Jahren. 22 der Befragten waren nie zur Schule gegangen. Tonkoroni ist etwa 7km westlich von Nouna gelegen. Die Bevölkerung lebt dort hauptsächlich, wie die Bevölkerung in Bagala, von subsistenzialer Landwirtschaft. Weitere Details sind in folgender Tabelle dargestellt:

Soziodemographische Charakteristika der Befragten in Tonkoroni	
Anzahl der Befragten: 25	
davon männlich:	13
davon weiblich:	12
Alter der Befragten:	Altersverteilung der Dorfbevölkerung in 2005:
15-24 Jahre: 7	15-24 Jahre: 57
25-34 Jahre: 4	25-34 Jahre: 34
35-44 Jahre: 4	35-44 Jahre: 24
45-54 Jahre: 6	45-54 Jahre: 27
55-74 Jahre: 4	55-74 Jahre: 23
Mittleres Alter der Befragten: 38,9 Jahre	
Standardabweichung: 16,8	
Varianz: 282,4	
Standardfehler des Mittelwerts: 3,58	
t=0,56	
Mittleres Alter der Dorfbevölkerung von 15-74 Jahren: 36,88 Jahre	
Standardabweichung: 16,35	
Varianz: 267,27	
Standardfehler des Mittelwertes: 1,26	
t= - 0,57, p-value=0,917	
Schulbildung der Befragten:	
Keine Schulbildung: 22	
Grundschule (Ecole primaire)	
CE1:	1
CE2:	1
CM1:	1
Weiterführende Schule (Etudes secondaires): keiner	
Mittlere Anzahl von Jahren an Schulbildung: 0,48 Jahre	
Standardabweichung: 1,36	
Beschäftigung der Befragten:	
Hausfrauen:	12
Bauern:	12
Sonstiges:	1
Region: ländlich, ohne Elektrizität und fließendes Wasser.	

Tabelle 10: Soziodemographische Daten zu Tonkoroni. Die Grundschulausbildung gliedert sich nach dem französischen System wie in Tabelle 9 beschrieben.

In den beiden Städten Nouna und Ouagadougou wurden jeweils 100 Personen nach mündlichem Einverständnis befragt. Hier wurden jeweils

Freiwillige aus Vierteln mit verschiedenem sozioökonomischen Hintergrund befragt. Die Interviewsprache war neben Französisch Moré, Yula und weitere lokale Sprachen. Die Befragung wurde in Nouna mit Karim Couliably als lokalem erfahrenen Übersetzer durchgeführt. In Ouagadougou wurde die Befragung zum Teil, bei französischsprachigen Teilnehmern, selbst durchgeführt und zum Teil mit Hilfe eines lokalen erfahrenen Übersetzers realisiert. Soziodemographische Details sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

Soziodemographische Charakteristika der Befragten in Nouna und Ouagadougou	
Nouna	Ouagadougou
Anzahl der Befragten: 100	Anzahl der Befragten: 100
davon männlich: 50	davon männlich: 50
davon weiblich: 50	davon weiblich: 50
Alter der Befragten in Nouna:	Alter der Befragten in Ouagadougou:
15-24 Jahre: 44	15-24 Jahre: 38
25-34 Jahre: 26	25-34 Jahre: 35
35-44 Jahre: 9	35-44 Jahre: 21
45-54 Jahre: 9	45-54 Jahre: 5
55-74 Jahre: 12	55-74 Jahre: 1
Mittleres Alter der Befragten: 30,84 Jahre	Mittleres Alter der Befragten: 28,87 Jahre
Standardabweichung: 14,5	Standardabweichung: 9,45
Varianz: 210,44	Varianz: 89,39
Standardfehler des Mittelwerts: 1,45	Standardfehler des Mittelwertes: 0,945
Schulbildung der Befragten:	Schulbildung der Befragten:
Keine Schulbildung: 46	Keine Schulbildung: 13
Grundschule (Ecole primaire)	Grundschule (Ecole primaire)
CI: 0	CI: 1
CP: 3	CP: 5
CE1: 6	CE1: 10
CE2: 3	CE2: 4
CM1: 6	CM1: 5
CM2: 8	CM2: 15
Weiterführende Schule (Etudes secondaires, 1.Zyklus): 18	Weiterführende Schule (Etudes secondaires) 1.Zyklus: 27
Weiterführende Schule (Etudes secondaires, 2.Zyklus): 10	Weiterführende Schule (Etudes secondaires, 2.Zyklus): 20
Abitur: 3	Abitur: 18
Studium: keiner	Studium: 10

Mittlere Anzahl von Jahren an Schulbildung: 3,84 Standardabweichung: 4,28	Mittlere Anzahl von Jahren an Schulbildung: 6,93 Standardabweichung: 4,90
Beschäftigung der Befragten: Kleinhändler: 6 Hausfrauen: 37 Bauern: 18 Schüler/Studenten: 12 Beamte: 1 Frisöre: 4 Ingenieure: 1 Schneider: 3 Sonstige Berufe: 18	Beschäftigung der Befragten: Kleinhändler: 15 Hausfrauen: 39 Bauern: 1 Schüler/Studenten: 20 Beamte: 2 Frisöre: 4 Ingenieure: 5 Schneider: 2 Sonstige Berufe: 12
Region: Urban	

Tabelle 11: Soziodemographische Daten zu Nouna und Ouagadougou. Die Grundschulausbildung gliedert sich nach dem französischen System wie in Tabelle 9 beschrieben.

3.3.1 Kenntnisse der Befragten über Malaria und deren Korrelation mit verschiedenen Faktoren

Um den Kenntnisstand der Befragten über Malaria zu ermitteln, wurden 5 standardisierte Fragen zur Übertragung, Symptomen und Schwere der Erkrankung gestellt. 4 der Fragen waren offen, eine geschlossen.

Zur Analyse der Daten wurden folgende Kernfragen untersucht:

- Wie ist die Verteilung der Gesamtpunktzahl des Fragekomplexes Kenntnisse zwischen Dörfern und Städten?
- Gibt es einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte der Gesamtpunktzahl zwischen Städten und Dörfern?
- Gibt es eine Korrelation zwischen Malaria-Kenntnissen und Schulbildung bzw. Alter und Geschlecht?

3.3.1.1 Ergebnisse der Einzelfragen

Bezüglich der Übertragung wurden die Teilnehmer nach dem Auslöser der Erkrankung gefragt. Die Antwortmöglichkeiten wurden gruppiert in

„fundierte Kenntnisse“, „vage Kenntnisse“ und „keine ausreichenden Kenntnisse“ zur Krankheits-Übertragung. Die Klassifikation „fundierte Kenntnisse“ wurde vergeben, wenn die Teilnehmer Malaria als eine nur durch Moskitos (alternativ zusätzlich Bluttransfusionen) übertragbare Krankheit ansahen. „Vage Kenntnisse“ wurde vergeben, wenn die Teilnehmer neben Moskitos auch andere Gründe, wie beispielsweise Nahrungsmittel oder externe Klimafaktoren, als Ursache der Erkrankung nannten. „Keine ausreichenden Kenntnisse“ wurde vergeben, wenn die Teilnehmer die Krankheit nicht mit Moskitos in Zusammenhang bringen konnten. In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass in den Dörfern Bagala und Tonkoroni eine große Mehrzahl der Befragten über unzureichende Kenntnisse zur Transmission von Malaria verfügt.

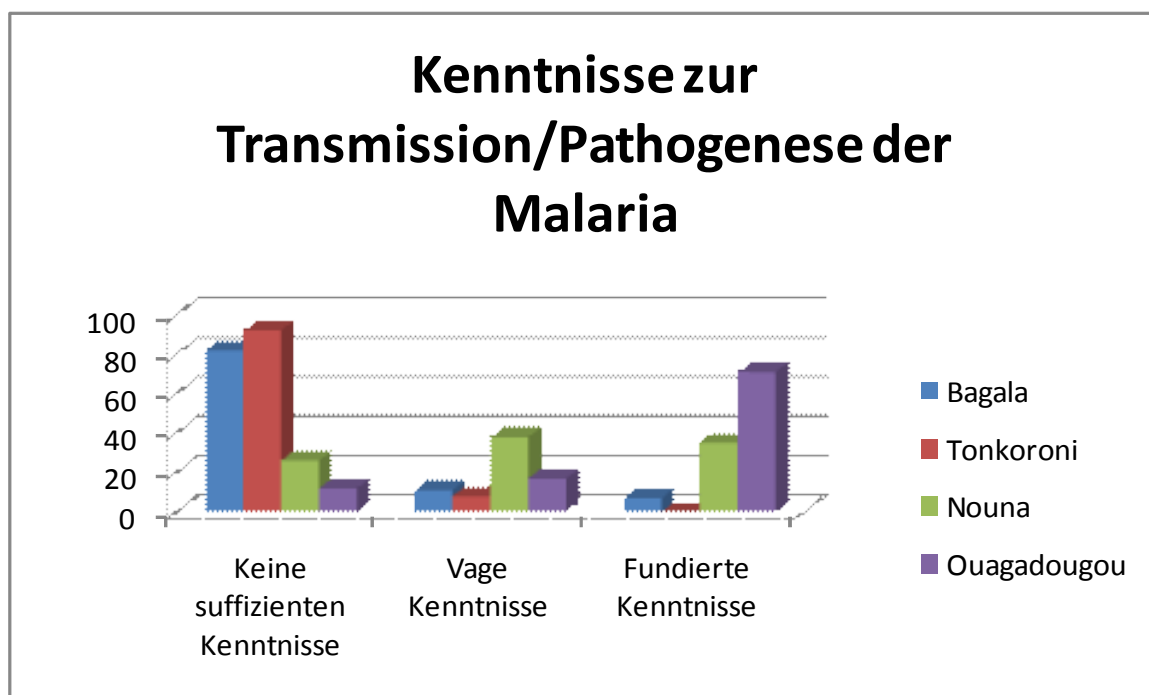


Abbildung 23: Kenntnisse der Befragten der Dörfern Bagala und Tonkoroni sowie der Städte Nouna und Ouagadougou zu Transmission/Pathogenese der Malaria in Prozentpunkten.

In Bagala verfügten 82% und in Tonkoroni 92% der Befragten über insuffiziente Kenntnisse zur Übertragung. Als Grund für Malaria-Transmission wurden am häufigsten frische Früchte oder frisches

Gemüse, insbesondere Mais, böse Geister und die Sonne aufgeführt. In den Städten war das Wissen zur Transmission der Malaria generell besser, jedoch verfügten auch in Nouna 26% und in Ouagadougou 12% über unzureichende Kenntnisse. Es fiel auf, dass in den Städten eher ein Halbwissen zur Transmission von Malaria vorhanden ist. Viele konnten zwar Moskitos als Überträger der Malaria nennen, glaubten aber gleichzeitig an oben aufgeführte Ursachen für Malaria.

Bei der Frage nach der direkten Übertragung der Malaria von Mensch zu Mensch wussten 74 Personen in Bagala (78,7%), 20 Personen in Tonkoroni (80 %), 70 in Nouna und 83 in Ouagadougou, dass Malaria nicht direkt von Mensch zu Mensch übertragen werden kann. Hier waren also insgesamt relativ gute Kenntnisse vorhanden.

Bezüglich der subjektiven Einschätzung der Malaria, wurde nach der Einstufung der Malaria als schwere, gemäßigte oder ungefährliche Krankheit gefragt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt.

Einschätzung von Malaria als:	Bagala n=94	Tonkoroni n=25	Nouna n=100	Ouagadougou n=100
Schwere, gefährliche Krankheit	56 (60%)	11 (44%)	74 (74%)	91 (91%)
Krankheit nicht ohne Risiken aber dennoch in der Regel nicht harmlos	38 (40)	14 (56%)	24 (14%)	5 (5%)
Harmlose, ungefährliche Krankheit	0	0	1 (1%)	4 (4%)

Tabelle 12: Einschätzung der Befragten von Malaria als schwere, gemäßigte oder harmlose Krankheit.

Es fällt auf, dass Befragte in den Dörfern Malaria als weniger bedrohlich im Vergleich zu Befragten in Städten einschätzen. Fast keiner der Befragten sieht Malaria als harmlos an. In Tonkoroni stufen die meisten Befragten Malaria als mäßig gefährliche Krankheit ein.

Am stärksten gefährdet sahen sowohl die Befragten in den Dörfern, als auch in den Städten, Kinder an. Die meisten Befragten räumten ein, selbst oder in der weitläufigeren Familie, schon ein Kind an Malaria verloren zu haben. Als am zweitstärksten gefährdet wurden Schwangere bzw. in Tonkoroni alte Menschen angesehen (Abbildung 24).

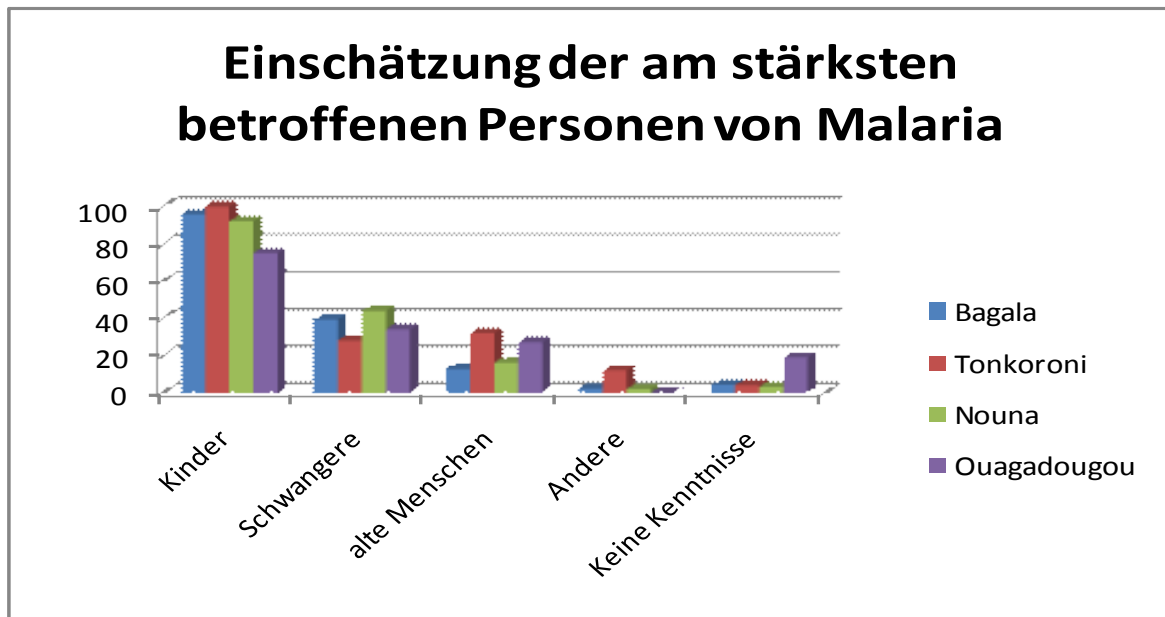


Abbildung 24: Gezeigt wird der prozentuale Anteil der, nach Einschätzung der Befragten, am stärksten von Malaria gefährdeten Personen.

Die Abbildung 25 zeigt, dass Befragte aus den Dörfern und aus Nouna, Kopfschmerzen als häufigstes Symptom der Malaria nannten. Fieber wurde von ca. 60% der Befragten aus Dörfern und Städten genannt. Wertet man jedoch, wie auch in der weiteren Auswertung, Schüttelfrost als ein Fiebersymptom, sind Fiebersymptome insgesamt die meist genannten Symptome. Ausfällig ist auch, dass in Nouna, Bagala und Ouagadougou gastrointestinale Symptome in über 40% genannt wurden.

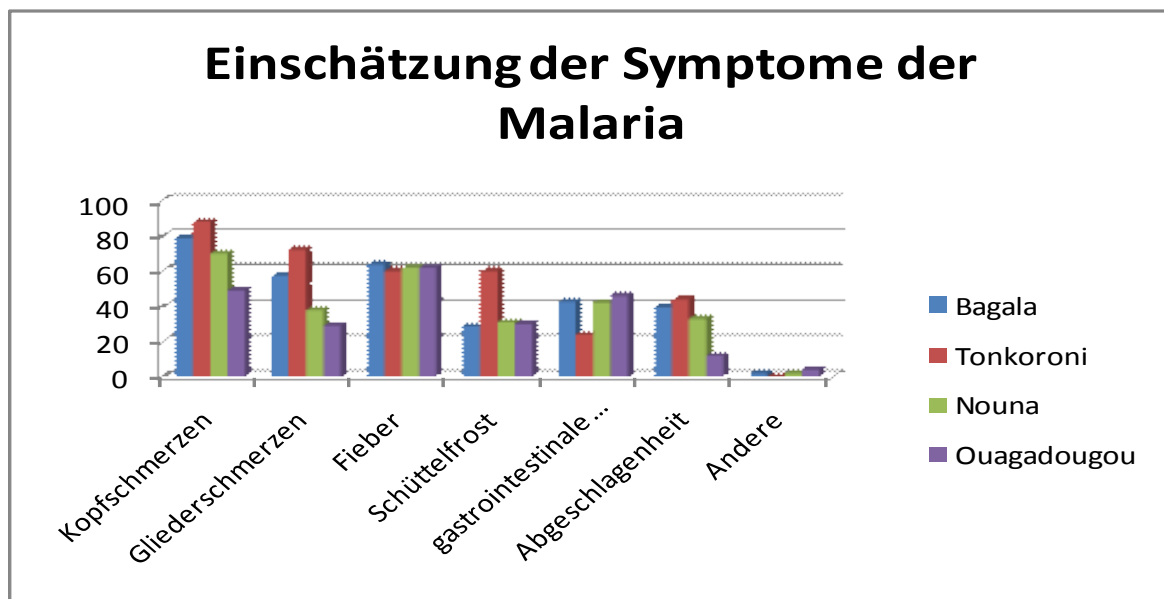


Abbildung 25: Einschätzung der Malaria Symptome. Dargestellt ist die Anzahl der genannten Symptome in Prozentpunkten.

3.3.1.2 Verteilung der Gesamtpunktzahl und Analyse der Unterschiede der Mittelwerten zwischen Dörfern und Städten

Um die Kenntnisse der Betroffenen zu analysieren, wurde den einzelnen Fragen eine Punktzahl zugewiesen. Aus den normierten Werten jeder Einzelfrage, die gleichwertig eingingen, wurde ein Summenwert gebildet. Um den Abstand der einzelnen Befragten vom Mittelwert der gesamten Befragten zu erhalten wurde ein z-Score berechnet. Zur Analyse der Kenntnisse zu Malaria wurde die Verteilung, der Mittelwert und die Standardabweichung der Gesamtpunktzahl der Befragten aus urbanen und ländlichen Gebieten berechnet. Die Resultate sind in folgender Tabelle und Abbildung dargestellt.

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Summenwert der Befragten der Städte n=200	3	16	10,39	2,79
Summenwert der Befragten der Dörfer n=119	6	15	9,99	1,91

Tabelle 13: Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung der Gesamtpunktzahl.

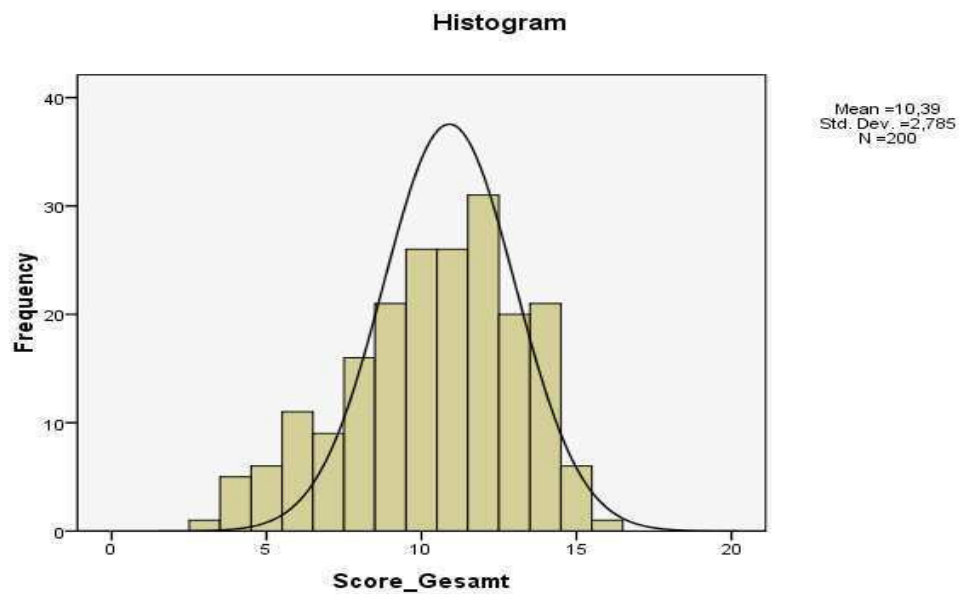


Abbildung 26: Häufigkeitsverteilung der Gesamtpunktzahl zu Kenntnissen über Malaria in den Städten Nouna und Ouagadougou.

Man erkennt hier eine annähernde Normalverteilung der Gesamtpunktzahl. Der Mittelwert der Gesamtpunktzahl zu den abgefragten Kenntnissen liegt in den Dörfern geringfügig niedriger als in beiden Städten.

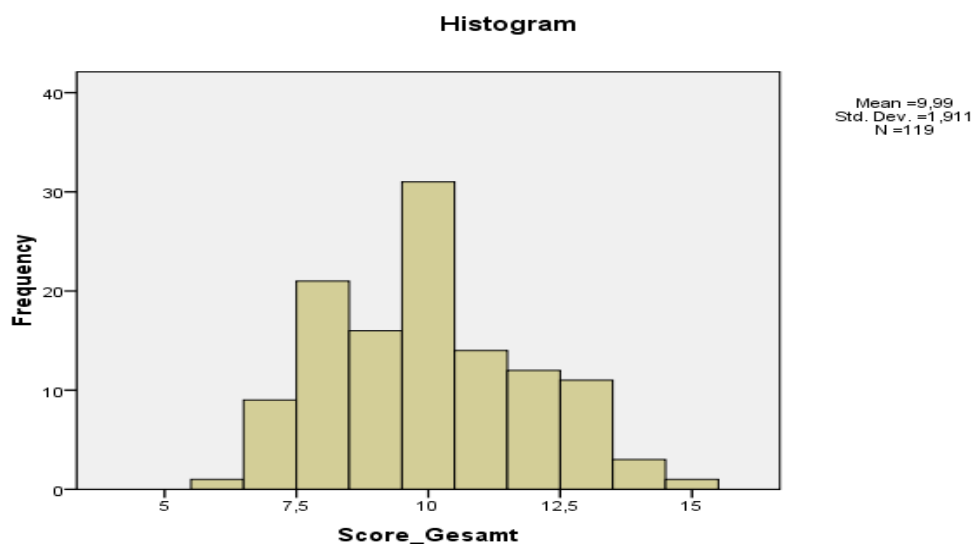


Abbildung 27: Häufigkeitsverteilung der Gesamtpunktzahl zu Kenntnissen über Malaria in den Dörfern Bagala und Tonkoroni.

In Abbildung 27 ist keine eindeutige Normalverteilung der Gesamtpunktzahl zu erkennen. Mittels des Mann-Whitney-U-Test und Wilcoxon-Test wurde untersucht, ob sich die Mittelwerte der Gesamtpunktzahl der Dörfer nicht signifikant von denen der Städte unterscheiden. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt:

	Gesamtpunktzahl
Mann-Whitney-U	10258,5
Wilcoxon W	17398,5
Z	-2,076
Aymptotisches Alpha (2-seitig)	0,038

Tabelle 14: Ergebnisse von Mann-Whitney-U- und Wilcoxon Test.

Bei einem Signifikanzniveau von 0,05 und $\alpha = 0,038$ ist von einem signifikanten Unterschied des Mittelwerts der Gesamtpunktzahl zwischen Städten und Dörfern auszugehen.

3.3.1.3 Korrelation der Kenntnisse über Malaria mit Faktoren wie Schulbildung und Alter

Um einen Zusammenhang zwischen den Merkmalen Malaria Kenntnissen und Schulbildung bzw. Alter zu untersuchen wurde eine bivariate Korrelationsanalyse durchgeführt. Hierbei wurde die Korrelation zwischen Schulbildung in Jahren und dem Z-Score der Gesamtpunktzahl berechnet. Bei nicht ganz eindeutiger Normalverteilung der Gesamtpunktzahl des Themenkomplexes Kenntnisse wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson (Normalverteilung) und Spearman durchgeführt. Beide ergaben nahezu identische Ergebnisse. Es konnte eine mittlere Korrelation zwischen Schulbildung und Malaria-Kenntnissen festgestellt werden. Exemplarisch sind die Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman der Dörfer und Städte in den Tabellen 15 und 16 dargestellt:

Ouagadougou und Nouna		Schulbildung in Jahren	Z-Score (Gesamtpunktzahl)
Schulbildung (in Jahren)	Korrelation nach Spearman	1	0,313
	Alpha (2-seitig)		0,000
	N	200	200
Z-Score (Gesamtpunktzahl)	Korrelation nach Spearman	0,313	1
	Alpha (2-seitig)	0,000	
	N	200	200

Tabelle 15: Spearman Korrelation von Schulbildung und Malaria Kenntnissen in den Städten Nouna und Ouagadougou.

Tonkoroni und Bagala		Schulbildung in Jahren	Z-Score (Gesamtpunktzahl)
Schulbildung (in Jahren)	Korrelation nach Spearman	1	0,211
	Alpha (2-seitig)		0,021
	N	119	119
Z-Score (Gesamtpunktzahl)	Korrelation nach Spearman	0,211	1
	Alpha (2-seitig)	0,021	
	N	119	119

Tabelle 16: Spearman Korrelation von Schulbildung und Malaria Kenntnissen in den Dörfern Bagala und Tonkoroni.

Eine Spearman Korrelation von 0,313 der Befragten der Städte und 0,211 der Dörfer deutet bei einem Signifikanzniveau von 0,05 auf eine mittelstarke Korrelation beider Faktoren hin. Befragte mit mehr Schulbildung weisen also auch bessere Malaria Kenntnisse auf.

Auch die Regressionsanalyse zeigt eine positive Korrelation zwischen Malaria-Kenntnisse und Schulbildung (siehe Abbildungen und Tabellen im Anhang).

Zwischen Alter und Kenntnissen konnte eine sehr schwach positive Korrelation ermittelt werden (siehe Abbildungen und Tabellen im Anhang). Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen dargestellt:

Ouagadougou und Nouna		Alter in Jahren	Z-Score (Gesamtpunkzahl)
Alter (in Jahren)	Korrelation nach Spearman	1	0,081
	Alpha (2-seitig)		0,254
	N	200	200
Z-Score (Gesamtpunkzahl)	Korrelation nach Spearman	0,081	1
	Alpha (2-seitig)	0,254	
	N	200	200

Tabelle 17: Spearman Korrelation von Schulbildung und Malaria Kenntnissen in den Städten Nouna und Ouagadougou.

Tonkoroni und Bagala		Alter in Jahren	Z-Score (Gesamtpunkzahl)
Alter (in Jahren)	Korrelation nach Spearman	1	0,073
	Alpha (2-seitig)		0,430
	N	119	119
Z-Score (Gesamtpunkzahl)	Korrelation nach Spearman	0,073	1
	Alpha (2-seitig)	0,430	
	N	119	119

Tabelle 18: Spearman Korrelation von Alter und Malaria Kenntnissen in den Dörfer Bagala und Tonkoroni.

Die Spearman Werte 0,081 und 0,073 sind nahe am Signifikanzniveau 0,05 und sprechen daher für wenig Zusammenhang.

3.3.2 Betroffenheit und Gesundheitsverhalten im Fieberfall

Die große Betroffenheit der Befragten, dargestellt in Abbildung 28, veranlasst einen Großteil der Befragten nach Therapien zu verlangen. Mehr als 80% alle Befragten litten mindestens einmal im vorangegangenen Jahr subjektiv an Fieber-Episoden, die sie mit Malaria

verbunden. Mehr als die Hälfte aller Befragten erlitten sogar mehr als zwei Fieber-Episoden.

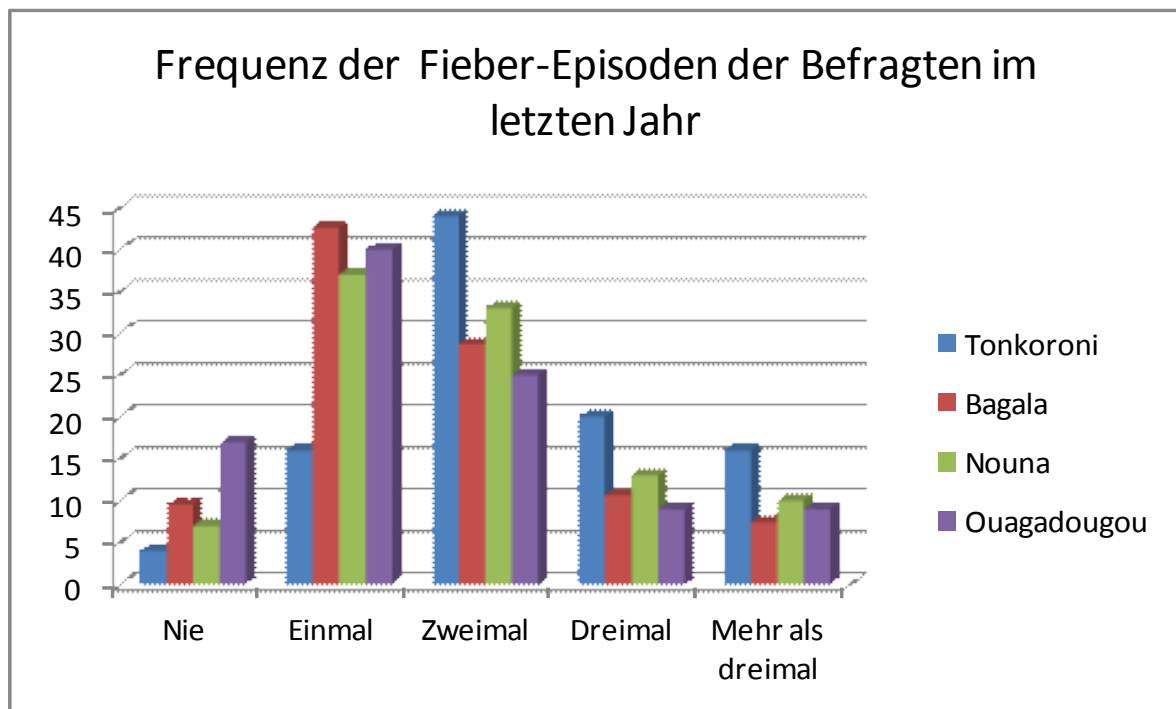


Abbildung 28: Frequenz der Fieber-Episoden im vorangegangenen Jahr in Prozentpunkten.

