

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Studiendesign und Methoden

Vor der Diskussion der Ergebnisse und den sich daraus ergebenden Schlussfolgerungen werden im folgenden Abschnitt zunächst der Studienaufbau und ausgewählte, in dieser Arbeit verwendete Methoden kritisch bewertet.

4.1.1 Studiendesign

Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf der Datenerhebung im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie. Dabei wird die Stichprobe nach dem Auftreten eines bestimmten Zielereignisses (hier: schwere Malaria) in eine Fallgruppe (Studienteilnehmer mit Zielereignis) und eine Kontrollgruppe (Studienteilnehmer ohne Zielereignis) unterteilt und anschließend nach dem Vorliegen einer oder mehrerer Expositionen (hier: verschiedene *iNOS*-Polymorphismen) untersucht. So weisen unterschiedliche Anteile von exponierten Personen in der Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf einen Zusammenhang von Zielereignis und Exposition hin.

Dieses Studiendesign zeichnet sich durch seine unkomplizierte Durchführung aus, da der Zugang zu erkrankten Personen im allgemeinen einfach ist und — verglichen mit prospektiven Studientypen — längere Beobachtungszeiten entfallen. Aus diesem Grund findet für die Untersuchung bestimmter wissenschaftlicher Fragestellungen in Untersuchungsgebieten mit schwacher Infrastruktur (z. B. Nordghana) häufiger das Studienkonzept der Fall-Kontroll-Studie Anwendung. Auch in der vorgestellten Arbeit waren diese Vorteile ausschlaggebend dafür, dieses Studiendesign zu wählen.

Jedoch ergeben sich bei der Auswertung der Ergebnisse im Vergleich zu anderen Studientypen (z.B. prospektive Kohortenstudien, experimentelle Studien) eine Reihe von Besonderheiten, die bei der Planung, Durchführung und Interpretation beachtet werden müssen [95,97]:

- *keine fiktive Grundgesamtheit.* Zwar geben Fall-Kontroll-Studien erste Anhaltspunkte für bestimmte vermutete Zusammenhänge, allerdings ist eine Verallgemeinerung der Ergebnisse aus dieser Studie auf die fiktive Grundgesamtheit nur bedingt vorhanden.
- *keine Strukturgleichheit in Fall- und Kontrollgruppe.* Eine weitere Gefahr von Fall-Kontroll-Studie liegt darin, dass ein beobachteter Zusammenhang zwischen einer Exposition und einem Ereignis möglicherweise auf eine dritte Variable (*Confounder*) zurückzuführen ist. Dieser Prozeß des *Confoundings* wurde in der vorgestellten Studie durch paarweises Matching eingeschränkt (siehe Abschnitt 2.2.2, Seite 19).
- *Problematik bei der Selektion von Fällen und Kontrollen.* Bei der Auswahl der Untersuchungsgruppen sollte stets das Kriterium der Repräsentativität gewahrt werden. Dieser Anforderung wurde bei der Auswahl der Kontrollgruppen durch die Unterteilung des Untersuchungsgebietes in mehrere Einheiten und eine randomisierte Stichprobenziehung aus diesen Einheiten (siehe Abschnitt 2.2.2, Seite 19) entsprochen. Da das Rekrutierungsgebiet für die Kontrollgruppen mit dem Einzugsbereich des *Tamale Teaching Hospitals* korrespondierte, erfolgte die Auswahl der Fälle ebenfalls weitestgehend repräsentativ. Weiterhin ist durch die — verglichen mit anderen Fall-Kontroll-Studien zu dieser Thematik — hohe Rekrutierungszahl mit jeweils 290 Probanden pro Gruppe (FG, KG 1, KG 2) ein hoher Grad an Repräsentativität gegeben. So wurden z. B. in Gabon 100 Kinder pro Gruppe (Fallgruppe mit schwerer Malaria, Kontrollgruppe mit unkomplizierter Malaria) untersucht, in Tanzania umfasste die gesamte Studienpopulation 179 bzw. 178 Probanden während in Thailand 256 Fälle mit schwerer Malaria einer Kontrollgruppe (unkomplizierte Malaria) mit $n = 179$ gegenübergestellt wurden.

