

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Vorbemerkung

Bis heute zählt die Malaria zu den weltweit verbreitetsten Infektionskrankheiten, der weder durch Immunisierungsmaßnahmen, universell einsetzbare Chemoprophylaxe noch durch Ausrottungsversuche des Vektors — der weiblichen Anophelesmücke — begegnet werden konnte. Nach dem Weltgesundheitsreport 2002 [1] macht die Malaria 1,4% der globalen Krankheitslast aus [2]. Jährlich wird mit über 500 Millionen Neuerkrankungen gerechnet, die Zahl der Todesfälle beträgt 1–3 Millionen pro Jahr. Etwa 90% dieser Todesfälle treten in Afrika auf, vor allem in Gebieten südlich der Sahara. Besonders gefährdet sind Kinder unter fünf Jahren, da sie in der Regel noch keine ausreichenden Immunitätsmechanismen gegen den Parasiten ausgebildet haben und daher zu schweren Verlaufsformen der Krankheit neigen [3–5].

Roll Back Malaria ist eine 1998 von der *WHO* begründete globale Partnerschaft internationaler Organisationen, Forschungsgruppen und Regierungen betroffener Länder, die sich zum Ziel gesetzt hat, die Malaria-assoziierten Morbiditäts- und Mortalitätszahlen bis zum Jahr 2010 zu halbieren. Dieses Ziel soll vorrangig erreicht werden durch interventionelle Maßnahmen wie z. B. verbesserten Zugang zu effektiven Medikamenten, Prävention und Kontrolle der Malaria während der Schwangerschaft, die systematische Verteilung von Insektizid-behandelten Moskitonetzen (*insecticide-treated nets, ITNs*) oder einen verbesserten Umgang mit Notfällen und Malariaepidemien [5]. Gegenstand wissenschaftlicher Forschung ist es, die Effektivität dieser Maßnahmen regelmäßig zu kontrollieren, zu evaluieren und gegebenenfalls zu optimieren.

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt konzentriert sich auf die Aufklärung des Parasit-Wirt-Verhältnisses. Hierzu zählt unter anderem die Identifizierung genetischer Wirtsfaktoren, die den Krankheitsverlauf der Malaria beeinflussen, eventuell auch ihren Krankheitsausgang determinieren. Die Aufdeckung und das Verständnis der entsprechenden pathophysiologischen Zusammenhänge ist die Voraussetzung für neue und effektive Präventions- und Krankheitsmanagementstrategien in der Zukunft. In diesen zuletzt genannten Forschungsrahmen ist auch die hier vorgestellte wissenschaftliche Untersuchung einzuordnen.

1.2 Grundlagen

1.2.1 Malaria

Entwicklungszyklus

Der Erreger der Malaria ist ein Parasit der Gattung *Plasmodium*. Infektionen des Menschen werden durch vier Spezies verursacht: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae*. Beim Menschen existieren drei — durch verschiedene Plasmodienarten ausgelöste — Ausprägungen eines Krankheitsbildes: die *Malaria tropica* (*P. falciparum*), *Malaria tertiana* (*P. vivax* und *P. ovale*) und die *Malaria quartana* (*P. malariae*), die sich jeweils durch ihren Krankheitsverlauf und die Prognose unterscheiden. Der Entwicklungszyklus der Plasmodien ist sowohl mit einem Generationswechsel als auch mit einem Wirtswechsel verbunden. Dabei ist der Mensch der Nebenwirt, bei dem ausschließlich die asexuelle Vermehrung stattfindet. Hauptwirt ist die weibliche Mücke der Gattung *Anopheles*. Von fast 400 verschiedenen Spezies der Anophelesmücke sind über 60 als Malariavektoren bekannt. Zu einem der effektivsten Vektoren in Afrika gehört *Anopheles gambiae* [6].

Mit dem Stich einer Anophelesmücke gelangen die Sporozoiten, die infektiöse Parasitenform, aus den Speicheldrüsen der Mücke in den menschlichen Blutkreislauf. Innerhalb von weniger als 30 Minuten befallen sie Leberparenchymzellen, um dort zu Schizonten zu differenzieren. Diesen Prozeß nennt man Schizogonie, genauer Gewebsschizogonie. Diese endet mit der Ruptur der infizierten Zelle und der Freisetzung von Merozoiten in den Blutkreislauf. Anschließend dringen die Merozoiten in Erythrozyten ein, wo sie dann als Trophozoiten bezeichnet werden. Die Trophozoiten der einzelnen Plasmodienspezies unterscheiden sich in ihrer Morphologie, ein wichtiges mikroskopisches Kriterium zur Identifizierung der

