

Aus dem Institut für Tropenmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Einfluss von Polymorphismen der Toll-Like-Rezeptoren 4 und 9 auf
die Malaria in der Schwangerschaft und die schwere Malaria in
Ghana*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Cordula von Kleinsorgen

aus Essen

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. F.P. Mockenhaupt
 2. Prof. Dr. K. Stark
 3. Prof. Dr. G.D. Burchard

Datum der Promotion: 24.02.2012

*Die Wissenschaft, richtig verstanden, heilt den Menschen von seinem Stolz;
denn sie zeigt ihm seine Grenzen.
(Albert Einstein)*

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	7
1.1	Grundlagen der Malaria tropica	8
1.1.1	Malaria tropica in der Schwangerschaft	10
1.1.2	Malaria tropica im Kindesalter	11
1.2	Die Bedeutung von Toll-like Rezeptoren	12
1.2.1	Aufbau und Signaltransduktion von TLRs	13
1.2.2	Die Bedeutung von Punktmutationen	15
1.2.3	Die Bedeutung von TLRs in Bezug auf die <i>P.-falciparum</i> -Infektion	15
1.2.4	Der Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9)	16
1.2.5	Der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4)	17
1.3	Fragestellung und Zielsetzung	18
2	Patienten, Material und Methoden	20
2.1	Studienort und Studiendesigns der Studie zu schwangeren Frauen in Agogo	20
2.2	Studienort und Studiendesigns der Fall-Kontrollstudie in Tamale, Nordghana	21
2.3	Nachweis der <i>TLR4</i> - und <i>TLR9</i> - Polymorphismen per Real-Time-PCR	22
2.3.1	Real-Time-PCR	22
2.3.2	Lightcyclerprotokoll für die Genotypisierung von <i>TLR9-T-1237C</i> und <i>TLR9-T-1486C</i>	24
2.3.3	Lightcyclerprotokoll für die Genotypisierung von <i>TLR4-D299G</i> und <i>TLR4-T399I</i>	25
2.3.4	Lightcyclerprotokoll für die Genotypisierung von <i>TLR4-E474K</i>	27
2.4	Untersuchung des Polymorphismus <i>TLR4Q510H</i> mittels Restriktionsverdau	29
2.4.1	Prinzip der Gelelektrophorese	29
2.4.2	Restriktionsverdau mit <i>HpyCH4III</i>	30
2.5	Sequenzierung der <i>TIR-Domäne</i> von <i>TLR4</i>	32
2.5.1	DNA-Sequenzierung nach Sanger	33
2.5.2	Strategie der automatischen Sequenzierung	33
2.7	Statistische Berechnungen	35
2.7.1	Berechnung der Parasitendichte	36
2.7.2	Überprüfung von Unterschiedshypothesen	36

3	Ergebnisse	38
3.1	Darstellung der Basisdaten der 304 Erstgebärenden aus Agogo	38
3.2	Häufigkeit der <i>TLR4</i> - und <i>TLR9</i> -Polymorphismen bei Erstgebärenden aus Agogo	39
3.3	Zusammenhänge zwischen <i>TLR</i> -Polymorphismen und Malaria bei Erstgebärenden	39
3.4	Darstellung der Basisdaten der Kinder aus Tamale	42
3.5	Klinische Manifestation der schweren Malaria	43
3.6	Häufigkeit der <i>TLR4</i> -Polymorphismen <i>TLR4</i> -E474K und <i>TLR4</i> -Q510H bei Kindern aus Tamale	44
3.7	Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von <i>TLR4</i> -E474K und <i>TLR4</i> -Q510H und der schweren Malaria	44
3.8	Identifizierung neuer <i>TLR4</i> -Polymorphismen	45
4	Diskussion	46
4.1	Kritische Beurteilung von Studiendesigns und Methoden	46
4.1.1	Studiendesign der Querschnittstudie zu schwangeren Frauen in Agogo	46
4.1.2	Studiendesign der Fall-Kontroll-Studie zu schwerer Malaria in Tamale	47
4.1.3	Nachweis der <i>Plasmodium falciparum</i> -Infektion und der Parasitendichte	47
4.1.4	Diagnosestellung schwerer Malaria	48
4.2	Vor- und Nachteile der angewendeten Labormethoden	49
4.3	Diskussion der Ergebnisse	50
4.3.1	Die Bedeutung von <i>TLR4</i> - und <i>TLR9</i> -Polymorphismen für die Malaria in der Schwangerschaft und die schwere Malaria in der Kindheit	50
4.3.2	Mögliche Auswirkungen von <i>TLR4</i> - und <i>TLR9</i> -Polymorphismen auf die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien gegen Malaria	53
5	Zusammenfassung	56
	Materialien und Bezugsquellen	59
	Literaturverzeichnis	62
	Lebenslauf	69
	Danksagung	70

