

Parasitologische und molekularbiologische Charakterisierung Isometamidium-empfindlicher und -resistenter *Trypanosoma congolense* und *T. brucei brucei* -Isolate aus Rindern Ost - und Westafrikas.

Die Resistenz gegen Isometamidium ist in vielen südlich der Sahara gelegenen Regionen Afrikas ein ernstzunehmendes Problem. Zum Nachweis von Arzneimittel-Resistenz bei Trypanosomen sind mehrere Methoden beschrieben worden, allerdings haben die zurzeit angewendeten Techniken eine Reihe von Nachteilen. Daher ist der Bedarf an sensitiveren und verlässlicheren Methoden groß. Ziel der Studie war a) die Prüfung der Isometamidium Empfindlichkeit von *Trypanosoma congolense* Klonen, die aus Populationen von natürlich infizierten Rindern aus West- und Ostafrika stammten, b) die Resistenz gegen Isometamidium in einem sensiblen *T. congolense* Klon zu erzeugen und c) die Charakterisierung des vermutlich Resistenzabhängigen Nukleosid –Transportgens (TbAT1) in Isometamidium-sensiblen und –resistenten *T. brucei brucei* und *T. congolense*.

Die Trypanosomen Klone stammen von *T. congolense* Populationen von Rindern aus Äthiopien und Burkina Faso, die unterschiedliche Phänotypen bezüglich Isometamidium-Sensibilität aufwiesen. Insgesamt lag der Klonierungserfolg bei 20.3%, der bei den einzelnen Populationen von 16,67% bis 25,0% schwankte. Die Sensibilität der Klone gegen Isometamidium wurde mittels Dosierungsversuchen an Mäusen erprobt. Es zeigte sich, dass alle *T. congolense* Klone im Vergleich mit den sicher Isometamidium-sensiblen Referenzstämmen einen hohen Grad an Resistenz gegen Isometamidium aufwiesen. Die Klone aus Burkina Faso zeigten in Mäusen signifikant ($p < 0,05$) stärkere Resistenz als die Klone aus Äthiopien. Mittels einer Varianzanalyse der mittleren Intervallzeiten bis zum Rückfall der Mäuse konnte bei den meisten getesteten Klonen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt des Rückfalls und der verwendeten Isometamidium Dosierung gezeigt werden; die Mäuse, die mit einer niedrigeren Dosierung behandelt worden waren, erlitten früher einen Rückfall, als die, die eine höhere Dosis erhielten ($p = 0,001$). Die CD_{50} -Werte der äthiopischen Klone lagen im Bereich von 9,86 bis 13,37 mg/Kg KGW während die Klone aus Burkina Faso CD_{50} -Werte von 19,80 bis $> 20,0$ mg/Kg KGW aufwiesen. Innerhalb von drei Klonen aus einer äthiopischen Population (PA 77) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Resistenzgrad. Ebenso ähnelte sich die Ausprägung von Isometamidium Resistenz zweier Klone aus einer Population von Burkina Faso ($p > 0,05$).

Um die Entwicklung des Resistenzmechanismus bei Trypanosomen besser zu verstehen, wurden mehrere *T. congolense* Klone mit unterschiedlichem Resistenzniveau aus einem Isometamidium-sensiblen Klon in der Maus gewonnen. Durch wiederholte Behandlung mit subtherapeutischer Dosierung über einen Zeitraum von 16 Monaten wurden der Resistenzgrad von Klon IL 2642 um mindestens das 159-fache gesteigert (von $CD_{50} = 0,0086$ auf 1,37 mg/kg KGW). Dies war verbunden mit einem 2,2 fachen Anstieg einer an Mäusen getesteten