Die subjektive Belastung durch die Erkrankung wurde wiederholt zum Ausdruck gebracht. Die Wichtigkeit einer verfügbaren Therapie wurde während der Interviews immer wieder stark von den Befragten betont. Wie in Abbildung 29 gezeigt, halten über 70% der Befragten eine verfügbare Therapie für sehr wichtig; die restlichen Befragten sahen sie als wichtig an. Immer wieder wurde in persönlichen Gesprächen hervorgehoben, dass meist aus finanziellen Gründen kein Zugang zur adäquater Behandlung bestünde. Man leide nicht nur unter den direkten Kosten durch die Krankheit, sondern auch unter den indirekten Folgen von Malaria durch regelmäßigen Arbeitsausfälle, die die Haushalte und somit die gesamte Familie belasten würden.

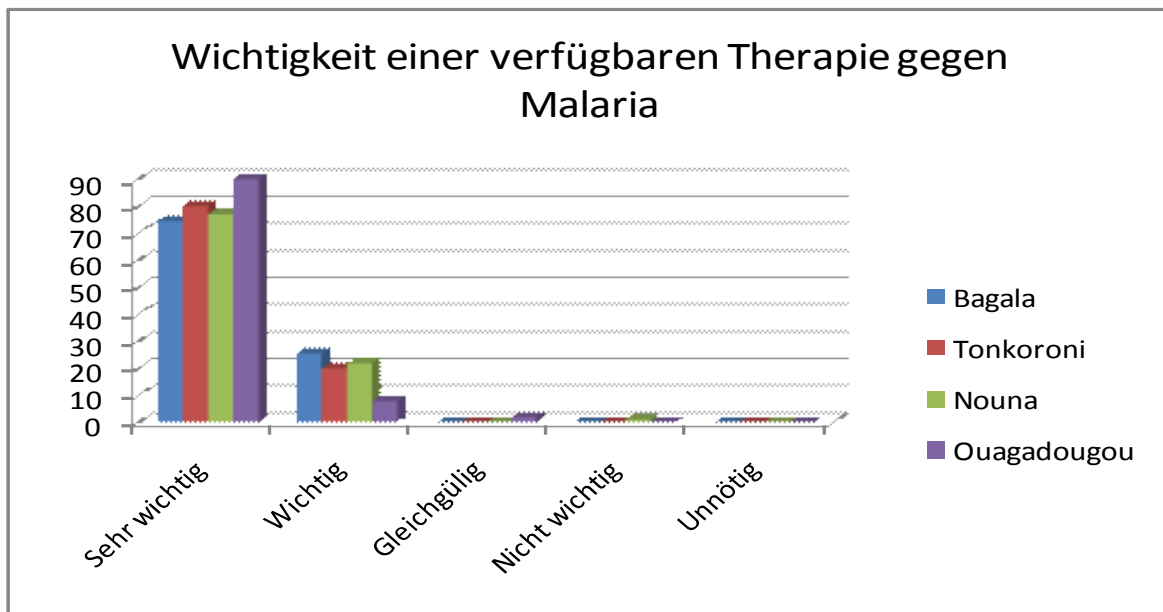


Abbildung 29: Wichtigkeit einer verfügbaren Malaria Therapie (dargestellt in Prozentpunkten).

Besonders in der ländlichen Region ist der Zugang zu Gesundheitseinrichtung verschiedenen Gründen erschwert. Deutlich weniger als 30% der Befragten in den Dörfern konsultierten eine Gesundheitseinrichtung im Fall von Fieber (Abbildung 30).

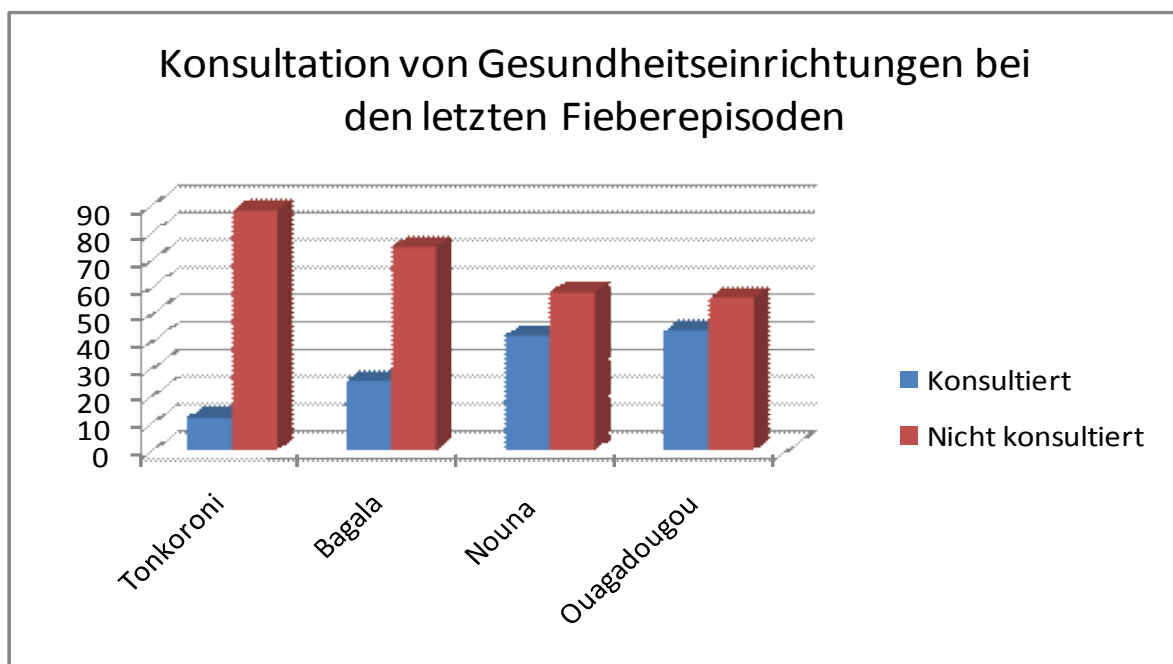


Abbildung 30: Prozentualer Anteil der Befragten, die bei Fieberepisoden primär eine Gesundheitseinrichtung konsultieren.

Die meisten Befragten räumten ein, primär mit traditionellen Heilmethoden die Krankheit zu behandeln und erst bei sehr schwerer Krankheit eine Gesundheitseinrichtung zu konsultieren. Als Hauptgrund hierfür wurden mangelnde finanzielle Mittel und zu lange Wege zu den nächstgelegenen Gesundheitseinrichtungen aufgeführt. In den Städten konsultiert generell ein höherer prozentualer Anteil der Befragten primär bei Fieber ein Gesundheitszentrum. Auch hier räumten jedoch über die Hälfte der Befragten ein, im Fieberfall nicht zu konsultieren.

3.3.3 Teilnahmebereitschaft der Befragten an einem E-Day-artigen Projekt

Die Befragten äußerten sich insgesamt positiv zu einer Teilnahme an einem E-Day-artigen zukünftigen Malaria-Projekt. Wie in Abbildung 31 gezeigt wird, sind nahezu alle Befragten bereit an einem solchen Projekt teilzunehmen.

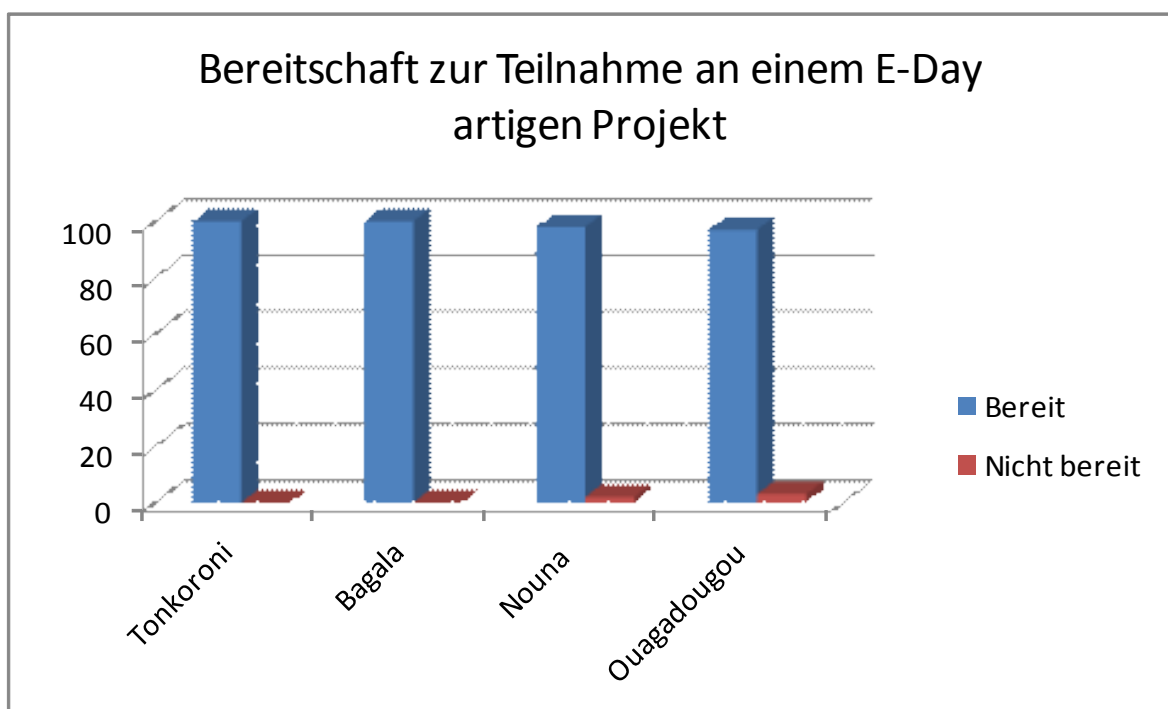


Abbildung 31: Bereitschaft der Befragten zur Teilnahme an einem E-Day-artigen Projekt (dargestellt in Prozentpunkten).

Weit über 79% der Befragten waren, in den ländlichen Regionen, zur Einnahme eines Anti-Malaria-Medikaments (bei fehlenden Krankheitssymptomen) über einen Zeitraum von 10 Wochen im Rahmen eines E-Day-artigen Projekt bereit. In den urbanen Regionen war die Teilnahmebereitschaft geringfügig niedriger. Hier waren jedoch auch immer noch 75% in Ouagadougou und 76% der Befragten in Nouna bereit Medikamente über einen derartigen Zeitraum einzunehmen (Abbildung 31). Die Hauptgründe für mangelnde Bereitschaft waren die persönliche Einschätzung keine Medikamente über einen langen Zeitraum einnehmen zu können, Angst vor Nebenwirkungen und der eigenen Vergesslichkeit.

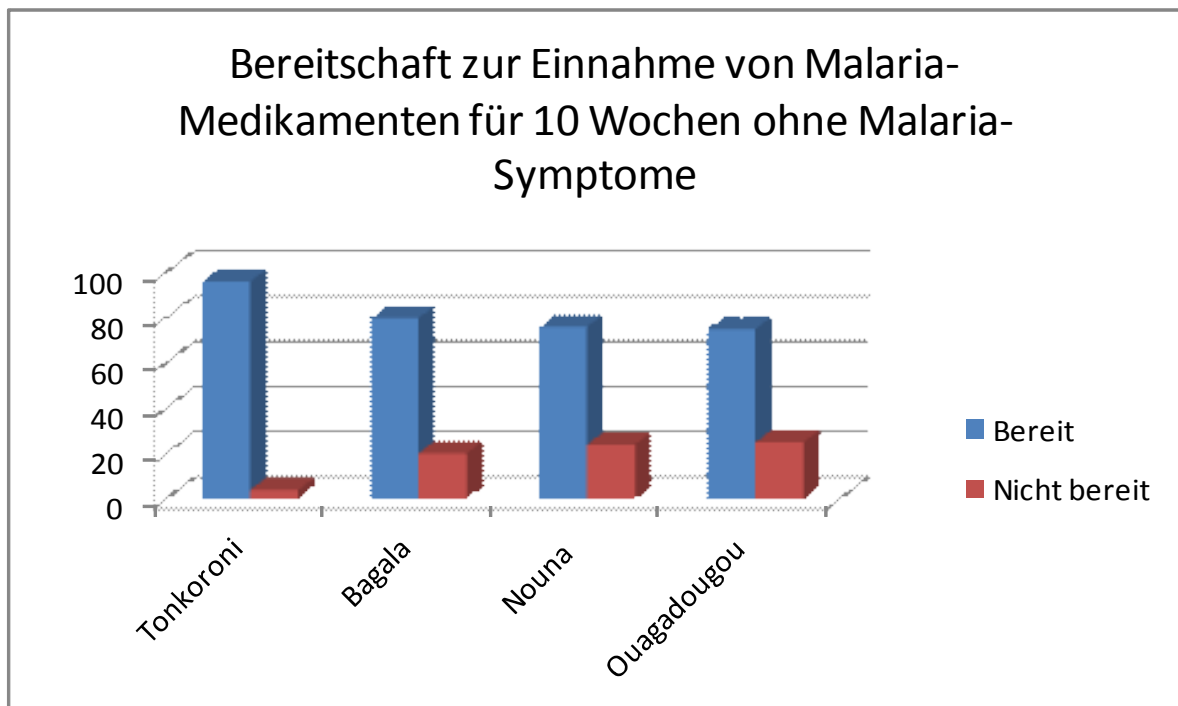


Abbildung 32: Bereitschaft zur Einnahme von Malaria-Medikamenten für 10 Wochen ohne Malaria-Symptome (dargestellt in Prozentpunkten).

In Abbildung 33 sind die Nebenwirkungen gezeigt, die die Befragten bereit wären zu tolerieren. Sowohl in den Städten als auch in den Dörfern waren die meisten Befragten bereit, blauen Urin als Nebenwirkung zu tolerieren. Bis zu 50% der Befragten wären ferner bereit, Übelkeit zu tolerieren. In Nouna zeigte sich insgesamt eine

niedrigere Toleranzbereitschaft von Nebenwirkungen. 33% schlossen eine Toleranz von Nebenwirkungen aus. Dies könnte von häufig durchgeführten klinischen Studien in Nouna mit verursacht sein.

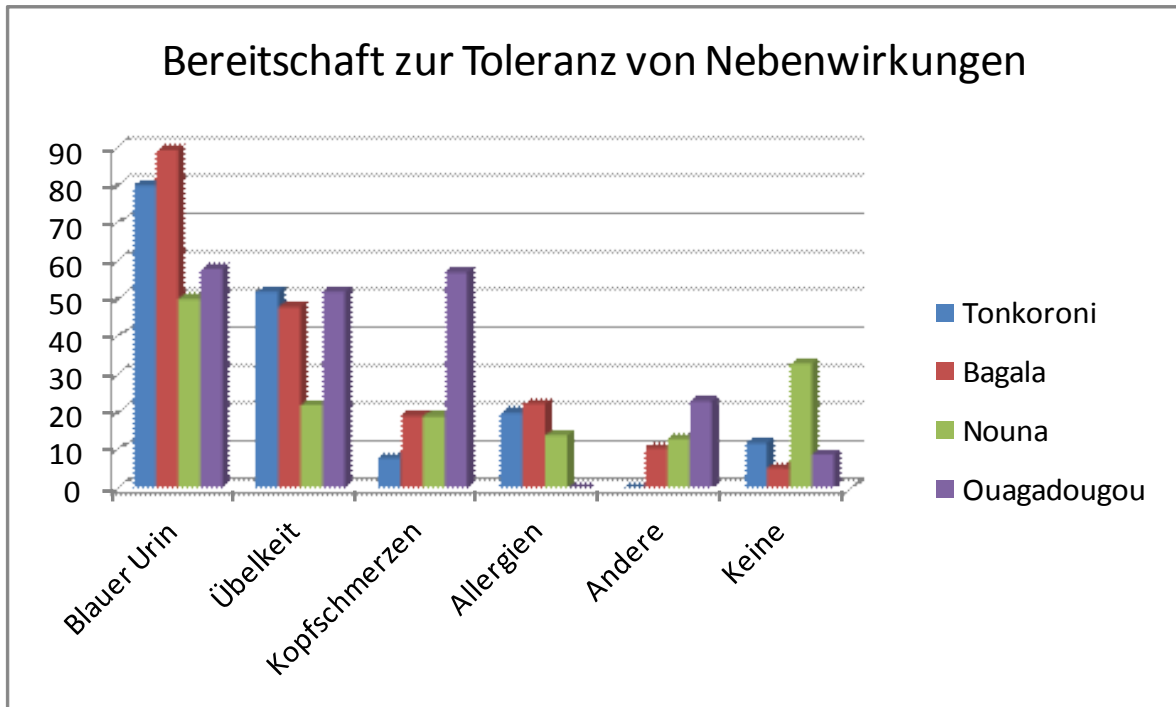


Abbildung 33: Bereitschaft zur Toleranz von Nebenwirkungen (dargestellt in Prozentpunkten).

3.3.4 Einstellung der Befragten zur modernen/westlichen Medizin im Vergleich zur traditionellen Medizin.

Insgesamt waren die Befragten der modernen Medizin gegenüber sehr aufgeschlossen. Über 95% der Befragten beider Dörfern und Städten waren davon überzeugt, dass die moderne/westliche Medizin im Stande ist, Malaria effektiv zu heilen. Wie in Abbildung 34 und 35 dargestellt, schätzt die Mehrzahl der Befragten die moderne Medizin als wirksam ein. Auch die traditionelle Medizin betrachtet man als effektiv. Generell stuft man sie jedoch als deutlich weniger effektiv im Vergleich zur modernen Medizin ein. Die traditionelle Medizin wird neben spirituellen Gründen meist als einzige Alternative konsultiert. In den Interviews wurde immer wieder eingeräumt, dass die traditionelle Medizin zwar bei

bestimmten Krankheiten weniger wirksam sei, jedoch bei anderen Krankheiten als einzige ein Heilung zu bringen vermag. Vor allem die Dorfbevölkerung glaubte, dass viele Krankheiten mit bösen Geistern assoziiert seien und nur durch die traditionelle Medizin zu behandeln sei.

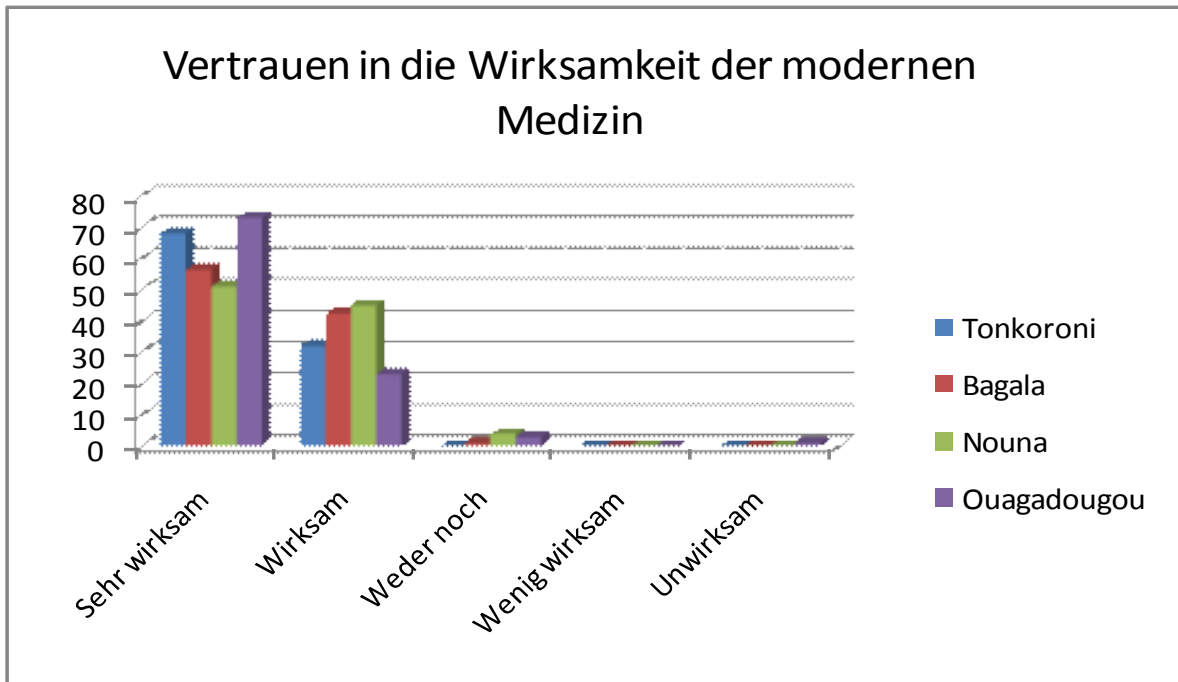


Abbildung 34: Vertrauen in die Wirksamkeit der modernen Medizin (dargestellt in Prozentpunkten).

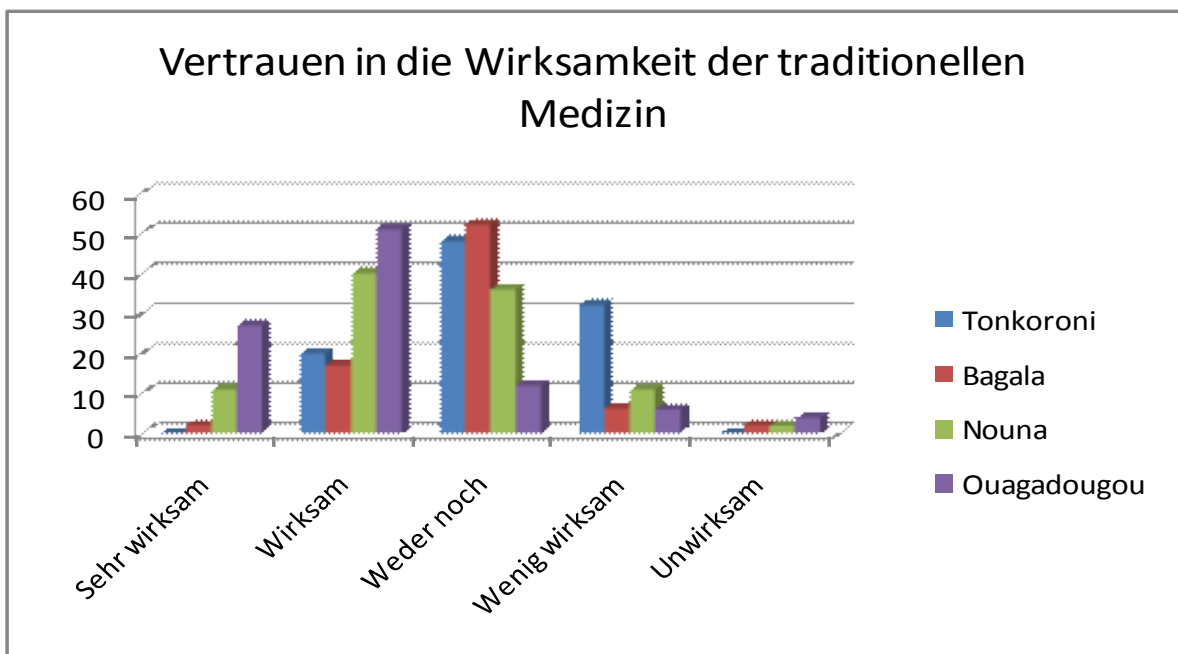


Abbildung 35: Vertrauen der Befragten in die traditionelle Medizin (dargestellt in Prozentpunkten).

4. Diskussion

4.1 Notwendigkeit neuer pharmazeutischer Strategien

Die Malaria-Situation in Burkina Faso ist weiterhin alarmierend. Malaria, am häufigsten verursacht durch *P. falciparum*, stellt hier als häufigster Grund für Todesfälle und Konsultationen das größte Gesundheitsproblem dar (Daten aus 2005) [6]. Hauptbetroffene der Krankheit sind Schwangere, Kinder unter 5 Jahren und alte Menschen. In Burkina Faso, einem der ärmsten Länder der Welt, müssen 54% der Gesundheitskosten direkt von der Bevölkerung getragen werden, was eine hohe Belastung für die einzelne Haushalte darstellt [189]. Im Nouna Gesundheitsbezirk, im Nordwesten von Burkina Faso gelegen, wo Malaria endemisch mit saisonaler Häufung der Erkrankung von Juni bis Oktober auftritt, erleiden Kinder unter fünf Jahren mindestens sechs Fieber- und zwei Malaria-Episoden pro Jahr [190]. Malaria ist hier der häufigste Grund kindlicher Todesfälle bei einer Kindersterblichkeitsrate von 35/1000 pro Jahr in diesem Gebiet [191]. Seit Dekaden versucht man in Burkina Faso der Malaria Herr zu werden. Nach Scheitern verschiedener Eradikations- und Kontrollprogramme mit DDT und Massen-Chemoprophylaxe seit den Vierzigern, versucht man seit 1992 vertikal, mit regelmäßig aktualisierten nationalen Aktionsplänen, angelehnt an die WHO Politik, die Krankheit zu kontrollieren [6]. Die aktuellen Strategien zur Bekämpfung der Malaria sind: Verbesserung einer prompten und effektiven Behandlung; Stärkung der Präventivmaßnahmen durch Applikation von Chemoprophylaxe bei Schwangeren, Verbreitung von Insektizid-behandelten Moskitonetzen, Vektoreindämmung, Abwassersanierung; Verbesserung des Kommunikations-, Monitoring- und Evaluierungssystems, Stärkung der Forschungsaktivitäten, Epidemieprävention und Ausbau der intersektoriellen nationalen und internationalen Partnerschaften und

Finanzierungsquellen [6]. In der Realität gestaltet sich die Umsetzung dieser Ansätze weiterhin sehr schwierig [32]. Nach WHO Schätzungen besaßen 2008 in Burkina Faso nur 18% der Haushalte ein Moskitonetz [30] und Resistenzen gegen gängige Malaria Medikamente breiten sich weiterhin aus. Besonders die schnelle Ausbreitung der Chloroquinresistenz, einem für Dekaden sichern und erschwinglichen Medikament, gilt als katastrophale Entwicklung für die öffentliche Gesundheit in Afrika südlich der Sahara [192]. In 1990 lag die Chloroquinresistenzrate in Burkina Faso bei 5% [193], in 2003 schon bei 63% [6]. Es erfolgte, gemäß den WHO-Empfehlungen, eine Umstellung der national empfohlenen Erstlinientherapie von Chloroquin auf Artemisinin basierte Kombinationen in 2005 [6]. Plasmodien sind offenbar Apikomplexa die durch Artemisinine besonders gut angegriffen werden können. Neu aufgetreten Resistenzen in West Kambodscha drohen jetzt jedoch die Wirksamkeit des bisher einzigen resistenzfreien Medikaments zu beeinträchtigen [35]. Nichtsdestotrotz stellt Artemisinin aktuell weiterhin die wirksamste pharmakologische Behandlungsoption gegen *P. falciparum* Malaria dar. 2009 hatten deshalb 77 von 81 Malaria endemischen Ländern Artemisinin basierte Kombinationstherapien, gemäß den WHO Empfehlungen, als Erstlinientherapie in ihre nationalen Behandlungsplan aufgenommen [30]. Ihre Anwendung mindert rasch eine bestehende Anämie und verringert die indirekte Infektiösität der Patienten durch schnelles Senken der Gametozytenzahlen [194], [195]. Die zelluläre Zielstruktur und der genaue Wirkmechanismus von Artemisinin sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Das Verständnis des Wirkmechanismus ist jedoch von großer Wichtigkeit im Anbetracht der drohenden aufkommenden Artemisinin-Resistenzen. Eine Aufklärung des genauen Wirkmechanismus kann generell dazu beitragen Resistenzen mit molekularen Techniken zu monitoren, und zum anderen, ein Derivat zu entwickeln, welches die Resistenz auslösenden Effekte der Mutation

im Zielprotein umgeht [128]. Generell sind für Artemisinine am ehesten zwei Resistenz Mechanismen denkbar: Mutation des Multi-Medikamentenrezeptors (und damit in der Regel gesteigerter Medikamenten Efflux aus dem Parasiten) und (Punkt-)Mutationen im Zielprotein [128]. Viele Studien weisen auf den sakroendoplasmatischen Calciumtransporter SERCA, eine P-Typ-ATPase, als die einzige Zielstruktur von Artemisinin hin und bisher konnte keine andere Theorie so gut untermauert werden, auch wenn die Studien diesbezüglich noch lange nicht abgeschlossen sind [128], [129] [132]. SERCA Transporter sind generell weit verbreitet und kommen in bakteriellen und eukaryotischen Plasmamembranen vor. Menschen verfügen auch über SERCA Transporter, die sich allerdings wesentlich von Plasmodien SERCA-Transporter unterscheiden. Muskoskelettale SERCA1a von Säugetieren konnte auch in hohen Konzentrationen nicht durch Artemisinin beeinträchtigt werden [132]. Uhlemann et al. konnten zeigen, dass einzelne Aminosäuremutationen im SERCA Transporter im Stande sind, die Wirkung von Artemisinin aufzuheben. Feldstudien in Französisch Guayana konnten diese Annahme bestätigen. Hier zeigten Isolate mit erhöhter mittleren inhibitorischen Konzentrationen eine Substitution von S769N in PFATP6 [196]. Unsere bioinformatische Domänenanalyse konnte gleiche funktionelle Domänen in den unterschiedlichen Plasmodienspezies nachweisen. *P. ovale* und *P. malariae* wurde in diese Analysen allerdings nicht eingeschlossen, da keine ausreichende Genomdaten zu ihnen vorliegen. Bei guter Wirksamkeit von Artemisinin auch auf *P. ovale* und *P. malariae*, lässt dies eine gleiche Zielstruktur vermuten [197]. Ein von mir durchgeführter iterativer Sequenzvergleich der Artemisinin bindenden Domäne in verschiedenen Datenbanken, bestätigt die bisherigen Arbeiten, die SERCA als einzige Zielstruktur identifizieren. Die Artemisinin bindende E1-E2-Domäne konnte nur in ATPasen identifiziert

werden. Ähnliche Domänen zeigten sich auch in SERCA ATPasen von Toxoplasmen, was eine Wirkung von Artemisinin auf Toxoplasmen vermuten lässt, die interessanterweise auch *in vitro* und *in vivo* nachzuweisen ist [142]. SERCA als alleiniges Zielprotein bedeutet folglich eine große Gefahr von Resistenzentwicklungen bei Mutation dieser einzigen Zielstruktur. Docking Analysen von Jung et al. (2005) ergaben, dass die Hauptbindung von Artemisinenen an SERCA über hydrophobe Wechselwirkungen der Seitenketten der c12 β -Position mit hydrophoben Resten wie Leucin263, Isoleucin272 und Phenylalanin273 erfolgt [143]. In meiner Homologiemodellierung konnte gezeigt werden, dass eine Punktmutation reicht, um Strukturen zu ändern und dass diese relevanten Aminosäuren genau am Übergang zwischen Membran und zytoplasmatischer Struktur lokalisiert sind. Dies bedeutet, dass eine Punktmutation relativ spontan auftreten kann und damit ein Faktor für schnelle Resistenzentwicklung vorliegt. Dagegen ist die Mutation eines funktionell wichtigen Restes für die Calciumbindung eher unwahrscheinlich (negative Selektion). Die Überlagerung beider Faktoren macht es besonders wahrscheinlich, dass die wenigen zulässigen Mutationen, die sowohl Resistenz gegen Artemisinin als auch funktionelle Calciumbindungen betreffen, genau am Domänenübergang zu finden sind. Dies konnte sowohl in unserem Modell als auch bei experimentell aufgefundenen Mutationen gezeigt werden [140]. Theoretisch sind natürlich auch andere Resistenzmechanismen denkbar. Beispielsweise scheinen die neu aufgetretenen Resistenzen in West Kambodscha nicht mit PfATPase oder dem Multi-Medikament Resistenz Gen (PfMDR) assoziiert zu sein [35]. Hier sind weitere Studien zur genauen Aufklärung des Resistenzmechanismus nötig. Zusätzlich besteht die Gefahr, dass die kurze Halbwertszeit von Artemisinin sowie die möglich non-Compliance bei einer nötigen Medikamenteneinnahme von 7 Tagen zur kompletten Parasiten Clearance, eine weitere

Entstehung von Resistenzen fördert. Trotz gegenteiliger Empfehlung der WHO werden immer noch Monotherapien verwendet, worunter es in bis zu mehr als einem Viertel der Fälle zu einem Wiederausbrechen der Erkrankung kommt und die zur Entstehung zukünftiger Resistenzen beitragen [198]. Im Anbetracht drohender Resistenzen bei immer stärkerem Gebrauch von Artemisinin, werden effektive neue medikamentöse Strategien dringend benötigt [32]. Das Ausbreiten einer Artemisinin Resistenz wäre katastrophal, da derzeit keine alternativen medikamentösen Strategien zu Verfügung stehen und kein zugelassener Kombinationspartner frei von Resistenzen ist. Das zur Behandlung von Methämoglobinämien zugelassene Medikament Methylenblau hat nachgewiesene Anit-Malaria Eigenschaften, ist nach bisherigen Erkenntnissen resistenzfrei und könnte somit einen geeigneten Kombinationspartner für Artemisinin darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass Methylenblau und Artemisinin in in vitro Tests synergistisch wirken. Durch die unterschiedlichen Zielproteine, theoretisch überall dort, wo der Farbstoff hin zu diffundieren vermag, wird diese Kombination höchstwahrscheinlich in der Lage sein, aufkommende Resistenzen (auch bei mutiertem Multi drug Rezeptor) zu verhindern [79].