4.1.2 Ausgewählte Methoden

Diagnosestellung schwere Malaria

Die Diagnosestellung einer schweren Malaria erfolgt aus der mikroskopischen Parasitämiebestimmung und anhand klinischer Kriterien. In der Vergangenheit wurden diese Kriterien

mit dem Ziel die Sensitivität für die Detektion der schwerer Malaria zu verbessern mehrmals modifiziert. Die aktuelle Definition der WHO von 2000 [15] besitzt im Vergleich zur vorherigen Definition von 1990 [14] laut Untersuchungen in Senegal und Ghana eine höhere Sensitivität bei gleichzeitig geringerer Spezifität [12, 96]. So benötigten in Dakar, Senegal, Kinder, die nach der aktuellen Definition von 2000 — jedoch nicht nach den Kriterien von 1990 — als schwere Malaria Fälle identifiziert wurden, weniger therapeutische Interventionen. Weiterhin betrug die Mortalitätsrate bei diesen Kindern 0% [12].

Aus wissenschaftlicher Sicht und bezogen auf die in dieser Arbeit bearbeitete Fragestellung wäre es günstig, die Fallgruppe hinsichtlich des Zielereignisses (schwere Malaria) möglichst spezifisch auszuwählen, um einen eindeutigen Effekt der Expositionsfaktoren (*iNOS*-Polymorphismen) zeigen zu können. Diese Überlegung steht jedoch einem praktikablen Nachweisverfahren gegenüber, welches weitläufiger die gesuchte Erkrankung erfaßt und für die Versorgung der schweren Malaria das geeignetere ist. Zu beachten bleibt jedoch, dass bei der Diskussion der Ergebnisse verschiedener Studien unterschiedlich angewendete Diagnosekriterien die Interpretation aufgrund der eingeschränkten Vergleichbarkeit erschweren.

Eine weitere Schwierigkeit der Definition schwere Malaria liegt darin, dass für die Diagnose neben der Existenz diagnosesichernder klinischer Kriterien eine Parasitämie mit *Plasmodium falciparum* mikroskopisch nachgewiesen werden muss. Es wurde allerdings bereits gezeigt, dass der Wert für die Parasitendichte während einer Infektion eine extrem hohe Variation aufweist. So unterschieden sich zwei im Abstand von sechs Stunden angefertigte Dicke Tropfen einer Blutprobe eines infizierten Probanden hinsichtlich der mikroskopisch bestimmten Parasitendichte um Faktor 100 und mehr. Ebenfalls wurden im Rahmen einer Infektion regelmäßig negative mikroskopische Befunde beobachtet [98]. Als Gründe für diese Schwankungen wurden die Sequestrierung der infizierten Erythrozyten in postkapillären Venolen bzw. das massive Freiwerden von Parasiten bereits sequestrierter Erythrozyten diskutiert [98]. In der vorgestellten Studie ergab sich regelmäßig die Problematik, dass bei Kindern, die klinisch eindeutig die Kriterien für eine schwere Malaria erfüllten, bei der Parasitämiebestimmung keine Plasmodien (Trophozoitenform) im peripheren Blut mikroskopisch nachweisbar waren. Diese — potentiell für die untersuchte Fragestellung interessanten — Patienten wurden dann den Rekrutierungsbedingungen zufolge von der Fallgruppe ausgeschlossen.

Parasitämiebestimmung

Die mikroskopische Diagnose der Malaria mittels des gefärbten Blutausstrichs oder des *Dicken Tropfens* gilt als Goldstandard und zeichnet sich durch ihre unkomplizierte Durchführung vor Ort und geringe Materialkosten aus. Bei der Beurteilung des *Dicken Tropfens* werden pro Blickfeld mehrere übereinandergelagerte Erythrozytenschichten auf den Malariaerreger hin untersucht, wobei die Erythrozyten bereits lysiert sind. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt verschiedenen Autoren zufolge bei 10-20 Parasiten/ μl Blut [99] bzw. bei 20-50 Parasiten/ μl Blut [6] und kann — verglichen mit der Mikroskopie des Blutausstrichs — geringe Parasitämien besser erfassen. Während sich der *Dicken Tropfen* also eher zum Screening von relativ großen Mengen Blut eignet, dient der Blutausstrich der Identifizierung der Plasmodienspezies.

