

Kapitel 2

Patienten, Material und Methoden

2.1 Studienort und Studiendesign

Tamale, eine Stadt mit circa 350 000 Einwohnern, ist die Provinzhauptstadt der *Northern Region*, einer der zehn Verwaltungseinheiten Ghanas. Nordghana liegt in einem Gebiet hoher und ganzjähriger Übertragung von Malariaerregern, allerdings schwanken die Erkrankungshäufigkeiten abhängig von Regenzeit (von Mai bis Oktober) und Trockenzeit (von November bis April) [85, 86]. In einer Querschnittsstudie (Mockenhaupt et al., nicht veröffentlichte Beobachtungen) im selben Gebiet der in dieser Arbeit vorgestellten Fall-Kontroll-Studie wurden in der Regenzeit 2002 bei etwa zwei Dritteln aller untersuchten Kinder Parasitämien mit *Plasmodium falciparum* mikroskopisch nachgewiesen. Dies ist definitionsgemäß vereinbar mit einer hyperendemischen Malariasituation [87]. In hyperendemischen Gebieten liegen besonders im Kindesalter hohe Malaria-assoziierte Morbiditäts- und Mortalitätszahlen vor, während im Erwachsenenalter häufig klinisch asymptomatische Malariainfektionen bzw. klinisch milde Verlaufsformen beobachtet werden [6].

Für die vorliegende Arbeit wurden im verbundenen Fall-Kontroll-Ansatz eine Gruppe schwerer Malaria Fälle und zwei nach Geschlecht und Altersgruppe gematchten Kontrollgruppen verglichen, wobei eine Kontrollgruppe parasitenfrei und gesund war, die andere klinisch inapparente Parasitämien aufwies. Die Rekrutierungen wurden zum einen auf der Kinderstation des *Tamale Teaching Hospitals*, zum anderen in Tamale und in den umliegenden Distrikten zwischen August und November 2002 durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde vor Studienbeginn von der Ethikkommission des *Ministry of Health* in Accra geprüft und zur Durchführung freigegeben.

2.2 Studienteil Tamale

Im Rahmen der Feldarbeit in Tamale oblag der Verfasserin dieser Arbeit die endgültige Entscheidung über die Rekrutierung der Fallgruppe. Alle der im *Tamale Teaching Hospital* durchgeführten laborchemischen Untersuchungen wurden eigenständig bearbeitet. Die Daten, die im Rahmen der Rekrutierung der Kontrollgruppe erhoben worden sind wurden für die Bearbeitung des Themas dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.2.1 Rekrutierung der Fallgruppe

Die Rekrutierung der Kinder mit schwerer Malaria erfolgte auf der Kinderstation des *Tamale Teaching Hospitals*. Da dieses Krankenhaus in Tamale und den umliegenden sechs Distrikten die einzige Institution darstellt, die die Möglichkeit zur Bluttransfusion bietet und damit die Behandlung einer Schweren Anämie möglich macht, ist es für dieses Einzugsgebiet die wichtigste Versorgungsstelle für Patienten mit schwerer Malaria.

Im Rahmen der durchgeführten Studie wurden alle neu aufgenommenen Patienten bei der routinemässigen Anamnese und körperlichen Untersuchung durch einen Studienarzt systematisch auf klinische Einschlusskriterien für die Aufnahme in die Studie geprüft. Dabei wurden außerdem soziologische Daten wie Alter und Wohnort sowie die Vitalparameter Puls, Blutdruck und Atemfrequenz erhoben. Weiterhin erfolgte die Dokumentation von Grösse und Gewicht sowie jede palpatorisch erfassbare Milzvergrösserung. Die Körpertemperatur wurde rektal mit einem digitalen Fieberthermometer (*Scala Electronic GmbH*) bestimmt. Schliesslich wurden die Untersuchungsbefunde auf einem für die Studie bereitgestellten Rekrutierungsbogen schriftlich festgehalten.

Wurde nach der Untersuchung die Verdachtsdiagnose schwere Malaria beibehalten, erfolgte die venöse Blutabnahme (in S-Monovetten[®] Kalium-EDTA, 2,7ml, *Sarstedt AG & Co.*) zur Bestimmung der Parasitendichte, Hämoglobin-, Glukose- und Laktatwerte (siehe Abschnitt 2.2.3, Seite 20). Erst wenn alle der folgenden Einschlusskriterien erfüllt waren, konnte eine endgültige Rekrutierung des jeweiligen Patienten in die Fallgruppe erfolgen.

Diagnosestellung schwere Malaria nach WHO Definition 2000 [15]

Die Schwere Falciparum Malaria ist durch eine mikroskopisch nachweisbare asexuelle *Plasmodium falciparum* Parasitämie, die mit mindestens einem der folgenden — nicht durch weitere Erkrankungen erklärbaren — klinischen Symptome assoziiert ist, definiert:

- *Prostration*: Prostration bezeichnet die Unfähigkeit des freien Sitzens ohne Hilfe. Für Kinder, die diese Fähigkeit noch nicht besaß, wurde Prostration angenommen, wenn bei entsprechender Reizpräsentation (z.B. Versuch der Bruststillung), kein Versuch der Nahrungsaufnahme unternommen wurde. Nach der Gabe von Antikonvulsiva (z.B. Diazepam) oder während des postiktalen Komas musste diese Untersuchung um eine Stunde nach hinten verlegt werden.
- *Eingeschränktes Bewusstsein*: Zur Beurteilung des Bewusstseins wurde die *Blantyre-Koma Skala* [88] verwendet. Ein Blantyre-Wert von ≤ 2 wurde als tiefes Koma oder mit dem Ausdruck zerebrale Malaria klassifiziert, Werte von 3 bis 5 beschreiben eine Bewusstseins Einschränkung. Für den Untersuchungszeitpunkt galten die selben Bedingungen wie bei *Prostration* (siehe oben).
- *Atemschwäche/Azidoseatmung*: Dieses Kriterium wurde bei permanentem Auftreten von Nasenflügeln oder schweren interkostalen Brustkorbeinziehungen oder beim Vorliegen von Azidoseatmung (*Kussmaulsche Atmung*) angenommen.
- *Multiple Anfälle*: Mehr als zwei Krämpfe mussten innerhalb von 24 Stunden berichtet werden, einer davon von medizinisch ausgebildetem Personal im Krankenhaus beobachtet.
- *Kreislaufkollaps*: Als Kreislaufkollaps wurde das gleichzeitige Vorliegen eines zentralen Hypotonus, definiert als ein systolischer Blutdruck unter 60 mm Hg bei Kindern bis fünf Jahren bzw. unter 80 mm Hg bei Kindern ab fünf Jahren und einer eingeschränkten peripheren Durchblutung, d.h. kalte Extremitäten oder schwache bzw. keine tastbaren Pulse, bezeichnet.
- *Lungenödem*: Ein Lungenödem musste durch einen positiven Röntgenbefund bestätigt werden, um als alleiniges Kriterium für die Rekrutierung gelten zu können.
- *Blutungsneigung*: Auffällige Blutungen der Schleimhäute und des Gastro-Intestinal-Traktes sowie an Venenpunktionsstellen kennzeichnen dieses Kriterium.