4.2 Einsatz von Methylenblau als vielversprechendes Anti-Malaria Medikament

Als eines der ältesten synthetischen Medikamente gegen Malaria, wurde Methylenblau bereits vor 100 Jahren sogar bei Kindern zur Behandlung von Malaria verwendet [199], [147], [200]. Mit dem Erscheinen von anderen Medikamenten, beispielsweise Chloroquin, geriet Methylenblau als alternatives Malaria-Medikament in Vergessenheit. Die schizontozide Aktivität von Methylenblau scheint auch gegen Chloroquin sensitive und resistente *P. falciparum* in niedrigen Konzentrationen zu wirken, was

sein hohes Potential gegen Schizonten von *P. falciparum* widerspiegelt. Methylenblau verhindert die Polymerisation von Häm in Hämozoin, ähnlich wie 4-Amino-Chinolon-Malaria-Medikamente und beeinflusst das Wachstum des Parasiten durch Inhibition des (Met-) Hämoglobinabbaus [73], [57]. Es schützt ferner vor der Bildung von Methämoglobin, einer schwerwiegenden Komplikation der Malaria Anämie [201]. Methylenblau wirkt an multiplen Zielproteinen, wobei zwei von ihnen, Methämoglobin und β -Hämatin, nicht vom Genom des Parasiten kontrollierbar sind. Hierdurch werden Resistenzentwicklungen unwahrscheinlich [44]. Methylenblau agiert als ein prooxidatives Agens und inhibiert selektiv nicht-kompetitiv die Glutathion Reduktase [66], [72], [73]. Klinische Studien haben bereits die Kombination von Methylenblau mit Chloroquin an Kinder zwischen 6 und 59 Monaten untersucht. Die Studie konnte zwar indirekt die Effektivität von Methylenblau zur Behandlung der unkomplizierten Malaria nachweisen, die Kombinationstherapie zeigte sich jedoch in den meisten Fällen als unzureichend effektiv. Der wahrscheinlichste Grund hierfür sind hohen Resistenzraten gegen Chloroquin in dem Studiengebiet [78]. In vitro Versuche konnten ferner eine antagonisierende Wirkung von Methylenblau und Chloroquin nachweisen, so dass Chloroquin nicht der ideale Kombinationspartner für Methylenblau zu sein scheint [79]. Eine ideale Medikamentenkombination sollte generell folgende Eigenschaften aufweisen: unterschiedliche Zielstrukturen, keine Medikamenteninteraktionen, gute Verträglichkeit, wenig Nebenwirkungen, kurze Behandlungsdauer, Wirkung gegen asexuelle Stadien, Partner mit langer Halbwertszeit, breites Wirkspektrum (auch gegen Gametozyten) und niedriger Preis [198]. In dieser Arbeit wird nicht detailliert auf die exakte Wahl des optimalen Kombinationspartners eingegangen, sondern es wird vielmehr die Rolle von Methylenblau als effektives Malariamedikament bzw. Kombinationspartner gezeigt und

dessen Wirkweise auch erstmalig bioinformatisch untersucht. Geeignete Kombinationspartner sind aktuell Gegenstand intensiver Forschung und ich verweise hierzu auf die Arbeiten von Schirmer et al., Akrochere et al., Meissner et al., Coulibaly et al., Zoungrana et al., Becker et al., Bozdech et al., Ginsburg et al. u.a..

4.3 Multi-Hit Aspekt und antibiotischer Synergie Effekt von Methylenblau.

Wir können in unseren bioinformatischen Analysen zusätzliche Daten für die effektive Wirksamkeit von Methylenblau auf das Redoxnetzwerk liefern und modellieren, welche zentrale Redoxstoffwechselwege durch Methylenblau beeinträchtigt werden. Verschiedenen Stoffwechselwege werden durch Methylenblau attackiert, was wir sowohl theoretisch, mittels extremer Pathway-Analyse, als auch praktisch mit Hilfe unserer kollaborierenden Gruppe unter Leitung von Katja Becker nachweisen konnten. Ihre Gruppe konnte mittels Real-time PCR den Einfluss von Methylenblau auf die mRNA Expression verschiedener Schlüsselenzyme ermitteln. Hierbei konnte eine Verminderung der Expression der meisten Schlüsselenzyme gezeigt werden. Die multiplen Effekte von Methylenblau auf das Redoxstoffwechselnetzwerk unterstützen den Multi-Hit-Aspekt von Methylenblau und stärken erste Hinweise auf ein gutes Kombinationspotential mit anderen Standard-Malaria Medikamenten wie Artemisinin (BlueArte) oder Amodiaquin (BlueDIAQIN) [202] .

Im Trophozoitenstadium, wo der Parasit mit der intensiven Verdauung des Wirtshämoglobins beginnt, ist der Parasit massivem oxidativen und nitrosativen Stress ausgesetzt und auf ein effektives antioxidatives Verteidigungssystem angewiesen [57], [157]. Wir konnten auch bioinformatisch zeigen, dass in diesem Stadium die Hauptaktivität des Parasiten in der Protektion vor oxidativem und nitrosativen Stress und

der dazu nötigen Energieproduktion liegt. Methylenblau beeinträchtigt maßgeblich diese Prozesse [73]. Zu erkennen ist eine Down-Regulierung der Stoffwechselwege zur Glutathionreduktase-Protektion mit nur geringem Erholungspotenzial. Dasselbe gilt für viele Stoffwechselwege zur Proteinprotektion, Detoxifikation von 2-Oxoaldehyden, der Generation und Konversion von Keto-Zuckern, dem unteren Anteil der Glycolyse und der Glutathionsynthese. Zu beachten ist bei der Bewertung der Moden, dass mRNA Expressionsdaten nicht gleichzusetzen sind mit realen Enzym Expressionsdaten, sondern hier nur eine brauchbare Annäherung liefern. Wir nutzten diese Annäherung hier nur um das Potenzial von Methylenblau zu unterstreichen, wofür uns eine semi-quantitative Aussage zur Wirkung von Methylenblau ausreicht. Wir können klar die trophozoitoziden Effekte von Methylenblau zeigen. Es ist anzunehmen, dass eine Stoffwechselmodellierung von den berichteten gametoziden Effekten über ähnliche Stoffwechselwege ablaufen würde, und ähnliche Moden beeinflussen würde.

Wie bereits erwähnt, sind wirksame Medikamentenkombinationen Paradigmen im Kampf gegen Malaria und stellen eine wichtige Strategie zur Verhinderung der Resistenzausbreitung dar. Artemisinin und Amodiaquin als Kombinationspartner für Methylenblau zeigten in klinischen und in vitro Studien gute Ergebnisse. Von Zoungrana et al. konnte eine effektive Wirksamkeit dieser Kombinationen in einer Studie an Kindern mit unkomplizierter Malaria zwischen 6 und 10 Jahren nachgewiesen werden [202]. Eine jüngste Studie von Coulibaly et al. zeigte, dass die Kombinationstherapien Methylenblau-Artesunat und Methylenblau-Amodiaquin gegenüber der Standardtherapie von Artesunat-Amodiaquin eine doppelt so gute Wirksamkeit gegen Gametozyten aufweisen [74]. In vitro konnte ferner eine Synergie zwischen Artemisinin und Methylenblau nachgewiesen werden [79]. Ein

negativer Aspekt des Medikaments ist der bittere Geschmack, was Nebenwirkungen wie Erbrechen provoziert und durch Applikation des Medikaments in einem Sirup oder in Tablettenform gemindert werden kann [202]. Der in der von Coulibaly et al. gezeigte starke gametozide Effekt von Methylenblau Kombination auf *Plasmodium falciparum* ist ein weiteres starkes Argument für die Verwendung von Methylenblau in Malaria Kontroll- bzw. Ausrottungsprogrammen [202]. Methylenblau scheint ein adäquater Kombinationspartner zum Verhindern von Resistenzen zu sein und zeichnet sich besonders durch seinen kostengünstigen Preis im Vergleich zu anderen Malaria-Medikamenten aus.

4.4 Methylenblau als neue Strategie ist auch in Malaria Eradikationsprogrammen denkbar

Trotz wiederholter Malaria Infektionen schafft es der Malaria Parasit dem Immunsystem auszuweichen. Erwachsene in Endemiegebieten können zwar eine Semi-Immunität ausbilden, wodurch Krankheitssymptome milder ausgeprägt sind, die Ausbildung einer vollständigen dauerhaften Immunität ist jedoch (bisher) nicht möglich [10]. Für Kinder ist Malaria lebensbedrohlich und stellt weiterhin eine Hauptursache der Kindersterblichkeit in Burkina dar [191]. Aktuell ist trotz internationaler Bemühungen kein adäquater Impfstoff verfügbar. Der neue vielversprechende Kandidat RTS,S/AS01E konnte zwar in ersten Studien eine Reduktion der schweren Malaria um fast die Hälfte bewirken, bietet jedoch keinen vollständigen Schutz vor einer Infektion und ist eher als Ergänzung zu bestehenden Malaria Maßnahmen zu werten [24]. Die beste Methode die Holoendemie zu durchbrechen, stellt weiterhin die Unterbrechung des Lebenszyklus des Parasiten auf Vektor-, Schizonten- oder Gametozyten-Ebene dar [203]. Dies könnte im Rahmen eines lokalen Malaria-Ausrottungsprogrammes wie beispielsweise einer

Operation E-Day erfolgen. Lokale Eradikationsmaßnahmen in spezifischen Ländern oder Regionen wurde bereits von verschiedenen Autoren als Alternative zu einer globalen Eradikationsstrategie vorgeschlagen. Nach frühem Erfolg der Malaria Ausrottung in einigen Ländern Europas und Amerikas und Scheitern der Maßnahmen in den meisten Ländern Afrikas wurde lange das Ziel der Malaria-Kontrolle verfolgt [10]. Mittlerweile ist jedoch auch von Seiten der WHO Eradikation wieder ein Teil der aktuellen globalen Strategie [31] [204]. Zu Beginn dieser Arbeit war das Konzept der WHO noch die alleinige Malaria-Kontrolle. Wir präsentieren hier erstmalig Daten zu den nötigen Grundvoraussetzungen eines solchen Eradikationsprogrammes in einem lokalen Setting in Burkina Faso. Wir fokussieren uns hierbei darauf, den Bogen zu spannen zwischen Molekularen- und Modellierungsdaten mit direkten praktischen Implementierungsaspekten. Hierbei wird die Durchführbarkeit eines E-Day-artigen Ausrottungsversuches mit Hilfe von Metylenblau evaluiert. Wir konzentrieren uns hierbei auf die nötigen Schlüsselbedingungen, ohne die ein lokaler Malaria Ausrottungsversuch von vornherein nicht möglich wäre. Ein Fehlschlagen eines solchen Projektes würde aus einer mangelnden Teilnahmebereitschaft der Bevölkerung, Fehlen adäquater wirksamer Medikamente, Fehlen additiver Strategie oder Stoffwechseleffekten von Metylenblau resultieren.

Nichtsdestotrotz wurden zahlreiche weitere Fragestellungen, wie beispielsweise das konkrete Behandlungsregime, inklusive der Dauer und der tatsächlichen Effektivität eines Eradikationsversuches, die Größe des Gebiets und der Umfang der Maßnahmen, sowie die strukturellen Voraussetzungen, die zur praktischen Durchführung eines solchen Ausrottungsversuches nötig wären, hier nicht geprüft.

Sicherlich kann jeder dieser Grundvoraussetzungen noch detaillierter in weiteren Studien untersucht werden. Unser Ziel war jedoch die

Schlüsselaspekte (Teilnahmebereitschaft, möglicher effektive Medikamentenkombinationen mit Methylenblau als Kombinationspartner, Zielstrukturen von Malaria-Medikamenten sowie Methylenblau und dessen Wirkung auf den Redoxstoffwechsel unter Validierung mit Real-time PCR an Parasiten) zu untersuchen.

Insgesamt zeigte sich trotz relativ geringen Kenntnissen über Malaria und mangelndem Grundverständnis der Krankheit eine große Bereitschaft der Bevölkerung an zukünftigen E-Day-artigen Malaria Programmen teilzunehmen. In den Dörfern war 84% der Befragten nicht bewusst, dass Malaria allein durch Moskitos übertragen wird. Weit verbreitet ist der Glaube Malaria werde durch frische Früchte, Mais, böse Geister oder schlicht die Sonne übertragen. Es besteht eine Korrelation zwischen Kenntnissen über Malaria und Jahren an Schulbildung. Besonders in den Dörfern war die mittlere Anzahl der Jahre an Schulbildung der Befragten sehr niedrig und lag bei 1,77 Jahren in Bagala und 0,48 Jahren in Tonkoroni. Trotz Schulpflicht besuchen in Burkina nur wenige Kinder die Schule. In 2002 betrug die Einschulungsrate nur ca. 40%, in 1998 besuchten sogar nur 26,4 Prozent der Kinder zwischen sechs und 14 Jahren die Schule [205]. Laut Daten der CIA könne in Burkina nur 21,8% der Bevölkerung über 15 Jahren Lesen und Schreiben [206]. Wenig Korrelation bestand zwischen Alter und Malaria-Kenntnissen. Die stetige Präsenz von Malaria und die persönliche Betroffenheit, weit über 80% der Befragten litten im vergangenen Jahr mindestens einmal subjektiv unter Malaria, steigern das Verlangen nach effektiven Therapien und Anti-Malaria-Maßnahmen. Malaria als häufigste Todesursache bei Kindern unter fünf Jahren und die Tatsache, dass burkinische Kinder unter durchschnittlich sechs Fieberepisoden pro Jahr leiden, machen Malaria zu einem präsenten Problem [190], [191]. Über 97% aller Befragten war bereit an einem E-Day-artigen Malaria-Programm teilzunehmen und Medikamente ohne

Symptome einzunehmen. Diese Teilnahmebereitschaft war homogen in den Städten und Dörfern vorhanden, was eine gute Voraussetzung für den Erfolg von Malaria Programmen darstellt. Bei der konkreten Frage nach einer 10 wöchigen Medikamenteneinnahme waren in Bagala 80% und in Tonkoroni 96% der Befragten hierzu bereit. In den Städten war die Teilnahmebereitschaft etwas geringer bei 76% in Nouna und 75% in Ouagadougou. Über 88% der Befragten in Ouagadougou, Bagala und Tonkoroni waren auch bereit bei einem solchen Projekt Nebenwirkungen der Medikation zu tolerieren. In Nouna war die Toleranzbereitschaft mit 67% etwas geringer. Blauer Urin würde hierbei am besten als Nebenwirkung akzeptiert werden. Insgesamt zeigte sich bei den Befragten ein großes Vertrauen in die moderne Medizin. Sowohl in den Dörfern als auch in den Städten waren mehr als 95% der Befragten von einer Heilung der Malaria durch die westliche Medizin und deren Effizienz überzeugt. Die Wirksamkeit der traditionellen Medizin wurde insgesamt als geringer eingestuft. Dennoch wird in deutlich mehr als der Hälfte der Fieberfälle primär keine Hilfe bei Vertretern der westlichen/modernen Medizin in Anspruch genommen, sondern primär lokale traditionelle Heiler aufgesucht. Hauptgründe hierfür sind mangelnde finanzielle Mittel und lange Wege zur nächsten Gesundheitseinrichtung. Im Durchschnitt belaufen sich die direkten Kosten zur Behandlung einer Fieberepisode auf US\$ 2. Bei sechs Fieberepisoden pro Jahr wird der durchschnittliche Haushalt mit vier Kindern mit US\$ 48 pro Jahr nur für die präsumptive Behandlung von Malaria belastet und ist so für einen Großteil der Bevölkerung untragbar [207]. Ein Großteil der Malaria Episoden wird primär zu Hause behandelt, was auch weitere Studien belegen [208]. Unsere Umfrage (vgl. Fragebogen im Anhang; Teilauswertung in den Resultaten) hat noch eine Reihe weiterer Einzelaspekte zu Tage gefördert; die Fragenblöcke umfassen die Dimensionen Kenntnisse der Befragten über Malaria, Therapiebereitschaft, Betroffenheit der

Befragten, Einstellungen zur modernen Medizin (auch im Vergleich zur Traditionellen), Kontakt mit der modernen Medizin, Bereitschaft der Befragten Malaria-Medikamente für 10 Wochen ein zu nehmen (Wichtig für einen Eradikationstag) und schließlich die monatlichen finanziellen Möglichkeiten für Gesundheitskosten (bei der letzteren Dimension ist es prinzipiell schwierig, verlässliche Auskünfte in einer Befragung zu bekommen.) Es ist geplant, diese detaillierteren Aspekte in einer eigenen Arbeit in Zusammenarbeit mit der Tropenmedizin zu publizieren.

4.5. Implementierungspunkte

Zusammenschauend kann Methylenblau als ein geeignetes vielversprechendes Medikament für zukünftige Malaria Maßnahmen angesehen werden. Bereits in vielen Arbeiten konnten die Wirkungen von Methylenblau auf den parasitären Redoxstoffwechsel nachgewiesen werden [72], [73], [157], [159], [176], [183], [209]. Auch in ersten klinischen Studien konnte die Wirksamkeit vom Methylenblau belegt werden. Hier zeigte sich ein deutlicher gametozider Effekt. Die Kombination Methylenblau-Artesunat wirkt doppelt so gut gegen Gametoziten wie Artesunat-Amodiaquin [74]. Eine weitere Phase III Studie zur Wirksamkeit von Methylenblau gegen Malaria hat im Frühjahr 2011 gestartet. Neuste Studien konnten auch einen Effekt von Methylenblau gegen Alzheimer belegen [71]. In vorliegender Arbeit wurden bioinformatisch qualitative Effekte von Methylenblau auf das Redoxstoffwechselnetzwerk von Plasmodien untersucht. Hierbei wurden Daten für subletale Dosen verwendet. Die bioinformatischen und experimentelle Ergebnisse bestätigen die multi Hit-Theorie von Methylenblau und konnten weiter zum Verständnis der molekularbiologischen Wirkung des Medikamentes auf den parasitären Redoxkreislauf beitragen. Generell ist das konstruierte Netzwerk auch für letale Dosen und für jedes andere Medikament anwendbar, sofern

experimentelle Expressionsdaten zur Verfügung stehen. Der Vorteil des Modells ist es, dass auch der direkte Effekt von Medikamentenkombinationen unabhängig von deren Halbwertszeit untersucht werden kann. Des Weiteren ist das Modell ausbaufähig und wurde bereits um den Dihydrofolatstoffwechsel ergänzt, um im Rahmen neuer Medikamentenentwicklung Zielenzyme zu identifizieren. Hierbei wurden mittels Bioinformatik Zielproteine identifiziert, die sich später experimentell bestätigten. Das Modell dient also somit auch als Grundlage zur Entwicklung neuer Medikamente.

Wie schon erste klinische und in vitro. Studien belegten ist Methylenblau ein geeigneter Kombinationspartner und wäre als wirksames Medikament auch für zukünftige Eradikationsmaßnahmen geeignet [74], [79]. Die Idee der Eradikation ist aktuell auch von der WHO wieder aufgegriffen und hat die Politik der alleinigen Malaria-Kontrolle wieder abgelöst [31]. Vorteilhaft für die Implementierung von Methylenblau basierten Medikamentenkombinationen sind die hohe Aufgeschlossenheit der Gesellschaft für neue Strategien und neue Medikamente der modernen Medizin sowie die Toleranzbereitschaft Methylenblau typischer Nebenwirkungen. Die lokale Bevölkerung nimmt Malaria als massives Problem wahr und hat großes Vertrauen in die moderne Medizin. Sicherlich wäre es bis zu einer tatsächlichen Durchführung einer lokalen Eradikationsaktion noch ein weiter Weg zu deren Realisierung auch logistische, personelle, politische, finanzielle und organisatorische Voraussetzungen erfüllt werden müssten, doch konnte in der Umfrage gezeigt werden, dass die Teilnahmebereitschaft der Bevölkerung, deren Fehlen in der Vergangenheit zum Scheitern vieler Malaria Projekte geführt hat, gegeben ist [10]. Diese Teilnahmebereitschaft war homogen zwischen Städten und Dörfern verteilt, eine erfolgversprechende Voraussetzung für eine größer angelegte E-Day-artige Eradikationsmaßnahmen. Bei unserer Umfrage zeigte sich sogar eine

Bereitschaft zur mehrwöchigen Medikamenteneinnahme ohne Symptome, trotz unzureichendem Kenntnisstand der Bevölkerung zur Malaria. Besonders niedrig waren die Kenntnisse in den Dörfern, wo wenig Schulbildung bestand. Hier ist weiterhin dringend Aufklärungsarbeit gefragt, denn durch effektive und zeitnahe Behandlung und Prophylaxe ließen sich schon jetzt viele Todesfälle vermeiden und Erkrankungen verhindern [208]. Der Vorteil von Methylenblau als neue effektive Behandlungsstrategie ist für die Bevölkerung vor allem auch der niedrige Preis. Das hohe Kombinationspotential bei niedrigem Preis zeichnet Methylenblau als BONARIA Medikament aus und macht Methylenblau zu einer attraktiven neuen Alternative im Kampf gegen Malaria. Sicherlich lohnen sich weitere Studien zur Implementierung dieses aktuell einzigen resistenzfreien Medikaments.

5. Zusammenfassung

Trotz beträchtlicher Anstrengung, Malaria zu kontrollieren bzw. zu eradizieren, stellt Malaria weiterhin eines der gravierendsten Gesundheitsprobleme unseres Jahrtausends dar. Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung lebt in Malaria-Risikogebieten. Die Krankheit fordert jährlich zwischen 0,7 und 2,7 Millionen Menschenleben, beeinträchtigt u.a. schulische und soziale Entwicklung und hemmt erheblich das Wirtschaftswachstum der betroffenen Länder. Am stärksten in Mitleidenschaft gezogen sind die Länder Afrikas südlich der Sahara, wo von Malaria alle 30s ein Kinderleben gefordert wird. In Burkina Faso, einem der ärmsten Länder der Welt, stellt Malaria das größte Gesundheitsproblem dar und ca. ein Drittel aller Todesfälle werden hier der Malaria angelastet. Der Kampf gegen Malaria war und ist weiterhin eine anspruchsvolle globale Herausforderung und man versucht die „lessons learned“ in aktuelle Konzepte zu integrieren. Hintergrund dieser Arbeit bildet die Idee eines E-Days von Collin Orth und Heiner Schirmer: durch eine zehnwöchige Medikamenteneinnahme ab einem bestimmten Stichtag soll eine Parasitenfreiheit der Vektormücke erreicht werden und somit Malaria eradiziert werden. Obwohl die Durchführung eines derartigen Projekts global gesehen zum aktuellen Zeitpunkt utopisch erscheint, stellt diese Idee jedoch einen sehr interessanter Ansatz dar, deren Grundvoraussetzungen eine Überprüfung lohnen. In der Vergangenheit war einer der erheblichen Gründe für das Scheitern von Malariaprogrammen bzw. Eradikationsmaßnahmen eine mangelnde Kooperationsbereitschaft der afrikanischen Bevölkerung. In dieser Arbeit wurden die lokalen Voraussetzungen, speziell im Gesundheitsbezirk Nouna, mittels einer sozialmedizinischen Umfrage untersucht. Hierbei zeigte sich eine große Teilnahmebereitschaft an einem E-Day-artigen Projekt und ein starkes Vertrauen in die moderne Medizin. Die Kenntnisse der Befragten über Malaria zeigten sich jedoch unzureichend.