Erregerspezies. Im Laufe der erythrozytären Schizogonie (Entwicklungszyklus im Erythrozyten) entwickeln sich aus Trophozoiten Schizonten, die sich wiederum in mehrere Merozoiten teilen, den Erythrozyten dabei zerstören und erneut weitere Erythrozyten befallen. Nach einer Serie von erythrozytären Schizogoniezyklen entwickeln sich aus einem Teil der Merozoiten Geschlechtsformen, die Gametozyten. Der sexuelle Zyklus oder Sporogonie kann erfolgen, wenn sowohl männliche Geschlechtsformen (Mikrogametozyten) als auch weibliche Geschlechtsformen (Makrogametozyten) von einem Vektor bei einer Blutmahlzeit aufgenommen werden. Im Verdauungstrakt der Mücke verschmelzen beide und bilden eine Zygote die sich anschließend in der Magenwand einnistet. Am Ende dieses Entwicklungszyklus steht wieder die Ausbildung infektiöser Sporozoiten die in die Speicheldrüsen der Mücke gelangen und von dort einen weiteren Menschen infizieren können [6–11].

Klinik der Malaria

Bei einer Malariainfektion treten nach einer variablen Inkubationszeit von 7 bis 28 Tagen (für *Malaria tropica*) [6] grippeartige Prodromalerscheinungen wie Kopf- und Gliederschmerzen und Abgeschlagenheit auf. Dem folgen in der Regel wenige Tage später hohes Fieber, anfangs remittierend und unregelmässig. Im weiteren Verlauf entwickelt sich sowohl bei Infektionen mit *P. vivax* und *P. ovale* als auch bei *P. malariae* ein klassischer Fieberrhythmus. Diese zeitlich wiederkehrenden Fieberanstiege beruhen auf der Synchronisierung des erythrozytären Schizogoniezyklus und der damit verbundenen intravasalen Hämolyse, bei der es zur Freisetzung von pyrogenen Substanzen kommt (48h-Rhythmus bei *P. vivax* und *P. ovale* bzw. 72h-Rhythmus bei *P. malariae*). Die Fieberschübe bei *P. falciparum* unterliegen dagegen keiner strengen zeitlichen Rhythmik. Weitere nahezu obligate klinische Zeichen einer Malaria sind Anämie, Thrombozytopenie und Hepatosplenomegalie. Besonders bei jüngeren Patienten werden zusätzlich untypische Krankheitssymptome wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall beobachtet [6, 8, 9].

Der überwiegende Teil aller Malariainfektionen hat unter adäquater Therapie einen benignen Verlauf. Bei der *Malaria tropica* treten ohne Behandlung schwere Verlaufsformen auf, die als Vollbild der schweren Malaria imponieren. Die Letalität dieser Form im Kindesalter beträgt in Afrika abhängig von der angewandten Diagnosedefinition 12 bis 17% [12]. Dabei stellen schwere Anämie und Koma (bei der so genannten zerebralen Malaria) die zwei wichtigsten pädiatrischen Symptome dar, die mit einer hohen Sterblichkeit einhergehen. Da-

neben können Krampfanfälle, Atemnot, ausgeprägte Azidose und Hypoglykämie, Gelbsucht, Hyperparasitämie, Hämoglobinurie, Nierenschäden, Kreislaufkollaps, Lungenödeme und eine verstärkte Blutungsneigung auftreten [6, 10, 11, 13–15].

Eine der schwersten Manifestationen der Malaria ist die zerebrale Malaria. Kennzeichnend dafür ist eine initiale Bewusstseinsintrübung, die sich bis hin zum Koma entwickelt. Oftmals werden generalisierte Krampfanfälle im Krankheitsverlauf beobachtet. Unbehandelt endet die zerebrale Malaria tödlich, abhängig von den Behandlungsbedingungen liegt die Letalität bei durchschnittlich 15% im Kindesalter. Darüber hinaus werden bei ungefähr 10% aller pädiatrischen Fälle mit zerebraler Malaria persistierende neurologische Defizite wie z. B. Paresen, Hemianopsie oder Tremor beobachtet [6, 11].

Die Grundlagen der pathophysiologischen Mechanismen werden im Folgenden vorgestellt.

Pathophysiologie der Malaria tropica

Die Pathophysiologie der Malaria tropica basiert auf vier Mechanismen: die Zerstörung der Erythrozyten, die Freilassung von Erythrozyten- und Parasitenbestandteilen in den Blutkreislauf, die Oberflächenveränderung Parasiten-befallener Erythrozyten und schließlich die Reaktion des menschlichen Organismus auf diese Ereignisse.