- *Gelbsucht*: Gelbliche Verfärbungen der Skleren und Schleimhäute sind für dieses Kriterium kennzeichnend und oblagen der ärztlichen Einschätzung.
- *Hämoglobinurie*: Bei jedem Verdacht auf Hämoglobinurie (z.B. positiver Teststreifen (Combur10 Test[®] M test strips (Roche Diagnostics GmbH), dunkelroter/schwarzer Urin) musste laborchemisch das Vorliegen einer mikroskopischen Hämaturie ausgeschlossen werden.
- *Schwere Anämie*: Das Vorliegen einer schweren Anämie wurde charakterisiert durch einen Hb-Wert $< 5\text{g/dl}$ im venösen Vollblut.

Alter: Kinder zwischen sechs Monaten und neun Jahren wurden in die Studie aufgenommen.

Transfusionsstatus: In die Studie wurden ausschließlich Kinder eingeschlossen, die laut Anamnese in drei dem Rekrutierungsdatum vorangegangenen Monaten keine Bluttransfusion erhalten hatten. Nach diesem transfusionsfreien Zeitraum wurde davon ausgegangen, dass Spender-DNA von eventuell weiter zurückliegenden Transfusionen nicht nachweisbar ist und damit zur keiner Verfälschung der Ergebnisse bei der genetischen Analyse der Blutproben führen können.

Einverständniserklärung: Die Eltern jedes rekrutierten Kindes wurden vor der endgültigen Rekrutierung über den Zweck und die weitere Durchführung der Studie aufgeklärt und die schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie wurde eingeholt.

Um eine möglichst große Stichprobe analysieren zu können, wurden alle Kinder mit schwerer Malaria in die Studie aufgenommen, die sich im Rekrutierungszeitraum im Regional Hospital vorstellten und den genannten Bedingungen genügten. Es wurde eine Teststärke von 80% und ein α -Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt. Die minimale Größe des signifikant nachweisbaren Unterschieds hängt wesentlich von der Prävalenz der Exposition ab. Ausgehend von erwarteten, in der Vergangenheit beobachteten Genotyp-Prävalenzen für die einzelnen Polymorphismen konnte die Studie diese Vorgaben einhalten, um bei 4% Prävalenz einen signifikanten Unterschied von 7% zu erfassen, bzw. bei 16% Prävalenz einen Unterschied von 10%.

2.2.2 Auswahl zweier Kontrollgruppen

Im Rahmen einer epidemiologischen Feldstudie, die zur selben Zeit wie die Rekrutierung der Fallgruppe stattfand, wurden insgesamt 2100 Kinder rekrutiert. Dabei korrespondierte das Rekrutierungsgebiet, das Tamale selbst und die sechs umliegenden Distrikte umfasste, mit dem Einzugsbereich des *Regional Hospitals* in Tamale, aus der die Fallgruppe rekrutiert wurde. Zum Zweck einer repräsentativen Stichprobenziehung aus diesem Gebiet erfolgte eine Stratifizierung der Region nach Censusuntersuchungen über die Bevölkerungszahl in 30 Communities und Censuseinheiten. Aus jeder dieser Untersuchungseinheiten wurden ≥ 70 Kinder zufällig für die Studie ausgewählt.

Kriterien für die endgültige Aufnahme in diese Feldstudie waren:

Alter: siehe Einschlusskriterien für die Aufnahme in die Fallgruppe

Transfusionsstatus: siehe Einschlusskriterien für die Aufnahme in die Fallgruppe

Einverständniserklärung: siehe Einschlusskriterien für die Aufnahme in die Fallgruppe

Nach der Rekrutierung wurde jedes Kind durch einen Studienarzt körperlich untersucht. Dabei wurden Daten wie Wohnort, Alter, Gewicht, axilläre Körpertemperatur, jede palpatorisch erfassbare Milzvergrößerung sowie weitere auffällige Untersuchungsbefunde auf einem Rekrutierungsbogen schriftlich fixiert. Anschließend erfolgte vor Ort eine venöse Blutabnahme (in S-Monovetten[®] Kalium-EDTA, 2,7ml, *Sarstedt AG & Co.*) zur Bestimmung von Parasitendichten und Hämoglobinwerten (siehe Abschnitt 2.2.3, Seite 20), die ebenfalls am Rekrutierungsort stattfand. Nach dem Transport der Blutproben in das Labor des *Tamale Teaching Hospitals* wurden die Proben wie in Abschnitt 2.2.5 (Seite 21) beschrieben weiterverarbeitet.

Aus dieser Stichprobe mit $n = 2100$ wurden nachträglich zwei Kontrollgruppen mit $n = 290$ für die hier dargestellte Fall-Kontroll-Studie erstellt. Zunächst wurden gesunde Probanden, bei denen im dicken Tropfen keine Parasiten nachgewiesen werden konnten, der Kontrollgruppe 1 zugeteilt, während sich die Kontrollgruppe 2 aus Patienten mit klinisch asymptomatischen Parasitämien zusammensetzte. Im Anschluss daran wurden die Daten jeder Kontrollgruppe mit denen der Fallgruppe nach den zwei Kriterien Geschlecht und Altersgruppe gematcht:

Geschlecht: männlich / weiblich

Altersgruppen: Es wurden neun Altersgruppen definiert:

6-11 Monate	60-71 Monate
12-23 Monate	72-83 Monate
24-35 Monate	84-95 Monate
35-47 Monate	96-107 Monate
48-59 Monate	

Abschließend wurde jedem Fall aus den zwei Kontrollpools eine Kontrolle zufällig zugeteilt.

2.2.3 Laborchemische Untersuchungen am Studienort

Parasitämiebestimmung

Zum Nachweis einer Parasitämie wurden von jeder Blutprobe zwei Dicke Tropfen angefertigt. Dazu wurden jeweils 5 μl antikoaguliertes Venenblut auf einen Objektträger aufgetragen und luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Färbung der unfixierten Präparate in 10% bzw. 5% Giemsa (*Merck KGaA*) in Titrisol[®] Puffer-Konzentrat für Pufferlösung nach WEISE (*Merck KGaA*) mit einem pH von 7,2 für 10 (10% Giemsa) bzw. 30 Minuten (5% Giemsa). Nach Spülung mit Tritrisol-Pufferlösung und weiterer Lufttrocknung wurde die Schnellfärbung (10 min) bei eintausendfacher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop (*Carl Zeiss*) beurteilt. Dabei wurden im Präparat die Anzahl der Parasiten auf 40 Leukozyten ermittelt. Die Parasitendichte wurde durch die Multiplikation dieses Verhältnisses mit der durchschnittlich angenommenen Leukozytenzahl von 8000 pro μl Blut errechnet:

$$\frac{\text{mikroskopisch bestimmte Parasitenzahl}}{\text{Anzahl der Leukozyten}} \times \text{Schätzwert für Leukozytenkonzentration}$$

Während das Ergebnis dieser Schnellfärbemethode zusammen mit dem klinischen Bild richtungsweisend für die Weiterbehandlung des jeweiligen Studienteilnehmers war, hatte es jedoch keinen Einfluss auf die Auswertung der Studie. Die Beurteilung des zweiten Dicken Tropfens erfolgte nach Abschluss der Rekrutierungsphase. Dabei wurde die Parasitenanzahl pro 200 Leukozyten bestimmt und die Parasitendichte analog zu der oben stehenden Formel berechnet. Wurden jedoch vor Erreichen von 200 Leukozyten 500 oder mehr Parasiten gezählt, galt die Zählung als beendet. Falls bei Erreichen der 200 Leukozyten weniger als drei Parasiten gezählt wurden, erfolgte eine Fortsetzung der Zählung bis auf 500 Leukozyten.