So wussten bis zu 84% nicht, dass Malaria von Mücken übertragen wird. Weit vorherrschend sind traditionelle Glaubensauffassungen sowie ein Halbwissen zur Krankheit. Zur effektiven Bekämpfung der Krankheit sind also primär eine umfassende Bildungs- bzw. Aufklärungsarbeit notwendig. Des Weiteren ist zur Realisierung eines derartigen Projekts eine effektive Medikamentenkombination nötig. Die sich ständig ausbreitenden Resistenzen gegen die aktuell zugelassenen Malaria-Medikamente stellen zunehmende Hürden im Kampf gegen Malaria dar. Auch gegen das bisher einzige resistenzfreie Medikament Artemisinin sind erste Resistenzen in Westkambodscha aufgetreten. Meine bioinformatische Untersuchung der wahrscheinlichsten Zielstruktur von Artemisinin, dem sarkoendoplasmatischen Calciumtransporter SERCA, einer P-Typ-ATPase, bestätigt die experimentellen Ergebnisse von SERCA als einzige Zielstruktur. Im iterativen Sequenzvergleich der Artemisinin bindenden E1-E2-Domäne in verschiedenen Datenbanken zeigte sich die Präsenz dieser Domäne nur in ATPasen. In meiner Homologiemodellierung konnte gezeigt werden, dass eine Punktmutation reicht, um die Struktur dieses Zielproteins zu ändern und dass die relevanten Aminosäuren genau am Übergang zwischen Membran und zytoplasmatischer Struktur lokalisiert sind. Punktmutationen können relativ spontan auftreten und stellen damit einen Faktor für schnelle Resistenzentwicklung dar. Im Anbetracht der sich rasant ausbreitenden Resistenzen und der bestehenden Gefahr von weiteren Resistenzentwicklungen werden neue medikamentöse Strategien dringend benötigt. Das zur Behandlung von Methämoglobinämien zugelassene Medikament Methylenblau hat nachgewiesene Anti-Malaria Eigenschaften und stellt eine neue Hoffnung im Kampf gegen Malaria dar. Methylenblau wirkt an multiplen Zielproteinen, wobei zwei von ihnen, Methämoglobin und β -Hämatin, nicht vom Genom des Parasiten kontrollierbar sind und dadurch Resistenzentwicklungen gegen

Methylenblau unwahrscheinlich werden. Als ein prooxidatives Agens inhibiert Methylenblau selektiv und nicht-kompetitiv die Glutathion Reduktase. Klinische Studien konnten bereits die Wirksamkeit von Methylenblau bestätigen. In einer aktuellen Studie in Burkina Faso mit 160 an Malaria erkrankten Kindern zwischen sechs und zehn Jahren wurden die Kombinationstherapien von Artemisinin und Methylenblau auf die Gametozyten im Blut getestet. Hier zeigte sich, dass beide Kombinationstherapien mit Methylenblau doppelt so gut gegen Gametozyten wie die Standardtherapie (Artesunat und Amodiaquin) wirken. In dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit von Methylenblau auf das Redoxnetzwerk mittels bioinformatischen Analysen untersucht. Verschiedene Stoffwechselwege werden durch Methylenblau attackiert, was wir sowohl theoretisch, mittels extremer Pathway-Analyse, als auch praktisch, mittels Real-time PCR, feststellen konnten. Hierzu wurden Daten der mRNA Expression verschiedener Schlüsselenzyme unter dem Einfluss von Methylenblau, mit Hilfe unserer kollaborierenden Gruppe unter Leitung von Katja Becker, untersucht. Experimentell konnte eine Verminderung der Expression der meisten Schlüsselenzyme gezeigt werden. Bioinformatisch ließ sich unter Verwendung der experimentellen Daten eine Hauptaktivität des Parasiten in der Protektion vor oxidativem und nitrosativen Stress und der dazu nötigen Energieproduktion im Trophozoiten Stadium nachweisen. Methylenblau beeinträchtigt maßgeblich diese Prozesse, beeinflusst multiple Stoffwechselwege und verstärkt den oxidativen und nitrosativen Stress des Parasiten. Die multiplen Effekte von Methylenblau auf das Redoxstoffwechselnetzwerk unterstützen den Multi-Hit-Aspekt von Methylenblau und stärken erste Hinweise auf ein gutes Kombinationspotential mit anderen Standard-Malaria Medikamenten wie Artemisinin (BlueArte) oder Amodiaquin (BlueDIAQIN). Unsere bioinformatischen und experimentellen Ergebnisse konnten weiter zum Verständnis der molekularbiologischen

Wirkung des Medikamentes auf den parasitären Redoxkreislauf beitragen. Generell ist das konstruierte Netzwerk auch für Expressionsdaten jedes anderen Medikaments anwendbar und kann somit die direkten Effekte von Medikamentenkombinationen unabhängig von deren Halbwertszeit untersuchen. Unsere Ergebnisse sowie erste klinische Studienergebnisse bestätigen Methylenblau als vielversprechenden neuen Kombinationspartner, der auch für zukünftige Eradikationsmaßnahmen geeignet erscheint. In unserer Umfrage zeigte sich eine hohe Aufgeschlossenheit gegenüber Methylenblau basierenden Eradikationsmaßnahmen, sowie eine hohe Toleranzbereitschaft von Methylenblau typischen Nebenwirkungen. Sicherlich gilt es bis zur Realisierung eines E-Day-artigen Projektes noch viele weitere Faktoren zu untersuchen, doch sehen wir in dem lokalen Setting in Burkina Faso bereits eine hohe Teilnahmebereitschaft der Bevölkerung, welche eine wichtige Grundvoraussetzung darstellt. Das hohe Kombinationspotential und der niedrige Preis qualifizieren Methylenblau zum BONARIA Medikament und machen es zur neuen Hoffnung im Kampf gegen Malaria.

6. Anhang

6.1 Domänen des SERCA-Transporters

Name der Domäne	Beschreibung	Beginn	Ende	E-value
Pfam:Kation_ATPase_N <i>P. falciparum</i>	Kationen-transportierende ATPase mit N-Terminus	3	81	1.50e-27
Pfam:Kation_ATPase_N <i>P. vivax</i>	Kationen-transportierende ATPase mit N-Terminus	7	81	5.17e-13
Pfam:Kation_ATPase_N <i>P. berghei</i>	Kationen-transportierende ATPase mit N-Terminus	7	81	2.32e-15
Pfam:Kation_ATPase_N <i>P. chabaudi chabaudi</i>	Kationen-transportierende ATPase mit N-Terminus	7	81	1.24e-15
Pfam:Cation_ATPase_N <i>P. yoeli yoeli</i>	Kationen-transportierende ATPase mit N-Terminus	7	81	3.11e-16
Pfam:E1-E2_ATPase <i>Plasmodium falciparum</i>	E1-E2 ATPase	99	348	6.90e-101
Pfam:E1-E2_ATPase <i>Plasmodium vivax</i>	E1-E2 ATPase	99	348	2.10e-78
Pfam:E1-E2_ATPase <i>Plasmodium berghei</i>	E1-E2 ATPase	99	348	8.80e-76
Pfam:E1-E2_ATPase <i>P. chabaudi chabaudi</i>	E1-E2 ATPase	99	348	3.20e-76
Pfam:E1-E2_ATPase <i>P. yoeli yoeli</i>	E1-E2 ATPase	99	348	2.80e-76
Pfam:Hydrolase <i>Plasmodium falciparum</i>	Halosäure Dehalogenase-ähnliche Hydrolase	352	935	6.60e-15
Pfam:Hydrolase <i>Plasmodium vivax</i>	Halosäure Dehalogenase-ähnliche Hydrolase	352	904	7.00e-14
Pfam:Hydrolase <i>Plasmodium bergei</i>	Halosäure Dehalogenase-ähnliche Hydrolase	352	825	1.40e-12

Name der Domäne	Beschreibung	Beginn	Ende	E-value
Pfam:Hydrolase <i>P. chabaudi chabaudi</i>	Halosäure Dehalogenase- ähnliche Hydrolase	352	824	3.10e-15
Pfam:Hydrolase <i>P. yoeli yoeli</i>	Halosäure Dehalogenase- ähnliche Hydrolase	352	821	7.70e-13
Transmembran-Domäne <i>Plasmodium vivax</i>	Transmembran Domäne	942	964	-
Transmembran Domäne <i>Plasmodium bergeri</i>	Transmembran Domäne	863	885	-
Transmembran Domäne <i>P. chabaudi chabaudi</i>	Transmembran Domäne	862	884	-
Transmembran Domäne <i>P. yoeli yoeli</i>	Transmembran Domäne	859	881	-
Pfam:Kation_ATPase_C <i>Plasmodium falciparum</i>	Kation transportierende ATPase mit C-Terminus	1031	1215	6.00e-75
Pfam:Kation_ATPase_C <i>Plasmodium vivax</i>	Kation transportierende ATPase mit C-Terminus	965	1180	1.30e-60
Pfam:Cation_ATPase_C <i>Plasmodium berhei</i>	Kation transportierende ATPase mit C-Terminus	886	1101	5.10e-62
Pfam:Kation_ATPase_C <i>P. chabaudi chabaudi</i>	Kationen- transportierende ATPase mit C-Terminus	885	1100	1.50e-62
Pfam:Kation_ATPase_C <i>P. yoeli yoeli</i>	Kation transportierende ATPase mit C-Terminus	882	1118	1.40e-36

Einzelene Domänen des SERCA-Transporters analysiert mit Pfam

6.2 Blast-Analyse der Artemisinin bindenden Domäne E1-E2 des SERCA Transporters

Exemplarisch sind die Resultat einer Blast-Analyse von der Artemisinin bindenden Domäne von SERCA E1-E2 mit der Datenbank UniProtKB dargestellt:

Eingangs- -zeichen	Name	Protein Name	Organismus	Länge	Identi- tät	E- Value
Q08853	ATC_PLA FK	Calcium-transportierende ATPase (EC 3.6.3.8)	<i>Plasmodium falciparum</i> (isolate K1)	1228	100	1 e ⁻¹³⁷
Q76NN8	Q76NN8 _PLAF7	Calcium-transportierende ATPase, putativ	<i>Plasmodium falciparum</i> (isolate 3D7).	1228	100	1 e ⁻¹³⁷
Q5R2K7	Q5R2K7 _PLAFA	Sarkoplasmatische und endoplasmatische Retikulum Ca-ATPase	<i>Plasmodium falciparum</i>	1227	100	1 e ⁻¹³⁷
Q5R2K6	Q5R2K6 _PLAFA	Sarkoplasmatische und endoplasmatische Retikulum Ca-ATPase	<i>Plasmodium falciparum</i>	1228	100	1 e ⁻¹³⁷
Q5R2K5	Q5R2K5 _PLAFA	Sarkoplasmatische und endoplasmatische Retikulum Ca-ATPase	<i>Plasmodium falciparum</i>	1228	100	1 e ⁻¹³⁷
Q5R2K3	Q5R2K3 _PLAFA	Sarkoplasmatische und endoplasmatische Retikulum Ca-ATPase	<i>Plasmodium falciparum</i>	1228	100	1 e ⁻¹³⁷
Q5R2K2	Q5R2K2 _PLAFA	Sarkoplasmatische und endoplasmatische Retikulum Ca-ATPase	<i>Plasmodium falciparum</i>	1228	100	1 e ⁻¹³⁷
Q5R2K0	Q5R2K0 _PLAFA	Sarkoplasmatische und endoplasmatische Retikulum Ca-ATPase	<i>Plasmodium falciparum</i>	1228	100	1 e ⁻¹³⁷
A5JTL7	A5JTL7_ PLAFA	Sarkoplasmatische und endoplasmatische Retikulum Ca-ATPase (Fragment)	<i>Plasmodium falciparum</i> .	986	100	1 e ⁻¹³⁷
A5JSU1	A5JSU1_ PLAFA	Calcium-transportierende ATPase (Fragment)	<i>Plasmodium falciparum</i> .	984	100	1 e ⁻¹³⁷
A5JSU0	A5JSU0_ PLAFA	Calcium-transportierende ATPase (Fragment)	<i>Plasmodium falciparum</i> .	995	100	1 e ⁻¹³⁷
A5JST9	A5JST9_ PLAFA	Calcium-transportierende ATPase (Fragment)	<i>Plasmodium falciparum</i> .	1000	100	1 e ⁻¹³⁷

Eingangs- -zeichen	Name	Protein Name	Organismus	Länge	Identi- tät	E- Value
Q5R2J7	Q5R2J7_ PLARE	Sarkoplasmatische und endoplasmatische Retikulum Ca-ATPase	<i>Plasmodium reichenowi.</i>	1248	99	1 e ⁻¹³⁷
Q4XXI4	Q4XXI4_ PLACH	Putatives uncharakter- isiertes Protein (Fragment)	<i>Plasmodium chabaudi.</i>	399	90	1 e ⁻¹²⁵
Q30CZ5	Q30CZ5 _PLACH	Calcium-abhängige ATPase	<i>Plasmodium chabaudi chabaudi.</i>	1118	90	1 e ⁻¹²⁵
B3KZL1	B3KZL1 _PLAKH	Sarkoplasmatische und endoplasmatische Retikulum Ca-ATPase, putativ	<i>Plasmodium knowlesi</i> (strain H).	1171	90	1 e ⁻¹²⁵
A5K9V1	A5K9V1 _PLAVI	Calcium-transportierende ATPase, putative	<i>Plasmodium vivax.</i>	1196	90	1 e ⁻¹²⁵
Q4Z579	Q4Z579 _PLABE	Calcium-transportierende ATPase, putativ	<i>Plasmodium berghei.</i>	1119	90	1 e ⁻¹²⁴
Q7RCK5	Q7RCK5 _PLAYO	Calcium-translokalisierende P-Typ ATPase, SERCA-Typ	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	1136	90	1 e ⁻¹²⁴
Q27764	Q27764 _9APIC	ATPase	<i>Plasmodium yoelii.</i>	1115	89	1 e ⁻¹²³
Q4XEG1	Q4XEG1 _PLACH	Calcium-transportierende ATPase, putativ (Fragment)	<i>Plasmodium chabaudi</i>	734	89	1 e ⁻¹⁰¹
Q5IH90	Q5IH90 _TOXGO	Calcium ATPase SERCA- ähnlich	<i>Toxoplasma gondii.</i>	1093	66	6 e ⁻⁹⁰
B9Q5D7	B9Q5D7 _TOXGO	Calcium-transportierende ATPase, putativ	<i>Toxoplasma gondii VEG</i>	1093	66	6 e ⁻⁹⁰
B9PHA9	B9PHA9 _TOXGO	Calcium-transportierende ATPase, putativ	<i>Toxoplasma gondii GT1.</i>	1093	66	6 e ⁻⁹⁰
B6KJD0	B6KJD0 _TOXGO	Calcium-transportierende ATPase, putativ	<i>Toxoplasma gondii ME49</i>	1093	66	6 e ⁻⁹⁰
Q4N4W6	Q4N4W6 _THEPA	Calcium-transportierende ATPase, putativ	<i>Theileria parva</i>	1277	61	4 e ⁻⁸²
A7AUB0	A7AUB0 _BABBO	Calcium ATPase SERCA- ähnlich, putativ	<i>Babesia bovis</i>	1028	61	8 e ⁻⁸²
Q4UEM8	Q4UEM8 _THEAN	Calcium-transportierende ATPase, putativ	<i>Theileria annulata</i>	1305	61	5 e ⁻⁸¹
C5K736	C5K736	Calcium-transportierende	<i>Perkinsus</i>	958	60	7 e ⁻⁷⁹

	_9ALVE	ATPase vom endoplasmatischen Retikulum-Typ, putative	<i>marinus</i> ATCC 50983.			
Q5CY06	Q5CY06 _CRYPV	Kationtransportierende P-Typ ATPase mit 11 oder mehr Trans-membran Domänen	<i>Cryptosporidium parvum Iowa II</i>	1129	60	1 e ⁻⁷⁷

Ergebnisse der Blast-Analyse von sequenzähnlichen Proteine der Artemisinin bindenden SERCA Domäne E1-E2. Die E1-E2-Domäne konnte nur in diesen ATPasen identifiziert werden. Generell sind ATPasen weit verbreitet und kommen auch in zahlreichen anderen Spezies vor. Interessanterweise kommen ähnliche Domänen beispielsweise auch in SERCA Transportern von Toxoplasmen und Thaileria Spezies vor.

6.3 Korrelation zwischen Kenntnissen über Malaria und Schulbildung

Regressionsanalyse der Städte Ouagadougou und Nouna:

ANOVA^b

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1 Regression	24,750	1	24,750	22,036	,000 ^a
Residual	222,386	198	1,123		
Total	247,137	199			

a. Predictors: (Constant), Schulbildung_Jahre

b. Dependent Variable: Z-score(Score_Gesamt)

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	-,333	,112		-2,971	,003
Schulbildung_Jahre	,073	,016	,316	4,694	,000

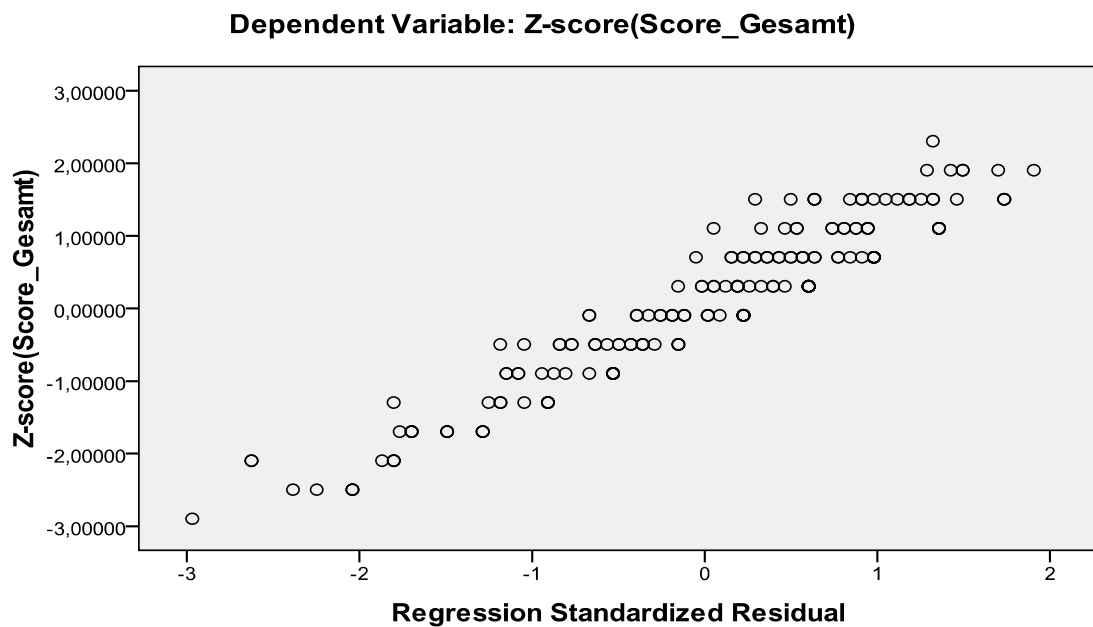
a. Dependent Variable: Z-score(Score_Gesamt)

Residuals Statistics^a

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	-,3334128	1,1958189	,0587259	,35266543	200
Residual	-3,14562035	2,02042365	,00000000	1,05712791	200
Std. Predicted Value	-1,112	3,224	,000	1,000	200
Std. Residual	-2,968	1,906	,000	,997	200

a. Dependent Variable: Z-score(Score_Gesamt)

Scatterplot



Regressionsanalyse der Dörfer Tonkoroni und Bagala:

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	5,944	1	5,944	11,026	,001 ^a
	Residual	63,071	117	,539		
	Total	69,014	118			

a. Predictors: (Constant), Schulbildung_Jahre

b. Dependent Variable: Z-score(Score_Gesamt)

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	-,216	,076		-2,841	,005
Schulbildung_Jahre	,078	,023	,293	3,321	,001

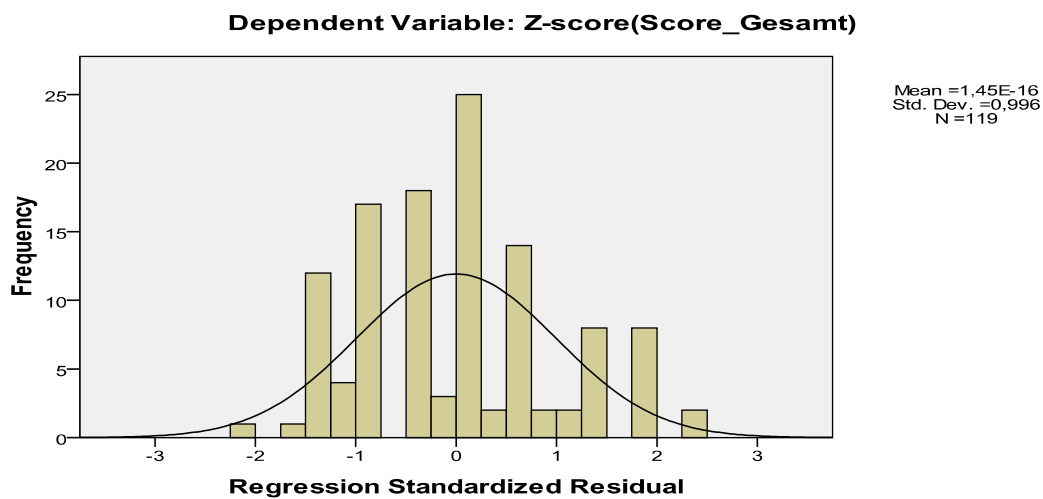
a. Dependent Variable: Z-score(Score_Gesamt)

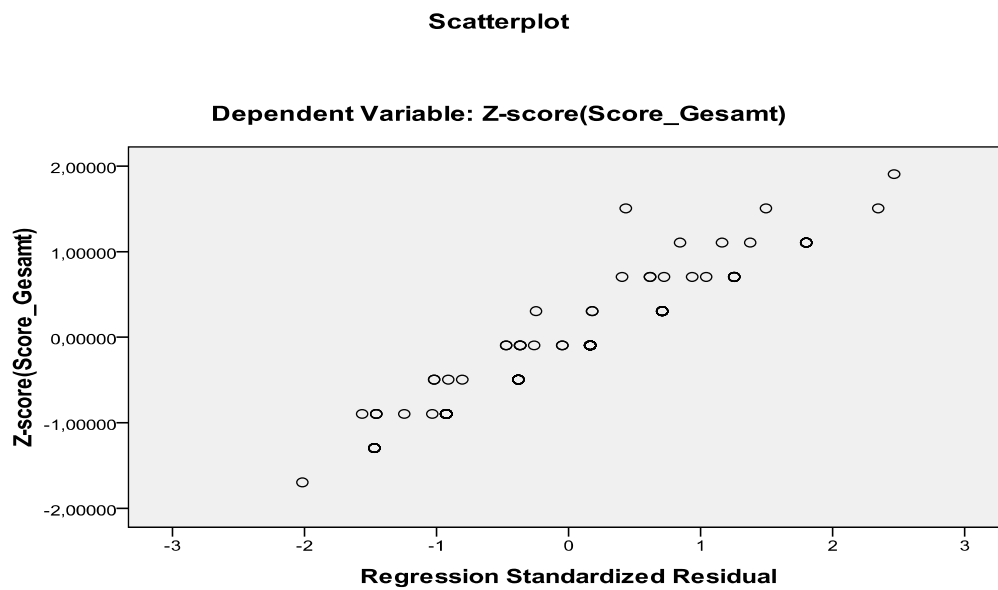
Residuals Statistics^a

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	-,2159778	1,1874361	-,0986990	,22443248	119
Residual	-1,48000562	1,80958056	,00000000	,73109385	119
Std. Predicted Value	-,523	5,731	,000	1,000	119
Std. Residual	-2,016	2,465	,000	,996	119

a. Dependent Variable: Z-score(Score_Gesamt)

Histogram





6.4 Korrelation zwischen Kenntnissen über Malaria und Alter

Regressionsanalyse der Städte Ouagadougou und Nouna:

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1,356	1	1,356	1,096	,296 ^a
	Residual	243,677	197	1,237		
	Total	245,033	198			

a. Predictors: (Constant), Alter

b. Dependent Variable: Z-score(Score_Gesamt)

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-,150	,208		-,721	,472
	Alter	,007	,006	,074	1,047	,296

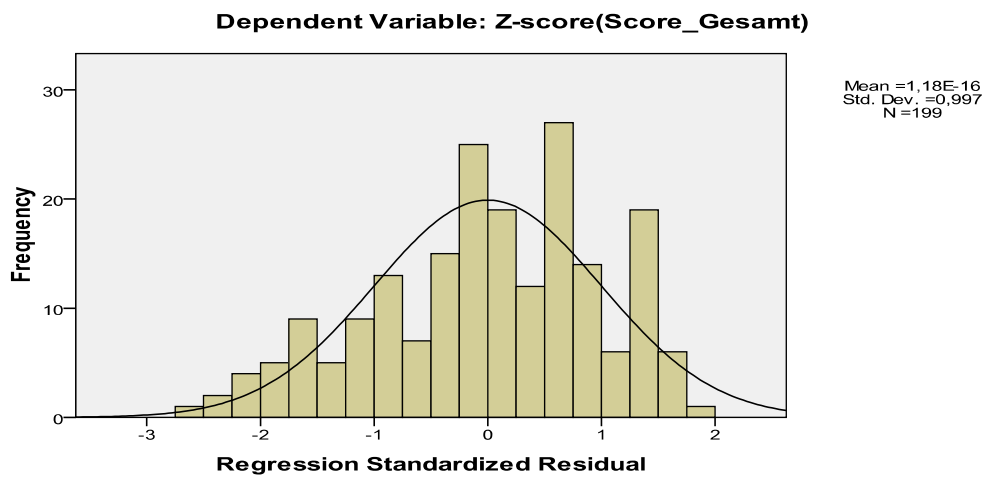
a. Dependent Variable: Z-score(Score_Gesamt)

Residuals Statistics^a

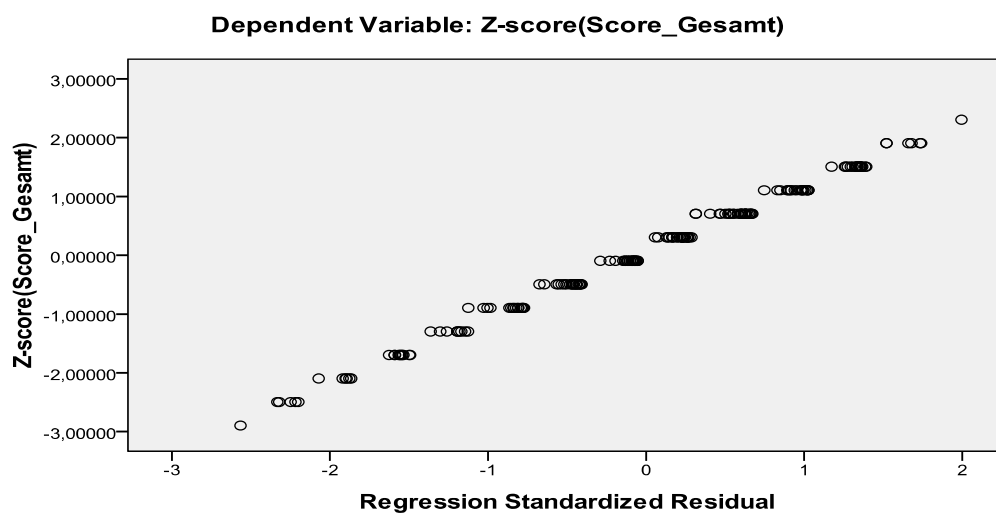
	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	-,0488270	,3555590	,0514567	,08275743	199
Residual	-2,85438156	2,21966600	,00000000	1,10936643	199
Std. Predicted Value	-1,212	3,675	,000	1,000	199
Std. Residual	-2,566	1,996	,000	,997	199

a. Dependent Variable: Z-score(Score_Gesamt)

Histogram



Scatterplot



Regressionsanalyse der Dörfer Bagala und Tonkoroni:

ANOVA^b

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1 Regression	,461	1	,461	,787	,377 ^a
Residual	68,553	117	,586		
Total	69,014	118			

a. Predictors: (Constant), Alter

b. Dependent Variable: Z-score(Score_Gesamt)

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	-,245	,179		-1,368	,174
Alter	,004	,005	,082	,887	,377

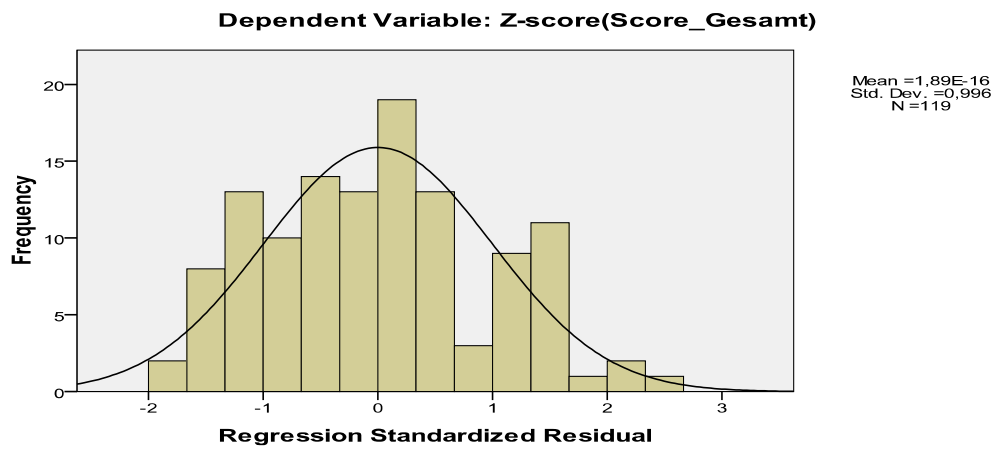
a. Dependent Variable: Z-score(Score_Gesamt)

Residuals Statistics^a

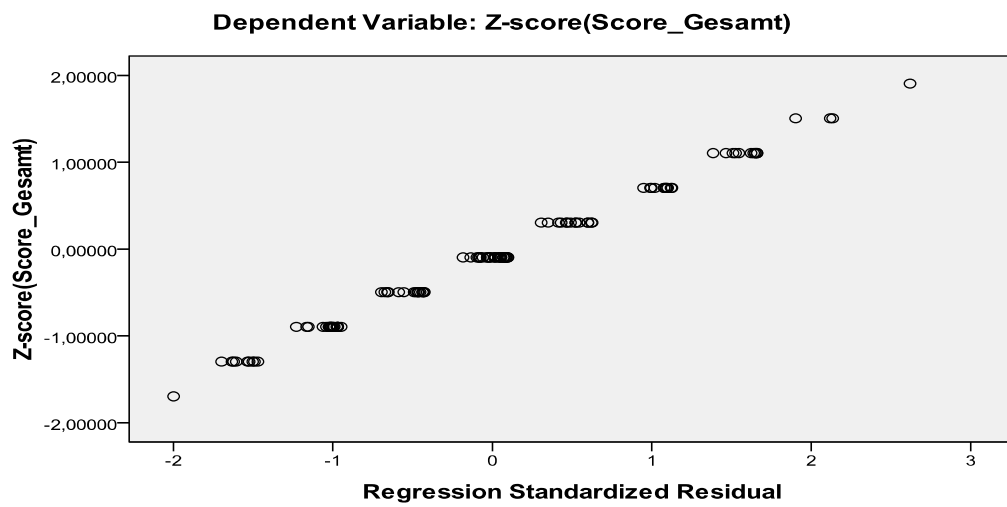
	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	-,1742515	,0700847	-,0986990	,06251113	119
Residual	-1,53001451	2,00518084	,00000000	,76220766	119
Std. Predicted Value	-1,209	2,700	,000	1,000	119
Std. Residual	-1,999	2,620	,000	,996	119

a. Dependent Variable: Z-score(Score_Gesamt)

Histogram



Scatterplot



6.5 Forschungsbericht der Befragung in Französisch (versendet an das «Centre de Recherche en Santé» in Nouna)

Interrogation sur le problème du paludisme et la disponibilité de participer à une opération comme le «E-Day»

L'opération «E-Day» est une idée de Colin Ohrt, directeur de recherche au département de recherche Reed Army de Washington et de Heiner Schirmer, directeur du projet B2 au SFB 544 de l'université d'Heidelberg, traitant de l'élimination du paludisme dès la prise des médicaments efficaces à 100%. Ces médicaments devraient être pris par tous les habitants vivant dans la région Sub-Sahara en Afrique pour une période de 10 semaines.