Im Rahmen des erythrozytären Schizogoniezyklus kommt es bei der Freisetzung von Schizonten zu einer massiven intravasalen Hämolyse sowohl infizierter als auch nicht infizierter Erythrozyten. Dieser Mechanismus ist die Hauptursache für die Malaria-bedingte Anämie. Zusätzliche Faktoren sind eine gesteigerte Zerstörung der roten Blutzellen durch die Milz aufgrund deformierter Erythrozyten und der damit einhergehende eingeschränkten Verformbarkeit dieser Zellen und vor allem auch die Zytokin-vermittelte Hemmung der kompensatorischen Knochenmarksaktivität [16, 17].

Desweiteren gelangen bei der Ruptur von Erythrozyten sowohl erythrozytäre als auch parasitäre Bestandteile in den Blutkreislauf und aktivieren Zytokinkaskaden des angeborenen Immunsystems, ähnlich der Endotoxin-bedingten Stimulation des humanen Immunsystems durch bestimmte Bakterienspezies. Diese Zytokin-vermittelten Immunmechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine entscheidende Rolle scheint tumour necrosis factor (TNF) und Interleukin-1 (IL-1) bei der Freisetzung weiterer proinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-6, IL-8) zu spielen. Zytokine sind für viele Malaria-assoziierten Symptome, z. B. Fieber, verantwortlich. Weiterhin gelten sie als Mediatoren der antiparasitären Abwehr durch

die Aktivierung von Leukozyten [6] und induzieren die Expression von Liganden.

Bei einer Infektion mit *P. falciparum* werden auf der Oberfläche befallener Erythrozyten Proteine exprimiert (z. B. Plasmodium falciparum erythrozytäres Membranprotein 1 PfEMP₁) und imponieren in vielen Fällen als elektronenmikroskopisch sichtbare Protuberanzen (humps, knobs). Durch die Oberflächenänderung wird die Bindung von Erythrozyten an Rezeptormoleküle von Endothelzellen (z. B. CD36 und ICAM1) ermöglicht. Durch diesen Mechanismus — genannt Zytoadhärenz — kommt es zur Sequestrierung (Anheftung) von Erythrozyten vor allem in den postkapillären Venolen und damit verbundenen Mikrozirkulationsstörungen in lebenswichtigen Organen wie Gehirn, Herz und Leber [6, 10, 11, 18, 19]. Neben der Zytoadhärenz an Endothelien können Erythrozyten, die Trophozoiten bestimmter Parasitenstämmen enthalten, auch an nicht infizierte Erythrozyten adhäreren [6]. Diese so genannte Rosettenbildung kann die Mikrozirkulation zusätzlich verschlechtern und ist unter anderem auch mit der zerebralen Malaria [20, 21], bzw. der schweren Malaria assoziiert [22].

Semi-Immunität und Prämunitation

In Gebieten mit hoher Endemizität wurde beobachtet, dass im Laufe wiederholter Malariaepisoden Immunitätsmechanismen einsetzen, die einen begrenzten Krankheitsschutz geben. Während Säuglinge in den ersten drei bis sechs Lebensmonaten v. a. durch diaplazentar übertragene Antikörper vor Malaria geschützt sind, neigen Kinder nach diesem Zeitraum zu besonders schweren Verlaufsformen. Die Krankheitsanfälligkeit und die Schwere der Ausprägung der Malaria verringert sich im Laufe der ersten Lebensjahre jedoch zunehmend. So treten im höheren Lebensalter hauptsächlich milde bzw. asymptomatische Krankheitsverläufe auf. Dieses Phänomen abnehmender Vulnerabilität gegenüber dem Parasiten ohne Erreichen einer sterilen Immunität ergibt sich aus dem Erwerb von Immunitätsmechanismen, die zusammenfassend mit dem Begriff Semi-Immunität bezeichnet werden.

Zur Aufrechterhaltung der Semi-Immunität ist eine kontinuierliche Exposition gegenüber Plasmodien notwendig. Typisch für diesen Status sind chronisch latente Infektionen mit geringen Parasitendichten und einer benignen Symptomatik [23]. Diese chronische Infektion wiederum vermittelt vermutlich Schutz vor einer Superinfektion mit virulenteren Erregern — ein Phänomen, welches Prämunitation genannt wird [24]. Die der Semi-Immunität und Prämunitation zugrunde liegenden Mechanismen sind noch weitgehend unbekannt.