1 Einleitung

Die Malaria ist nach wie vor eines der größten globalen Probleme unserer Zeit, vor allem für die Gesundheit und das ökonomische Wohlergehen der ärmsten Teile der Welt. Es leben 3,2 Milliarden Menschen, dies entspricht 50% der Weltbevölkerung, in Malariagebieten, von denen 350-500 Millionen jährlich erkranken (1). Ungefähr 60% der klinischen Malariafälle und 80% der Malaria-assoziierten Todesfälle (ca. 520.000-1.126.000 pro Jahr) ereignen sich in Afrika südlich der Sahara. Die Leidtragenden sind vor allem Schwangere und Kinder unter 5 Jahren (2, 3). Seit Jahrzehnten gibt es internationale Anstrengungen, die Malaria zu bekämpfen. 1998 wurde die Organisation Roll Back Malaria (RBM), eine Kooperation aus Forschungsgemeinschaften, internationalen Organisationen und Regierungen betroffener Länder, gegründet. Als Ziel der Interessengemeinschaft wurde 1998 formuliert, bis 2010 die malariaassoziierten Morbiditäts- und Mortalitätszahlen zu halbieren. In Zusammenarbeit mit der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation* (WHO)) konnten in den letzten Jahren Fortschritte in der Initiierung von Programmen zur Verhütung der Malaria und ihrer Behandlung verzeichnet werden (3). Die Halbierung der malariaassoziierten Morbiditäts- und Mortalitätszahlen wurde jedoch nicht erreicht. Die Programme beinhalten die Unterstützung von Projekten, die zu einem besseren Zugang zu Medikamenten, zu Prävention und Kontrolle der Malaria während der Schwangerschaft und im Kindesalter sowie zu einem verbesserten Umgang mit Notfällen und Malariaepidemien führen sollen (2, 3). Ein zusätzlicher Schwerpunkt ist die Ausgabe von Insektizid-behandelten Moskitonetzen (insecticide-treated nets, ITNs)

Ein besonderer Focus liegt auf der Prävention der Malaria während der Schwangerschaft, da Malaria während der Schwangerschaft sowohl die mütterliche als auch die fetale Morbidität und Mortalität erhöht (3). Jährlich werden etwa 50 Millionen Frauen in Malariaendemiegebieten schwanger (4). Malaria in der Schwangerschaft kann zu mütterlicher Anämie, intrauteriner Wachstumsretardierung, Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht des Neugeborenen führen (2, 3). Vor allem das niedrige Geburtsgewicht ist für eine erhöhte Neugeborenensterblichkeit nach einer Malaria in der Schwangerschaft ausschlaggebend (2). Die Zahl der an den Folgen einer Malaria in der Schwangerschaft sterbenden Säuglinge liegt bei 75.000 - 200.000 pro Jahr (1). Hinzu kommen noch ca. 881.000 Todesfälle jährlich an Malaria wovon 91% in Afrika zu finden sind, 85% davon bei Kindern unter 5 Jahren.

Laut RBM werden Medikamentenresistenzen und demographische Gegebenheiten die Morbidität und Mortalität der Malaria zukünftig noch erhöhen (3). Schlechte Infrastrukturen

in den betroffenen Ländern, Korruption, Krieg und ein geringer Bildungsstand der Bevölkerung werden weiterhin vielen Menschen den Zugang zu Moskitonetzen, effektiven Medikamenten und Krankenhäusern verwehren (1).

Die Aufgabe an die internationale Forschungsgemeinschaft ist es, die ergriffenen Maßnahmen zur Bekämpfung der Malaria regelmäßig zu kontrollieren, sowie ihre Effektivität zu bewerten und zu optimieren. Hierbei ist es zum einen wichtig, die politischen und ökonomischen Gegebenheiten der betroffenen Länder zu verstehen, um geplante Projekte mit größtmöglichem Erfolg durchzuführen, zum anderen sich mit der Untersuchung der biologischen Mechanismen der Malaria zu beschäftigen. Ziel ist es, ein besseres Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen der Malaria sowohl von Erreger- als auch von Wirtsseite aus zu erlangen.

Ein Schwerpunkt liegt auf der Untersuchung des Wirtsgenoms. Die Entdeckung, dass Veränderungen im Wirtsgenom, wie z.B. bei der Sichelzellanlage, den Verlauf der Malaria und ihren Krankheitsausgang beeinflussen können (1), führt zu der Frage, ob es noch weitere Veränderungen im Wirtsgenom gibt, die die Manifestation der Malaria schwächen oder verstärken. Die Untersuchung dieser Veränderungen und ihrer Physiologie, oder Pathophysiologie, soll in der Zukunft dazu beitragen, neue und effektive Präventions- und Behandlungsstrategien gegen die Malaria zu entwickeln. Ein besseres Verständnis der ablaufenden biologischen Mechanismen soll dabei helfen z.B. neue Medikamente zu finden oder die Entwicklung einer Malariaimpfung voranzutreiben. In diesen Rahmen ist auch die vorliegende Arbeit einzuordnen.