Équipe de recherche:

Chercheur principal: Janina Zirkel

Chercheur associé: Dr. Bocar Kouyaté

Partenaires/Institutions collaboratrices :

Centre de Recherche en Santé de Nouna

Pr. Heiner Schirmer: Département de Biochimie de l'Université d'Heidelberg

Pr. Thomas Dandekar: Département de Bioinformatique de l'Université de Würzburg

Dr. Boubacar Coulibaly: Centre de Recherche en Santé de Nouna

Source de financement:

SFB 544, Projet B2

Durée:

Début: 25. Août 2005

Fin: 20. Septembre 2005

Question de recherche, objectifs et méthodologie:

Question de recherche:

Est-ce qu'une opération comme le «E-Day» pourrait être réalisable si l'on considère la disponibilité de participation des gens qui se trouvent sur place?

Objectifs de l'interrogation:

Objectif général:

Évaluer la disponibilité de participation des gens ainsi que d'étudier différentes conditions qui permettraient la réalisation de l'opération «E-Day».

Objectifs spécifiques:

1. Vérifier si un projet comme l'opération «E-Day» soit envisageable ou non. Particulièrement il faudrait observer si les gens interrogés prennent les médicaments «E-Day» et quels effets secondaires dont ils seraient prêt à supporter. En prenant des médicaments il y a souvent des effets secondaires. Ces effets devraient être acceptés par les participants pour atteindre un bon résultat de l'opération «E-Day». Dans cette interrogation les effets secondaires prêts à être supportés par les gens provenant de l'opération.
2. Evaluer les connaissances des gens interrogés sur le paludisme et leur point de vue sur ce problème. Par ce moyen l'interrogation devrait constater si les gens considerent le paludisme comme un problème grave et si des mesures prévues contre le paludisme leur paraissent importants. Car pour atteindre une coopération active des gens il est nécessaire qu'ils aient réalisé que le paludisme est un problème très grave pour eux-mêmes.
3. Examiner leur contact et leur opinion sur la médecine moderne

parce que cela est non seulement primordial pour leur participation mais aussi pour les résultats qu'ils collaborent avec les agents de la santé.

4. Faire prendre conscience de la dimension du paludisme et montrer combien de fois par an les gens sont affectés du paludisme.
5. Montrer que les Burkinabés ne peuvent pas se permettre de financer une opération «E- Day» par eux-mêmes, mais qu'elle doit être financée par une organisation externe.

Méthodologie

Il s'agit d'une interrogation descriptive et d'une enquête par sondage des deux populations rurales et deux contrôles prises au hasard à Nouna et à Ouagadougou.

La recherche quantitative:

Il s'agit essentiellement d'une enquête par questionnaire qui concerne plus de 10% de la population, ayant plus de 15 ans dans deux villages rurales, Bagala et Tonkoroni. Dans ces villages la moitié des ménages furent interrogée. Deux contrôles de 100 personnes à Ouagadougou et à Nouna ont été pris au hasard, à fin d'obtenir une petite impression des trois niveaux du système de la santé: le niveau central, le niveau intermédiaire et le niveau périphérique.

Les données ont été enregistrées sur EXCEL pour permettre leur interprétation en tables de données analysées à l'aide du programme statistique R au département de Bioinformatique de l'Université de Würzburg.

La recherche qualitative:

Les participants ont été choisis au hasard, une moitié mâle et l'autre moitié femelle.

En plus elle n'a été réalisée qu'avec des hommes et des femmes

disposant d'un esprit intact, ceci étant important lorsque des personnes âgées sont interrogés.

Elle a été effectuée à Ouagadougou avec la permission du Centre Hospitalier Charles de Gaulles en veillant à choisir des participants avec des différents niveaux scolaires, des différents groupes ethniques et des différents niveaux sociaux. L'interrogation a pris en compte le groupe ethnique majoritaire dans les villages Bagala et Tonkoroni, les Bwaba.

Les données obtenues ont été saisies sous forme de texte puis codifiées. L'analyse a été ensuite faite à partir des codes obtenus.

- **Considérations éthiques:**

La recherche de l'information a tenu à respecter les valeurs morales et culturelles des populations.

Pour l'enquête, le but de l'étude a été toujours expliqué et les questions n'ont été posées qu'après avoir obtenu le consentement des répondants.

L'interrogation a été réalisée avec l'aide du centre de recherche en Santé de Nouna et en présence d'un traducteur. Ceux-ci ont proposé les démarches organisationnelles en mettant en exergue les exigences sur des structures et des valeurs traditionnelles locales.

- **Résultats atteints:**

1. **Disponibilité des personnes interrogées de participer à l'opération «E-Day»**

- 1.1. Disponibilité de prendre une prise en charge gratuite du paludisme

Les interviewés ont été repartis en fonction de la disponibilité de prendre une prise en charge gratuite comme indiqué dans la figure 1:

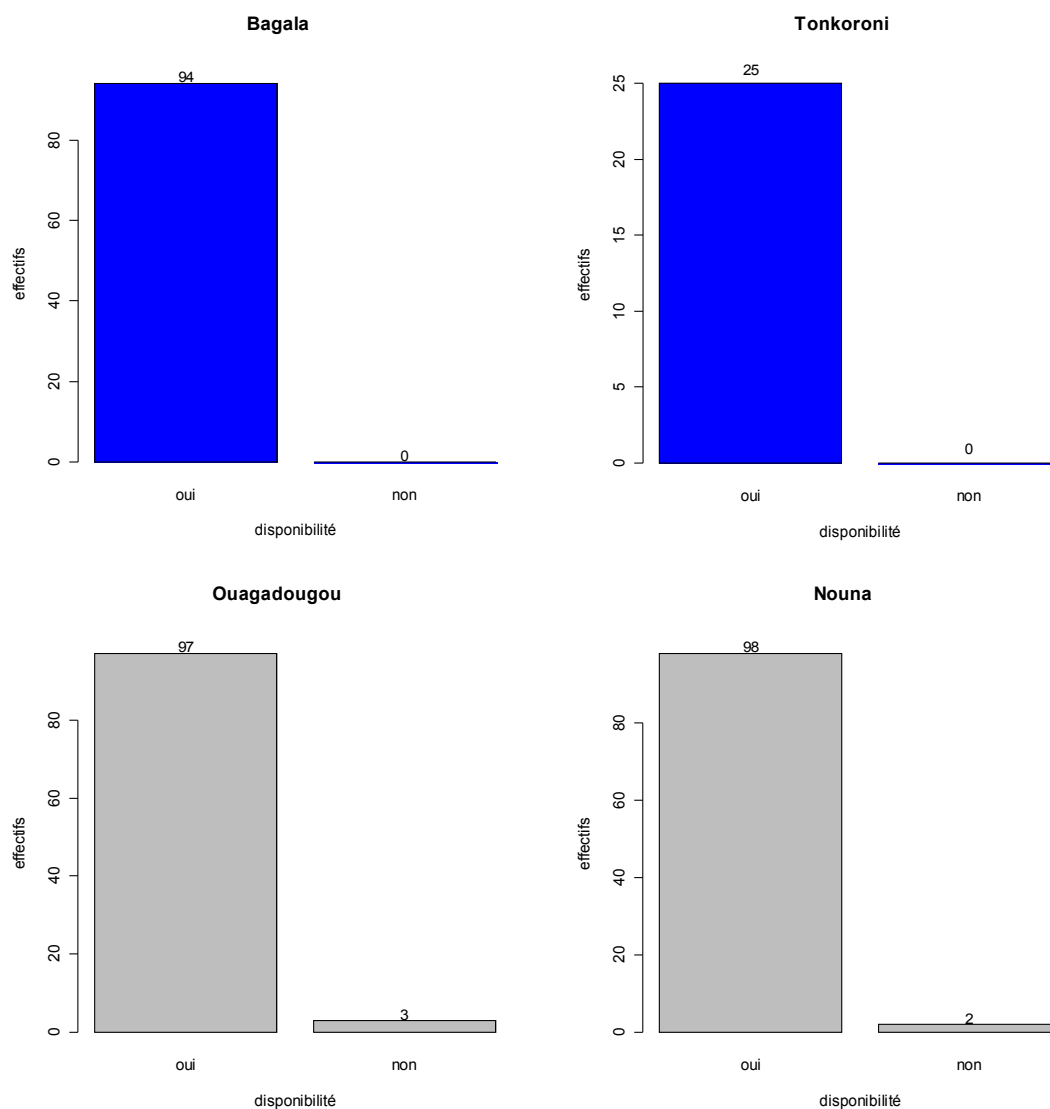


Figure 1 Répartition de la disponibilité de prendre une prise en charge gratuite (Bagala n=94, Tonkoroni n=25, Nouna n=100, Ouagadougou n=100) Dans tous les contrôles au hasard on peut constater une claire disponibilité de prendre une prise en charge gratuite.

1.2. *La disponibilité de prendre des médicaments pendant dix semaines*

Les résultats obtenus concernant la disponibilité de prendre des médicaments, même sans souffrir d'une maladie sont présentés à la figure 1:

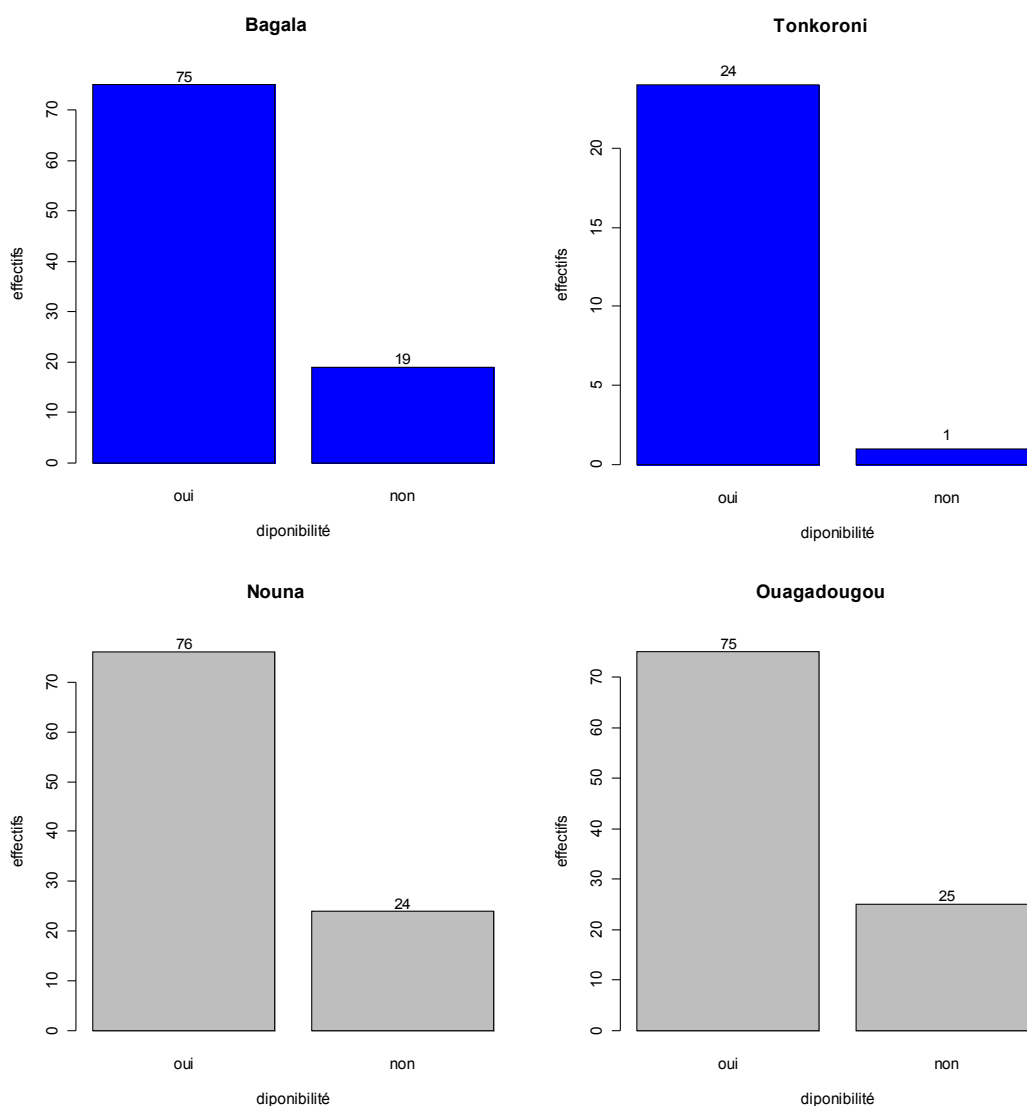


Figure 2: Répartition des interviewés en fonction de leur disponibilité de prendre un médicament pendant dix semaines.

La majorité des interviewés pris au hasard à Bagala ($n=94$), Tonkoroni ($n=25$), à Nouna ($n=100$) et à Ouagadougou ($n=100$) sont prêts à prendre des médicaments pendant 10 semaines, mais il faut constater que jusqu'à un quart des interviewés ont refusé, pour différentes raisons, de participer.

1.2. *Effets secondaires supportés par les interrogés*

Les interrogés ont été repartis selon les effets secondaires qu'ils accepteraient de supporter en prenant des médicaments anti-paludisme. Les résultats sont représentés dans le tableau I:

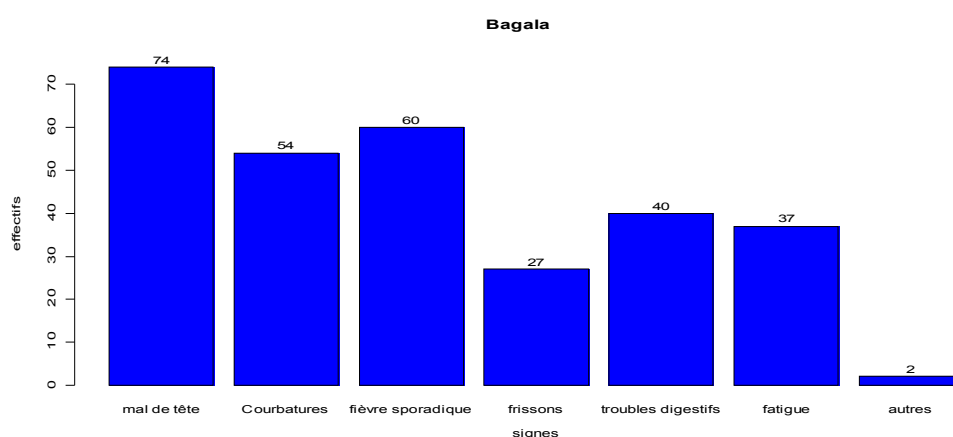
Effets secondaires	Bagala n=94	p (%)	Tonkoroni n=25	p (%)	Nouna n=100	p (%)	Ouagadougou n=100	p (%)
Urine bleu	84	89	20	80	50	50	58	58
Nausée	45	48	13	52	22	22	52	52
Mal de tête	18	19	2	8	19	19	57	57
Allergie	21	22	5	20	14	14	15	15
Autres	10	11	0	0	13	13	23	23
Aucun	5	5	3	12	33	33	9	9

Tableau I: Répartition des effets secondaires, qui seraient supportés par de interviewés. Les plus grand nombre d'interviewés qui étaient prêts à supporter les effets secondaires des médicaments anti-paludisme se trouvent: urine bleue et nausée à Bagala et à Tonkoroni; urine bleue et mal de tête à Ouagadougou et urine bleue et nausée à Nouna, quoique à Nouna 33% des interviewés ne seraient pas prêt à supporter des effets secondaires.

2. Connaissances des gens interrogés sur le problème du paludisme

2.1 *Signes du paludisme décrits par les gens.*

Les interrogés ont été repartis selon les signes sur lesquels ils se basent pour poser le diagnostique de paludisme comme indiqués dans la figure 3:



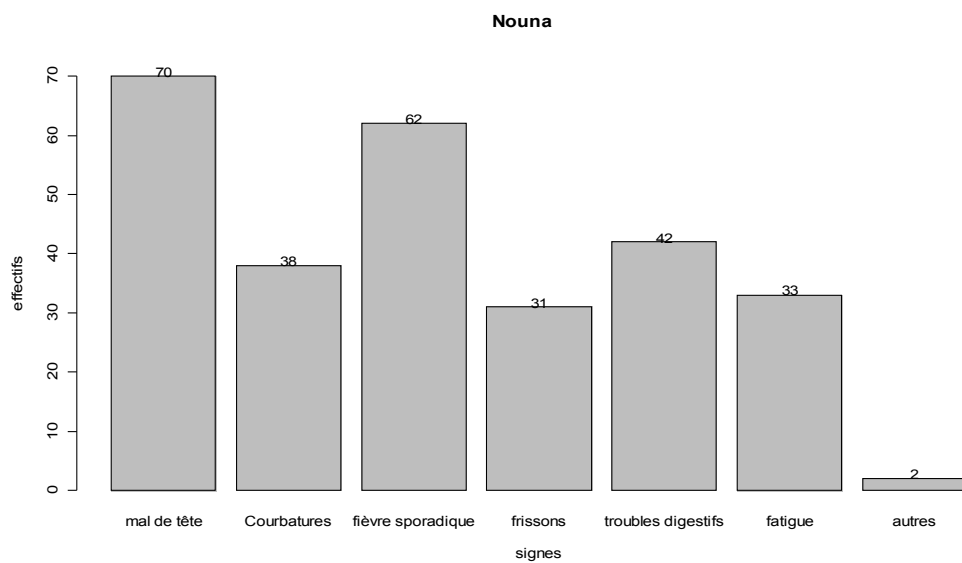
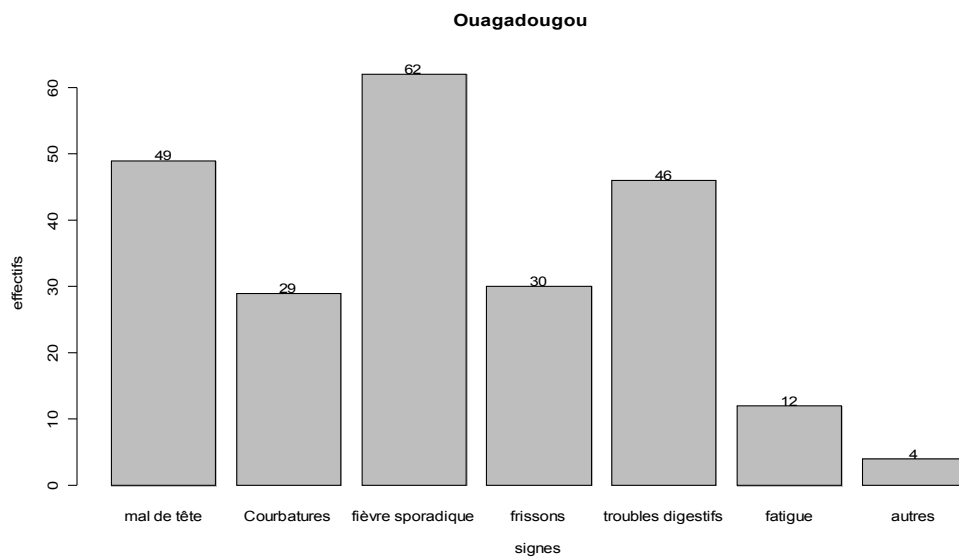
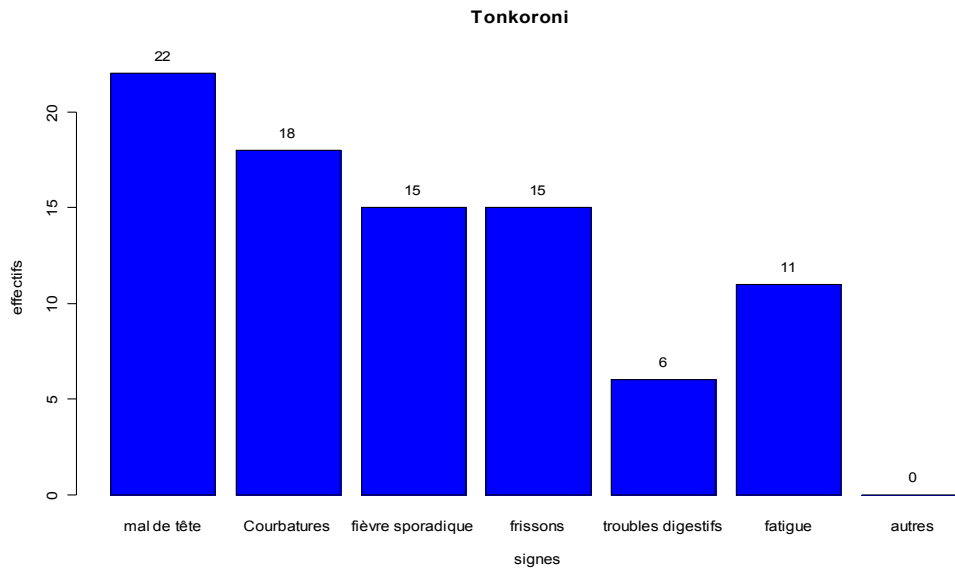


Figure 3: Répartition des interviewés selon la réponse donnée sur les signes du paludisme: (Bagala n=94, Tonkoroni n=25, Nouna n=100, Ouagadougou n=100) Le mal de tête, la fièvre sporadique et les courbatures étaient les signes les plus cités pour le diagnostic présomptif du paludisme à Bagala. À Tonkoroni le mal de tête, les courbatures et à la troisième place la fièvre sporadique et des frissons. A Ouagadougou et à Nouna les signes les plus cités étaient le mal de tête, la fièvre sporadique et les troubles digestifs.

2.2 *Transmissibilité du paludisme*

Le paludisme, maladie parasitaire, peut seulement être transmis par l'anophèle femelle. Infections directes d'un homme à l'autre ne sont pas possibles sans une piqûre de l'anophèle. A Tonkoroni 20 personnes (80%) et à Bagala 74 personnes (78,7%) ont su que le paludisme ne pouvait pas être transmis directement d'une personne à l'autre. A Ouagadougou 83% et à Nouna 70% des interviewés disposent d'une telle connaissance.

2.3 *Cause du paludisme*

La question clé est : qu'est-ce que les gens considèrent comme étant la cause du paludisme. "Connaissance fondée" ont été adjugées si les interviewés citaient les moustiques, comme transmetteurs de parasites, comme seule cause du paludisme. "Idée vague" a été adjugée si les interviewés citaient en plus des moustiques, des autres causes comme des facteurs alimentaires, climatiques, environnementaux ou physiologiques. "Pas d'idée" a été adjugée si les interviewés ne mentionnaient pas les moustiques.

L'appréciation des connaissances des interviewés sur l'agent causal du paludisme révèle que le paludisme est reconnu comme étant une maladie multifactorielle et que la majorité des interviewés ne dispose pas de connaissances fondées comme indiqué dans la figure 4:

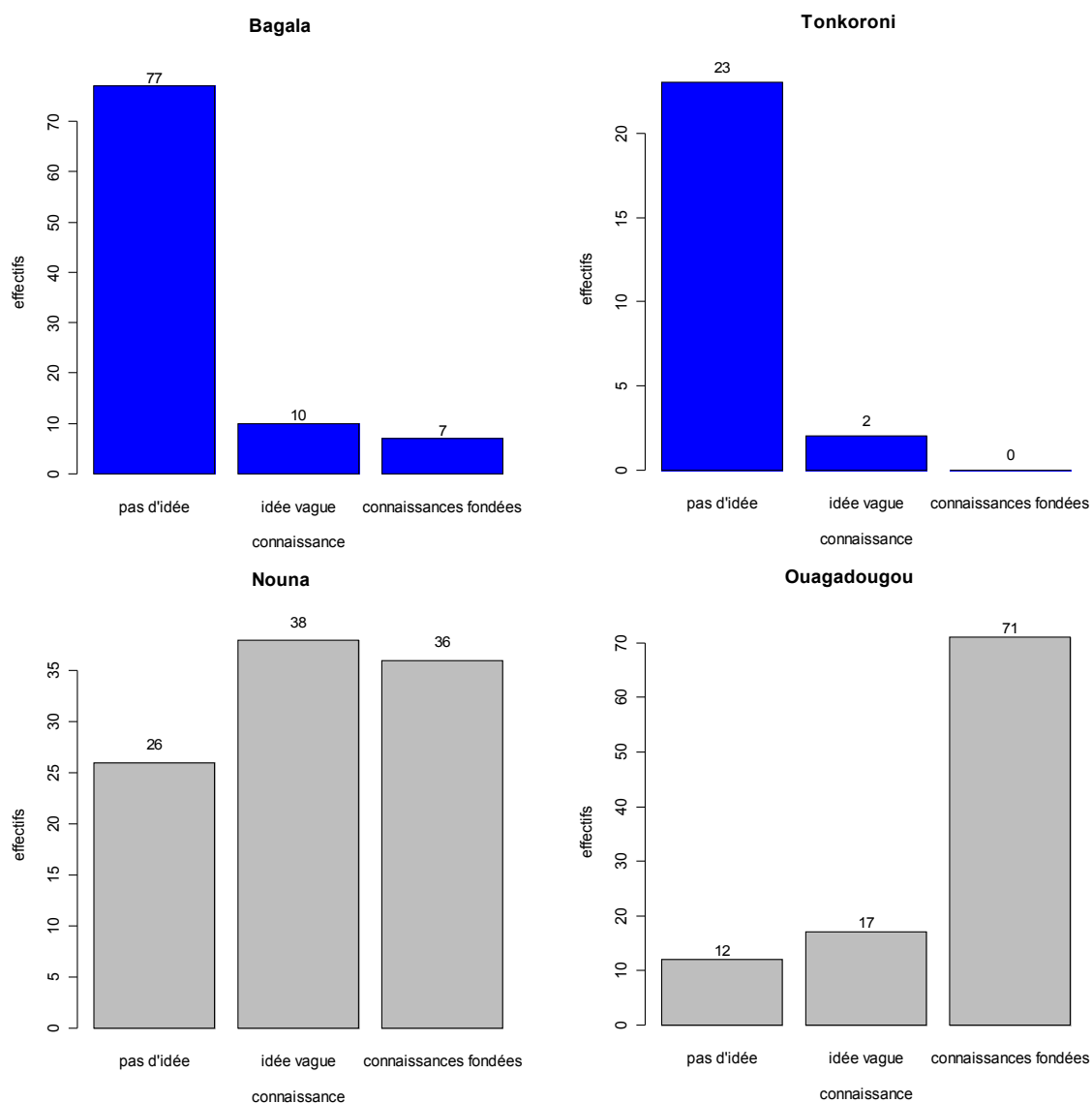


Figure 4: Répartition des interviewés en fonction de leurs connaissances sur le paludisme. (Bagala n=94, Tonkoroni n=25, Nouna n=100, Ouagadougou n=100) Ainsi la majorité des interviewés ne dispose pas de connaissances causales du paludisme à Bagala et Tonkoroni. À Nouna, la majorité des gens dispose d'une idée vague et à Ouagadougou la majorité des gens contrôlés pris au hasard dispose des connaissances fondées.

2.4 Estimation de la gravité du paludisme

Les interviewés ont été repartis en fonction de leur estimation sur la gravité du paludisme. Les résultats sont représentés dans le tableau II:

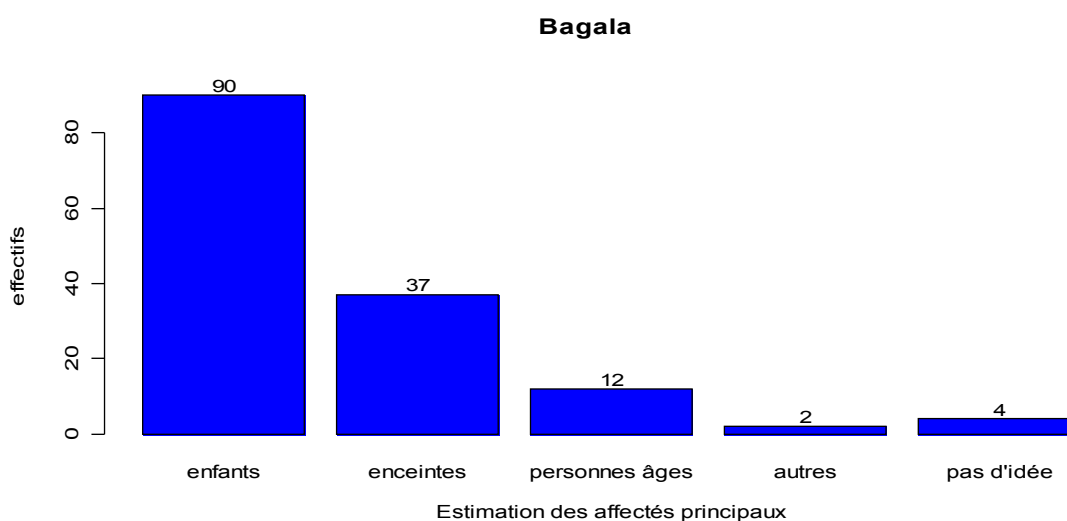
Estimation du paludisme	Bagala n=94	p (%)	Tonkoroni n=25	p (%)	Nouna n=100	p (%)	Ouagadougou n=100	p (%)
Maladie grave	56	60	11	44	74	74	91	91
Maladie pas sans danger	38	40	14	56	24	24	5	5
Maladie inoffensive	0	0	0	0	1	1	4	4

Tableau II : Répartition des interviewés selon leur estimation sur la gravité

du paludisme. La majorité des interviewés voient le paludisme comme une maladie grave à Ouagadougou, à Nouna et à Bagala. A Tonkoroni la majorité voit le paludisme comme une maladie sans grand danger.