1.2.2 Protektion durch das Genom - Die Malaria-Hypothese

Neben den erworbenen Immunitätsmechanismen gibt es bestimmte genetische Dispositionen, die zu einer angeborenen Schutz gegenüber dem Parasiten führen. Vor mehr als 50 Jahren postulierte J. B. S. Haldane [25] einen positiven Selektionsvorteil für Individuen mit verschiedenen Thalassämieformen in Regionen, in denen Malaria endemisch ist. Demnach reflektieren die hohen Prävalenzen dieser genetischen Polymorphismen in tropischen und subtropischen Gebieten der Welt die Balance zwischen der eingeschränkten Lebenserwartung der Homozygoten und dem Überlebensvorteil der Heterozygoten gegenüber Malariagebieten. Seitdem wurde *Haldanes Malariahypothese* für weitere Hämoglobinopathien bestätigt [26]. Die größte Evidenz für die enge Beziehung zur Malaria ist für die Sichelzellanämie (HbS) erbracht worden. So beruht der Überlebensvorteil von heterozygoten Genträgern des Sichelzellgens (HbAS) in Malariagebieten auf einer Vielzahl von Mechanismen [27, 28], wie z.B. der Tendenz von parasitenbefallenen Erythrozyten auszusicheln und frühzeitig eliminiert zu werden [29].

In einer Zahl weiterer Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass neben den erythrozytären Polymorphismen noch weitere genetische Wirtsfaktoren existieren, die ebenfalls das Risiko für die Entwicklung einer Malaria oder einer schweren Malaria erhöhen bzw. senken. Dies betrifft z. B. Promotorvarianten im Gen von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [30–32], Polymorphismen im Gen für Interferon- γ -Rezeptor 1 (IFNGR1) [33], Mannose-bindende Lektin (MBL) [34] oder das humane Leukozyten Antigen Bw53 [35]. Bei einem weiteren dieser Faktoren handelt es sich um die Promotorregion der induzierbaren Stickstoff-Synthase (NOS2, iNOS), ein Enzym zur Synthese von Stickstoffmonoxid (NO). Wie auch bei anderen parasitären Infektionen, wirkt NO *in vitro* bei der Malaria antiparasitär [36]. Basierend auf der Hypothese, dass genetische Faktoren die Expression von iNOS, dem effektivsten NO-Synthaseenzym, determinieren und damit einen Einfluss auf die NO-Produktion während einer Plasmodiuminfektion haben, wurden verschiedene genetische Polymorphismen in der *iNOS*-Promotorregion identifiziert und auf eine Assoziation mit der Malaria tropica hin geprüft (siehe Abschnitt 1.2.4, Seite 9).

1.2.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Die Rolle von NO in der Immunabwehr

Als potentes Effektormolekül besitzt NO eine Schlüsselrolle in einer Vielzahl physiologischer Regulationsvorgänge. Neben seinen Funktionen als Neurotransmitter ist endogenes NO — zuerst bekannt als endothelium-derived relaxing factor (EDRF) — hauptsächlich für die Einstellung des Vasotonus verantwortlich und gilt als wichtiger Blutdruckregulator [37, 38]. Zusätzlich zu diesen Funktionen hat sich NO im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte als ein vielseitiger Mediator des Immunsystems herausgestellt und ist somit in Pathogenese und Kontrolle verschiedener Infektionskrankheiten involviert. Im Vergleich zu den anderen genannten NO-Effekten, bei denen konstitutiv exprimierte Enzymisoformen die Hauptrolle spielen (nNOS, eNOS), ist hier vorrangig eine induzierbare Isoform des Enzyms zur Synthese von NO von Bedeutung (iNOS, siehe Abschnitt 1.2.4, Seite 9). Die große Bandbreite an Reaktionspartnern von NO sowie die Produktion durch eine Vielzahl von Zellen, Geweben und Organen führt zu einem sehr komplexen z. T. noch unverstandenen Bild von seinen Funktionen im Rahmen der Immunantwort beim Menschen.

In-vitro-Untersuchungen haben bereits einen wachstumshemmenden Effekt von NO und seinen Abkömmlingen auf viele Bakterien und Parasiten nachweisen können [39–41], unter anderem auch auf humanpathogene Plasmodien [36, 42–44]. Diese antimikrobiellen Effekte von NO werden auf Mechanismen wie z.B. die Hemmung von DNA-Synthese- und Reparaturabläufen sowie die Hemmung der Proteinsynthese, die Veränderung von Proteinen durch S-Nitrosylierung oder die Inaktivierung von Enzymen durch die Zerstörung von Eisen-Schwefel-Verbindungen, Zinkfinger-Strukturen oder Häm-Gruppen zurückgeführt [40, 45, 46]. Weiterhin entsteht bei der Oxidation von $\cdot\text{NO}$ mit freien Sauerstoffradikalen (O_2^-) das ebenfalls potente antimikrobiell wirkende Sauerstoffperoxid (ONOO^-) [40, 45]. Darüber hinaus werden indirekte NO-Effekte wie z.B. die Behinderung der Zellproliferation vieler Erreger bedingt durch die Knappheit an Arginin — welches bei der NO-Synthese verbraucht wird — diskutiert. Auch die Hemmung von Gewebsfibrosierung und die Beendigung der Immunantwort durch die Apoptoseinduktion aktivierter CD4^+ Zellen gehören zu den iNOS-abhängigen Schutzeffekten während infektiöser Erkrankungen [45].