Präparate von Patienten mit schwerer Malaria, die bei dieser Zählung parasitenfrei waren, mussten nachträglich aus der Fallgruppe ausgeschlossen werden.

Messung von Hämoglobin (Hb), Glukose, Laktat

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurde von jeder Blutprobe der Hb-Wert photometrisch (Vario-Photometer, *Diaglobal GmbH*) bestimmt.

Glukose und Laktat im Vollblut wurden nur in der Fallgruppe mittels Vario-Photometer (*Diaglobal GmbH*) bestimmt. Beide Messverfahren beruhen auf einer enzymatischen Reaktion, bei der ein photometrisch erfassbarer Farbkomplex entsteht. Aus der Extinktion dieses Komplexes kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes die Konzentration des gewünschten Parameters bestimmt werden.

Die laborchemische Bestimmung von Hämoglobin-, Glukose- und Laktatwerten erleichterte die klinische Einschätzung über die Notwendigkeit von Bluttransfusionen bzw. die adäquate Therapie von Anämien und Stoffwechsellstörungen (z. B. Hypoglykämie) der Studienteilnehmer.

2.2.4 Therapie der schweren Malaria

Alle Studienteilnehmer der Fallgruppe wurden mit Artesunate (Plasmotrim[®], *Mepha Pharma*) über fünf Tage mit einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht und der doppelten Dosis am ersten Tag behandelt. Die Applikationsart (oral, Zäpfchen oder via Nasogastraltubus) wurde je nach klinischem Zustand des Patienten variiert. Zusätzlich beinhaltete die Behandlung Glucosesubstitutionen (oral, i.v.), Rehydratationsinfusionen, Gabe von Paracetamol, Diazepam und Phenobarbital bei entsprechender Indikation. Alle Patienten mit einer schweren Anämie erhielten eine Bluttransfusion.

2.2.5 Weiterverarbeitung der Blutproben

Für die geplante genetische Analyse der Proben am Tropeninstitut Berlin wurden 200 μ l antikoaguliertes Vollblut jedes Studienteilnehmers mit 200 μ l Stabilisierungspuffer (Buffer AS1[®], *Quiagen GmbH*) aliquotiert, weiterhin 100 μ l unversetztes antikoaguliertes Vollblut abpipettiert und bei 4°C (Pufferaliquots) bzw. -20°C (Vollblutaliquots) gelagert. Nach Ende der Studie in Tamale wurden diese Proben bei geschlossener Kühlkette von Tamale nach Berlin transportiert und standen den nachfolgenden Untersuchungen zur Verfügung.

2.3 Untersuchungen am Tropeninstitut Berlin

Alle hier beschriebenen Verfahren zur genetischen Analyse der Blutproben fanden im Institut für Tropenmedizin in Berlin direkt im Anschluss an die Rekrutierungsphase in Tamale statt. Theoretisches Basiswissen zu den Grundprinzipien der verwendeten Methoden wurde mit Hilfe von [89] und [90] erarbeitet. Dabei wurden die Verfahren zum Nachweis des Polymorphismus *iNOS*-954 durch die Verfasserin dieser Arbeit für alle Proben bearbeitet. Andere Methoden wurden exemplarisch für einzelne Blutproben selbständig durchgeführt. In den folgenden zwei Abschnitten sollen wichtige Verfahren wie Polymerase-Kettenreaktion und Agarose-Gel-Elektrophorese zusammenfassend vorgestellt werden, so dass bei der Beschreibung der Nachweisverfahren im einzelnen für die jeweilige Untersuchung nur noch auf die speziellen Bedingungen eingegangen werden muss.

2.3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Das 1984 von Kary Mullis entwickelte Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) dient der Amplifikation einer spezifischen Sequenz eines DNA-Doppelstrangs. Mittlerweile wurden vielfältige Anwendungsmöglichkeiten dieses Verfahrens entwickelt, bei denen einzelne Punkte in der Durchführung variieren. Der klassische PCR-Ansatz jedoch enthält grundsätzlich Ausgangs-DNA, die so genannte Template-DNA, zwei Oligonukleotidprimer, Nukleotide und eine thermostabile DNA-Polymerase inklusive eines Reaktionspuffers. Das Grundprinzip der PCR besteht aus folgenden drei Schritten:

Denaturierung: Bei der Denaturierung trennt sich durch die Erhöhung der Temperatur auf über 90°C die Doppelstrang-DNA in Einzelstränge.

Oligonukleotidbindung: Nach raschem Abkühlen auf eine so genannten Annealing-Temperatur können die im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer, die der Sequenz an den 3'-Enden der beiden Einzelstränge komplementär sind, an die einzelsträngige Template-DNA hybridisieren. Dabei ist die Annealing Temperatur für das verwendete Primerpaar spezifisch und hängt hauptsächlich von dessen Basengehalt (G/C und A/T) ab.

Elongation: Nach einer Temperaturerhöhung auf 72°C — das Temperaturoptimum der *Taq* DNA Polymerase — werden die Primer durch Anbau von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) verlängert bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA theoretisch exakt gleicht (Standard Fehlerrate der *Taq* DNA Polymerase beträgt circa $2,7 \times 10^{-5}$ [91]). Die *Taq* DNA Polymerase wird aus einem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus*, der in 70°C heissen Quellen wächst, isoliert.

Derartige Reaktionszyklen werden bis zu 45-mal wiederholt und führen zur Zunahme der amplifizierten DNA.

In dieser Arbeit diente die aus den mit Puffer (Buffer AS1[®], *Quiagen GmbH*) versetzten Blutproben bzw. aus den darin enthaltenen kernhaltigen Leukozyten präparierte genomische DNA als DNA-Matrize. Zur DNA-Isolierung wurde ein Extraktionskit (QIAamp DNA Blood Mini Kit, *Quiagen GmbH*) verwendet. Dieses DNA-Extraktionsverfahren beruht auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, in Anwesenheit von Guanidiniumhydrochlorid an Silikamoleküle zu binden. Bei der Durchführung wurde entsprechend der Vorgaben der Firma *Quiagen* vorgegangen.

Ausgehend von einer DNA-Konzentration von ca. 30 ng/ μ l wurde 1 μ l genomische DNA für die PCR eingesetzt. Bei der Wiederholung einer PCR wurde 2 μ l DNA-Extrakt eingesetzt. Als Reaktionsbehältnis für die PCR dienten PCR SoftTubes[®] 0,5 ml (*Biozym Scientific GmbH*) und Safe-Lock Tubes 2 ml (*Eppendorf AG*), die Amplifikation erfolgte in T3 Thermocyclern (*Biometra GmbH i.L.*). Sämtliche Primer wurden nach Vorgabe der Nukleotidsequenz von der Firma *MWG Biotech GmbH* bezogen.