2.5 *Estimation des gens affectés par le paludisme*

Les interviewés ont été repartis dans la figure 5 en fonction de leur estimation des gens, qu'ils considéraient comme étant les plus en danger. Ils ont cités:



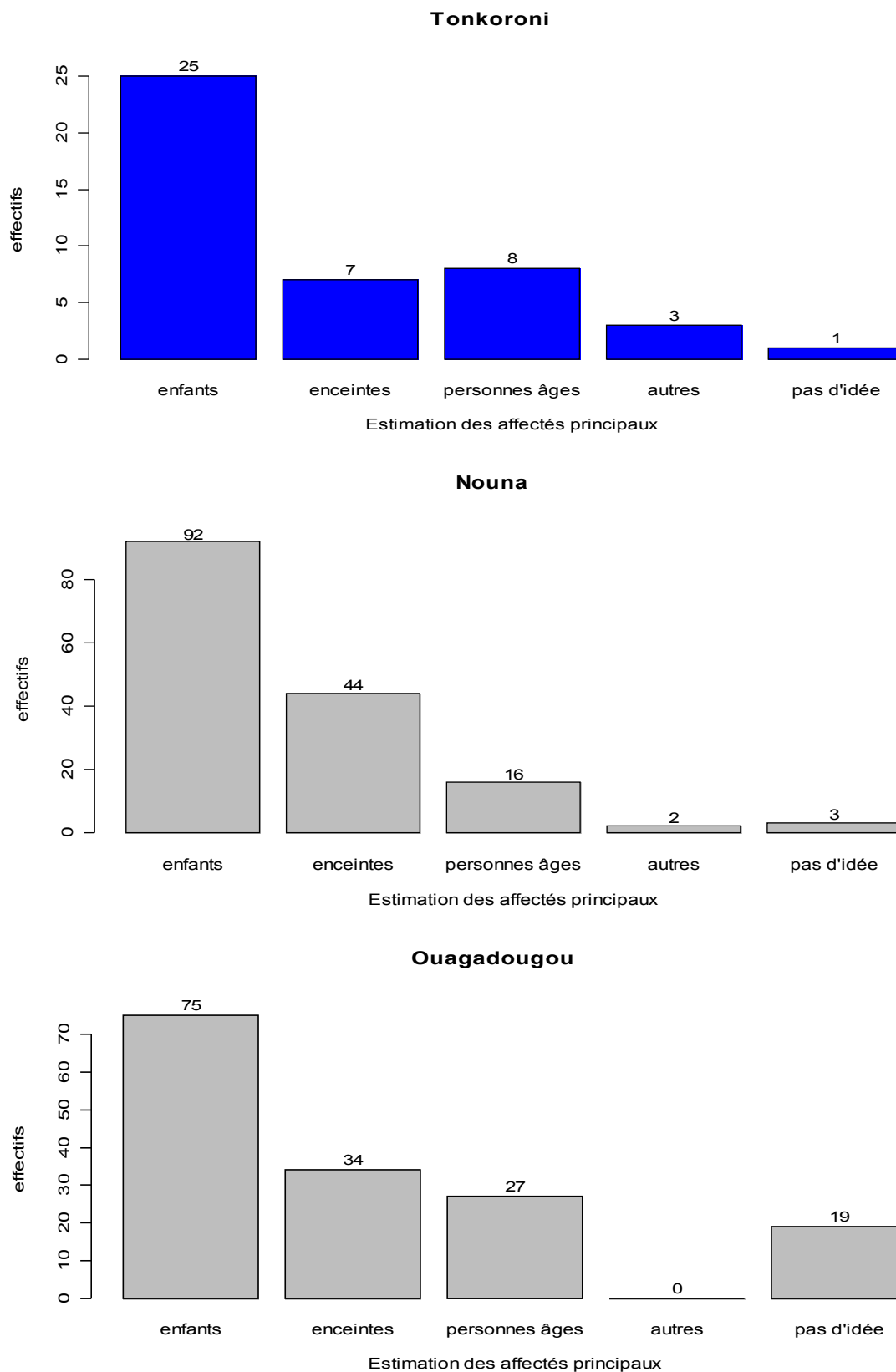


Figure 5: Répartition des interviewés en fonction de leur estimation des gens, les plus affectés par le paludisme. (Bagala n=94, Tonkoroni n=25, Nouna

n=100, Ouagadougou n=100) Chez tous contrôles pris au hasard on peut constater que les enfants sont vues comme des personnes les plus en danger. Les femmes enceintes se trouvent à la deuxième place, sauf à Tonkoroni où les personnes âgées prennent cette place.

2.6 Importance d'une thérapie contre le paludisme

Une thérapie accessible à tous est très importante pour 70 personnes (74,5%) et importante pour 24 personnes (25,5%) des interviewés à Bagala (n=94). À Tonkoroni (n=25) 20 personnes (80%) trouvent une thérapie très importante et 5 personnes (20%) la trouvent importante. À Nouna (n=100) 77% et à Ouagadougou (n=100) 90% trouvent une thérapie contre le paludisme très importante et 22 % à Nouna et 8% à Ouagadougou la trouvent importante. Il faut noter que seulement 2 personnes (2%) à Ouagadougou trouvent une thérapie accessible pour tous un peu importante et une seule personne (1%) à Nouna reste indifférente.

3. Le contact et l'opinion des gens interrogés sur la médecine moderne

3a Contact des gens interrogés avec la médecine moderne:

3a.1. Fréquence et disponibilité de visiter une formation sanitaire les dernières 5 années:

La fréquence et la disponibilité de visiter une formation sanitaire ont été examinés et les résultats sont indiqués dans le tableau III:

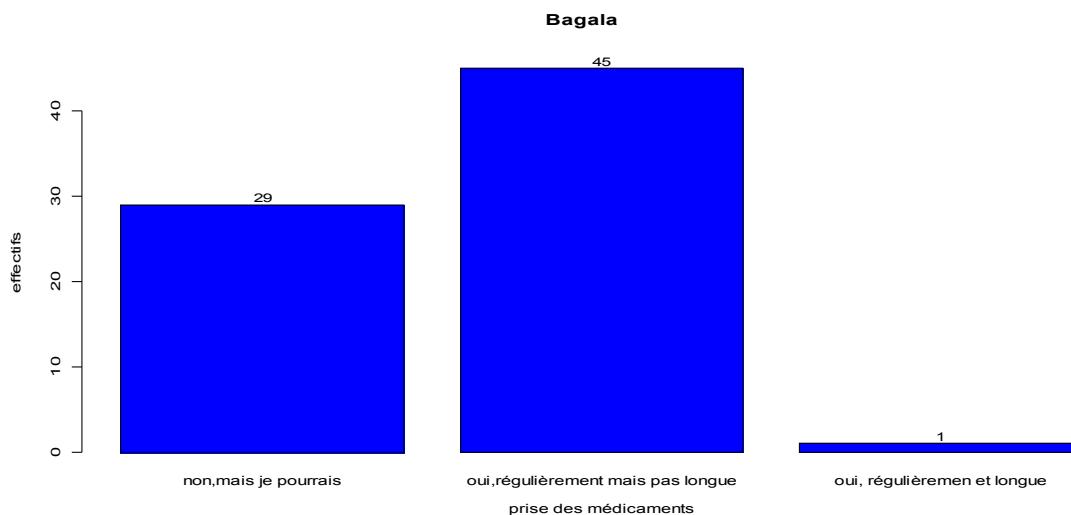
Fréquence et disponibilité de consulter une formation sanitaire les dernières 5 années	Bagala n=94	p%	Tonkoroni n=25	p%	Nouna n=100	p%	Ouagadougou n=100	P%
Jamais	35	37,2	15	60	24	24	20	20
Moins de 5 fois	45	47,9	9	36	57	57	48	48
Plus de 5 fois	13	13,8	1	4	16	16	29	29
Toujours en cas de maladie	1	1	0	0	3	3	3	3

3a.2 Consultation d'une formation sanitaire en cas de paludisme l'année passée

En cas de paludisme présomptif l'année passée 24 personnes (26,4%) ont consulté une formation sanitaire à Bagala (n=91). À Tonkoroni (n=25) 3 personnes (12%) l'ont consulté. À Nouna (n=94) 43 personnes (45,7%) et à Ouagadougou (n=82) 44 personnes (53,7%) ont rendu visite à une formation sanitaire. On peut constater qu'à l'exception des interviewés à Ouagadougou, moins de la moitié des gens ont rendu visite à une formation sanitaire en cas de paludisme présomptif.

3a.3 Fréquence et durée des médicaments déjà pris par les interviewés

Les interviewés ont été repartis en fonction de la fréquence et de la durée des médicaments déjà pris et le qui est représentée dans la figure 6:



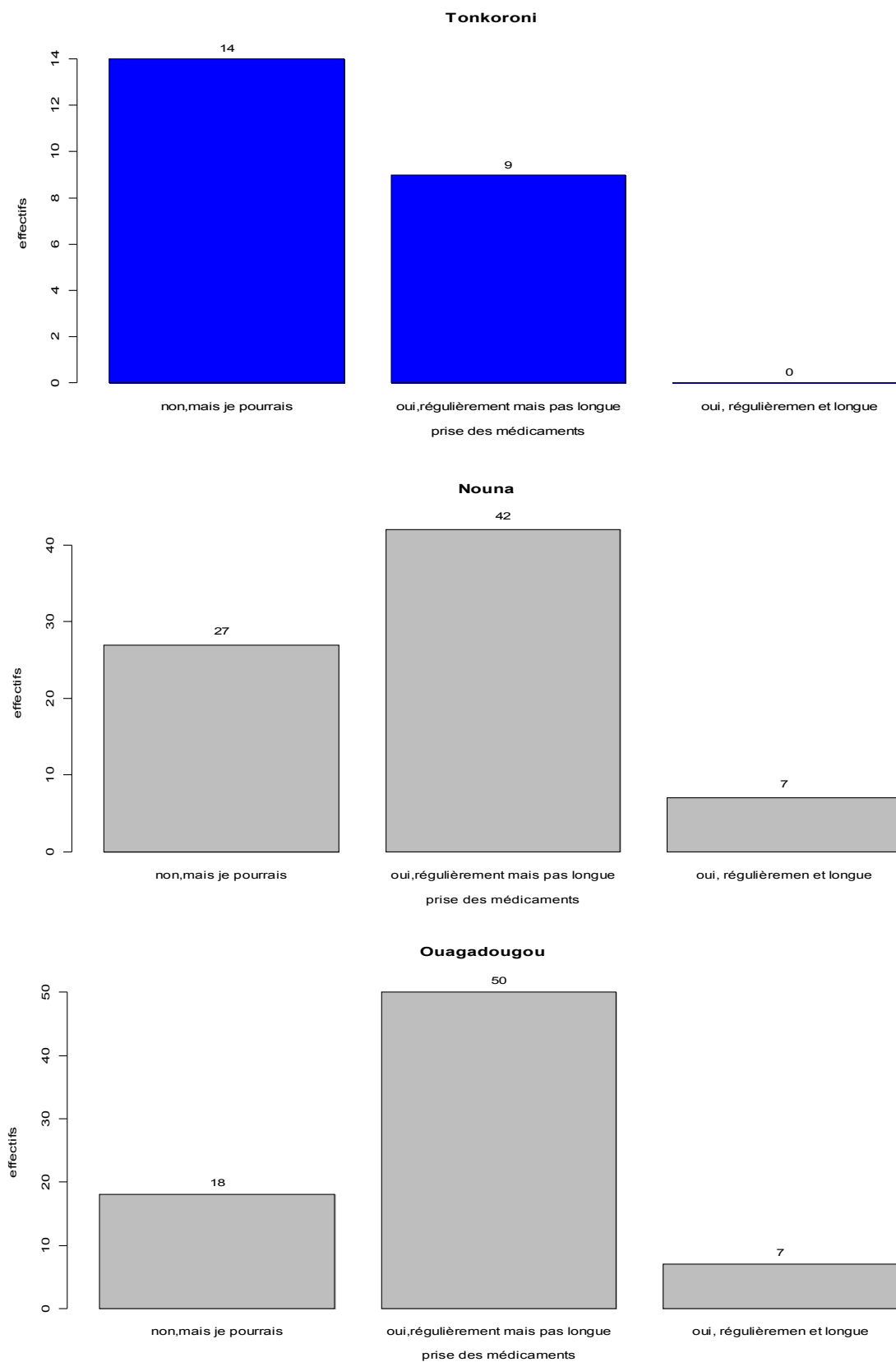


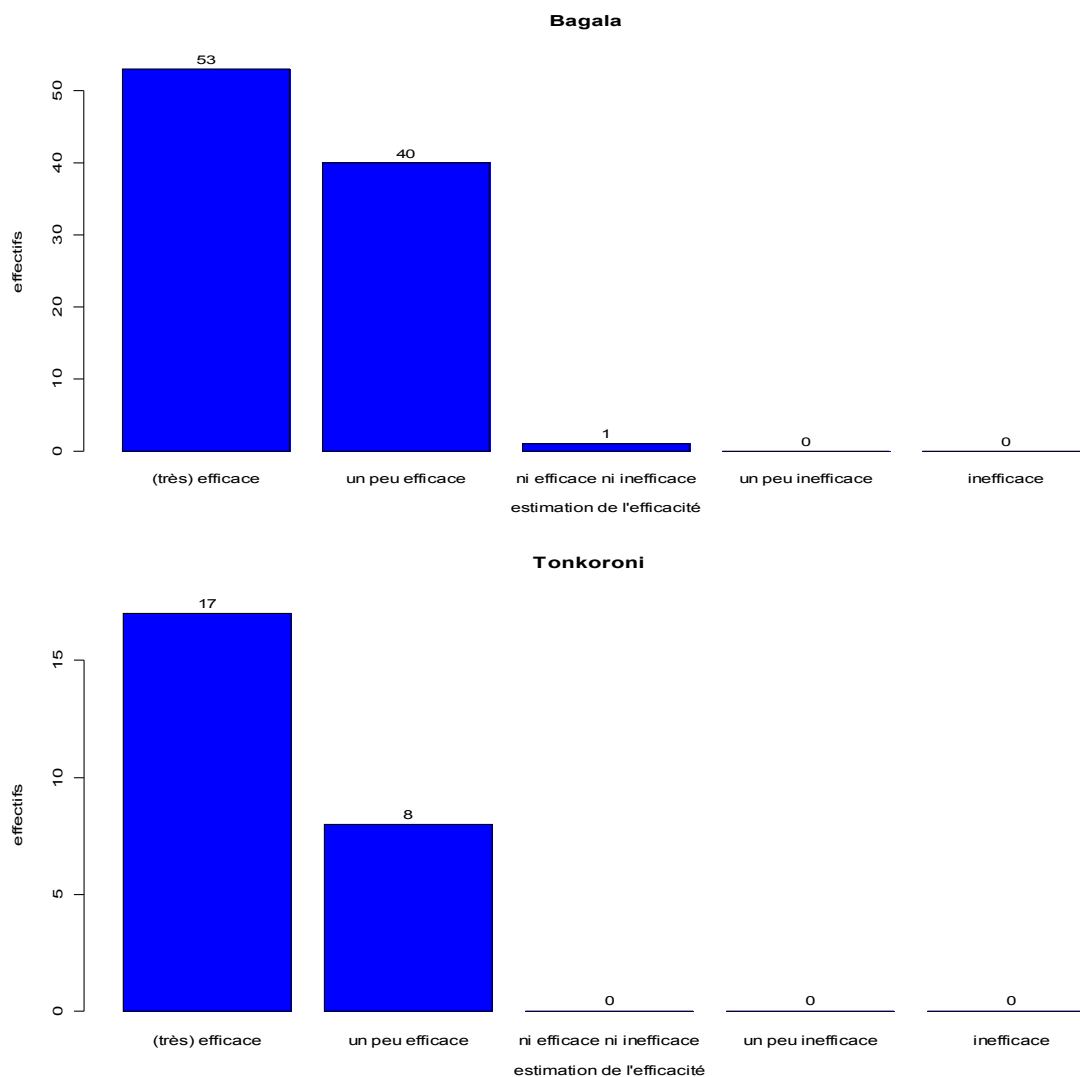
Figure 6: Répartition de la prise des médicaments des interviewés en fonction de la fréquence et de la durée. (Bagala: n=76, Tonkoroni: n= 23, Nouna:

n=76, Ouagadougou: n=75) La majorité des gens a déjà pris un médicament régulièrement mais pas pour une période longue (plus de trois semaines) sauf à Tonkoroni, où la majorité des interviewés n'ont pas encore pris des médicaments.

3b Confiance et opinion des interviewés sur la médecine moderne, en comparaison également avec la médecine traditionnelle.

3b.1 *Estimation de l'efficacité de la médecine moderne*

Comme indiqué dans la figure 7, les interviewés ont été repartis selon leur opinion sur la médecine moderne:



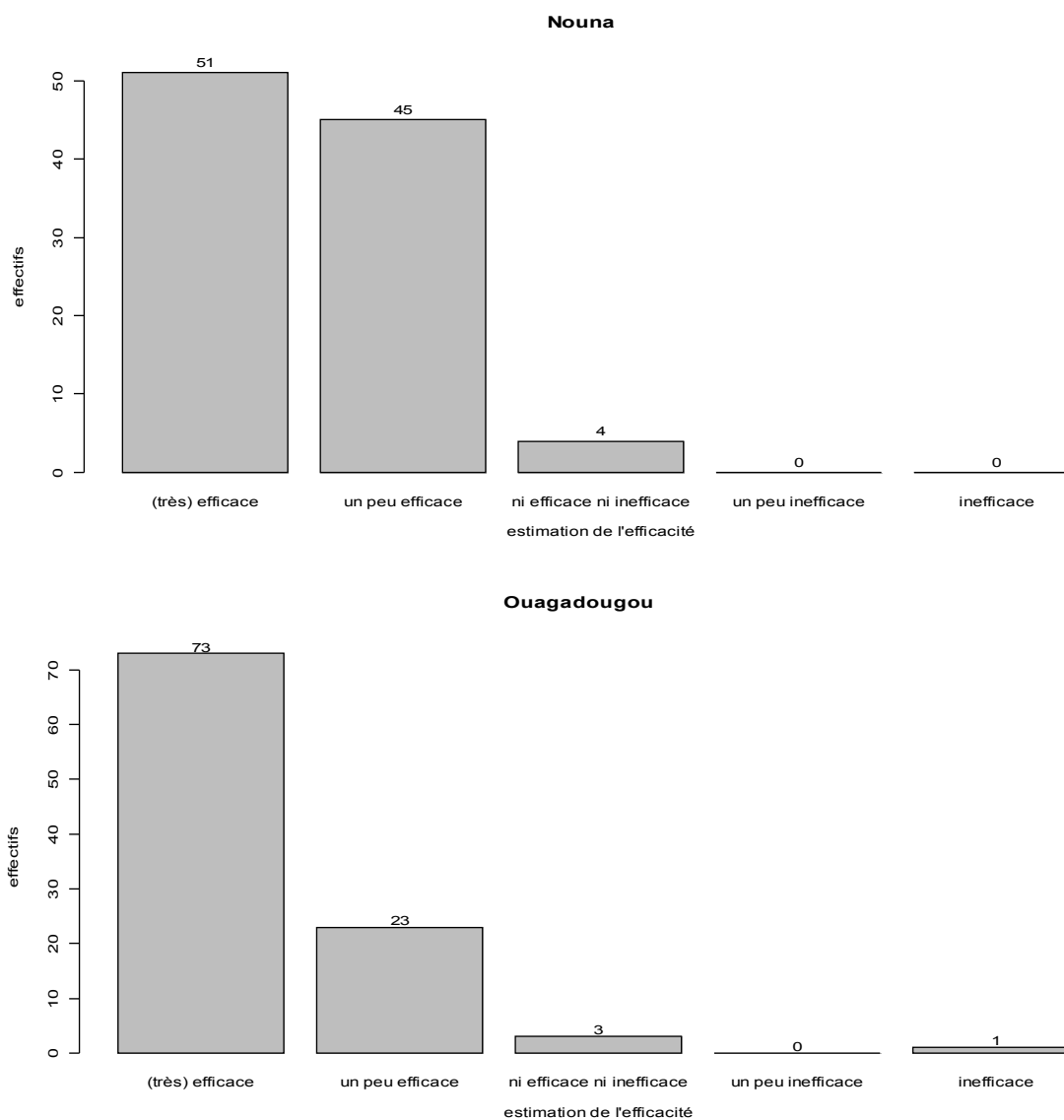
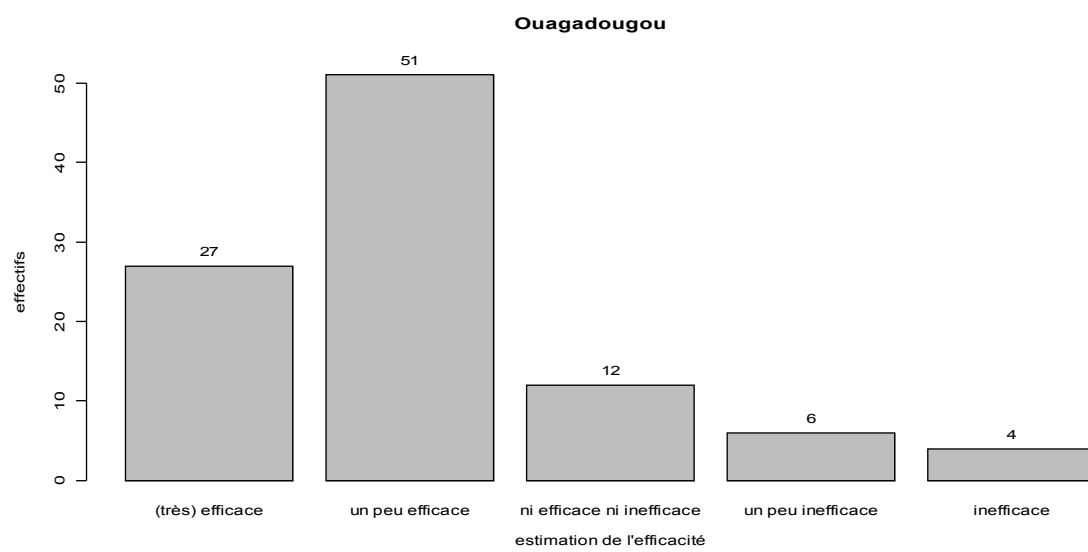
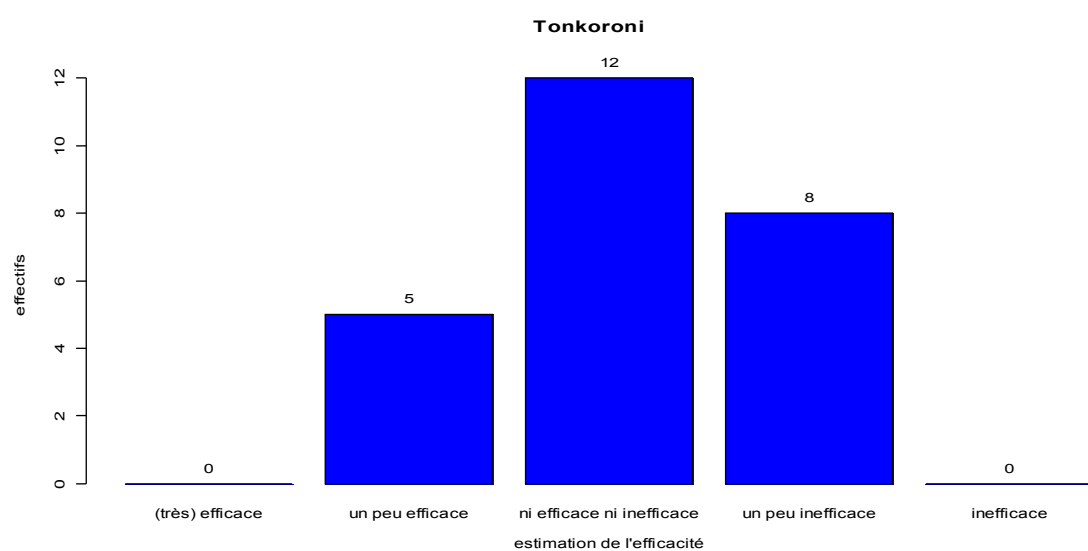
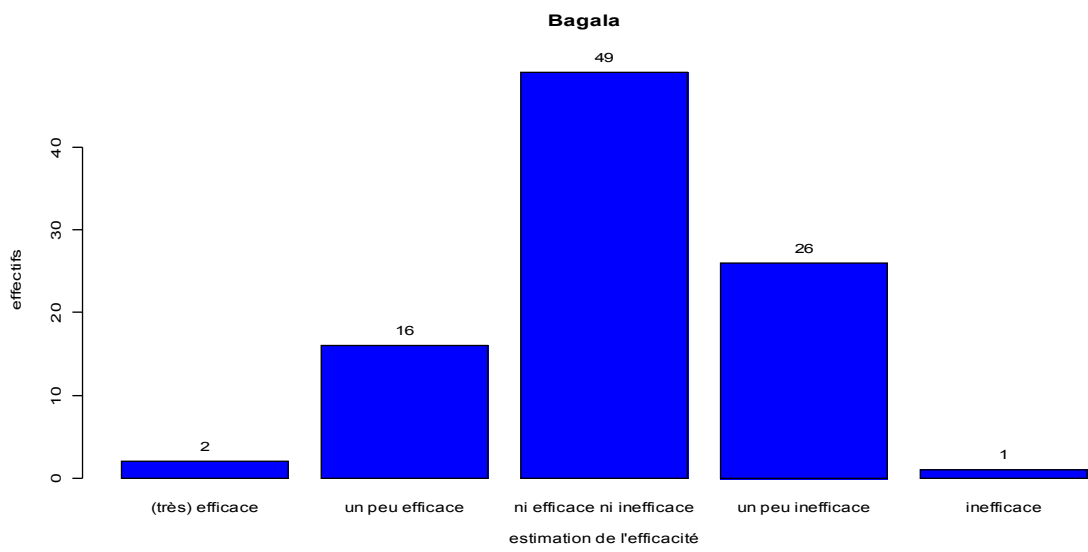


Figure 7: Répartition des interviewés en fonction de leur estimation de l'efficacité de la médecine moderne (Bagala n=94, Tonkoroni n=25, Nouna n=100, Ouagadougou n=100). La majorité des interviewés dans tous les contrôles des gens pris au hasard trouvent que la médecine moderne est très efficace

3b.2 Estimation de l'efficacité de la médecine traditionnelle

Les interviewés ont été repartis selon leur opinion sur la médecine traditionnelle, ce qui est indiquée dans la figure 8:



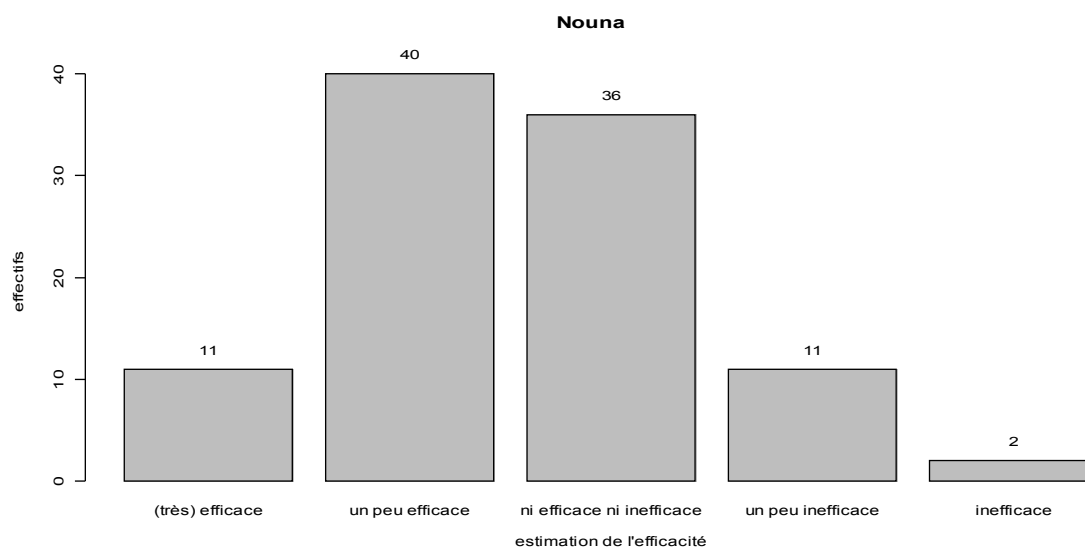
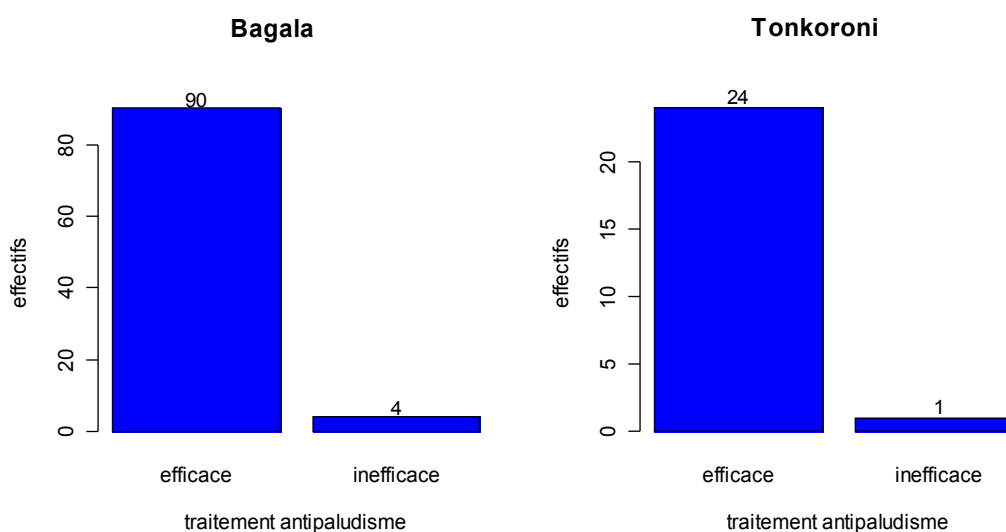


Figure 8: Répartition des interviewés en fonction de leur opinion sur la médecine traditionnelle (Bagala n=94, Tonkoroni n=25, Nouna n=100, Ouagadougou n=100). A Bagala la majorité trouve la médecine traditionnelle ni efficace mais aussi ni inefficace indiquant qu'il y a quelques maladies où la médecine traditionnelle aide très bien, mais il y a des autres maladies où la médecine moderne aide mieux. À Nouna et à Ouagadougou la majorité des interviewés pense que la médecine traditionnelle est un peu efficace.