1.1 Grundlagen der Malaria tropica

Die Malaria tropica wird vom *Plasmodium falciparum* ausgelöst. Dieses gehört zu den vier humanpathogenen Plasmodien (P.): *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*. Sie bilden zusammen mit Toxoplasmen und Leishmanien die Klasse der Sporentierchen. Während der Blutmahlzeit injiziert die weibliche Anopheles-Mücke mit dem Speichel Sporoziten, die binnen 30 Minuten in das Leberparenchym eindringen und sich dort durch ungeschlechtliche Vielteilung vermehren (Schizogenie). Die durch Teilung der Schizonten entstandenen Parasitenformen heißen Merozoiten. Diese gelangen nach mehreren Tagen aus der Leber in die Blutbahn (Ende der Präpatenzzeit), dringen in Erythrozyten ein und vermehren sich durch ungeschlechtliche Vielteilung (erythrozytäre Schizogonie) bis der Erythrozyt zerfällt. Durch den Zerfall der Erythrozyten werden wieder Merozoiten frei,

welche neue Erythrozyten befallen. Nach ca. 5 Tagen differenzieren sich in den Erythrozyten einige Merozoiten in weibliche (Makrogametozyten) und männliche (Mikrogametozyten) Geschlechtsstadien. Die Gametozyten werden bei einer erneuten Blutmahlzeit von der Anopheles-Mücke aufgenommen. In ihrem Magen vereinigen sich die Gametozyten zur Zygote, welche die Magenwand der Mücke durchdringt. Außerhalb der Magenwand entsteht eine Oozyste, in der sich Sporozoiten entwickeln, die in die Speicheldrüse der Mücke wandern (5). Von hier an beginnt der Zyklus aufs Neue.

Durch den Befall der Erythrozyten kommt es zu deren strukturellen Veränderung. Die Dauer des erythrozytären Zyklus ist erregerabhängig, wodurch es im Verlauf zu unterschiedlicher Periodizität der Fieberschübe kommt, z.B. 2 Tage bei *P. vivax* und alle 3 Tage bei *P. malaria*. Der Zerfall der Erythrozyten ist ein Grund für die entstehende Anämie. Zusätzlich führt die Bindung von Parasitenkomponenten an befallene und gesunde roten Blutzellen zu einer überschießenden Phagozytose durch aktivierte Makrophagen. In der Milz kommt es zur vermehrten Aussonderung der veränderten Erythrozyten, im Knochenmark zur Drosselung der Knochenmarksfunktion und zu Dyserythropoese. Zudem setzt eine Autohämolyse ein (6, 7, 8). Diese Mechanismen tragen zur Anämie bei und können auch zu Neutropenie und Thrombozytopenie führen (6, 9).

Gelangt der Erreger in die Blutbahn, wird das angeborene Immunsystem durch spezielle Oberflächenphospholipide aktiviert. Die angeborene Immunabwehr erkennt zum einen das *P. falciparum* Oberflächenphospholipid Glykosylphosphatidylinositol (GPI), zum anderen das hydrophobe Hämopolymer Hämozoin (HZ), das während der Infektion freigesetzt wird. Anschließend wird eine inflammatorische Zytokinkaskade in Gang gesetzt. Hierbei werden der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) freigesetzt, diese induzieren weitere proinflammatorische Interleukine (z.B. IL-6) (10). Die Interleukinausschüttung ist maßgeblich an der Entwicklung des Fiebers beteiligt. Zudem ist die Suppression des Knochenmarkes vermutlich TNF- α -vermittelt (6, 9).

Mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten bilden an der Oberfläche sogenannte Knobs aus. Diese werden durch das *P. falciparum* Erythrozyten Membran Protein 1 (PfEMP1) gebildet und vermitteln die Bindung an verschiedene Rezeptoren des Endothels (Zytoadhaerenz). Durch diese Bindungen kommt es zur Sequester- und Rosettenbildung, die zu lokalen Entzündungsreaktionen, Mikrozirkulationsstörungen und Gewebischämie führen. Die Sequesterbildungen sind der Grund für die schweren Organkomplikationen der Malaria, wie Lungenödem, Nierenversagen, Multiorganversagen und zerebrale Malaria (6, 7, 9).