Neben den beschriebenen antimikrobiellen Effekten können hohe NO Konzentrationen auch für den Wirt schädlich wirken. Mechanismen der NO-vermittelten Zytotoxizität und Gewebszerstörung (s.o.), Hemmung der T-Zell-Proliferation und Induktion von T-Zell-Apoptose,

Generation viraler Escape-Mutanten sowie direkte positive Effekte auf mikrobielles und virales Wachstum gelten dabei als mögliche Erklärungen für die Assoziation der NO-Konzentration und der Schwere des Krankheitsverlaufs mancher Infektionen [45]. Darüber hinaus wurde NO als Vermittler von Schock und Multiorganversagen infolge Vasodilatation bei der Sepsis [47], sowie aufgrund seiner reaktiven Metabolite als neurotoxisches Molekül beschrieben [48].

NO-Effekte bei der schweren Malaria bzw. bei der zerebralen Malaria

NO wird neben seinem protektiven Effekt ein Beitrag zur Pathogenese der Malaria bzw. der zerebralen Malaria zugeschrieben. Einerseits begünstigt NO die Entstehung der Malaria-bedingten Anämie indem es direkt toxisch auf Erythrozyten wirkt und zusätzlich eine Knochenmarkssuppression vermittelt [49–51]. Außerdem werden Pathomechanismen wie die freie Diffusion von intravaskulär produziertem NO durch die Blut-Hirn-Schranke und die dadurch bedingte verminderte NO-Produktion in postsynaptischen Neuronen sowie die Erhöhung des intrakraniellen Drucks durch NO vermittelte Vasodilatation der Hirngefäße während einer Malariaepisode diskutiert [52, 53]. In Papua Neu Guinea konnte eine positive Korrelation zwischen hohen NO Konzentrationen und Komatiefe bzw. Komalänge bei zerebraler Malaria gezeigt werden [54, 55]. Gegen dieses Erklärungskonzept sprechen Untersuchungsergebnisse aus Tanzania und Kamerun, in denen hohe NO-Plasma-Konzentrationen bei Kindern mit schwerer Malaria mit einem günstigeren Verlauf assoziiert waren [56, 57]. Eine Untersuchung an 24 erwachsenen Patienten europäischen Ursprungs stützt ebenfalls die These hinsichtlich der vorteilhaften Wirkung von NO gegenüber Malaria [58]. Entgegengesetzte NO-Effekte bei der schweren Malaria wurden ebenfalls im Rahmen einer Studie in Gabon beobachtet. Darin wurden die höchsten NO-Plasmakonzentrationen in Fällen mit schweren Malariaverläufen gemessen; allerdings stellte dieser Parameter auch gleichzeitig einen Prädiktor für eine beschleunigte und komplikationsfreie Heilung dar [59].

Insgesamt betrachtet sind die Ergebnisse zu den Pathomechanismen von NO bei der Malaria sehr widersprüchlich.

Problematik des Nachweis von NO-Effekten in vivo und die Rolle der induzierbaren Nitrit-Oxid-Synthase (iNOS) bei der NO Produktion

Insgesamt ist der Nachweis eines protektiven bzw. schädlichen Effektes von NO in vivo schwierig, da der Rückschluss auf die NO Produktion durch die Messung stickstoffhaltiger Stoffwechselprodukte im Blutplasma und im Urin zahlreiche Störgrößen wie z.B. Ernährung und Nierenfunktion enthält. Dazu kommt erschwerend die Tatsache, dass systemisch gemessene NO Konzentrationen kaum die lokalen Konzentrationen in den Schlüsselorganen der Immunabwehr reflektieren [46].

Eine weitere Möglichkeit auf die Relevanz von NO in der Abwehr mikrobieller Erreger zu schließen, stellt die Aufklärung der Rolle der induzierbaren Nitrit Oxid Synthase (NOS2, iNOS) in diesem Zusammenhang dar. iNOS gilt neben seinen beiden Isoformen (nNOS, eNOS) als effektivstes NO Syntheseenzym [46]. So konnten Experimente in vivo mit iNOS-Inhibitoren bzw. knock out Verfahren bei Mäusen einen Einfluss auf verschiedene bakterielle und parasitäre Infektionen zeigen [41, 60–62] — so auch auf die Malaria [63].