Die grössten Nachteile dieser Methode hingegen liegen in den langen Vorbereitungs- und Arbeitszeiten und einer erheblichen Abhängigkeit der Richtigkeit und Genauigkeit des Ergebnisses von der Fachkenntnis des Mikroskopierenden. Die Fehleranfälligkeit des Verfahrens wurde durch die in Abschnitt 2.2.3 (Seite 20) beschriebenen Konventionen über Ausnahmen in der gezählten Leukozytenzahl bei Hyper- bzw. Hypoparasitämien, einer intensiven Schulung des Untersuchers bzw. des Mikroskopierenden vor Beginn der Studie und der Mehrfachmikroskopie einzelner Präparate reduziert. Trotz allem geht man davon aus, dass mit steigender Parasitendichte auch die Reliabilität des Verfahrens zunimmt [100]

Hinsichtlich des rein qualitativen Nachweises einer Parasitämie mit *Plasmodium falciparum* besitzen neuere Verfahren wie z. B. die Amplifikation parasitärer DNA mittels Polymerasekettenreaktion zwar eine größere Sensitivität [101], jedoch ist nach der aktuellen Definition der *Schweren Falciparum Malaria* [15] weiterhin der mikroskopische Nachweis einer Parasitämie für die Diagnose ausschlaggebend. Außerdem bleibt die Durchführung des Dicken Tropfens das praktikablere und kostengünstigere Untersuchungsverfahren in den Tropen.

Was die Berechnung der Parasitendichte betrifft, kann die erhebliche Variabilität der wahren Leukozytenzahlen jedes einzelnen Probanden gegenüber eines angenommenen, festen Wertes für die durchschnittliche Leukozytenzahl (hier: 8000 pro μl Blut) zu ungenauen Ergebnissen führen. Dies betrifft zwar vor allem Werte für mittlere und hohe Parasitendichten und war somit für Diagnosestellung einer Malaria nach WHO 2000, d. h. bezüglich der rein qualitativen Entscheidung ob eine Parasitämie vorliegt (siehe Abschnitt 2.2.1, Seite 17) von untergeordneter Bedeutung.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Diskussion der in der vorgestellten Studie ermittelten Ergebnisse ist in vier Teile gegliedert (siehe Abbildung 4.1)