Die klinische Manifestation der *Malaria tropica* hängt vom Immunstatus des Wirtes ab. Durch regelmäßige *P.-falciparum*-Infektion kommt es in Endemiegebieten zur Entwicklung einer Semiimmunität, die im Alter von ca. 5 Lebensjahren vollständig ausgereift ist. Diese erworbene Immunität schützt die Menschen vor der schweren Malaria, eine asymptomatische Parasitämie ist in Gebieten mit hoher Transmissionsrate bei Erwachsenen der Regelfall. (9). Es gibt zwei Lebensabschnitte, in denen es vermehrt zur klinisch manifesten Malaria kommt. Zum einen die frühe Kindheit (0,6 bis 5 Lebensjahre), in der sich die Semiimmunität erst noch entwickeln muss. Zum anderen die erste Schwangerschaft, in der es zu einer Infektion mit relativ immununfremden plazentaadhärenten *P.-falciparum* -Stämmen kommt, die den Wirt nur in der Schwangerschaft befallen können (11).

Die ersten Symptome der *Malaria tropica* sind unspezifisch. Initial kann der Patient die Zeichen einer einfachen Grippe empfinden, wie Kopfschmerzen, Müdigkeit, Übelkeit, Muskelschmerzen, Durchfall und leichtes Fieber. Mit dem Zerfall der Erythrozyten kommt es, durch die Freisetzung von endogenen Pyrogenen, zum Kardinalsymptom der Malaria, plötzlich ansteigendem, hohem Fieber mit Schüttelfrost. Zusätzlich kann es zu starken Kopfschmerzen, Unwohlsein und Appetitverlust kommen. Nach dem Fieber folgt eine Periode mit starkem Schwitzen und Erschöpfung. Bei einer Infektion mit *P. falciparum* können sich die Symptome der schweren Malaria binnen weniger Tage ausbilden und tödlich sein (9). Die schwere Malaria ist nach WHO-Kriterien gekennzeichnet durch zerebrale Malaria mit Bewusstseinsverlust, schwere Anämie, Nierenversagen, Lungenödem, Hypoglykämie, Kreislaufversagen mit Schock, spontanes Zahnfleisch-, Nasen- oder gastrointestinales Bluten, generalisierte Krämpfe, Azidose, makroskopische Haemoglobinurie sowie die postmortale Diagnose (12).

1.1.1 Malaria tropica in der Schwangerschaft

Die *P.-falciparum*-Infektion in der Schwangerschaft ist in vielen Endemiegebieten die Hauptursache für mütterliche Anämie, Frühgeburt, intrauterine Wachstumsretardierung, geringes Geburtsgewicht und schließlich Säuglingssterblichkeit (11, 13). Ein erhöhtes Infektionsrisiko liegt besonders bei Erstgebärenden vor. Die häufig symptomatische Infektion in der ersten Schwangerschaft wird vor allem auf den Befall mit noch immununbekannten plazenta-adhaerenten *P.-falciparum*-Stämmen zurückgeführt (14). Zusätzlich kommt es während der Schwangerschaft zu einer physiologischen Immunsuppression. Eine ebenfalls physiologische Verjüngung der Erythrozytenpopulation bietet zusammen mit der nicht seltenen Erhöhung der Glukosekonzentration im peripheren Blut ideale Voraussetzungen für

die Vermehrung von *P. falciparum*. Darüber hinaus erhalten Schwangere in den Endemiegebieten 3-5 mal mehr Moskitostiche als ihre nichtschwangeren Altersgenossinnen. Die Ursachen hierfür sind unklar (13, 15).

Die plazentaadhärenten *P.-falciparum*-Stämme exprimieren PfEMP1-Varianten, die an spezifische Liganden der plazentaren Synzytiotrophoblastenmembran binden (16). Die Bindungsdomäne des PfEMP1 wird klonal exprimiert, ist hochvariabel und stellt das Hauptantigen in der Erkennung des Erregers dar (16). Da plazentaadhärente *P.-falciparum* Stämme im Kindesalter nur sehr unwahrscheinlich eine Infektion etablieren können, unterbleibt die Ausbildung von spezifischen Immunmechanismen in diesem Lebensalter. Die Erstschwangere sieht sich daher mit einem relativ immunfremden Erreger konfrontiert. Es resultiert eine weitgehend uneingeschränkte parasitäre Multiplikation vor allem im intravillösen Raum, und es kommt zur ausgeprägten klinischen Manifestation (16). Im Verlauf der ersten und insbesondere mit weiteren Schwangerschaften entwickeln sich effektive Immunmechanismen. Das Parasitenwachstum wird kontrolliert und die klinische Manifestation wird geringer (17).

Bei ungehemmter Vermehrung der Parasiten resultieren eine Sequesterbildung in der Plazenta und eine exzessive lokale Akkumulation von befallenen Erythrozyten, was zur Induktion einer proinflammatorischen Antwort von Makrophagen und Zytokinausschüttung führt. Diese ist über die Plazentaschädigung mit einer intrauterinen Wachstumsretardierung des Feten, sowie ein geringes Geburtsgewicht und Frühgeburtlichkeit vergesellschaftet (18). Bei der histopathologischen Untersuchung einer mit *P. falciparum* befallenen Plazenta findet man in den intervillösen Räumen Infiltrationen mit Entzündungszellen, Chorionnekrosen und Trophoblastenverdickungen, die das fetale Wachstum ungünstig beeinflussen (19).