2.3.2 Nachweis des Amplifikats durch Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese ist eine einfache und effektive Methode, um DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 kb Länge zu trennen und zu identifizieren. Ihr Prinzip beruht auf der Eigenschaft von DNA-Molekülen aufgrund ihrer bei neutralem pH negativen Ladung (bedingt durch Phosphatgruppen) im elektrischen Feld von der Kathode zu Anode zu wandern. Durch die Siebstruktur der Agarose wird die grössere Laufgeschwindigkeit kleinerer Fragmente im Vergleich zu grösseren ausgenutzt und das Gemisch aus DNA-Fragmenten in einem bestimmten Spannungsbereich ihrer Grösse nach aufgetrennt. Die Agarosekonzentration im

Gel, die anliegende Spannung und die Zeit, in der das elektrische Feld anliegt, beeinflussen die Trennschärfe der Untersuchungsmethode. Um die Auftrennung der DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wird das Agarosegel mit Ethidiumbromid versetzt. Bei der Elektrophorese interkalieren Ethidiumbromid mit den DNA-Molekülen und fluoreszieren im ultraviolettem Licht. Um auf die Länge eines Fragments schließen zu können, wird zusammen mit den PCR-Amplifikaten ein DNA-Größenmarker bei der Elektrophorese aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurden für die Agarose-Gel-Elektrophorese jeweils 5 μl PCR-Amplifikat eingesetzt. Als Laufpuffer wurde TBE Puffer 1 \times (Protokoll siehe Anhang, Seite 66) verwendet. Für die Herstellung eines Agarosegels diente SeaKem[®] LE Agarose (*Cambrex Bio Science Rockland; Biozym Scientific GmbH*), die zusammen mit 50 ml TBE Puffer 1 \times in einem Mikrowellengerät aufgeköcht und anschließend mit 7 μl Ethidiumbromid (*Merck KGaA*) versetzt wurde. Während der Erstarrungsphase des Agarosegels (circa 30 Minuten) wurde die Elektrophoresekammer zusammgebaut und die PCR-Proben sowie der DNA-Größenmarker zur Bandenidentifikation (100 bp DNA Ladder, *Invitrogen GmbH*) mit 1 μl Bromphenolblaulösung (Farbstoffmarker, Protokoll siehe Anhang, Seite 66) versetzt. Schließlich wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert und der Lauf gestartet. Im Anschluss an die Agarose-Gel-Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente im ultravioletten Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm dargestellt und mit Polaroidfotos dokumentiert.

2.3.3 Nachweis des Polymorphismus *iNOS*-954G→C

Nachweisprinzip

Die durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis des Polymorphismus *iNOS*-954G→C orientieren sich an den Arbeiten [76] und [82]. Danach handelt es sich bei *iNOS*-954G→C um eine Punktmutation in der Promotorregion des *iNOS* Gens an der Position -954 Basenpaare (bp) vor Transkriptionsstart mit einem Basenaustausch von Guanin zu Cytosin (G→C). Der Nachweis beruht auf der Eigenschaft dieser Mutation, eine Schnittstelle durch das Restriktionsenzym *Bsa*I aufzuheben. *Bsa*I ist eine aus dem Bakterium *Bacillus stearothermophilus* isolierte Restriktionsendonuklease, die homologe DNA-Sequenzen schneidet. Durch die Resistenz der Mutation gegenüber *Bsa*I kann der Polymorphismus nach der Auftrennung der verdauten Amplifikate bei der Agarose-Gel-Elektrophorese vom Wildtyp unterschieden werden.

PCR

Für den Nachweis des Polymorphismus *iNOS*-954G→C wurde der entsprechende DNA-Abschnitt mittels der Primer

NOS F 5'-CAT ATG TAT GGG AAT ACT GTA TTT CAG-3'

NOS 4 5'-TCT GAA CTA GTC ACT TGA GG-3'

amplifiziert. Tabelle 2.1 (Seite 26) gibt einen Überblick über die verwendeten Chemikalien und Reaktionsbedingungen für die Amplifikation und die anschließend durchgeführte Agarose-Gel-Elektrophorese zur Darstellung des 626 bp langen Amplifikates (siehe Abbildung 2.1, Seite 26).

Chemikalien für PCR	V für 1×Ansatz à 50 µl	Konzentration im Ansatz
destilliertes H ₂ O	40,5 µl	–
Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂)	5 µl	50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl	1 mM
dNTP (25 mM pro Base)	0,3 µl	150 µM
NOS F (20 µM)	0,5 µl	0,2 µM
NOS 4 (20 µM)	0,5 µl	0,2 µM
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	1 U
Template-DNA	1 µl	ca. 0,6 ng/µl
PCR-Programm		
initiale Denaturierung	- 94°C für 4 min	
40 Zyklen der Schritte	- Denaturierung bei 94°C für 30sec	
	- Primer Annealing bei 61°C für 50sec	
	- Elongation bei 72°C für 50sec	
terminale Elongation	- 72°C für 10 min	
Agarose-Gel-Elektrophorese		
Agarose-Gel-Konzentration	2% SeaKem [®] LE Agarose	
Elektrophoresebedingungen	50 min bei 80 V	
PCR-Produkt	Bande bei 626 bp	

Tabelle 2.1: PCR-und Elektrophoresebedingungen für *iNOS*-954G→C.
V = Volumen, min = Minuten, sec = Sekunden

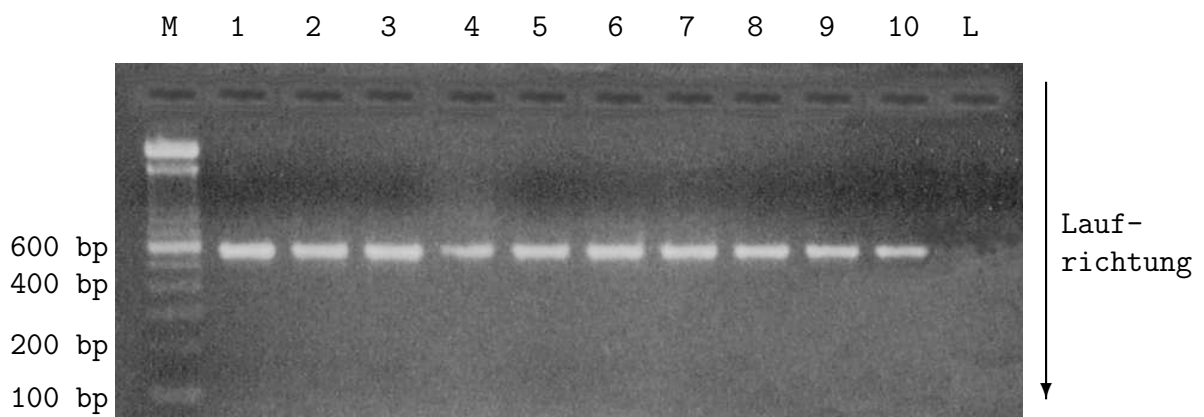
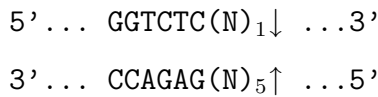


Abbildung 2.1: Darstellung der ungeschnittenen PCR-Produkte zum Nachweis von *iNOS*-954G→C.