Diminazen-Resistenz (von $CD_{50} = 8,20$ auf $18,2$ mg/Kg KGW). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass mit einer Verabreichung subtherapeutischer Dosierung Resistenzen gegen Medikamente hervorgerufen werden können. Der hier in immunsupprimierten Mäusen erzeugte hohe Resistenzgrad war stabil und erwies sich auch bei im Folgenden mit diesen Klonen infizierten immunkompetenten Mäusen als dauerhaft. Allerdings konnte mit ähnlichem Dosierungsschema und Studienprotokoll bei normalen immunkompetenten Mäusen keine Isometamidium-Resistenz bei dem Klon IL 2642 hervorgerufen werden. Dies zeigt, dass eine Immunsuppression des Wirts die Wirksamkeit von trypanoziden Wirkstoffen beträchtlich herabsetzen und so zu einer schnellen Entwicklung von Resistenz beitragen kann.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Genmutationen und Isometamidium-Resistenz zu finden, wurde das TbAT1 Gen des *T. b. brucei* Feldstammes analysiert, welches für den P2 Transporter kodiert. Insgesamt wurde das TbAT1 Gen von *T. b. brucei* von 11 Isometamidium-sensiblen Feldstämmen sowie von zwei sensiblen und zwei resistenten Referenzklonen analysiert. Im Sequenzvergleich zeigte der Isometamidium-sensible Stamm von *T. b. brucei* das Sequenzmuster des Wildtyps. Im Gegensatz dazu wies der Isometamidium-resistente Stamm von *T. b. brucei* ein mutiertes Sequenzmuster auf, welches mit der DNA Sequenz des experimentell gewonnenen Melarsoprol-resistenten Stammes STIB 777R übereinstimmte. In diesen Isometamidium-resistenten Stämmen konnten sechs Punktmutationen nachgewiesen werden, die auch schon bei dem experimentell gewonnenen Melarsoprol-resistenten Stamm STIB 777R gefunden worden waren. Vier dieser Nukleotid-Unterschiede führten zum Austausch einer Aminosäure: Ala¹⁷⁸ → Thr (A178T), Gly¹⁸¹ → Glu (G181E), Asp²³⁹ → Gly (D239G) und Asn²⁸⁶ → Ser (N286S). Des Weiteren wurden bei den resistenten Stämmen drei Nukleotid-Deletionen (TTC) entdeckt, die für die Aminosäure Phenylalanin kodieren. Die Punktmutation, die im sensiblen Stamm an der Position 532 (G532A) zu einem Austausch von G durch A führte, zerstörte so die Schnittstelle für das Enzym Sfa NI. Im Gegensatz dazu generierte die Punktmutation an Position 857 bp, welche den Austausch von A durch G (A857G) verursachte, eine neue Schnittstelle für das Enzym Sfa NI. Im Folgenden wurden die 677 bp-großen PCR-Produkte von acht der Isometamidium-sensiblen und von zwei der Isometamidium-resistenten *T. b. brucei* mit Sfa NI verdaut, um das RFLP Muster des Fragments von TbAT1 (Nukleotid 430-1108) zu analysieren. Das Ergebnis enthüllte zwei verschiedene Bandmuster: Bei TbAT1 von Isometamidium-sensiblen Stämmen ergab der Verdau Fragmente von 566 bp und 111 bp, während die Fragmente bei TbAT1 von Isometamidium-resistenten Stämmen bei 435 und 242 lagen. Demzufolge konnten Isometamidium-sensible und Isometamidium-resistente Stämme von *T. b. brucei* erfolgreich durch eine Restriktionsverdau mit Sfa Ni unterschieden werden. Daraus kann geschlossen werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der Präsenz von Punktmutationen im Nukleotid Transportergen (TbAT1) von *T. b. brucei* und dem Auftreten von Isometamidium-Resistenz gibt. Des Weiteren ist der RFLP von Sfa NI nach einer Validierung mittels umfangreicher Untersuchungen von Feldisolaten möglicherweise eine geeignete Methode für eine schnelle Diagnose von Isometamidium-resistenten *T. b. brucei*. Der Versuch, das homologe TbAT1-Gen von *T. congolense* zu amplifizieren, blieb erfolglos.