Das angeborene Immunsystem scheint einen entscheidenden Beitrag zur Bekämpfung des Parasiten in der ersten Schwangerschaft beizusteuern. Veränderungen in den Signalkaskaden des angeborenen Immunsystems scheinen eine Rolle für die Manifestation der Malaria tropica zu spielen (11). Eine entscheidende Rolle in der angeborenen Immunantwort haben die Toll-Like-Rezeptoren (TLR). Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in TLRs zur Verstärkung der schweren Malaria im Kindesalter führen (20).

1.1.2 Malaria tropica im Kindesalter

In den Hochendemiegebieten verlaufen Infektionen mit *P. falciparum* im Kindesalter in der Regel unkompliziert. Allerdings kommt es in 1-2% der Fälle zu schwerer Malaria. Die Letalitätsrate der schweren Malaria liegt zwischen 5-50% (1, 9). Die höchste

malariaassoziierte Morbiditäts- und Mortalitätsrate findet man im Altersabschnitt 0,5-5 Jahre (3). Neugeborene und Säuglinge sind das erste halbe Jahr weitgehend durch mütterliche Antikörper geschützt (9). Ein weiterer Schutz vor einer Infektion ist das anfänglich noch vorhandene fetale Hämoglobin (HbF), welches durch seinen strukturellen Unterschied zum Hämoglobin des Erwachsenen (Hb) den Befall mit *P. falciparum* erschwert (9). Bis zum Erlangen einer Semiimmunität, die sich in Gebieten mit hoher Transmissionsrate bis zum 5 Lebensjahr entwickelt, spielt das angeborene Immunsystem eine wesentliche Rolle in der Abwehr des Parasiten (9).

Warum einige Kinder schwer an Malaria erkranken und andere nur eine leichte oder gar keine Malaria bekommen, ist Gegenstand der Forschung. Man vermutet einen Zusammenhang mit der Erkennung des Parasiten durch das angeborene Immunsystem, beziehungsweise einen Zusammenhang mit Defekten im angeborenen Immunsystem speziell den TLRs (20, 21). Bisher konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in den TLRs zu einer verstärkten Manifestation von schwerer Malaria im Kindesalter führen (20).

1.2 Die Bedeutung von Toll-like Rezeptoren

Das menschliche Immunsystem reagiert mit verschiedenen Mechanismen auf das Eindringen von Pathogenen. An der Immunantwort sind eine Vielzahl von Organen, Zellen und Botenstoffen beteiligt. Im Wesentlichen wird zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität unterschieden.

Das angeborene Immunsystem ist ein evolutionsüberdauerndes System zur Abwehr von mikrobiellen Infektionen. Die Toll-Like-Rezeptoren (TLR) gehören zu einer Hauptklasse von Rezeptoren, die molekulare Strukturen von verschiedenen Pathogenen, sogenannte pathogen-assoziierte- molekulare Muster (*pathogen-associated-molecular pattern* (PAMP)), erkennen. Die Gruppe der Pathogene umfasst Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen. Auf die Erkennung des Pathogens folgt eine Signalinduktion durch die TLRs, aus der eine Expression von Genen folgt, die zur Inflammation, zur Induktion der antiviralen Antwort und zur Aktivierung von dendritischen Zellen führt. Je nach TLR aktivieren diese über verschiedene Signalwege Transkriptionsfaktoren, die zu einer Zytokinausschüttung führen, um spezielle biologische Antworten gegen den eindringenden Mikroorganismus hervorzurufen (22). Durch die Entdeckung der TLRs wurde die These unterstützt, dass das angeborene Immunsystem spezifisch reagiert und unterscheiden kann, um welche Art Pathogene es sich handelt (23).

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems ist eine Vorbedingung für die Induktion des erworbenen Immunsystems. Die Erkennung der PAMPs führt zur Aktivierung von

Makrophagen und so zur Phagozytose des mikrobiellen Organismus und anschließend zur Antigenpräsentation, welche die Induktion des erworbenen Immunsystems hervorruft (24).

1.2.1 Aufbau und Signaltransduktion von TLRs

Bis heute sind 11 Mitglieder (TLR1-TLR11) der TLR-Familie bekannt. Es handelt sich um integrierte Membranglykoproteine Typ 1, die in ihrer zytoplasmatischen Region homolog zu den Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1R) sind, die zunächst in Insekten gefunden und als wichtig für die Immunabwehr beschrieben wurden (22). Sowohl die TLRs als auch der IL-1R haben einen aus ca. 200 Aminosäuren bestehenden zytoplasmatischen Teil, die sogenannte Toll/IL-1R-(TIR) Domäne. Innerhalb der TIR Domäne umfassen die homologen Regionen drei Boxen, welche entscheidend für die Signaltransduktion sind (22).