Fotographie von mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennten PCR-Amplifikaten: 1 bis 10 = Amplifikate von 10 Patienten aus der Fallgruppe, M = Marker (100 bp DNA Ladder), L = Leerwert/Negativ-Kontrolle, Bande bei 626 bp

Restriktionsverdau mit *BsaI*

Nach der Amplifikation der DNA erfolgte der Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *BsaI* (*New England Biolabs GmbH*). *BsaI* schneidet einen DNA-Doppelstrang mit der spezifischen Sequenz:



Für einen Ansatz à 20 μl wurden 12,5 μl H_2O , 2 μl NEBuffer 3 (*New England Biolabs GmbH*), 0,5 μl *BsaI* (5 U/ μl) und 5 μl PCR-Produkt benötigt. Dieser Ansatz wurde für mindestens 3h bei 50°C inkubiert und abschließend mit 1 μl Bromphenolblaulösung (Farbstoffmarker, Protokoll siehe Anhang, Seite 66) versetzt. Für die Agarose-Gel-Elektrophorese wurden 15 μl dieses Verdau-Produkts eingesetzt. Weitere Bedingungen für die Elektrophorese waren: ein 2%iges Agarosegel (SeaKem® LE Agarose, *Cambrex Bio Science Rockland; Biozym Scientific GmbH*) und eine Laufzeit von 50 min bei 80 V. Durch die anschließende Betrachtung des Gels unter UV-Licht konnte durch die Bandenverteilung auf den Genotyp geschlossen werden. Dabei gab es folgende Konstellationen (siehe Abbildung 2.2):

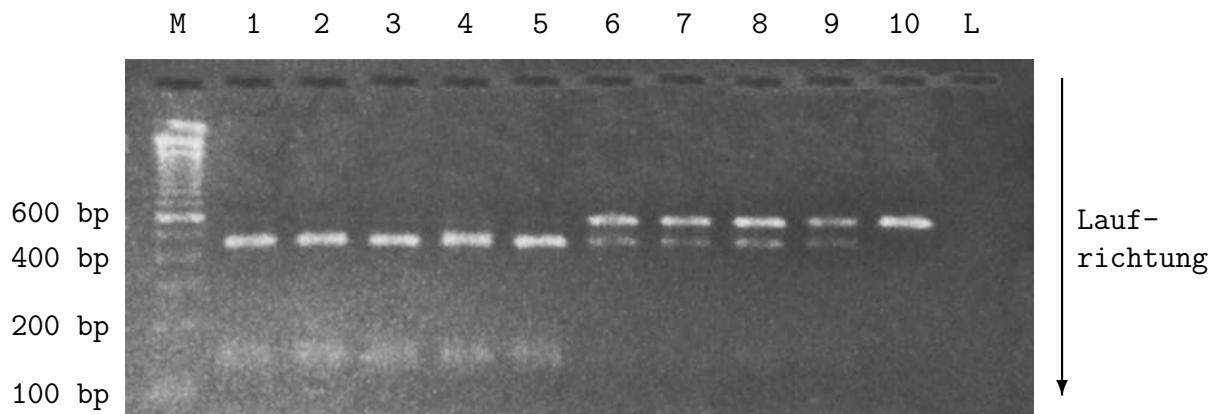


Abbildung 2.2: Darstellung nach Restriktionsverdau mit *BsaI*.

Fotographie eines mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennten Restriktionsverdau: 1 bis 10 = Amplikate von 10 Patienten aus der Fallgruppe (davon: Probe 1 bis 5 = Wildtyp, Probe 6 bis 9 = heterozygot für *iNOS-954G*→*C*, Probe 10 homozygot für *iNOS-954G*→*C*), M = Marker (100 bp DNA Ladder), L = Leerwert/Negativ-Kontrolle, Banden bei 626 bp, 470 bp und 131 bp (schwach)

- (1) **zwei Banden bei 470 bp und 131 bp:** Der Wildtyp liegt vor. Das Enzym hat entsprechend seiner Spezifität das PCR-Produkt an der entsprechenden Stelle geschnitten.
- (2) **drei Banden bei 626 bp, 470 bp und 131 bp:** Heterozygotie für den Polymorphismus liegt vor. *BsaI* schneidet das Wildtyp-Allel, das Allel mit dem Polymorphismus bleibt ungeschnitten.
- (3) **eine Bande bei 626 bp:** Homozygotie für den Polymorphismus liegt vor. Das Amplifikat besitzt vollständige Resistenz gegenüber dem Enzym.

2.3.4 Nachweis des Polymorphismus *iNOS*-1173C→T

Nachweisprinzip

Bei dem Polymorphismus *iNOS*-1173C→T handelt es sich ebenfalls um eine Punktmutation im *iNOS*-Promotor; jedoch mit Basenaustausch von Cytosin zu Thymin an Position -1173 bp vor Transkriptionsstart. Dieser Polymorphismus kann durch eine modifizierte PCR — der *mutagenically separated PCR (MS-PCR)* [92] — nachgewiesen werden. Das Grundprinzip dieses Mutationsnachweisverfahrens beruht auf der Verwendung allelspezifischer Primer unterschiedlicher Länge in einem Reaktionsansatz. So kann die durch die unterschiedliche Primärlänge bedingte Längendifferenz der Amplifikate durch die anschließende Durchführung einer Agarose-Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden und ermöglicht damit die Unterscheidung zwischen mutiertem Allel (bzw. Polymorphismus) und Wildtyp-Allel.

PCR

Die für den Nachweis des Polymorphismus *iNOS*-1173C→T speziellen *MS-PCR* Bedingungen wurden bereits im Rahmen einer Studie in Kenia beschrieben [75] und waren richtungsweisend für die hier dargestellten Untersuchungsbedingungen. Es wurden die unten stehenden Primer verwendet.

MS-P2F 5'-GAC AAG AAG GAA ATG AGT GGA CAC AGG TAG CAA AGT GTT GAG A C-3'

MS-P4F 5'-G TGG TAG CAA AT GTT GGA A T-3'

MS-P3R 5'-GCA TTT TTC CAT CAT AAA AGT AA-3'

Dabei findet sich bei den unterstrichenen Basen eine Veränderung gegenüber der Wildtyp-Sequenz, die mit einem Recheck markierte Base entspricht der oben beschriebenen Mutation an Position -1173. Während MS-P3R allelunspezifisch mit dem komplementären DNA-Matri-zenstrang hybridisiert, handelt es sich bei MS-P2F mit 44 bp und MS-P4F mit 21 bp um Primer, die für den Polymorphismus bzw. den Wildtyp allelspezifisch sind, d.h. MS-P2F hybridisiert nur mit dem Matrizenstrang -1173C (Wildtyp), MS-P4F hingegen mit -1173T (Polymorphismus). Somit unterscheidet sich das aus beiden Amplifikationen resultierende PCR-Produkt ausschließlich durch eine Längendifferenz von 23 bp aufgrund der Benutzung verschieden langer Primer. Dieser Unterschied kann mit der Agarose-Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2.3, Seite 30). So können Individuen, die heterozygote Träger für *iNOS*-1173C→T sind, durch den Nachweis von zwei Banden (bei 131 bp und 108 bp) genotypisiert werden, während eine Bande einer Homozygotie für den Wildtyp (Bande bei 131 bp) bzw. den Polymorphismus (Bande bei 108 bp) entspricht. Nähere Informationen zu den verwendeten Chemikalien und Reaktionsbedingungen für die Amplifikation und die Agarose-Gel-Elektrophorese können aus Tabelle 2.2 entnommen werden.