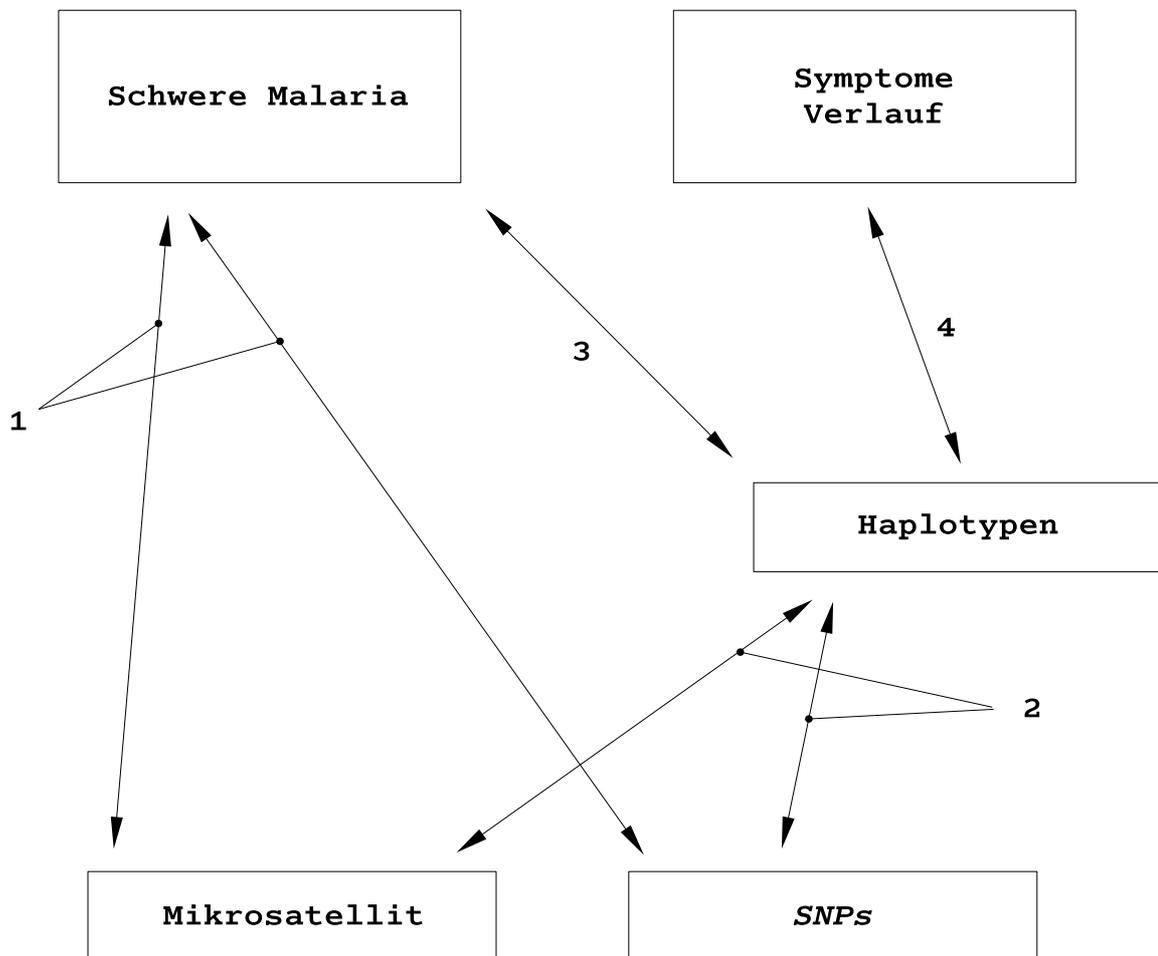


Abbildung 4.1: Übersicht zum Aufbau der Diskussion.

Dargestellt sind die jeweiligen Teilschritte zur Beantwortung der Frage bezüglich des Einfluss von Polymorphismen bzw. Haplotypen auf die schwere Malaria: 1 = Zusammenhang zwischen einzelnen Polymorphismen ($iNOS-954G \rightarrow C$, $iNOS-1173C \rightarrow T$, $-2,5 \text{ kb CCTTT}_{(n)}$ Mikrosatellit) und der schweren Malaria, 2 = Identifikation von Haplotypen ($iNOS-954G \rightarrow C/CCTTT_{(8)}$, $-1173C \rightarrow T/CCTTT_{(13)}$) bei der Assoziation der Polymorphismen untereinander, 3 = Zusammenhang zwischen Haplotypen und der schweren Malaria, 4 = Zusammenhang zwischen einzelnen Polymorphismen bzw. Haplotypen und der schweren Malaria

4.2.1 Die SNPs, der -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatellit und die schwere Malaria

Im ersten Teil der Diskussion der Ergebnisse geht es um den Einfluss der verschiedenen Polymorphismen auf die Entwicklung einer schweren Malaria (in Abbildung 4.1, Seite 54 beschriftet mit 1). In der hier vorgestellten Fall-Kontroll-Studie konnte für keinen der *iNOS*-Varianten ein protektiver Effekt auf die Entwicklung einer schweren Malaria gezeigt werden.

Hinsichtlich *iNOS*-954G→C konnte von Kun et. al., dem Erstbeschreiber des Polymorphismus, sowohl im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie als auch bei einer prospektiven Kohortenstudie in Gabon ein positiver Einfluss auf die Schwere der Malariaerkrankung und die Anzahl an Krankheitsattacken gezeigt werden [76, 82]. Allerdings konnten einerseits die vorgestellte Untersuchung, andererseits aber auch Beobachtungen in Tanzania und Gambia diese Ergebnisse nicht bestätigen [75, 79, 102]. Die in dem Untersuchungsgebiet von Nordghana ermittelte Allelfrequenz für *iNOS*-954G→C von circa 9% stimmte mit Angaben anderer Arbeiten überein [79, 82, 103]. So wird in Westafrika von einer relativ hohen Allelfrequenz von 7-10% ausgegangen, während diese in Asien 2-4% beträgt. Bei Europäern wird dieser Polymorphismus nicht gefunden [82]. Es wurde postuliert, dass diese Verteilung auf einen Selektionsvorteil gegenüber der Erkrankungswahrscheinlichkeit z. B. für die schweren Malaria beruht und im Rahmen der Evolution selektiert wurde.

Auch hinsichtlich des *iNOS*-1173C→T Polymorphismus konnte keine Risikoreduktion bezüglich der Entwicklung einer schweren Malaria gezeigt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit einer kürzlich durchgeführten Studie in Gambia überein [102], widerspricht jedoch der Arbeit von Hobbs et al. [75], in der dieser Polymorphismus erstmals beschrieben und mit der schweren Malaria assoziiert war. Darin wurde im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie in Tanzania gezeigt, dass das Risiko, an einer Malaria (sowohl unkomplizierte als auch komplizierte Verlaufsform) zu erkranken, für heterozygote Genträger (C/T) verglichen mit dem Wildtyp (C/C) 88% geringer war. Weiterhin ergab die Untersuchung einer Kohorte von Kindern aus Kenia einen Schutz vor der Malaria-bedingten Schweren Anämie für *iNOS*-1173C→T [75]. Die Allelfrequenz des Polymorphismus *iNOS*-1173C→T wurde für Tanzania sowie für Kenia jeweils mit etwa 4% angegeben, d. h. die Prävalenz dieses Polymorphismus in den entsprechenden Untersuchungsgebieten war vergleichbar mit Tamale (Allelfrequenz: 5%). Ferner fanden auch Hobbs et. al. die homozygote Form von *iNOS*-1173C→T seltener als man es nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erwarten würde [75].