3b.3 Estimation de l'efficacité du traitement antipaludisme de la médecine moderne

La répartition des interviewés en fonction de leur estimation de l'efficacité du traitement antipalustre est représentée dans la figure 9:



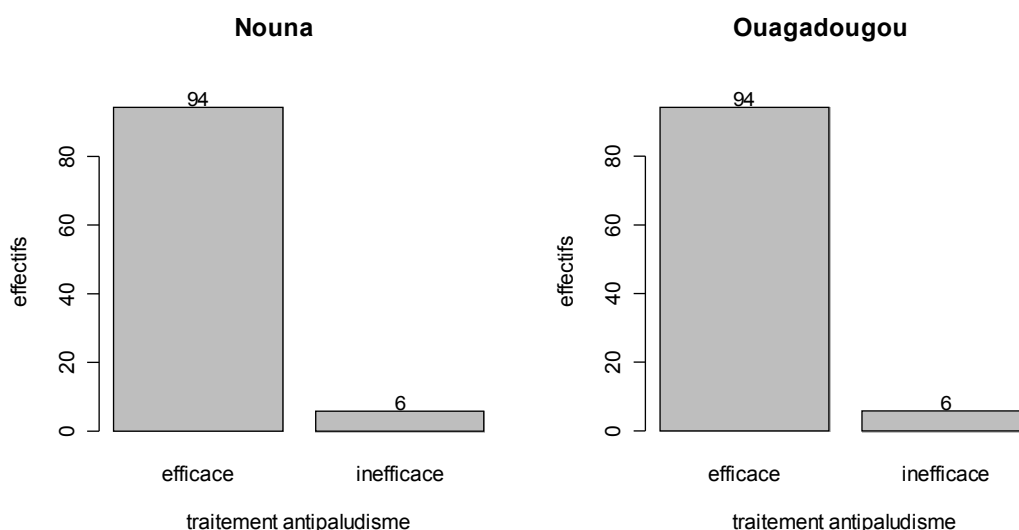


Figure9: Répartition des interviewés en fonction de leur estimation de l'efficacité du traitement antipaludisme (Bagala n=94, Tonkoroni n=25, Nouna n=100, Ouagadougou n=100) La majorité des interviewés dans tous les contrôles pris au hasard sont persuadés de l'efficacité du traitement antipaludisme de la médecine moderne.

4. Dimension du paludisme

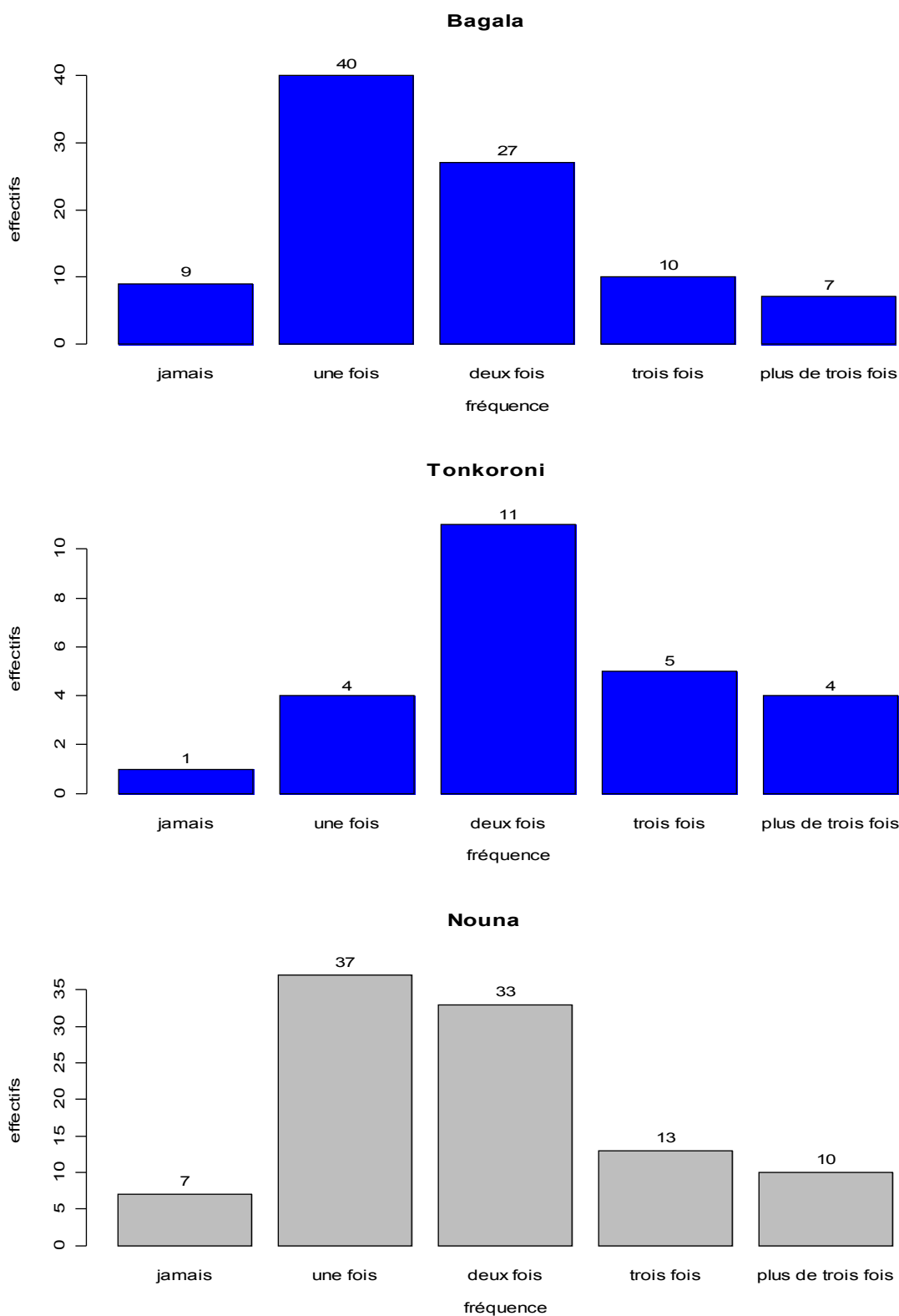
4.1 Nombre des interviewés déjà affecté par le paludisme

Comme le paludisme est une maladie endémique au Burkina Faso, à Bagala 93 (98,9%), à Tonkoroni 25 (100%), à Nouna 100 (100%) et à Ouagadougou 98 (98%) des interviewés ont déjà souffert du paludisme. De ceux, qui ont déjà souffert du paludisme à Bagala 14 (14,9%), à Tonkoroni 3 (12%), à Nouna 30 (30%) et à Ouagadougou 82 (82%) des interviewés ont pu se souvenir d'avoir souffert du paludisme pendant leur enfance.

De plus 31 (66%) des femmes à Bagala, 8 (66,7%) des femmes à Tonkoroni, 27 (54%) et 6 (12%) des femmes à Ouagadougou ont pu se souvenir d'avoir souffert du paludisme pendant leur grossesse.

4.2 Fréquence des épisodes de fièvre supporté par les interviewés l'année passé.

Les interviewés ont été repartis selon la quantité des épisodes de fièvre, pendant l'année passée, comme indiqué dans la figure 10:



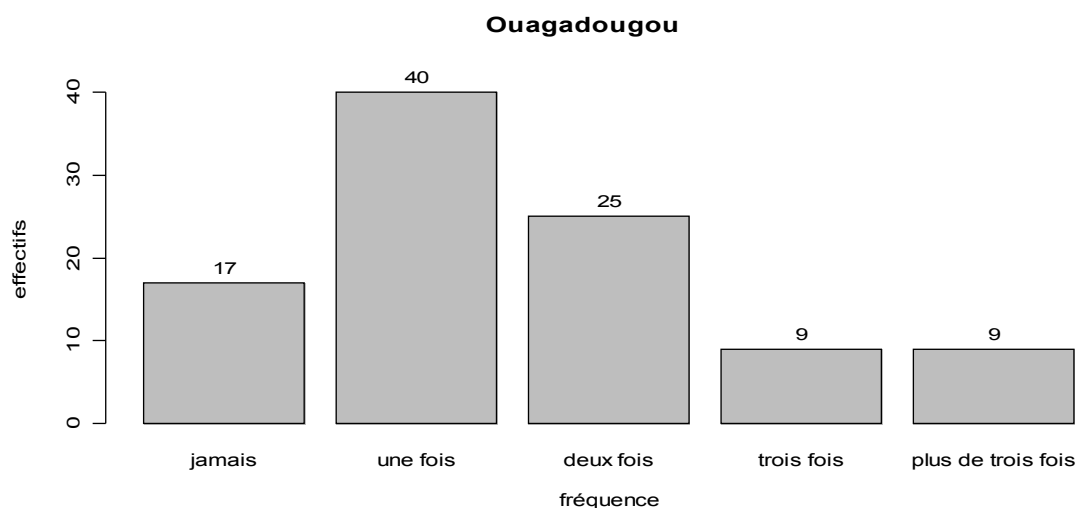


Figure 10 : Répartition des interviewés en fonction des épisodes de fièvre, pendant l'année passée. (Bagala n=94, Tonkoroni n=25, Nouna n=100, Ouagadougou n=100) La majorité des interviewés à Bagala, Nouna et à Ouagadougou a souffert une fois par an d'une épisode de fièvre. A Tonkoroni la majorité des interviewés en a souffert deux fois par an.

5. Dépenses mensuelles pour la santé envisageables

Les personnelles dépenses envisageables pour la santé sont indiqués dans le tableau IV:

Possibles dépenses mensuelles pour la santé	Bagala n=94	p%	Tonkoroni n=25	p%	Nouna n=100	p%	Ouagadougou n=100	p%
rien	12	12,8	5	20	8	8	11	11
Moins de 500 FCFA	46	48,9	10	40	40	40	17	17
Entre 500 et 5000 FCFA	0	0	0	0	5	5	10	10
Plus de 5000 FCFA	0	0	0	0	5	5	10	10

Tableau IV: Répartition des dépenses mensuelles envisageables pour la santé. (Bagala n=94, Tonkoroni n=25, Nouna n=100, Ouagadougou n=100)

La majorité des interviewés à Nouna et à Ouagadougou peut dépenser entre 500- et 5000 FCFA par mois pour la santé. A Bagala la majorité peut dépenser moins de 500 FCFA mensuel et à Tonkoroni le même nombre des interviewés peut dépenser moins de 500 FCFA ou bien entre 500- et 5000 FCFA.

7. Literaturverzeichnis

- 1: World Health Organization/UNICEF. World Malaria Report 2008. Verfügbar unter: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241563697/en/index.html>
- 2: World Health Organisation. World Malaria Report 2005. Verfügbar unter: <http://www.rollbackmalaria.org/wmr2005/>
- 3: Platz J.A., Olson S.H. Malaria Risk and temperature: influence from global climate change and local land use practice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006; 103:5635-5636
- 4: World Health Organisation. Africa Malaria Report 2006. Verfügbar unter <http://www.afro.who.int/>
- 5: Sachs G., Malaney P. The economic and social burden of malaria. Nature. 2002; 415:680-685
- 6: Ministere de la Santé Burkina Faso. Plan d'action 2007 du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP). Verfügbar unter: <http://www.sante.gov.bf/SiteSante/plans/pnlp.html>
- 7: Ministere de la Santé Burkina Faso. Plan strategique 2006-2010. Verfügbar unter: <http://www.sante.gov.bf/SiteSante/plans/pnlp.html>
- 8: Rowe A.K., Rowe S.Y., Snow R.W., Korenromp E.L., Schellenberg J.R., Stein C., Nahlen B.L., Bryce J., Black R.E., Steketee R.W. The burden of malaria mortality among African children in the year 2000. Int J Epidemiol. 2006; 35:691-704
- 9: RKI. Malaria, RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte, 2006. Verfügbar unter: http://www.rki.de/cln_109/nn_494530/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Mbl__Malaria.html. Zuletzt aufgerufen 02/2011
- 10: Warell D., Gilles H. Essential Malariology. Arnold Verlag. 2002; Kpt: 6, Rationale and technique of malaria control; 7, clinical

- features of malaria; 11, Immunology of Malaria; 12, Treatment and prevention of malaria; 13, Malaria vaccines. S: 107-190, 191-205, 252-267, 268-312, 313-325
- 11: Hume J.C., Lyons E.J., Day K.P. Human migration, mosquitoes and the evolution of *Plasmodium falciparum*. Trends Parasitol. 2003; 19:144-149
- 12: Newbold C., Craig A., Kyes S., Rowe A., Fernandez-Reyes D., Fagan T. Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. Int J Parasitol. 1999; 29:927-937
- 13: Menendez C., Kahigwa E., Hirt R., Vounatsou P., Aponte J.J., Font F., Acosta C.J., Schellenberg D.M., Galindo C.M., Kimario J., Urassa H., Brabin B., Smith T.A., Kitua A.Y., Tanner M., Alonso P.L. Randomised placebo-controlled trial of iron supplementation and malaria chemoprophylaxis for prevention of severe anaemia and malaria in Tanzanian infants. Lancet. 1997; 350:844-850
- 14: World Health Organisation. Malaria Case Management. 2009. verfügbar unter: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598088_eng.pdf
- 15: Newbold C.I. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: mechanisms and consequences. Curr Opin Microbiology. 1999; 2:420-425
- 16: Tanner M., Vlassof C. Treatment-seeking behaviour for malaria: a topology based on endemicity and gender. Soc Sci Med. 1998; 46:4-5
- 17: Hausmann-Muela S., Ribera J.M., Tanner M. Fake malaria and hidden parasites - the ambiguity of malaria. Anthropology and Medicine. 1998; 5:43-61
- 18: Saleh J.A., Yusuph H., Zailani S. B., Aji B. Malaria vaccine: the pros and cons. Niger Journal of Medicine. 2010; 19:8-13
- 19: Dame J.B., Williams J.L., McCutchan T.F., Weber J.L., Wirtz R.A.,

- Hockmeyer W.T., Maloy W.L., Haynes J.D., Schneider I., Roberts D., et al. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 1984; 225:593-599
- 20: Ballou W.R., Rothbard J., Wirtz R.A., Gordon D.M., Williams J.S., Gore R.W., Schneider I., Hollingdale M.R., Beaudoin R.L., Maloy W.L. et al. Immunogenicity of synthetic peptides from circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Science*. 1985; 228:996-999
- 21: Alonso P.L., Sacarlal J., Aponte J.J., Leach A., Macete E., Milman J. Mandomando I., Spiessens B., Guinovart C., Espasa M., Bassat Q., Aide P., Ofori-Anyinam O., Navia M.M., Corachan S., Ceuppens M., Dubois M.C., Demoitié M.A., Dubovsky F., Menéndez C., Tornieporth N., Ballou W.R., Thompson R., Cohen J. Efficacy of the RTS S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*. 2004; 364:1411-1420
- 22: Alonso P.L., Sacarlal J., Aponte J.J., Leach A. Macete E., Aide P., Sigaumque B., Milman J. Mandomando I., Bassat Q., Guinovart C., Espasa M., Corachan S., Lievens M., Navia M.M., Dubois M.C., Menendez C., Dubovsky F., Cohen J., Thompson R., Ballou W.R. Duration of protection with RTS, S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single blind extended follow-up of randomised controlled trial. *Lancet*. 2005; 366:2012-2018
- 23: Abdulla S., Oberholzer R., Juma O., Kubhoja S., Machera F., Membi C., Omari S., Urassa A., Mshinda H., Jumanne A., Salim N., Shomari M., Aebi T., Schellenberg D.M., Carter T., Vilafana T., Demopitié M.A., Dubois M.C., Leach A., Lievens M., Vekemans J., Cohen J., Ballou W.R., Tanner M. Safety and immunogenicity of RTS, S/AS02D malaria vaccine in infants. *New England Journal of Medicine*. 2008;

- 359:2533-2544
- 24: Bejon P., Lusingu J., Olotu A., Leach A., Lievens M., Vekemans J., Mshamu S., Lang T., Gould J., Dubois M.C., Demoitié M.A., Stallaert J.F., Vansadia P., Carter T., Njuguna P., Awuondo K.O., Malabeja A., Abdul O., Gesase S., Mturi N., Drakeley C.J., Savarese B., Villafana T., Ballou W.R., Cohen J., Riley E.M., Lemnge M.M., Marsh K., von Seidlein L. Efficacy of RTS, S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 month of age. *New England Journal of Medicine*. 2008; 359:2521-2532
- 25: *Lancet*. Malaria 2010: more ambition and accountability please. 2010; 375:1407
- 26: Najera J. Malaria and the work of WHO. *WHO Bulletin*. 1989; 67:229-243
- 27: Onori E., Beales P., Gilles H. From malaria eradication to malaria control: the present and the future. Erschienen in Bruce-Chwatt's *Essential Malariology*. Third edition. Herausgegeben von Gilles HM, Warrell DA. Arnold. 1993; 305-310
- 28: Bruce-Chwatt L., Lessons learned from applied field research activities in Africa during the malaria eradication area. *WHO Bulletin*. 1984; 62: 19-29
- 29: Trigg P., Kondrachine A. Malaria control in the 1990s. *WHO Bulletin* 1998; 76:11-16
- 30: World Health Organisation. World Malaria Report 2009. Verfügbar unter: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html
- 31: Roll back Malaria Partnership. The Global Malaria Action Plan - For a malaria free world, 1-74, 2008. Verfügbar unter: <http://www.rollbackmalaria.org/gmap/>
- 32: Kouyaté B., Sie A., Yé M., Allegri De M., Müller O. The Great Failure of Malaria Control in Africa: A District Perspective from Burkina Faso

- Plos Medecine. 2007; 4:e127
- 33: Trape J. F. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001; 64:12-17
- 35: D'Alalissandro U., Talisuna A., Boelaert M. Should artemisinin-based combination treatment be used in the home-based management of malaria? *Tropical Medicine and International Health*. 2005; 10:1-2
- 36: Noedl H., Se Y., Schaecher K., Smith B.L., Socheat D., Fukuda M.M. Evidence of artemisinin-resistance in west Cambodia. *New England Journal*. 2008; 359:2619-2620
- 37: Müller S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2004; 53:1291-1305
- 38: Stadtman E.R. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res*. 2006; 40: 1250-1258
- 39: Lykkesfeldt J., Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J*. 2007; 173: 502-511
- 40: Bunik V.I. 2-Oxo acid dehydrogenase complexes in redox regulation. *Eur J Biochem*. 2003; 270: 1036-1042
- 41: Fialkow L., Wang Y., Downey G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42: 153-164
- 42: Boyd C.S., Cadenas E. Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial dependent apoptosis. *Biol Chem*. 2002; 383: 411-423
- 43: Krauth-Siegel R.L., Bauer H., Schirmer R.H. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2005; 44: 690-715
- 44: Atamna H., Ginsburg H. The Malaria Parasite supplies Glutathione to its host cell - investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Eur. J.*

- Biochem. 1997; 250:670-679
- 45: Becker K., Tilley L., Vennerstrom J.L., Roberts D., Rogerson S., Ginsburg H., Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol.* 2004; 34: 163-189
- 46: Niles J. C., DeRisi J. L., Marletta M. A., Inhibiting *Plasmodium falciparum* growth and heme detoxification pathway using heme-binding DNA aptamers. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009; 106:13266-13271
- 47: Krugliak M., Zhang J., Ginsburg H. Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the aminoacids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol Biochem Parasitol.* 2002; 119:249-256
- 48: Lew V.L., Tiffert T., Ginsburg H. Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood.* 2003; 101:4189-4194
- 49: Spiller D.G., Bray P.G., Hughes R.H., Ward S.A., White M.R. The pH of the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole: holy grail or dead-end trail? *Trends Parasitol.* 2002; 18:441-444
- 50: Mashima R., Tilley L., Siomos M.A., Papalexis V., Raftery M.J., Stocker R. *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein-2 (PfHRP2) modulates the redoxactivity of ferri-protoporphyrin IX (FePPIX): peroxidase-like activity of the PfHRP2-FePPIX complex. *J Biol Chem.* 2002; 277:14514-14520
- 51: Egan T.J., Combrinck J.M., Egan J., Hearne G.R., Marques H.M., Ntenti S., Sewell B.T., Smith P.J., Taylor D., van Schalkwyk D.A., Walden J.C. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J.* 2002; 365:343-347
- 52: Slater A.F., Cerami A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malariatrophozoites. *Nature.* 1992;

- 355:167-169
- 53: Ginsburg H., Famin O., Zhang J., Krugliak M. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56:1305-1313
- 54: Campanale N., Nickel C., Daubenberger C.A., Wehlan D.A., Gorman J.J., Klonis N., Becker K., Tilley L. Identification and characterization of heme-interacting proteins in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 2003; 278:27354-27361
- 55: Famin O., Ginsburg H. The treatment of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes with chloroquine leads to accumulation of ferriprotoporphyrin IX bound to particular parasite proteins and to the inhibition of the parasite's 6-phosphogluconatedehydrogenase. *Parasite.* 2003; 10:39-50
- 56: Tilley L., McFadden G., Cowman A., Klonis N. Illuminating *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Trends Parasitol.* 2007; 23:268-277
- 57: Atamna H., Pascarmona G., Ginsburg H., Hexose-monophosphate shunt activity in intact *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and in free parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; 67: 79-89
- 58: Becker K., Rahlfs S., Nickel C., Schirmer R.H. Glutathione--functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol Chem.* 2003; 384:551-566
- 59: Omodeo-Salè F., Motti A., Basilico N., Parapini S., Olliaro P., Taramelli D. Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*. *Blood.* 2003; 102:705-711
- 60: Parker P.D., Tilley L., Klonis N. *Plasmodium falciparum* induces reorganization of host membrane proteins during intraerythrocytic growth. *Blood.* 2004; 103:2404-2406
- 61: Turrini F., Ginsburg H., Bussolino F., Pescarmona G.P., Serra M.V.,

- Arese P. Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. *Blood*. 1992; 80:801-808
- 62: Homolya L., Váradi A., Sarkadi B. Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors*. 2003; 17:103-114
- 63: Griffith O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27:922-935
- 64: Atamna H., Ginsburg H. The Malaria Parasite supplies glutathione to its host cell - investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem*. 1997; 250:670-679
- 65: Lüersen K., Walter R.D., Müller S. *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells depend on a functional glutathione de novo synthesis attributable to an enhanced loss of glutathione. *Biochem J*. 2000; 346:545-552
- 66: Meierjohann S., Walter R.D., Müller S. Regulation of intracellular glutathione levels in erythrocytes infected with chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. 2002; 368:761-768
- 67: Guttman P., Ehrlich P. Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berliner Klinische Wochenschrift*. 1891; 39:953-956
- 68: Bohne U.L., Kreher R.P. Methylenblau. Geschichte eines Farbstoffs – ein Farbstoff mit Geschichte. *NiU-Chemie*. 1999; 52:36-37
- 69: Mansouri A., Lurie A.A. Concise review: methemoglobinemia. *Am J Hematol*. 1993; 42:7-12
- 70: Coleman M.D., Coleman N.A. Drug-induced methaemoglobinaemia. Treatment issues. *Drug Saf*. 1997; 14:394-405
- 71: Pelgrims J., De Vos F., Van den Brande J., Schrijvers D., Prove A.,

- and Vermorken J.B. Methylene blue in the treatment and prevention of ifosfamide-induced encephalopathy: report of 12 cases and a review of the literature. *Br J Cancer*. 2000; 82:291-294
- 72: Oz M., Lorke D.E., Petroianu G.A. Methylene blue and Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*. 2009; 78:927-932
- 73: Atamna H., Krugliak M., Shalmiev G., Deharo E., Pescarmona G., and Ginsburg H. Mode of antimalarial effect of methylene blue and some of its analogues on *Plasmodium falciparum* in culture and their inhibition of *P. vinckei petteri* and *P. yoelii nigeriensis* in vivo. *Biochem Pharmacol*. 1996; 51:693-700
- 74: Schirmer R.H., Coulibaly B., Stich A., Scheiwein M., Merkle H., Eubel J., Becker K., Becher H., Müller O., Zich T., Schiek W. and Kouyate B. Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Rep.*, 2003; 8:272-275
- 75: Coulibaly B., Zoungrana A., Mockenhaupt F.P., Schirmer R.H., Klose C., Mansmann U., Meissner P.E., Müller O. Strong gametocytocidal effect of methylene blue-based combination therapy against falciparum malaria: a randomised controlled trial. *PLoS One*. 2009; 4:e5318
- 76: Meissner P.E., Mandi G., Witte S., Coulibaly B., Mansmann U., Rengelshausen J., Schiek W., Jahn A., Sanon M., Tapsoba T., Walter-Sack I., Mikus G., Burhenne J., Riedel K.D., Schirmer R. H., Kouyate B., Müller O. Safety of the methylene blue plus chloroquine combination in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in young children of Burkina Faso. *Malar J*. 2005; 4:45
- 77: Müller S., Gilberger T.W., Krnajski Z., Luersen K., Meierjohann S., Walter R.D. Thioredoxin and glutathione system of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protoplasma*. 2001; 217:43-49
- 78: Mandi G., Witte S., Meissner P., Coulibaly B., Mansmann U., Rengelshausen J., Schiek W., Jahn A., Sanon M., Wust K., Walter-

- Sack I., Mikus G., Burhenne J., Riedel K.D., Schirmer R. H., Kouyate B., Müller O. Safety of the combination of chloroquine and methylene blue in healthy adult men with G6PD deficiency from rural Burkina Faso. *Trop Med IntHealth*. 2005; 10:32-38
- 79: Meissner P.E., Mandi G., Coulibaly B., Witte S., Tapsoba T., Mansmann U., Rengelshausen J., Schiek W., Jahn A., Walter-Sack I., Mikus G., Burhenne J., Riedel K.D., Schirmer R.H., Kouyate B., Müller O. Methylene blue for malaria in Africa: results from a dose-finding study in combination with chloroquine. *Malar J*, 2006; 5:84
- 80: Akoachere M., Buchholz K., Fischer E., Burhenne J., Haefeli W.E., Schirmer R.H., Becker K. In vitro assessment of methylene blue on chloroquine-sensitive and -resistant *Plasmodium falciparum* strains reveals synergistic action with artemisinin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005; 49:4592-4597
- 81: Duarte N.C., Palsson B.B. and Fu. P. Integrated analysis of metabolic phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 2004; 5:63
- 82: Förster J., Gombert A.K., Nielsen J. A functional genomics approach using metabolomics and in silico pathway analysis. *Biotechnol. Bioeng*. 2002; 79:703-712
- 83: Ibarra R.U., Fu P., Palsson B.O., DiTonno J.R., Edwards J.S. Quantitative analysis of *Escherichia coli* metabolic phenotypes within the context of phenotypic phase planes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2003; 6:101-108
- 84: Carlson R., Sreenc F. Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: creation of overall flux states. *Biotechnol. Bioeng*. 2004; 86:149-162
- 85: Human development report 2009. Verfügbar unter: <http://hdr.undp.org/en/reports/global/hdr2009/>
- 86: Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L.