Chemikalien für PCR	V für 1×Ansatz à 25 µl	Konzentration im Ansatz
destilliertes H ₂ O	22,1 µl	–
Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂
dNTP (25 mM pro Base)	0,1 µl	100 µM
MS-P3R (20 µM)	0,5 µl	0,4 µM
MS-P2F (20 µM)	0,05 µl	0,04 µM
MS-P4F (20 µM)	0,6 µl	0,48 µM
HotStarTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl	0,75 U
Template-DNA	1,5 µl	ca. 0,9 ng/µl
PCR-Programm		
initiale Denaturierung	- 95°C für 10 min	
40 Zyklen der Schritte	- Denaturierung bei 95°C für 30sec - Primer Annealing bei 63°C für 45sec - Elongation bei 72°C für 45sec	
terminale Elongation	- 72°C für 7 min	
Agarose-Gel-Elektrophorese		
Agarose-Gel-Konzentration	3% SeaKem [®] LE Agarose	
Elektrophoresebedingungen	60 min bei 90 V	
PCR-Produkt	Bande bei 131 bp: -1173C Bande bei 108 bp: -1173T	

Tabelle 2.2: PCR- und Elektrophoresebedingungen für *iNOS*-1173C→T.
V = Volumen, min = Minuten, sec = Sekunden

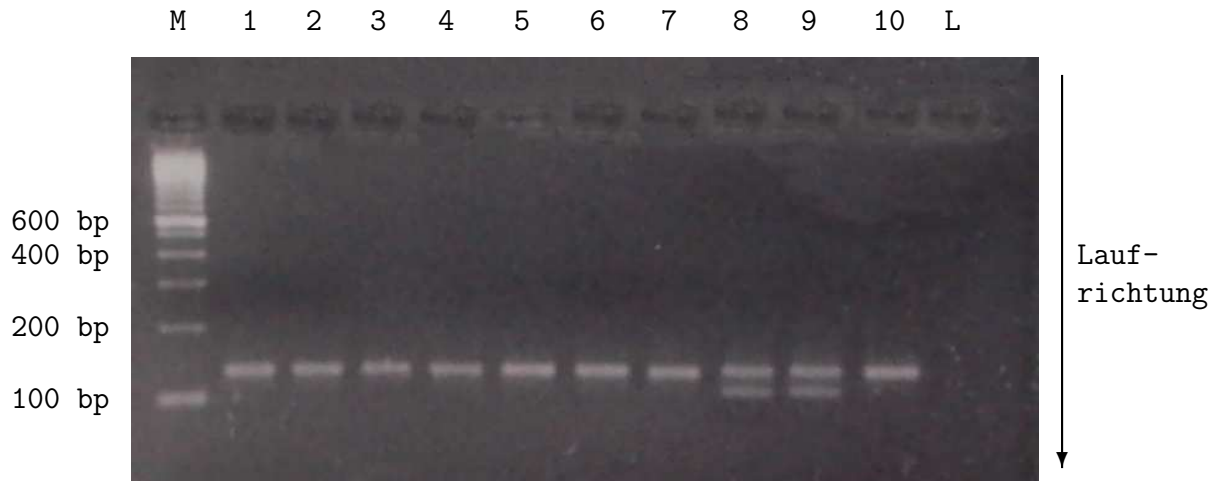


Abbildung 2.3: Darstellung der PCR-Produkte zum Nachweis von *iNOS*-1173C→T. Fotografie von mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennten PCR-Amplifikaten: 1 bis 10 = Amplifikate von 10 Patienten aus der Fallgruppe (davon: Probe 1 bis 7 und 10 = Wildtyp, Probe 8 und 9 = heterozygot für *iNOS*-1173C→T), M = Marker (100 bp DNA Ladder), L = Leerwert/Negativ-Kontrolle, Banden bei 131 bp und 108 bp

2.3.5 Nachweis des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten

Nachweisprinzip

Bei dem -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten handelt es sich um ein 2500 Basenpaare (bp) vor dem Transkriptionsstart von *iNOS* gelegenes Pentanucleotid mit der Sequenz CCTTT. -2,5kb CCTTT_(n) gehört in die Gruppe der short tandem-repeat (STR) Mikrosatelliten, welche in der DNA von Vertebraten relativ häufig auftreten und eine hohe Allel-Vielfalt bezüglich ihrer Kopienzahl besitzen (siehe Abschnitt 1.2.4, Seite 9). Die Identifizierung dieses Mikrosatelliten gelang 1997 durch die Amplifikation der entsprechenden *iNOS*-Promotorsequenz mittels PCR und der anschließenden Sequenzierung (nach Sanger et al. [93]) [77]. In der hier vorgestellten Untersuchung wurde die Region des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten durch die PCR wie in [77] amplifiziert und im Anschluss daran durch die Anwendung der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese hinsichtlich der Anzahl der CCTTT-Kopien analysiert.

PCR

Für den Nachweis des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten wurde der entsprechende DNA-Abschnitt mittels folgender Primer amplifiziert:

NOS2-MSF^L 5'-ACC CCT GGA AGC CTA CAA CTG CAT-3'

NOS2-MSR 5'-GCC ACT GCA CCC TAG CCT GTC TCA-3'

Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die verwendeten Chemikalien und Reaktionsbedingungen für die Amplifikation und die anschließend durchgeführte Agarose-Gel-Elektrophorese.

Chemikalien für PCR	V für 1×Ansatz à 25 µl	Konzentration im Ansatz
destilliertes H ₂ O	20,5 µl	–
Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂
dNTP (25 mM pro Base)	0,2 µl	200 µM
NOS2-MSF ^L (0,1 mM)	0,05 µl	0,2 µM
NOS2-MSR (0,1 mM)	0,05 µl	0,2 µM
HotStarTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	1 U
Template-DNA	1,5 µl	ca. 0,9 ng/µl
PCR-Programm		
initiale Denaturierung	- 94°C für 5 min	
35 Zyklen der Schritte	- Denaturierung bei 94°C für 30sec	
	- Primer Annealing bei 58°C für 45sec	
	- Elongation bei 72°C für 45sec	
terminale Elongation	- 72°C für 7 min	
Agarose-Gel-Elektrophorese		
Agarose-Gel-Konzentration	4% SeaKem [®] LE Agarose	
Elektrophoresebedingungen	45 min bei 90 V	
PCR-Produkt	Bande zwischen 166 bp (6 Kopien) und 221 bp (17 Kopien)	

Tabelle 2.3: PCR-und Elektrophoresebedingungen für -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatellit.
V = Volumen, min = Minuten, sec = Sekunden

Nachweis des Mikrosatelliten durch die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Der Nachweis der Kopienanzahl des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten mittels Elektrophorese setzt ein hohes Auflösungsvermögen des verwendeten Gels voraus, da sich die jeweiligen Allelsequenzen bezüglich ihrer Länge nur um bis zu fünf Basenpaare unterscheiden (CCTTT_(n)). Im Gegensatz zu Agarosegelen kann bei der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese eine gute Auflösung kleiner DNA-Fragmente bis zu 1000 Basenpaaren (bp) erzielt werden [90]. Das Grundprinzip dieser Methode entspricht dem der — bereits in Abschnitt 2.3.2 (Seite 23) vorgestellten — Agarose-Gel-Elektrophorese.