Betrachtet man die Rolle des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten in Bezug auf die Malaria konnte diese Arbeit die Beobachtung von Burgner et al. in Gambia für Nordghana nicht bestätigen [78]. Dort war Homozygotie für Mikrosatellitenallele von kleiner als 11 Kopien mit zerebraler Malaria assoziiert. In dem Untersuchungsgebiet um Tamale wiesen Kinder mit schwerer Malaria verglichen mit Kindern mit asymptomatischer Malaria signifikant häufiger auf einem Allel den Genotyp CCTTT₍₁₆₎ auf, während CCTTT₍₁₀₎ signifikant seltener war. Bei der Interpretation dieser Beobachtung sollte jedoch berücksichtigt werden, dass der schützende Effekt von CCTTT₍₁₆₎ gegenüber der schweren Malaria nicht bei einem Vergleich mit gesunden Kindern bestätigt werden konnte. Gleiches gilt für das prädisponierende Einfluss von CCTTT₍₁₀₎, auch hier konnte im Vergleich mit Kontrollgruppe 2 kein Unterschied festgestellt werden. Hohe Kopienzahlen ($n \geq 13$) tauchten auf beiden Allelen eines Probanden in der Fallgruppe am häufigsten auf, weniger häufig bei parasitärischen Kindern und noch seltener bei Kindern ohne Parasitämie. Eine ähnliche Beobachtung wurde in Thailand gemacht [80]. Hier war das Vorliegen eines längeren Allels (CCTTT_(n) mit $n \geq 13$) mit schwerer Malaria assoziiert. Allerdings erschwerten die Unterschiede des Verteilungsmusters des Mikrosatelliten in verschiedenen geographischen Regionen den Vergleich von Erkrankungsrisiken bezüglich der Malaria zwischen Thailand und Westafrika. So wurde in Thailand keine bimodale Verteilung der CCTTT-Kopien wie in Tanzania, Gambia und in Nordghana beobachtet [78–80]. Insgesamt gingen die in der vorgestellten Studie ermittelten Ergebnisse hinsichtlich des Mikrosatelliten und der schweren Malaria mit Untersuchungen in Gabon und Tanzania konform, die keinen Zusammenhang zeigten [79, 82]. In einer kürzlich durchgeführten Studie wurden die Kopienanzahlen des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten auf die Assoziation mit NO-Plasma-Konzentrationen hin geprüft und kein signifikanter Zusammenhang beobachtet [104]. Auch dieses Ergebnis sprach dafür, dass der Mikrosatellit allein keinen Einfluß auf die Transkription von *iNOS* und damit den Verlauf der schweren Malaria hat.

4.2.2 Identifizierung von *iNOS*-Haplotypen

Im Anschluß an die Analyse einzelner Polymorphismen in Bezug auf die schwere Malaria wurden nun die identifizierten Polymorphismen untereinander in Beziehung gesetzt (in Abbildung 4.1, Seite 54 beschriftet mit 2). Die starke Kopplung von *iNOS*-954G→C und 8 CCTTT-Mikrosatellitenkopien bzw. *iNOS*-1173C→T und 13 Mikrosatellitenkopien lässt die Existenz von Haplotypen vermuten. Der Nachweis von Haplotypen mittels Segregationsanalyse konnte bei vorliegendem Studiendesign nicht durchgeführt werden. Ein weiterer Hinweis auf das Vorliegen von Haplotypen war jedoch, dass 7 von insgesamt 10 Kindern mit beiden *SNPs* jeweils 8 und 13 CCTTT-Kopien trugen. Und auch in anderen Studien wurden diese Hypothese unterstützt: Oates et al. beschrieben den Haplotyp *iNOS*-954G→C/CCTTT₍₈₎ bei Amerikanern afrikanischer Herkunft [105]. Die Existenz des Haplotyps *iNOS*-1173C→T/CCTTT₍₁₃₎ hingegen wurde erstmals in Tanzania vermutet [75]. Kürzlich wurden neben den oben genannten weitere Haplotypen in der Promotorregion identifiziert [102].