Die TIR-Domäne besteht aus einer α -Helix und einer β -Faltblattstruktur, die durch Schleifen (*Loops*) verbunden sind (22). Die extrazellulären Regionen unterscheiden sich allerdings deutlich (24). Die TLRs haben eine leucinreiche Wiederholung (*leucin rich repeat*, LRR) in Form einer Hufeisenstruktur, von der angenommen wird, dass ihre konkave Oberfläche direkt für die Erkennung der Pathogene verantwortlich ist. Die Transmembrandomäne besteht aus ca. 60 Aminosäuren und enthält 2 bis 4 Cysteinbausteine (schematischer Aufbau siehe Abb. 1) (25).

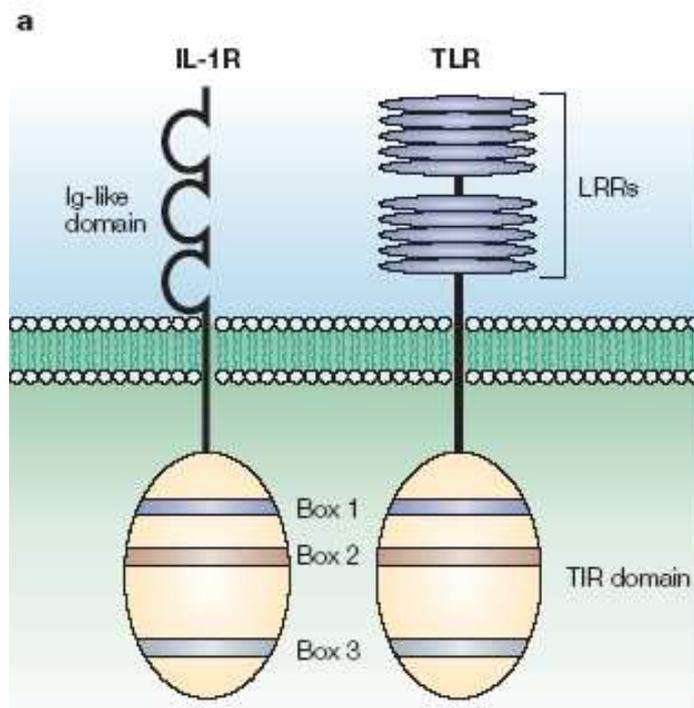


Abbildung. 1: Darstellung eines TLR und des IL-1R aus (25).

Die jeweilige subzelluläre Lokalisation der Rezeptoren hängt mit dem molekularen Muster ihrer Liganden zusammen. So befinden sich zum Beispiel TLR2 und TLR4 auf der Zelloberfläche von Makrophagen, sie aktivieren die Phagosomen, nachdem der Ligand gebunden hat. Im Gegensatz dazu befindet sich TLR9 im endoplasmatischen Retikulum und erkennt nukleinsäureähnliche Strukturen (22).

Nachdem der Ligand an die LRR des TLR gebunden hat, verschmelzen sie miteinander und der Rezeptor verändert seine Form, so dass die TIR-Domäne im Zytoplasma eine Signalkaskade anstößt. Diese beinhaltet die folgenden Moleküle: *Myeloid differentiation primary-response* (MyD88), *IL-1R-associated kinase* (IRAKs), *Transforming growth factor- β* (TGF- β)-*activated kinase* (TAK1), *TAK1-binding protein 1* (TAB1), TAB2, Tumornekrosefaktor (TNF) und den *TNF-receptor-associated factor 6* (TRAF6) (25). An ihrem Ende steht die Transkription von NF κ B, TNF- α und IL6, die zur Induktion der proinflammatorischen Antwort führt (26) (Schematische Darstellung siehe Abb.2).