Zunächst wurden die Elektrophoreseplatten des für die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese verwendeten Sequenziergeräts (LI-COR DNA Sequencer Model 4000, *LI-COR; MWG Biotech GmbH*, Ebersberg, Deutschland) gründlich gesäubert und mit Ethanol entfettet. Diese Vorbereitung ist essentiell, da verbleibende Gelreste das Wanderungsverhalten der DNA-Moleküle im elektrischen Feld beeinträchtigen oder falsch positive Signale bei der Sequenzlängenanalyse erzeugen können. Beim Zusammenbauen der Elektrophoresekammer sorgten zwei Abstandhalter für einen definierten Abstand von 0,3 mm zwischen den beiden Platten.

Für die Herstellung des Polyacrylamidgels wurde das Reaktionsset SequaGelTM XR (*Biozym Technik GmbH*) verwendet. Dazu wurde die Pufferlösung und die Monomerlösung im Verhältnis von 4:1 vermischt. Für einen Ansatz à 30ml wurden entsprechend 24 ml SequaGel-Lösung und 6ml Pufferlösung (TBE Puffer 1×, Protokoll siehe Anhang, Seite 66) vermischt. Nach der Zugabe von 320 µl 10% Ammoniumperoxidsulfat (APS) setzt die Polymerisierung ein. Das Gel wurde nun frei von Lufteinschlüssen zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm zur Erzeugung von Geltaschen in die dafür vorgesehene Öffnung gesteckt. Nach etwa 45 Minuten ist die Polymerisierung abgeschlossen.

In der Zwischenzeit wurde der Elektrophorese-Puffer hergestellt und das Sequenziergerät programmiert. Als Laufpuffer wurde TBE Puffer 1× (Protokoll siehe Anhang, Seite 66) verwendet. Weiterhin wurden die DNA-Proben aus der PCR mit 5 µl Bromphenolblaulösung (Farbstoffmarker, Protokoll siehe Anhang, Seite 66) versetzt und für fünf Minuten bei 95°C denaturiert (T3 Thermocycler, *Biometra GmbH i.L.*), d.h. der DNA-Doppelstrang wurde in zwei Einzelstränge getrennt.

Schließlich wurden nach der Polymerisierung des Gels und dem Erreichen einer ausreichenden Laserstrahlintensität des Sequenziergeräts jeweils 0,3 µl der PCR-Amplifikate sowie 0,8 µl eines DNA-Längenstandards (Bp-Marker, *LI-COR Biosciences GmbH*) in die Geltaschen aufgetragen und der Lauf gestartet. Dabei wandern die DNA-Sequenzen im elektrischen Spannungsfeld und werden der Länge nach aufgetrennt. Die Detektion der DNA-Sequenzen erfolgte durch den Laser des Sequenzers und konnte mit dem vom Hersteller mitgelieferten Softwareprogramm (Gene ImagIRTM, *LI-COR Biosciences GmbH*) ausgewertet werden. In Abbildung 2.4 (Seite 33) sind beispielhaft Ergebnisse der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von Proben aus der Fallgruppe dargestellt.

Anzahl der
CCTTT-Kopien

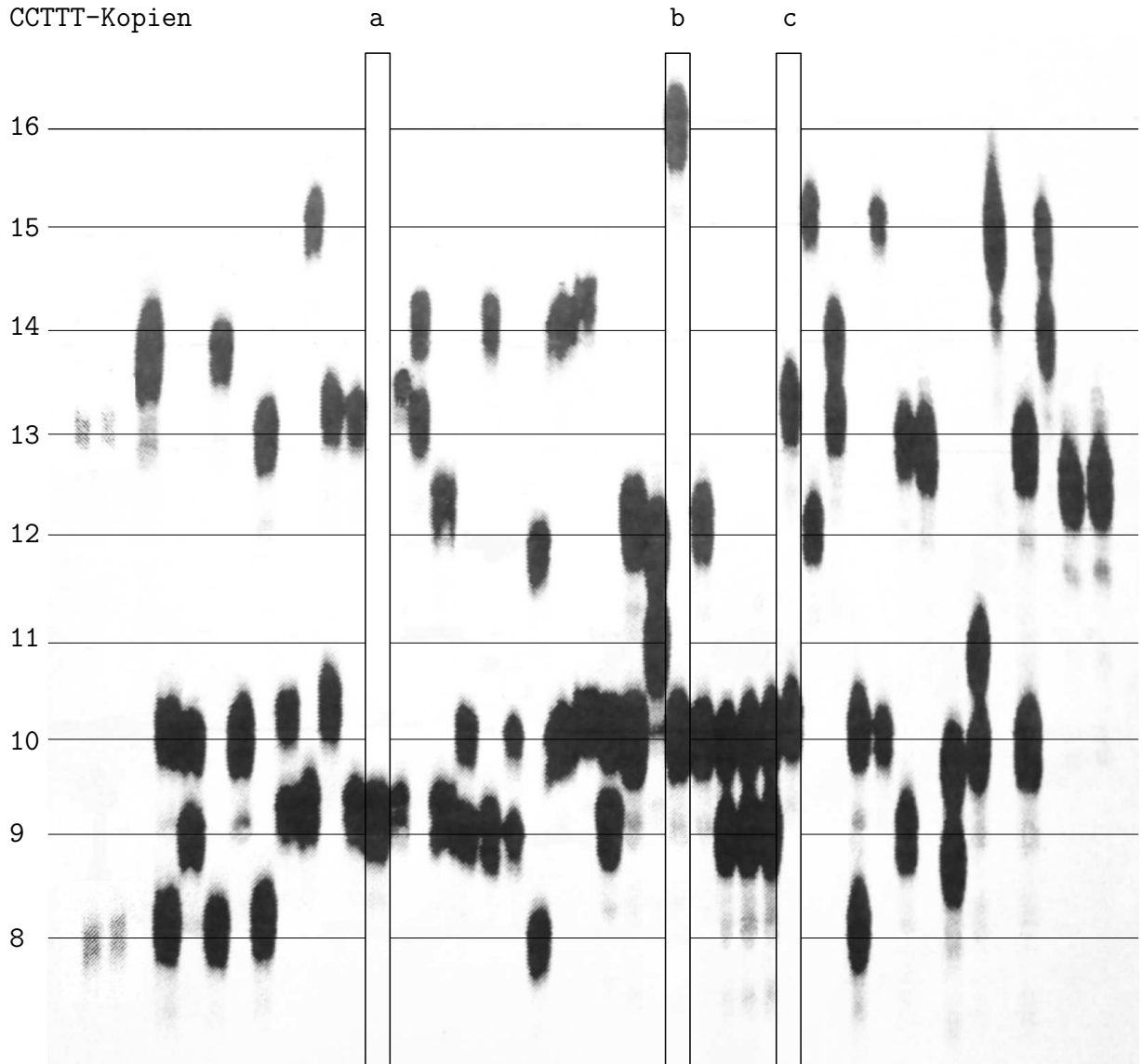


Abbildung 2.4: Darstellung der PCR-Produkte zum Nachweis des Mikrosatelliten.