4.2.3 Haplotypen und schwere Malaria

Basierend auf der gegebenen Evidenz über das Vorliegen von Haplotypen wurde die Prävalenz von *iNOS*-954G→C/CCTTT₍₈₎ sowie von *iNOS*-1173C→T/CCTTT₍₁₃₎ auf Unterschiede in den einzelnen Untersuchungsgruppen geprüft (in Abbildung 4.1, Seite 54 beschriftet mit 3). Die Verteilung beider Haplotypen zeigte in den jeweiligen Untersuchungsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Folglich wurde das Risiko, eine schwere Malaria zu entwickeln, per se nicht durch diese Haplotypen modifiziert. Es liegen keine weiteren Untersuchungen vor, in denen dieser Zusammenhang geprüft wurde. Aufschlussreich jedoch ist die Tatsache, dass in einer aktuellen Studie bei Kindern aus Gambia ein weiterer *SNP*-Haplotyp, der durch einen Basenaustausch an Position -1659 vor dem *iNOS*-Transkriptionstart liegt, mit einem erhöhten Risiko für die zerebrale Malaria assoziiert war [102].

4.2.4 Polymorphismen bzw. Haplotyten und klinische Manifestation / Verlauf der schweren Malaria

Insgesamt konnte kein Zusammenhang der einzelnen Polymorphismen sowie der Haplotyten mit der schweren Malaria per se gezeigt werden. Das heißt, ein Kind mit einer entsprechenden genetischen Variation bzw. der Kopplung zweier Polymorphismen im Sinne der beschriebenen Haplotyten erkrankte mit der gleichen Wahrscheinlichkeit wie ein Kind mit genetischer Normvariante. Abschließend soll die Fragestellung erörtert werden, ob bei schon bestehender Erkrankung diese Polymorphismen bzw. Haplotyten einen Einfluss auf die Art der Manifestation und auf den Verlauf der schweren Malaria haben (in Abbildung 4.1, Seite 54 beschriftet mit 4). Hierzu wurden in der Fallgruppe Untergruppen gebildet und die verschiedenen Variationen in der *iNOS*-Promotorregion auf ihren Einfluß auf einzelne Symptome bzw. Verlaufsergebnisse der schweren Malaria untersucht. Außerdem wurden die Assoziationsberechnungen in Bezug auf die einzelnen Genotypen und dem fatalen Ausgang einer schweren Malaria unter Beachtung der bekannten Mortalitäts-Prädikationsfaktoren (Bewusstseinsverlust, Kreislaufkollaps, Hypoglykämie, Malnutrition [96]) mittels multipler logistischer Regressionsanalyse korrigiert.

Im Untersuchungsgebiet zeigte sich, dass der Haplotyp *iNOS*-954G→C/CCTTT₍₈₎ bei Patienten mit Hyperparasitämie signifikant seltener war und somit einen schützenden Effekt haben könnte. Der *SNP* *iNOS*-1173C→T, der Genotyp CCTTT₍₁₃₎/CCTTT₍₁₃₎ sowie der Haplotyp *iNOS*-1173C→T/CCTTT₍₁₃₎ gingen hingegen mit einer erhöhten Malaria-bedingten Letalität einher. Diese Ergebnisse sind möglicherweise dadurch bedingt, dass die pathophysiologischen Mechanismen, welche zu den verschiedenen klinischen Manifestation einer schweren Malaria führen, unterschiedlich von NO abhängig sind. So ist es z. B. vorstellbar, dass hohe NO-Level auf der einen Seite die Parasitenclearance begünstigen, gleichzeitig jedoch durch eine Knochenmarkssuppression die Entstehung einer Schweren Anämie fördern. Weiterhin wurde durch Beobachtungen in Gabon und Tanzania — bei denen die Polymorphismen positiv mit der NO-Produktion korrelierten [75, 82] — die Vermutung unterstützt, dass diese Polymorphismen bzw. die Haplotyten trotz der fehlenden Assoziation mit dem Erkrankungsrisiko per se einen Einfluß auf die einzelnen Symptome und Konditionen der schweren Malaria haben. Angesichts der komplexen Diagnosedefinition der schweren Malaria ist es einleuchtend, dass man den Effekt einer Genvariante auf eine einzelne Krankheitsmanifestation nur schwierig nachweisen kann.

4.3 Weitere Überlegungen und Schlußfolgerungen

Abschließend werden in diesem Kapitel allgemeine Überlegungen zu der erörterten Thematik vorgestellt und zusammenfassende Schlußfolgerungen aus den durchgeführten Analysen abgeleitet.