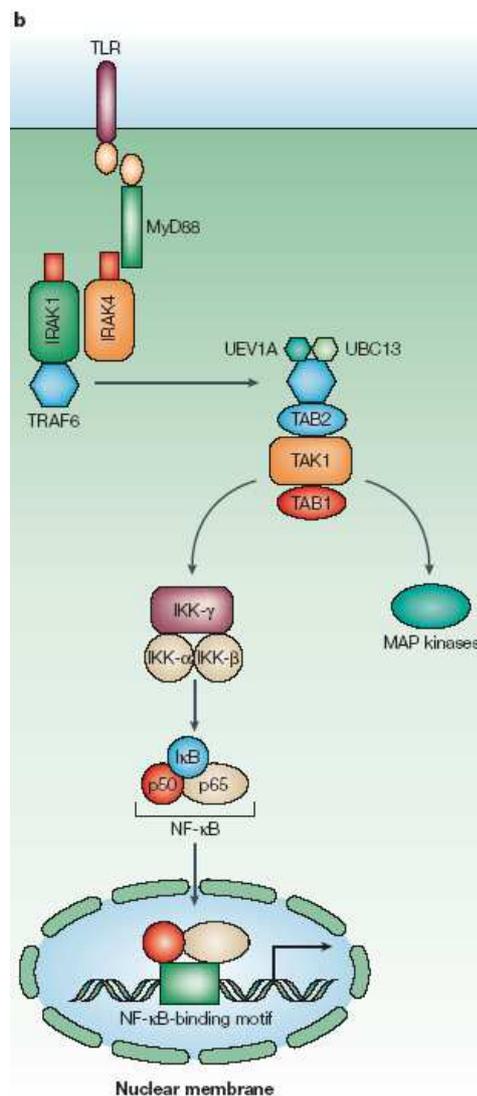


Abbildung 2: Darstellung der TLR-Signalkaskade aus (25).

1.2.2 Die Bedeutung von Punktmutationen

Punktmutationen sind Veränderungen im genetischen Code. Es handelt sich um den Austausch von einzelnen Basen in der DNA. Ein solcher Austausch kann zur Veränderung der Aminosäuresequenz und so zu sinnveränderten oder sinnentstellenden Mutationen, sowie zu stillen Mutationen führen. Im Falle der stillen Mutation ergibt sich keine Konsequenz, da beide Basen für die Aminosäure kodieren können. Für den Träger einer sinnveränderten oder sinnentstellten Punktmutation bedeutet dies entweder ein fehlerhaftes, und somit in seiner Funktion eingeschränktes, oder gar kein funktionstüchtiges Protein. Dies führt meistens dazu, dass der Träger den Belastungen der Umwelt schlechter entsprechen kann. So führen zum Beispiel verschiedene Punktmutationen im Interleukin 10 Gen zum erhöhten Risiko für Asthma, systemischen Lupus erythematoses und Arthritis (27).

Es gibt aber auch Beispiele in denen die Punktmutationen zu einem Selektionsvorteil werden, wie es bei HbC der Fall ist. Dies ist ein Polymorphismus in den roten Blutkörperchen, der durch eine Strukturveränderung der Erythrozyten vor der Entwicklung einer schweren Malaria schützt (28).

Die Bedeutung von Punktmutationen in Toll-like-Rezeptoren ist zurzeit Gegenstand der Forschung, auch im Hinblick auf die Frage, inwieweit sie für die Manifestation von Malaria Bedeutung haben.

1.2.3 Die Bedeutung von TLRs in Bezug auf die *P.-falciparum*-Infektion

Studien haben gezeigt (20, 27, 29, 30), dass die TLRs in die Erkennung von Plasmodien und in die Pathogenese der Malaria involviert sind. Adachi *et al.* beobachteten, dass MyD88, ein zentraler Mediator des TLR- und IL-Signalwegs, bei einer *P.-berghei*-Infektion bei Mäusen für die Induktion von IL-12 in dendritischen Zellen erforderlich ist (31). Krishnegowda *et al.* untersuchen den TLR Signalweg in Bezug auf die Erkennung von *P. falciparum*. TLR2 wurde als Hauptrezeptor für die Erkennung des *P.-falciparum*-Glykosylphosphatidylinositols (GPI) identifiziert (10). Weiter wurde TLR9 als Rezeptor für die Erkennung von *P. falciparum* DNA beschrieben (30). Neben TLR2 und TLR9 ist auch TLR4 an der Erkennung von *P. falciparum*, mittels der Detektierung von GPI beteiligt (10). Mockenhaupt *et al.* untersuchten in einer Studie in Ghana Kinder auf bekannte *TLR2*-Polymorphismen, mit der Hypothese, dass *TLR2*-Varianten zu einer verstärkten Manifestation der schweren Malaria führen.

Mockenhaupt *et al* konnten keine Polymorphismen im *TLR2*-Gen finden. Daraus schlussfolgerten sie, dass Veränderungen im *TLR2* in Endemiegebieten nachteilig sind (20). Zusätzlich wurden in dieser Studie bekannte *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen (*TLR4*-D299G , *TLR4*-Thr-99Ile, *TLR9*-T-1237C, *TLR9*-T-1486C) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Polymorphismen bei den Kindern in Ghana vorliegen. Für *TLR4*-D299G und *TLR4*-T399I wurden ein erhöhtes Risiko schwerer Malaria beschrieben (20). Ob diese *TLR*-Varianten zu Veränderungen in der Manifestation der Malaria während der Schwangerschaft führen, ist bisher nicht bekannt. Auch ob andere seltener *TLR4*-Varianten zu Verstärkung der Manifestation von Malaria im Kindesalter führen wurde bisher nicht untersucht und ist deshalb Gegenstand dieser Arbeit.