1.2.4 Die Nitrit Oxid Synthase (NOS)

NOS: ein Enzym - drei Isoformen

NO entsteht bei der oxidativen Desaminierung von L-Arginin zu L-Citrullin durch NOS. Es existieren drei Isoformen dieses Enzyms, wovon zwei konstitutiv exprimiert werden, während eine Dritte induzierbar ist [64]. Zu den ersteren beiden Isoformen gehören die neuronale (NOS1, nNOS) und die endotheliale Stickstoffsynthase (NOS3, eNOS). Diese Calcium-Calmodulin-abhängigen Enzyme produzieren kleine Mengen NO, welche Prozesse wie Neurotransmission und Vasorelaxation vermitteln. Weitgehend unabhängig von Calciumkonzentrationsverschiebungen ist die induzierbare Stickstoffsynthase (NOS2, iNOS). Obwohl dieses Enzym in nativen Makrophagen nicht nachweisbar ist, konnte die Exprimierung von iNOS durch die Aktivierung dieser Immunzellen bei Mäusen durch verschiedene proinflammatorische Zytokine und Endotoxine (Lipopolysaccharide, LPS) bakterieller Erreger induziert werden und wird daher auch *macrophage NOS* genannt [65]. iNOS produziert NO in 100-1000 mal höheren Konzentrationen als die zwei konstitutiv exprimierten Enzyme nNOS und eNOS.

Genstruktur und Expressionsregulation von *iNOS*

Das Gen für die *iNOS* wurde 1996 charakterisiert und kloniert. Danach besteht das etwa 40 Kilobasen (kb) große humane *iNOS* Gen aus 27 Exons und ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 lokalisiert [66].

Im Gegensatz zu den anderen beiden Nitrit Oxid Synthasen (NOS1, NOS3), deren Aktivität über die intrazelluläre Konzentration von Calcium reguliert wird, erfolgt die Aktivierung von *iNOS* hauptsächlich durch eine Induktion der Transkription [45, 67]. Während bei Mäusen die Zytokine (z. B. Interferon- γ IFN- γ , Tumornekrosefaktor- α TNF- α , Lipopolysaccharide LPS) für die Beeinflussung der Transkription von *iNOS* über entsprechende Transkriptionsfaktoren und die daraus resultierende NO Produktion durch Makrophagen gut etabliert sind, scheinen die Regulationsmechanismen der Transkription der humanen *iNOS* komplexer zu sein [68]. Verschiedene Zellen des menschlichen angeborenen Immunsystems (z. B. Monozyten, Makrophagen), aber auch andere Zelltypen (z. B. Endothelzellen) können *iNOS* exprimieren [45, 46]. In einigen Studien konnte zwar der stimulierende Effekt einzelner Faktoren wie z. B. nuclear transcription factor NF κ B [69, 70], Interleukin 1 β (IL-1 β) [67] sowie Interferon- γ (IFN- γ) [71] auf die Transkription von *iNOS* in einzelnen humanen Zellarten gezeigt werden, jedoch ist in vitro der Nachweis einer Expression von *iNOS* in Makrophagen durch Zytokine schwierig. Allerdings wurden bereits in vivo im Blut von Patienten mit infektiösen Erkrankungen erhöhte Zahlen NO produzierender Leukozyten als eine Antwort auf eine gesteigerte *iNOS* Expression nachgewiesen [72, 73], unter anderem auch bei der Malaria [56]. Letztlich bleibt die Aufklärung des Einflusses verschiedener Zytokine sowie der Bestandteile infektiöser Erreger, die über eine Induktion der *iNOS* Transkription zu antimikrobiell wirkenden NO Konzentrationen führen, Gegenstand aktueller und zukünftiger Forschung.

Polymorphismen in der *iNOS*-Promotorregion und Malaria

Die vorrangige Regulation der Expression von *iNOS* auf der Ebene der Transkription gibt Anhalt dafür, dass genetische Variationen in der *iNOS*-Promotorregion einen Einfluss auf die Genexpression haben. Die vollständige DNA Sequenz des 5' Promotors von *iNOS* wurde 1996 publiziert [74]. Zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Untersuchung waren die zwei Polymorphismen *iNOS*-954G \rightarrow C und *iNOS*-1173C \rightarrow T sowie der -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatellit im proximalen *iNOS*-Promotor (in der 5' Region) identifiziert [75–77]. Die relativen

Positionen in Bezug auf den Transkriptionsstart dieser Polymorphismen innerhalb der ersten 2500 Basenpaare des *iNOS*-Promotors sind in Abbildung 1.1 dargestellt. Während bei den Polymorphismen *iNOS*-954G→C und *iNOS*-1173C→T eine einzige Base ausgetauscht und durch eine andere ersetzt ist (*single nucleotide polymorphism, SNP*), handelt es sich bei dem Mikrosatelliten um eine 2500 Basenpaare (bp) vor dem Transkriptionsstart von *iNOS* gelegene Pentanucleotid-Sequenz aus den Basen CCTTT, welche *n*-mal wiederholt wird [77]. Im Gegensatz zu Kaukasiern und Asiaten, wo der der -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatellit unimodal verteilt ist, zeigt dieser Polymorphismus bei Afrikanern eine bimodale Verteilung mit einem Tiefpunkt bei 11 Kopien und reicht von 6 bis 18 Kopien [77–81].