4.3.1 Funktionelle Bedeutung von Polymorphismen

Polymorphismen haben aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes oft keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz eines Protein, insbesondere wenn es sich um einen Austausch der dritten Base eines kodierenden Triplets handelt. Jedoch ist es denkbar, dass Basenaustausche in Regulationsabschnitten — wie die SNPs in der Promotorregion des *iNOS* Gens — die Interaktion von bestimmten Transkriptionsfaktoren im Sinne eines enhancements (d. h. die gesteigerte Transkription des Protein) bzw. einer repression (d. h. einer verminderten Transkription des Proteins) beeinflussen und damit zu einer quantitativen Veränderung der Proteinproduktion beitragen. Allerdings existieren noch keine Arbeiten, die diesen Mechanismus für einzelne *iNOS*-Polymorphismen zeigen konnten — obwohl einige Transkriptionsfaktoren in der Nähe binden [67]. Weiterhin gibt es die Möglichkeit, dass die untersuchten Polymorphismen per se keine Auswirkungen auf das Protein haben, sondern nur Marker darstellen, die sich mit einer funktionell relevanten — jedoch noch unbekanntem — Genregion im Verteilungsungleichgewicht befinden. Die Tatsache, dass die Frequenzen mit denen die Polymorphismen in verschiedene geographischen Regionen auftreten sehr unterschiedlich sind bzw. die unterschiedliche Stabilität der entsprechenden Verteilungsungleichgewichte, könnte auch die widersprüchlichen Ergebnisse aus verschiedenen Studien erklären. Zusätzlich unterscheiden sich die Verlaufsmuster der schweren Malaria in verschiedenen Malariagebieten unterschiedlicher Transmission [6] und erschweren damit ebenfalls den Vergleich der Beobachtungen über die Relevanz der untersuchten Polymorphismen bzw. die Kombination dieser im Sinne von Haplotypen in Bezug auf die Malaria.

4.3.2 Relevanz von Haplotypen

Laut Clark et al. ist nachvollziehbar, dass die Untersuchung eines einzelnen Polymorphismus mit Basenaustausch nur mit einer relativ kleinen Wahrscheinlichkeit die wirkliche, funktionell relevante Genvariation detektieren kann [106]. So gilt generell die Analyse von Haplotypen, bei der das gleichzeitige Vorliegen mehrerer Polymorphismen auf einem Allel untersucht wird, als das geeignetere Verfahren um komplexe Krankheitsassoziationen aufzudecken [106, 107]. Dieses Verfahren beruht auf der Annahme, dass beim Vorliegen eines Verteilungsungleichgewichts zwischen nicht-funktionellen Markern (z. B. der -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatellit) und funktionellen Markern bzw. Mutationen (unbekannte Lage im Gen) leichter Assoziationen zu bestimmten Erkrankungen gefunden werden können, da ein größerer Genabschnitt (z. B. im Gegensatz zu einer einzelnen funktionell relevanten Punktmutation) in die Betrachtung einfließt [107]. Auch die in der vorgestellten Untersuchung ermittelten Ergebnisse gaben einen Hinweis darauf, dass — verglichen mit *SNPs* — vielmehr *iNOS*-Haplotypen mit der schweren Malaria bzw. mit bestimmten Krankheitsmanifestationen assoziiert sind. So hatten die in dieser Arbeit identifizierten Haplotypen zwar keinen signifikanten Einfluss auf die Auftretenswahrscheinlichkeit einer schweren Malaria, jedoch konnte ein Effekt auf bestimmte Krankheitsmanifestationen bzw. Verlaufereignisse (Hyperparasitämie, Letalität) beobachtet werden. Letztlich bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Rolle von Haplotypen sowohl in der *iNOS*-Promotorregion als auch im Gen selbst eindeutig aufzuklären.

4.3.3 Funktionelle Relevanz von NO bei der Malaria

Die Analyse verschiedener Genvarianten in der *iNOS*-Promotorregion in Bezug auf die klinische Manifestation der Malaria wird auch in Zukunft letztlich keinen Kausalzusammenhang liefern können. Deshalb sollten auch funktionelle Mechanismen, die die jeweiligen Polymorphismen und den Krankheitsverlauf der Malaria verbinden, untersucht werden. Nach dem aktuellen Stand besitzt NO bezüglich der Malaria ein breites Spektrum an Effekten, die sowohl protektiv als auch schädlich sind. So wurden kürzlich im Rahmen einer Untersuchung in Blantyre, Malawi, eine signifikant höhere *iNOS*-Expression in Gehirn-Autopsiepräparaten von schweren Malaria Fällen im Vergleich zu Kontrollpräparaten beobachtet [108]. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Beobachtungen in Tanzania, bei denen eine hohe *iNOS*-Expression in zirkulierenden Monozyten invers mit der Schwere der Malaria assoziiert war [56]. Mit anderen Worten schützten dort eine hohe *iNOS*-Expression vor kompli-