- GenBank. 2008; 36:D25-30
- 87: Cohen B., Oren M., Min H., Perl Y., Halper M. Automated Comparative Auditing of NCIT Genomic Roles Using NCBI. *Journal of Biomedical Informatics*. 2009; 41:904-913
- 88: Cochrane G., Akhtar R., Bonfield J., Bower L., Demiralp F., Faruque N., Gibson R., Hoad G., Hubbard T., Hunter C., Jang M., Juhos S., Leinonen R., Leonard S., Lin Q., Lopez R., Lorenc D., McWilliam H., Mukherjee G., Plaister S., Radhakrishnan R., Robinson S., Sobhany S., Hoopen P.T., Vaughan R., Zalunin V., Birney E. Petabyte-scale innovations at the European Nucleotide Archive. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37:D19-25
- 89: Aurrecochea C., Brestelli J., Brunk B.P., Dommer J., Fischer S., Gajria B., Gao X., Gingle A., Grant G., Harb O.S., Heiges M., Innamorato F., Iodice J., Kissinger J.C., Kraemer E., Li W., Miller J.A., Nayak V., Pennington C., Pinney D.F., Roos D.S., Ross C., Stoeckert C.J. Jr., Treatman C., Wang H. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37:D539-543
- 90: Bahl A., Brunk B., Coppel R.L., Crabtree J., Diskin S.J., Fraunholz M. J., Grant G.R., Gupta D., Huestis R.L., Kissinger J.C., Labo P., Li L., McWeeney S.K., Milgram A.J., Roos D.S., Schug J., Stoeckert C.J. PlasmoDB: the Plasmodium genome resource. An integrated database providing tools for accessing, analyzing and mapping expression and sequence data (both finished and unfinished). *Nucleic Acids Research*. 2002; 30:87-90
- 91: Boeckmann B., Blatter M.-C., Famiglietti L., Hinz U., Lane L., Roechert B., Bairoch A. Protein variety and functional diversity: Swiss-Prot annotation in its biological context. *C. R. Biol*. 2005; 328: 882-889
- 92: Jain E., Bairoch A., Duvaud S., Phan I., Redaschi N., Suzek B.E.,

- Martin M.J., McGarvey P., Gasteiger E. Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics*. 2009; 19:136
- 93: Finn R.D., Tate J., Mistry J., Coghill P.C., Sammut J.S., Hotz H.R., Ceric G., Forslund K., Eddy S.R., Sonnhammer E.L., Bateman A. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*. 2008; 36:D281-D288
- 94: Letunic I., Doerks. T., Bork P. SMART 6: recent update and new developments. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37:D229-232,
- 95: Berman H.M., Henrick K., Nakamura H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nature Structural Biology*. 2003; 10:980
- 96: Selzer P.M., Marhöfer R., Rohwer A. *Angewandte Bioinformatik: Eine Einführung*. Springer. 2003; Kapitel 4:71-81
- 97: Dayhoff M.O., Schwartz R.M., Orcutt B.C. A model of evolutionary change in proteins. *National Biomedical Research Foundation* 1979; 22:345-352
- 98: Henikoff S., Henikoff J. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; 89:10915-10919
- 99: Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers O.E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol*. 1990; 215:403-410
- 100: Altschul S.F., Madden T.L., Schäfer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25: 3389-3402
- 101: Hansen Andrea, *Bioinformatik - Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler*. Birkhäuser Verlag. 2004; Kapitel 1-10, S:1-129
- 102: Karlin S., Altschul S.F. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 1992; 87:2264-2268
- 103: Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan

- P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007; 23:2947-2948
- 104: Lesk Arthur M. *Bioinformatik- Eine Einführung*, Spektrum, akademischer Verlag, 2003; Kapitel 1-5:3-271
- 105: Steger G., *Bioinformatik: Methoden zur Vorhersage von RNA- und Proteinstrukturen*, Birkhäuser Verlag Basel 2003; Kapitel 1-16:3-279
- 106: Lengauer T. *Bioinformatics: From Genomes to Drugs*, Wiley-VCH Verlag, 2001; Kapitel 1-7:3-361
- 107: Bairoch A. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:304-305
- 108: Chang A., Scheer M., Grote A., Schomburg I., Schomburg D. BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37:D588-D592
- 109: Bozdech Z., Llinás M., Pulliam B.I., Wong E.D., Zhu J. DeRisi J. L. The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of *Plasmodium falciparum*. *Plos Biol.* 2003; 1:E5
- 110: Kanehisa M., Araki M., Goto S., Hattori M., Hirakawa M., Itoh M., Katayama T., Kawashima S., Okuda S., Tokimatsu T., Yamanishi Y. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36:D480-D484
- 111: Schuster S., Dandekar T., Fell D.A. Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends Biotechnol.* 1999; 17: 53-60
- 112: Papin J.A., Stelling J., Price N.D., Klamt S., Schuster S., Palsson B.O. Comparison of network-based pathway analysis methods. *Trends Biotechnol.* 2004; 22:400-405

- 113: Finney A., Hucka M. Systems biology markup language: Level 2 and beyond. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31:1472-1473
- 114: Schwarz R., Liang C., Kaleta C., Kühnel M., Hoffmann E., Kuznetsov S., Hecker M., Griffiths G., Schuster S., Dandekar T. Integrated network reconstruction, visualization and analysis using YANASquare. *BMC Bioinformatics.* 2007; 8:313
- 115: Hornik K. The {R} {FAQ}. 2009. Verfügbar unter: <http://CRAN.R-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html>
- 116: Wernsdorfer W.H. Epidemiology of drug resistance in malaria: a crucial interaction. *Acta Trop.* 1994; 56:143-156
- 117: Molyneux, D.H., Floyd K., Barnish G., Fevre E.M. Transmission control and drug resistance in malaria: a crucial interaction. *Parasitol Today.* 1999; 15:238-240
- 118: Travassos M.A, Laufer M.K. Resistance to antimalarial drugs: molecular, pharmacological, and clinical considerations. *Pediatr Res.* 2009; 65:64-70
- 119: Fidock D.A., Nomura T., Talley A.K., Cooper R.A., Dzekunov S.M., Ferdig M.T., Ursos L.M., Sidhu A.B., Naude B., Deitsch K.W., Su X.Z., Wootton J.C., Roepe P.D., Wellems T.E. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell.* 2000; 6:861-871
- 120: Lakshmanan V., Bray P.G., Verdier-Pinard D., Johnson D.J., Horrocks P, Muhle R.A., Alakpa G.E., Hughes R.H., Ward S.A., Krogstad D.J., Sidhu A.B., Fidock D.A. A critical role for PfCRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance. *EMBO J.* 2005; 24:2294-2305
- 121: Wellems T.E., Plowe C.V. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis.* 2001; 184:770-776
- 122: Valderramos S.G., Fidock D.A. Transporters involved in resistance

- to antimalarial drugs. Trends Pharmacol Sci. 2006; 27:594–601
- 123: Duraisingh M.T., Cowman A.F. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. Acta Trop. 2005; 94:181–190
- 124: Sidhu A.B., Valderramos S.G., Fidock D.A. *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. 2005; 57:913–926
- 125: Sidhu A.B., Uhlemann A.C., Valderramos S.G., Valderramos J.C., Krishna S., Fidock D.A. Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. J Infect Dis. 2006; 194:528-535
- 126: Rohrbach P., Sanchez C.P., Hayton K., Friedrich O., Patel J., Sidhu A.B., Ferdig M.T., Fidock D.A., Lanzer M. Genetic linkage of *pfmdr1* with food vacuolar solute import in *Plasmodium falciparum*. EMBO J. 2006; 25:3000–3011
- 127: Trape J.F., Legros F., Ndiaye P., Konate L., Bah I.B., Diallo S., Verdier F., Hatin I., Le Bras J. Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Senegal. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989; 83:761
- 128: Krishna S., Woodrow C., Staines H., Haynes R., Mercereau-Puijalon O. Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance. Trends in Molecular Medicine. 2006; 12:200-205.
- 129: Haynes R.K., Krishna S., Artemisinins: activities and actions. Microbes Infect. 2004; 6:1339-1346
- 130: Pandey A. V., Tekwani B.L., Singh R.L., Chauhan V.S. Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite. J. Biol. Chem. 1999; 274:19383-19388

- 131: Robert A., Benoit-Vical F., Claparols C., Meunier B. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005; 102:13676-13680.
- 132: 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. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. Nature. 2003; 424:957-961
- 133: Ellis D.S., Li Z.L., Gu H.M., Peters W., Robinson B.L., Tovey G., Warhurst DC. The chemotherapy of rodent malaria, XXXIX. Ultrastructural changes following treatment with artemisinin of *Plasmodium berghei* infection in mice, with observations of the localization of [3H]-dihydroartemisinin in *P. falciparum* in vitro. Ann. Trop. Med. Parasitol. 1985; 79:367-374
- 134: Kannan R., Kumar K., Sahal D., Kukreti S., Chauhan V.S. Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity. Biochemistry Journal. 2005; 385:409-418
- 135: Krungkrai S.R., Yuthavong Y. The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987; 81:710-714
- 136: Wu Y. How might qinghaosu (artemisinin) and related compounds kill the intraerythrocytic parasite? A chemist view. Acc. Chem. Res. 2002; 35:255-259
- 137: Olliaro P.L. et al. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. Trends Parasitol. 2001; 17:122-126
- 138: Haynes R.K. Reply on comments on "highly antimalaria-active artemisinin derivatives: biological activity does not correlate with chemical reactivity. Angew. Chem. 2005; 44:2064-2065
- 139: Li W., Mo W., Shen D., Sun L., Wang J., Lu S., Gitschier J.M., Zhou B. Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in the action of

- artemisinin. PLoS Genet., 2005; 1:e36
- 140: Uhlemann A.-C., Cameron A., Eckstein-Ludwig U., Fischbarg J., Iserovich P., Zuniga F.A., East M., Lee A., Brady L., Haynes R.K., Krishna S. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. Nature structural and molecular biology. 2005; 12:628-629
- 141: Fidock D.A., Eastman R.T., Ward S.A., Meshnick S.R. Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research. Trends Parasitol. 2008; 24:537-44
- 142: Dunay I.R., Chan W.C., Haynes R.K., Sibley L.D. Artemisone and artemiside control acute and reactivated toxoplasmosis in a murine model. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53:4450-4456
- 143: Jung M., Kim H., Nam K.Y., No K.T. Three-dimensional structure of *Plasmodium falciparum* Ca²⁺-ATPase (PfATP6) and docking of artemisinin derivatives to PfATP6. Bioorg Med Chem Lett., 2005; 15:2994-2997
- 144: Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994; 22:4673-4680
- 145: Gilberger T.W., Schirmer R.H., Walter R.D., Müller S. Deletion of the parasite-specific insertions and mutation of the catalytic triad in glutathione reductase from chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* 3D7. Mol. Biochem. Parasitol. 2000; 107:169-179
- 146: Böhme C.C., Arscott L.D., Becker K., Schirmer R.H., Williams C.H. Jr. Kinetic characterization of glutathione reductase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Comparison with the human enzyme. J Biol Chem. 2000; 275:37317-37323
- 147: Sarma G.N., Savvides S.N., Becker K., Schirmer M., Schirmer R.H., Karplus P.A. Glutathione reductase of the malarial parasite

- Plasmodium falciparum*: crystal structure and inhibitor development. J Mol Biol. 2003; 328:893-907
- 148: Becker K., Schirmer M., Kanzok S., Schirmer R.H. Flavins and flavoenzymes in diagnosis and therapy. Methods Mol Biol. 1999; 131:229-245
- 149: Krauth-Siegel R.L., Coombs G.H. Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. Parasitol Today. 1999; 15:404-409
- 150: Davioud-Charvet E., Delarue S., Biot C., Schwöbel B., Boehme C.C., Müssigbrodt A., Maes L., Sergheraert C., Grellier P., Schirmer R.H., Becker K. A prodrug form of a *Plasmodium falciparum* glutathione reductase inhibitor conjugated with a 4-anilinoquinoline. J Med Chem. 2001; 44:4268-4276
- 151: Meierjohann S., Walter R.D., Müller S. Glutathione synthetase from *Plasmodium falciparum*. Biochem J. 2002; 363:833-838
- 152: Collinson E.J., Wheeler G.L., Garrido E.O., Avery A.M., Avery S.V., Grant C.M. The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. J Biol Chem., 2002; 277:16712-16717
- 153: Hirota K., Matsui M., Murata M., Takashima Y., Cheng F.S., Itoh T., Fukuda K., Yodoi J. Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF-kappaB, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 274:177-182
- 154: Song J.J., Rhee J.G., Suntharalingam M., Walsh S.A., Spitz D.R., Lee Y.J. Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H₂O₂. J Biol Chem. 2002; 277:46566-46575
- 155: Cotgreave I.A., Gerdes R., Schuppe-Koistinen I., Lind C. S-glutathionylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: role of thiol oxidation and catalysis by glutaredoxin. Methods Enzymol. 2002; 348:175-183
- 156: Porrás P., Pedrajas JR., Martínez-Galisteo E., Padilla C.A.,

- Johansson C., Holmgren A., Bárcena J.A. Glutaredoxins catalyze the reduction of glutathione by dihydrolipoamide with high efficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 295:1046-1051
- 157: Rahlfs S., Nickel C., Deponte M., Schirmer R.H., Becker K. *Plasmodium falciparum* thioredoxins and glutaredoxins as central players in redox metabolism. *Redox Rep.*, 2003; 8:246-250
- 158: Bozdech Z., Ginsburg H. Antioxidant defense in *Plasmodium falciparum*-data mining of the transcriptome. *Malar J.* 2004; 3:23
- 159: Rahlfs S., Fischer M., Becker K. *Plasmodium falciparum* possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain. *J Biol Chem.* 2001; 276:37133-37140
- 160: Rodríguez-Manzanque M.T., Ros J., Cabisco E., Sorribas A., Herrero E. Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1999; 19:8180-8190
- 161: Witte S., Villalba M., Bi K., Liu Y., Isakov N., Altman A. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF-kappa B pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. *J Biol Chem.* 2000; 275:1902-1909
- 162: Isakov N., Witte S., Altman A. PICOT-HD: a highly conserved protein domain that is often associated with thioredoxin and glutaredoxin modules. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25:537-539
- 163: Bellí G., Polaina J., Tamarit J., De La Torre M.A., Rodríguez-Manzanque M.T., Ros J., Herrero E. Structure-function analysis of yeast Grx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein. *J Biol Chem.* 2002; 277:37590-37596

- 164: Rodríguez-Manzaneque M.T., Tamarit J., Bellí G., Ros J., Herrero E. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfurenzymes. *Mol Biol Cell*. 2002; 13:1109-1121
- 165: Thornalley P.J. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol*. 1996; 27:565-573
- 166: Thornalley P.J. Glutathione-dependent detoxification of alpha-oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors. *Chem Biol Interact*. 1998; 111-112:137-151
- 167: Moldéus P., Cotgreave I.A. N-acetylcysteine. *Methods Enzymol*. 1994; 234:482-492
- 168: Mannervik B., Danielson U.H. Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem*. 1988; 23:283-337
- 169: Srivastava P., Puri S.K., Kamboj K.K., Pandey V.C. Glutathione-S-transferase activity in malarial parasites. *Trop Med Int Health*. 1999; 4:251-254
- 170: Harwaldt P., Rahlfs S., Becker K. Glutathione S-transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: characterization of a potential drug target. *Biol Chem*. 2002; 383:821-830
- 171: Becker K., Müller S., Keese M.A., Walter R.D., Schirmer R.H. A glutathione reductase-like flavoenzyme of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: structural considerations based on the DNA sequence. *Biochem Soc. Trans*. 1996; 24:67-72
- 172: Kanzok S.M., Schirmer R.H., Turbachova I., Iozef R., Becker K. The thioredoxin system of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Glutathione reduction revisited. *J Biol Chem*. 2000; 275:40180-40186
- 173: Wang P.F., Arscott L.D., Gilberger T.W., Müller S., Williams C.H. Jr.

- Thioredoxin reductase from *Plasmodium falciparum*: evidence for interaction between the C-terminal cysteine residues and the active site disulfide-dithiol. *Biochemistry*. 1999; 38:3187-3196
- 174: Williams C.H., Arscott L.D., Müller S., Lennon B.W., Ludwig M.L., Wang P.F., Veine D.M., Becker K., Schirmer R.H. Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur J Biochem*. 2000; 267:6110-6117
- 175: Krnajski Z., Gilberger T.W., Walter R.D., Cowman A.F., Müller S. Thioredoxin reductase is essential for the survival of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages. *J Biol Chem*. 2002; 277:25970-25975
- 176: Rahlfs S., Schirmer R.H., Becker K. The thioredoxin system of *Plasmodium falciparum* and other parasites. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59:1024-1041
- 177: Wood Z.A., Schröder E., Robin Harris J., Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*. 2003; 28:32-40
- 178: Hofmann B., Hecht H.J., Flohé L. Peroxiredoxins. *Biol Chem*. 2002; 383:347-364
- 179: Rahlfs S., Becker K. Thioredoxin peroxidases of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem*. 2001; 268:1404-1409
- 180: Akerman S.E., Müller S. 2-Cys peroxiredoxin PfTrx-Px1 is involved in the antioxidant defence of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003; 130:75-81
- 181: Sztajer H., Gamain B., Aumann K.D., Slomianny C., Becker K., Brigelius-Flohé R., Flohé L. The putative glutathione peroxidase gene of *Plasmodium falciparum* codes for a thioredoxin peroxidase. *J Biol Chem*. 2001; 276:7397-7403
- 182: Nickel C., Trujillo M., Rahlfs S., Deponte M., Radi R., Becker K.

- Plasmodium falciparum* 2-Cys peroxiredoxin reacts with plasmoredoxin and peroxynitrite. Biol Chem. 2005; 386:1129-1136
- 183: Buchholz K., Rahlfs S., Schirmer R.H., Becker K., Matuschewski K. Depletion of *Plasmodium berghei* plasmoredoxin reveals a non essential role for life cycle progression of the malaria parasite. PloS ONE, 2008; 3:e2474
- 184: Bozdech Z., Ginsburg H. Antioxidant defense in *Plasmodium falciparum*-data mining of the transcriptome. Malar J. 2004; 3:23
- 185: Stocker R., Hunt NH., Buffinton GD., Weidemann MJ., Lewis-Hughes PH., Clark IA. Oxidative stress and protective mechanisms in erythrocytes in relation to *Plasmodium vinckei* load. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985; 82:548-551
- 186: Fairfield AS., Abosch A., Ranz A., Eaton JW., Meshnick SR. Oxidant defense enzymes of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 1988; 30:77-82
- 187: Ginsburg H., Atamna H. The redox status of malaria-infected erythrocytes: an overview with an emphasis on unresolved problems. Parasite. 1994; 1:5-13
- 188: Kita K., Hirawake H., Miyadera H., Amino H., Takeo S. Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*. Biochim Biophys Acta. 2002; 1553:123-139
- 189: World Health Organisation, global health observatory: Burkina Faso: country profiles. Verfügbar unter: http://www.who.int/gho/countries/bfa/country_profiles/en/index.html
- 190: Traoré C. Epidemiology of malaria in a holoendemic area of rural Burkina Faso [Dissertation], 2003
- 191: Sankoh O.A., Ye Y., Sauerborn R., Müller O., Becher H. Clustering of childhood mortality in rural Burkina Faso. International Journal

- of Epidemiology. 2001; 30:485-492
- 192: Marsh K. Malaria disaster in Africa. Lancet 1998; 352:924
- 193: Guiguende T.R., Aouba A., Ouedraogo J.B., Lamizana L. Ten years surveillance of drug resistant Malaria in Burkina Faso (1982-1991). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1994; 50: 699-704
- 194: Price R.N., Nosten F., Luxemburger C., ter Kuile F.O., Paiphun L., Chongsuphajaisiddhi T., White N.J. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. Lancet. 1996; 347:1654-1658
- 195: Sutherland C.J., Ord R., Dunyo S., Jawara M., Drakeley C.J., Alexander N., Coleman R., Pinder M., Walraven G., Targett G.A. Reduction of malaria transmission to Anopheles mosquitoes with a six-dose regimen of co-artemether. Plos Medicine 2005; 2:e92
- 196: Jambou R., Legrand E., Niang M., Khim N., Lim P., Volney B., Ekala M.T., Bouchier C., Esterre P., Fandeur T., Mercereau-Puijalon O. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. Lancet. 2005; 366:1960-1963
- 197: World Health Organisation. The use of antimalarial drugs. Report of an Informal Consultation, 2000. Verfügbar unter: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_rbm_2001_33/en/index.html
- 198: Davis T.M., Karunajeewa H.A., Ilett K.F., Artemisinin-based combination therapies for uncomplicated malaria. The Medical Journal of Australia. 2005; 182:181-185
- 199: Ehrlich P. Chemotherapeutics: scientific principles, methods, and results. Lancet. 1913; 182:445-451
- 200: Ferreira C. Sur l'emploi du bleu de méthylène dans la malaria infantile. Rev Ther Med Chir. 1893; pp. 488-525

- 201: Anstey N.M., Hassanali M.Y., Mlalasi J., Manyenga D., Mwaikambo E.D. Elevated levels of methaemoglobin in Tanzanian children with severe and uncomplicated malaria. Transactions of the Tropical Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1996; 90:147-151
- 202: Zoungrana A., Coulibaly B., Sie A., Walter-Sack I., Mockenhaupt F.P., Kouyate B., Schirmer R.H., Klose C., Mansmann U., Meissner P., Muller O. Safety and efficacy of methylene blue combined with artesunate or amodiaquine for uncomplicated falciparum malaria: a randomized controlled trial from Burkina Faso. PLoS ONE. 2008; 3: e1630
- 203: Greenwood B. Can malaria be eliminated? Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2009; 103 Suppl 1:S2-5
- 204: Mendis K., Rietveld A., Warsame M., Bosman A., Greenwood B., Wernsdorfer W.H. From malaria control to eradication: The WHO perspective. Tropical Medicine and International health. 2009; 14: 802-809
- 205: UNESCO Institute for Statistics, Education. Verfügbar unter: <http://stats.uis.unesco.org/TableView/tableView.aspx?ReportId=51>
- 206: CIA, World factbook. Verfügbar unter: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/uv.html>
- 207: Su T. Household cost of illness, study in the Nouna Health District, Burkina Faso [Dissertation], 2006
- 208: Müller O., Traoré C., Kouyaté B., Becher H. Malaria morbidity, treatment seeking behaviour, and mortality in a cohort of young children in rural Burkina Faso. Tropical Medicine and International Health. 2004; 8:290-296
- 209: Wainwright M., Amaral L. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. Tropical Medicine and International Health: 2005; 10:501-511

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geschätzte Inzidenz der Malaria-Episoden 2004.	2
Abbildung 2: Malaria Verteilung in Burkina Faso 2005.	4
Abbildung 3: Entwicklungszyklus von Plasmodien.	7
Abbildung 4: Schwere Anämie eines 3-jährigen Malaria Patienten in der Kinderklinik in Ouagadougou.	11
Abbildung 5: 2-jährige Patientin mit schwerer Anämie unter Behandlung mit Bluttransfusionen.	12
Abbildung 6: Intrazelluläre Disulfid-reduzierende Redoxsysteme.	30
Abbildung 7: Struktur von Methylenblau.	34
Abbildung 8: Chemische Entwicklung von Anti-Malaria- -Medikamenten ausgehend von Methylenblau.	34
Abbildung 9: Phylogenetischer Stammbaum der SERCA Transporter verschiedener Plasmodien Spezies im Vergleich zu einer Calcium ATPase von <i>Drosophila</i> konstruiert mit dem Bootstrapping Verfahren.	71
Abbildung 10: Verschiedene Domänen des SERCA Transporters unterschiedlicher Plasmodien-Spezies.	73
Abbildung 11: Alignment der SERCA-Transporter verschiedener Plasmodium Spezies mit Hilfe von CLUSTALX.	77
Abbildung 12: Dreidimensionale Struktur der SERCA-Transporter verschiedener Plasmodien-Spezies.	79
Abbildung 13: SERCA von <i>P. falciparum</i>	80
Abbildung 14: SERCA von <i>P. vivax</i>	80
Abbildung 15: Ausschnitt aus dem Pentosephosphatzyklus	83
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Biosynthese von Glutathion.....	84
Abbildung 17: Pentosephosphat-Zyklus von <i>Plasmodium falciparum</i> . .	93
Abbildung 18: Glykolyse von <i>Plasmodium falciparum</i>	94
Abbildung 19: Redoxstoffwechsel von <i>Plasmodium falciparum</i>	95

Abbildung 20: Modelliertes Stoffwechselnetzwerk von *P. falciparum*. . .97

Abbildung 21: Netzwerk Graphik der konvexen Basis Analyse relativ zu mRNA Expressionsdaten.105

Abbildung 22: Netzwerk Graphik der konvexen Basis Analyse relativ zu mRNA Expressionsdaten und zur experimentellen mRNA Expressionsdaten unter Inkubation mit Methylenblau nach neun Stunden.112

Abbildung 23: Kenntnisse der Befragten der Dörfern Bagala und Tonkoroni sowie der Städte Nouna und Ouagadougou zu Transmission/Pathogenese der Malaria in Prozentpunkten.119

Abbildung 24: Einschätzung der am stärksten von Malaria gefährdeten Personen.121

Abbildung 25: Einschätzung der Malaria Symptome.122

Abbildung 26: Häufigkeitsverteilung der Gesamtpunktzahl zu Kenntnissen über Malaria in den Städten Nouna und Ouagadougou.123

Abbildung 27: Häufigkeitsverteilung der Gesamtpunktzahl zu Kenntnissen über Malaria in den Dörfern Bagala und Tonkoroni.123

Abbildung 28: Frequenz der Fieber-Episoden im vorangegangenen Jahr in Prozentpunkten.127

Abbildung 29: Wichtigkeit einer verfügbaren Malaria Therapie.128

Abbildung 30: Prozentualer Anteil der Befragten, die bei Fieberepisoden primär eine Gesundheitseinrichtung konsultieren.....128

Abbildung 31: Bereitschaft der Befragten zur Teilnahme an einem E-day-artigen Projekt.....129

Abbildung 32: Bereitschaft zur Einnahme von Malaria-Medikamenten für 10 Wochen ohne Malaria-Symptome.130

Abbildung 33: Bereitschaft zur Toleranz von Nebenwirkungen.131
Abbildung 34: Vertrauen in die Wirksamkeit der modernen Medizin. . 132
Abbildung 35: Vertrauen der Befragten in die traditionelle Medizin. ...132

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Medikamenten Preise von Anti-Malaria-Medikamenten in Burkina Faso in 2009.	36
Tabelle 2: Schematische Darstellung einer Identitätsmatrize.	47
Tabelle 3: Ähnlichkeit der einzelnen ATPasen untereinander.	74
Tabelle 4: Sensibilität modulierende Aminosäuren in den verschiedenen Plasmodienspezies.	76
Tabelle 5: Extreme Pathway Analyse des Redosstoffwechsels.	98
Tabelle 6: Flux der Konvexen Basis Moden berechnet mit R.	103
Tabelle 7: Relative mRNA Expression unter Inkubation von <i>P.</i> <i>falciparum</i> mit Methylenblau nach 9, 12 und 18 Stunden. .	107
Tabelle 8: Flux der konvexen Basis Moden unter Einfluss von Methylen- blau nach 9, 12 und 18 Stunden berechnet mit R.	108
Tabelle 9: Soziodemographische Daten zu Bagala.	114
Tabelle 10: Soziodemographische Daten zu Tonkoroni.	116
Tabelle 11: Soziodemographische Daten zu Nouna und Ouagadougou.	117
Tabelle 12: Einschätzung der Befragten von Malaria als schwere, gemäßigte oder harmlose Krankheit.....	120
Tabelle 13: Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung der Gesamtpunktzahl.....	122
Tabelle 14: Ergebnisse von Mann-Whitney-U- und Wilcoxon Test.....	124
Tabelle 15: Spearman Korrelation von Schulbildung und Malaria Kenntnissen in den Städten Nouna und Ouagadougou.....	125
Tabelle 16: Spearman Korrelation von Schulbildung und Malaria Kenntnissen in den Dörfern Bagala und Tonkoroni.....	125
Tabelle 17: Spearman Korrelation von Schulbildung und Malaria Kenntnissen in den Städten Nouna und Ouagadougou.....	126
Tabelle 18: Spearman Korrelation von Alter und Malaria Kenntnissen in den Dörfer Bagala und Tonkoroni.....	126

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Thomas Dandekar für die Ermöglichung der Dissertation und die hervorragende Betreuung während der gesamten Arbeit. Insbesondere danke ich ihm für seine Geduld, mich in die Materie der Netzwerkmodellierung und Homologiemodellierung einzuführen, sowie für seine immer währende Offenheit für neue Ideen und Fragen.

Besonderen Dank gilt auch dem Team der Bioinformatik, insbesondere Tobias Müller, Chunguang Liang und Alexander Cecil für die gute Zusammenarbeit und zahlreiche informatische und statistische Unterstützung.

Danke auch der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Katja Becker für die Bereitstellung der experimentellen Daten und die Unterstützung bei unserer Publikation.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Heiner Schirmer für die fachliche Unterstützung und Motivation, sowie für die Ermöglichung des Aufenthaltes in Burkina Faso.

Hier möchte ich den Kollegen des Centre de Recherche en Santé in Nouna danken; besonders Boubacar Coulibaly, Bocar Kouyaté, Karim Coulibaly, Valerie Coulibaly und Cheik Hamidou für die fachliche und persönliche Unterstützung bei meiner Befragung und während meines Aufenthaltes in Burkina.

In Ouagadougou möchte ich dem Krankenhausdirektor des Hôpital pédiatrique Charles de Gaulles, sowie dem Team der Notaufnahme des Krankenhauses für die Ermöglichung einer Famulatur und für die hervorragende Zusammenarbeit danken. Mit ihrer Hilfe konnte ich einen umfassenden Eindruck zur klinischen Problematik der Malaria und den verbundenen gesellschaftlichen und sozialen Problemen gewinnen. Für die Unterstützung bei meiner Befragung in Ouagadougou möchte ich besonders Arsène Ouedraogo, Salif Zongo und Salem Sawadogo danken, auch für die weiterhin bestehenden Freundschaft und Zusammenarbeit in Projekten.

Für die Übernahme des Koreferats danke ich herzlichst Priv.-Doz. Dr. August Stich.

Danke auch meinen Freunden, insbesondere Frauke Schäfer, für die seelische, moralische und fachliche Unterstützung während der Arbeit.

Der größte Dank gebührt meinen lieben Eltern, die mich während meines gesamten Studiums mit Rat und Tat begleiteten und mich in allen Vorhaben unterstützten.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Janina Zirkel
Geboren: 09.04.1983 in Darmstadt

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1989 – 1992: Grundschule Züntersbach
1992 – 1993: Grundschule Altengronau
1993 – 2002: Ulrich von Hutten Gymnasium Schlüchtern
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

HOCHSCHULAUSBILDUNG

Seit 10/2002: Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
08/2004: Ärztliche Vorprüfung
04/2005: Beginn der Promotion im Institut für Bioinformatik, Universität Würzburg
03/2006 - 08/2006: Auslandsstudium an der Universidad de Buenos Aires
08/2007 - 12/2007: viermonatiges Praktikum im Sektorvorhaben „Stärkung des HIV-Profiles in der deutschen Entwicklungszusammenarbeit“ der Gesellschaft für technischen Zusammenarbeit in Eschborn
12/2007-12/2008 Praktisches Jahr
Innere Medizin: Universitätsklinikum Würzburg und Hôpital Riviera in Blonay, Schweiz
Chirurgie: Hôpital Universitaire de Parakou, Benin
Infektiologie: Missionsärztliche Klinik Würzburg und Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg
05/2009 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Seit 09/2009 Assistenzärztin im Bereich Infektiologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Würzburg

Würzburg 26.10.2011