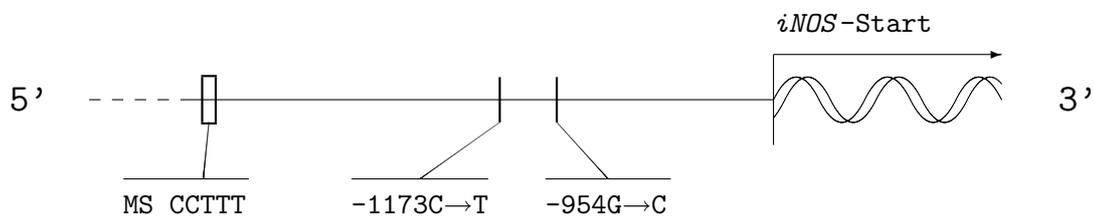


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der ersten 2500 bp des *iNOS*-Promotors. Dargestellt sind die relativen Positionen der SNPs *iNOS*-954G→C und *iNOS*-1173C→T sowie des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten (CCTTT MS) bezogen auf den Transkriptionsstart des *iNOS* Gens.

Hinsichtlich ihrer funktionellen Relevanz wurde in einigen Studien die positive Korrelation zwischen den beiden SNPs *iNOS*-954G→C und *iNOS*-1173C→T und einer in vivo gesteigerten NO Synthese gezeigt [75, 82]. Die bereits erwähnten ethnischen Unterschiede in der Verteilung der Allelfrequenzen des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten unterstützen die Hypothese, dass die Malaria aber auch andere Infektionskrankheiten einen Selektionsdruck auf diesen Polymorphismus haben könnten [81]. Tatsächlich wurden bereits bestimmte Kopienanzahlen (CCTTT_(n)) des Pentanucleotids mit diversen Erkrankungen des Menschen assoziiert [83, 84]. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Rolle von NO bei parasitären Infektionen wurden die vorgestellten Polymorphismen auch auf ihren Effekt bezüglich des Krankheitsverlaufs der Malaria hin geprüft [75, 76, 78–80, 82]. Die bisherigen Untersuchungsergebnisse dazu sind jedoch sehr widersprüchlich.

Es konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber der schweren Malaria vermittelt durch *iNOS*-954G→C in Gabon, jedoch nicht in Tanzania gezeigt werden [75, 76, 79, 82]. Hinsichtlich des *iNOS*-1173C→T Polymorphismus wurde ein Schutz vor Malaria in Tanzania und ein Schutz

vor der Malaria-bedingten Schwere Anämie in Kenia gezeigt [75]. Auch die Rolle des Mikrosatelliten in Bezug auf die Malaria ist umstritten. Während in Gambia eine Homozygotie für < 11 Kopien gehäuft bei zerebraler Malaria auftrat [78], war in Thailand das Vorliegen längerer Allele (≥ 13 Kopien) mit schwerer Malaria assoziiert [80]. Dagegen konnte in Gabon und Tanzania kein Zusammenhang zwischen Mikrosatellit und dem Verlauf der Malaria gezeigt werden [79, 82].

Die Relevanz von Haplotypen des *iNOS*-Promotors

Der Begriff *Haplotyp* beschreibt ein spezifisches Allel eines Individuums, das sich durch die Kopplung von Genvarianten auszeichnet.

Die Existenz von Haplotypen in der Promotorregion des *iNOS* Gens wurde erstmals im Rahmen einer Studie in Tanzania für den Polymorphismus *iNOS*-1173C→T und 13 Kopien des -2,5 kb CCTTT Mikrosatelliten vermutet [75].

Zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Untersuchung gibt es keine weiteren Untersuchungen, die diese These bestätigen. Weiterhin sind über die Relevanz von Haplotypen in der *iNOS*-Promotorregion im Hinblick auf die schwere Malaria keine Untersuchungsergebnisse bekannt.