Ansicht eines Polyacrylamidgels im LI-COR DNA Sequencer Model 4000 (*LI-COR; MWG Biotech GmbH*): Am linken Bildrand sind zusätzlich zu den entsprechenden Hilfslinien die CCTTT-Kopienanzahlen (8 bis 16 Kopien) aufgetragen. Die Abbildung zeigt die Auftrennung von PCR-Amplifikaten und die daraus hervorgehenden Genotypen für den -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten für 39 Patienten der Fallgruppe. Dabei wurde in die ersten beiden Geltaschen der Längenstandard (Bp-Marker, *LI-COR Biosciences GmbH*) aufgetragen mit einem Signal bei 175 bp (176 bp entsprechen 8 Kopien) und 200 bp (201 bp entsprechen 13 Kopien). Für die mit a, b und c bezeichneten und durch einen Kasten hervorheobenen Proben soll beispielhaft der Genotyp ermittelt werden (Allel 1; Allel 2). Probe a: (9 Kopien; 9 Kopien) homozygot, Probe b: (10 Kopien; 16 Kopien) heterozygot, Probe c: (10 Kopien; 13 Kopien) heterozygot

2.4 Statistische Berechnungen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie der Medizinischen Fakultät Charité — Universitätsmedizin Berlin. Die Grundlagen, der in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Berechnungen basieren auf den Lehrbüchern [94] und [95]. Für die Berechnung und Auswertung der Ergebnisse wurden die Programme Microsoft Excel, OpenOffice.org 1.1.0 und SPSS V11.0 verwendet.

2.4.1 Transformation der Werte für die Parasitendichte

Die Werte für die Parasitendichten nach der Formel (siehe Kapitel 2.2.3, Seite 20) wurden mit Hilfe der \log_{10} -Funktion transformiert. So ergeben die transformierten Werte der Parasitendichten eine symmetrische Verteilung, die gut durch die Dichtefunktion der Normalverteilung approximiert wird. Somit konnten die geometrischen Mittelwerte der Parasitendichten (GMPD) und die entsprechenden 95% Konfidenzintervalle in den verschiedenen Studiengruppen errechnet und miteinander verglichen werden.

2.4.2 Überprüfung von Unterschiedshypothesen

Die Allelfrequenzen der jeweiligen SNPs (*iNOS*-954G→C und *iNOS*-1173C→T), die jeweiligen Kopienzahlen des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten sowie die Haplotypen (*iNOS*-954G→C/CCTTT₍₈₎, *iNOS*-1173C→T/CCTTT₍₁₃₎) der Fallgruppe wurden mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe durch die Anwendung des 4-Felder-Chi²-Tests bzw. des exakten Tests nach Fisher verglichen. Ebenso wurde mit Hilfe dieser Tests für die genannten *iNOS*-Polymorphismen das Risiko für einzelne Symptome bzw. Konditionen der schweren Malaria (Prostration, Bewusstseinsstörung, Atemschwäche, Multiple Anfälle, Kreislaufkollaps, Gelbsucht, Hämoglobinurie, Schwere Anämie, zerebrale Malaria, Hyperparasitämie, Hypoglykämie, Hyperlaktatämie, Hyperpyrexie, Mortalität) in der Fallgruppe bestimmt. Dafür musste diese zuvor in einzelne Untergruppen unterteilt werden.

Die genannten Testverfahren (4-Felder-Chi²-Test, exakter Test nach Fisher) dienen der Analyse dichotomer Merkmale bzw. Merkmalskombinationen. Dabei werden jedoch bei dem 4-Felder-Chi²-Tests große Stichprobenumfänge vorausgesetzt (alle erwarteten Einzelhäufigkeiten > 5 [94]), während der exakte Test nach Fisher auch bei kleineren Stichproben eingesetzt werden kann. Beide Testverfahren untersuchen, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass die unterschiedlichen Häufigkeiten von Merkmalsausprägungen nicht zufällig zustan-

de gekommen sind, d.h. der Unterschied signifikant ist. Eine Aussage über die Signifikanz wird durch die Festlegung des entsprechenden Signifikanzniveaus ermöglicht: In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von $p < 0,05$ bei beiden Testverfahren die Nullhypothese (H_0) formuliert, dass zwischen den Gruppen kein Unterschied hinsichtlich des untersuchten Merkmals vorliegt. Ausgehend von der H_0 lautet die Alternativhypothese (H_1): Die Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich des untersuchten Merkmals.

Die H_0 muss zugunsten der H_1 verworfen werden, wenn die Berechnung nur mit einer Wahrscheinlichkeit von $> 95\%$ ergibt, dass der Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen hinsichtlich des Auftretens des untersuchten Merkmals nicht durch Zufall bedingt ist. Dies setzt bei der Anwendung des 4-Felder- χ^2 -Tests voraus, dass der empirisch ermittelte Wert über dem jeweiligen kritischen Wert (aus Tabellen über die Verteilungsfunktion der χ^2 -Verteilung ersichtlich) liegt.

Um die Stärke des Zusammenhangs zweier Merkmale, die nach dem 4-Felder- χ^2 -Tests bzw. dem exakten Test nach Fisher assoziiert sind, abzuschätzen, wurde als Maß die Odds Ratio berechnet. Dabei wird das Verhältnis der Häufigkeit des eingetretenen Ereignisses zur Häufigkeit des nicht eingetretenen Ereignisses bestimmt. Die Odds Ratio beinhaltet die relativen Chancen für das Ereignis bei Vorhandensein des Faktors im Vergleich zum Nichtvorhandensein des Faktors. So wird ein Wert $x < 1$ als ein Schutz vor einem Ereignis, ein Wert $x > 1$ als ein Risiko für ein Ereignis und schließlich ein Wert von $x = 1$ als keinen Einfluss auf das untersuchte Ereignis interpretiert.

Mögliche Unterschiede stetiger, normalverteilter Parameter, z.B. logarithmisierte Parasitendichten, in Abhängigkeit von Merkmalen nominalen Charakters wurden mittels dem t-Test nach Student verglichen. Bei nicht-normal verteilten Variablen, wie z.B. Alter, kamen der Mann-Whitney U-Test oder der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz.

2.4.3 Überprüfung von Zusammenhangshypothesen

Die multivariate Berechnung von Risikofaktoren z.B. für Sterblichkeit wurde mittels logistischer Regressionsanalyse durchgeführt. Dieses Verfahren dient zur Untersuchung des Einflusses eines Faktors unter der Berücksichtigung des Einflusses von Ko-Faktoren auf die Manifestation einer Erkrankung. Dabei wurden alle Faktoren, die sich als univariat assoziiert erwiesen ($p < 0,05$), in das Modell eingegeben und gegebenenfalls wieder entfernt, wenn sie sich multivariat als nicht signifikant assoziiert erwiesen. Die Assoziation

zwischen einzelnen Genotypen und fatalem Ausgang einer schweren Malaria wurde unter Beachtung bekannter Letalitätsrisikofaktoren (Bewusstseinsverlust, Kreislaufkollaps, Hypoglykämie, Mangelernährung [96]) korrigiert. Um das Ausmaß mit dem die Zielvariable von den einzelnen Einflussfaktoren im Rahmen des angewendeten Regressionsmodells verändert wird abzuschätzen, wurde die adustierte Odds Ratio berechnet.