zierten Krankheitsverläufen. Im Studiengebiet um Tamale zeigte sich unter anderem eine Assoziation von hohen NO-Plasma-Konzentrationen und geringeren Parasitendichten bei jungen Patienten, während bei Kindern über zwei Jahren hohe NO-Plasma-Konzentrationen mit geringeren Hb-Werten korrelierten (Cramer et al. 2004, zum Druck angenommen in *Trop Med Int Health*). Hiernach ist vorstellbar, dass besonders jüngere Kinder, die noch keine ausreichenden Immunmechanismen gegen *P. falciparum* entwickelt haben, von den NO-Wirkungen profitieren. Dieser Effekt erlischt demnach mit der Ausbildung spezifischer Abwehrmechanismen gegen den Parasiten allmählich. Letztlich überwiegen bei zunehmenden Alter die hämatotoxischen Wirkungen NOs und könnten so zu einer verstärkten schweren Anämie neigung beitragen. So sind es zusätzlich die ambivalenten Effekte von NO, die die Beantwortung der Frage nach der funktionellen Relevanz genetischer Variationen in der *iNOS*-Promotorregion im Hinblick auf die Malaria erschweren.

4.3.4 Ausblick

Zukünftig bleibt die weitere Aufdeckung von funktionellen Polymorphismen im *iNOS* Gen mittels Haplotypenanalyse ein aktueller Forschungsgegenstand. Dafür ist das bessere Verständnis von pathophysiologischen NO-Mechanismen von Bedeutung. Erst wenn diese Vorgänge besser verstanden werden, ist es denkbar, das Wissen um iNOS bzw. NO als potentielles Ziel für therapeutische Interventionen o. ä. zu diskutieren. Bis dahin scheinen derartige Überlegung jedoch noch fern.

4.3.5 Schlussfolgerungen

1. In dieser Arbeit an insgesamt 870 Kindern ergab sich eine Allelfrequenz für *iNOS*-954G→C von 9,0% und für *iNOS*-1173C→T von 5,4%. Der Unterschied in den einzelnen Untersuchungsgruppen war nicht signifikant. Folglich wurde das Risiko, eine schwere Malaria zu entwickeln nicht durch diese *SNPs* modifiziert.
2. Auch die Verteilung des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten zeigte in den jeweiligen Untersuchungsgruppen keinen signifikanten Unterschied.
3. Aufgrund der starken Assoziation der *SNPs* und einer bestimmten Anzahl an Mikrosatellitenkopien wurde die Existenz der Haplotypen *iNOS*-954G→C/CCTTT₍₈₎ und *iNOS*-1173C→T/CCTTT₍₁₃₎ postuliert.
4. Diese Haplotypen hatten ebenfalls keinen Einfluß auf das Risiko an einer schweren Malaria zu erkranken, d. h. die Prävalenzen der entsprechenden Genotypen unterschieden sich in den jeweiligen Untersuchungsgruppen nicht signifikant.
5. Der Haplotyp *iNOS*-954G→C/CCTTT₍₈₎ bot einen Schutz vor Hyperparasitämie während *iNOS*-1173C→T/CCTTT₍₁₃₎ mit einer erhöhten Malaria-bedingten Letalität einherging. Diese Auswirkung der betreffenden Genvarianten auf singuläre Malariaeffekte könnte auf die pleiotropen Effekte von NO im Rahmen der Immunreaktion als Antwort auf die Malariainfektion zurückgeführt werden.
6. Die Ergebnisse dieser Arbeit können nicht ausschließen, dass identifizierten Polymorphismen für die schwere Malaria per se ohne Funktion sind und die analysierten Haplotypen die tatsächlich funktionelle Genregion bloß im Sinne von Markern widerspiegeln.
7. Die aus dieser Arbeit abgeleiteten Schlußfolgerungen gelten lediglich für die Untersuchungsregion nämlich für die *Northern Region* Ghanas. Die Vergleichbarkeit mit Ergebnissen aus anderen Studien wird durch unterschiedliche Diagnosedefinitionen der schweren Malaria, durch transmissionsabhängige Verlaufsmuster der Erkrankung und schließlich durch geographischen Unterschiede bezüglich der Frequenz und Stabilität verschiedener Polymorphismen bzw. Haplotypen eingeschränkt.