1.3 Synopsis

Weltweit gehört die Malaria zu den verbreitetsten Infektionskrankheiten mit potentiell tödlichem Ausgang. Dabei treten die höchsten Malaria-assoziierten Mortalitätszahlen als Folge der schweren Malaria in hyper- und holoendemischen Malariagebieten im Kindesalter auf. Wiederholte Infektionen führen zu einem Status von Semi-Immunität, der einen gewissen Schutz vor schweren und fatalen Verlaufsformen der Malaria bietet. Wegen der Abhängigkeit des Grades dieser erworbenen Immunität von der Expositionszeit mit dem Erreger sind Kinder besonders vulnerabel für die Entwicklung einer schweren Malaria. In diesen Fällen, d.h. in denen der Zustand der Semi-Immunität noch nicht vollständig erreicht ist, scheinen angeborene Immunitätsmechanismen eine besondere Rolle zu spielen.

So wurde vermutet, dass die kontinuierliche Exposition über viele Jahrtausende mit dem Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium falciparum*, einen Selektionsdruck auf das menschliche Genom darstellt. Diese Hypothese konnte durch die Identifizierung unterschiedlicher genetischer Wirtsfaktoren, die eine Toleranz gegenüber dem Parasiten hervorrufen, bestätigt werden. Der daraus resultierende Selektionsvorteil für genetische Variationen im heterozygotem Zustand gegenüber der Malaria, die im homozygotem Zustand oftmals mit einer geringeren Reproduktionswahrscheinlichkeit im Sinn der Evolution einhergehen, ist eine Begründung für die hohe Prävalenz dieser Variationen in Regionen, in denen Malaria endemisch war bzw. ist.

In diesem Zusammenhang steht auch die Frage, ob verschiedene Polymorphismen in der Promotorregion der iNOS einen Effekt auf die Manifestation der schweren Malaria haben. Das u.a. von iNOS bereitgestellte Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger Mediator der Immunabwehr bei *Plasmodium falciparum* Infektionen. Seine aniparasitären Effekte konnten in vitro bereits nachgewiesen werden. Allerdings werden hohe NO Konzentrationen auch mit der Pathogenese der zerebralen Malaria und der Anämie in Verbindung gebracht. Polymorphismen im Promotor des *iNOS* Gens werden als Einflussfaktoren der Malaria diskutiert, da sie über die veränderte Expression des Syntheseeenzyms die Produktion von NO modulieren können. Im Mittelpunkt der bisherigen Untersuchungen standen die SNPs *iNOS*-954G→C und *iNOS*-1173C→ und der -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatellit. Letzlich bleibt die klinische Relevanz dieser *iNOS*-Promotor Variationen hinsichtlich des Krankheitsverlaufs der Malaria umstritten.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Die Rolle verschiedener genetischer Polymorphismen in der Promotorregion des Gens für die *iNOS* bei der schweren Malaria ist noch weitgehend ungeklärt. In einigen Gebieten konnte ein protektiver Effekt einzelner dieser Polymorphismen gezeigt werden, in anderen dagegen war kein Effekt nachweisbar oder es konnte ein negativer Einfluss auf den Verlauf der schweren Malaria beobachtet werden. Aus der *Northern Region* Ghanas liegen bislang diesbezüglich keine Daten vor. Weiterhin sind hinsichtlich des Zusammenwirkens mehrerer Polymorphismen in der *iNOS*-Promotorregion, also die Assoziation von *iNOS*-Promotor Haplotypen mit der schweren Malaria, zum Zeitpunkt der vorgelegten Untersuchung keine Arbeiten bekannt.

Im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie mit Kindern mit schwerer Malaria, mit klinisch asymptomatischer Parasitämie und mit gesunden Kontrollen aus Nordghana soll die jeweilige Prävalenz sowohl der Polymorphismen *iNOS*-954G→C und *iNOS*-1173C→T als auch des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten in der *iNOS*-Promotorregion bestimmt werden.

Es soll in dieser Arbeit der Fragestellung nachgegangen werden, inwieweit die drei verschiedenen *iNOS*-Promotor-Varianten die Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit *P. falciparum*, besonders im Hinblick auf die schwere Malaria und deren Manifestationsmuster beeinflussen. Dabei soll untersucht werden, ob ein einzelner dieser Polymorphismen oder auch die Kombination mehrerer einen Effekt auf die Erkrankung hat. Ausgehend von dieser Fragestellung sollen die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit anderen Arbeiten verglichen und diskutiert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, für die *Northern Region* Ghanas eine Aussage über die Relevanz dieser drei Promotor-Polymorphismen der *iNOS* in Bezug auf die schwere Malaria zu treffen und damit einen weiteren Baustein für die Beantwortung der Frage nach dem Einfluss genetischer Faktoren, hier *iNOS*-Promotor-Varianten, auf die schwere Malaria zu liefern.