1.2.4 Der Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9)

Das Gen des *TLR9* liegt auf dem Chromosom 3p21.3. Der *TLR9* wird im endoplasmatischen Retikulum von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. *TLR9* erkennt nicht-methylierte CpG DNA, welche Bestandteil von Viren und Bakterien ist (32). Die Erkennung von *P. falciparum* durch *TLR9* ist hier eine Ausnahme, da die Parasiten-DNA nicht CG-sondern AT-reich ist mit einzelnen kleinen CG-Abschnitten (32). Parroche *et al.* konnten in ihrer Studie zeigen, dass diese AT-reiche DNA mittels Hämozoin (HZ), das durch den Verdau von Hämoglobin in den befallenen Erythrozyten zu hydrophoben Hämopolymeren entsteht, dem *TLR9* präsentiert wird (30). In der Schwangerschaft kommt es zu einer Akkumulation von Hämozoin in der Plazenta (14). In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob *TLR9*-Polymorphismen zu Verstärkung der Malaria in der Schwangerschaft führen, da die Signalkaskade der angeborenen Immunantwort gestört sein könnte.

Lazarus *et al.* untersuchten in ihrer Studie 71 Individuen aus drei ethnischen Gruppen (afrikanische, europäische, spanische Amerikaner) auf Punktmutation im *TLR9*. Sie konnten vier Punktmutation identifizieren, die häufig vorkommen: *TLR9*-T-1486C, *TLR9*-T-1237C, *TLR9*-G-1174A und *TLR9*-G-2848A (27).

In einer daran anschließenden Kohortenstudie konnte ein Zusammenhang zwischen *TLR9*-T-1237C und einem erhöhten Risiko für Asthma gezeigt werden (33, 34). Zudem werden Zusammenhänge zwischen den vier Punktmutationen und systemischem Lupus erythematoses sowie Morbus Crohn vermutet (35). Diese konnten bisher allerdings nicht bestätigt werden (27). Wie bereits erwähnt wurden von Mockenhaupt *et al.* in einer Studie in Nordghana *TLR9*-T-1237C und *TLR9*-T1486C untersucht. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Polymorphismen und der Manifestation von schwerer Malaria

festgestellt werden, doch zeigte sich eine Prävalenz von jeweils über 50% (20). Ob es einen Zusammenhang zwischen Malaria in der Schwangerschaft und den o.g. *TLR9*-Polymorphismen gibt, ist nicht bekannt, weswegen sie für diese Arbeit ausgewählt wurden.

1.2.5 Der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4)

Der Toll-like 4 Rezeptor (TLR4) ist der am besten verstandene TLR. Das Gen des TLR4 liegt auf dem Chromosom 9q32-q33. Der Rezeptor wird vor allem in der Milz, auf Monozyten und peripheren Lymphozyten exprimiert (36). Die Funktion des TLR4 ist vor allem die frühzeitige Erkennung von gram-negativen Bakterien. TLR4 reagiert spezifisch auf bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), die Bestandteil der gram-negativen Zellwand sind (37) und führt zu Transmembransignaltransduktion. Zudem spielt TLR4 eine entscheidende Rolle in der Erkennung von Glycoinositolphospholipiden (GPIs) von *Trypanosoma cruzi* (38) sowie für die Erkennung von *Aspergillus fumigatus* und viralen Proteinen (39).

Krishnegowda *et al.* konnten zeigen, dass neben TLR2 auch TLR4 in die Erkennung von *P. falciparum* involviert ist (10). Die Induktion der Signalkaskade wird wie bei TLR2 über GPI vermittelt (10).

Smirnova *et al.* untersuchten in einer Studie TLR4 auf Polymorphismen (40). Es gibt zwei Punktmutationen, die häufig in der kaukasischen Bevölkerung vorkommen, *TLR4-D299G* und *TLR4-T399I* (41). Sie befinden sich in der extrazellulären Region des Rezeptors. Patienten mit *TLR4-D299G* haben bei Endotoxinexposition ein erhöhtes Risiko Asthma und andere Atemwegserkrankungen zu entwickeln (42). Weiterhin hat man bei Patienten, die an schwerer Meningokokkenmeningitis erkrankt waren, festgestellt, dass sie vermehrt seltene *TLR4*-Punktmutation aufwiesen, welche zur erniedrigten Sensibilität gegenüber bakteriellem LPS führen und so zur Verstärkung der Manifestation der Erkrankung (37).

In der bereits erwähnten Studie von Smirnova *et al* fanden sich zwei Polymorphismen vor allem bei Afroamerikanern und Kamerunern, *TLR4-E474K* und *TLR4-Q510H*, die beide die extrazelluläre Region betreffen (41).

In Bezug auf die Malaria konnte bisher von Mockenhaupt *et al.* gezeigt werden, dass die beiden Polymorphismen *TLR4-D299G* und *TLR4-T399I* von Bedeutung sind (20). In Nordghana zeigten Kinder mit den Polymorphismen ein 1,5- und 2,6-fach erhöhtes Risiko, an schwerer Malaria zu erkranken (20). Ob es einen Zusammenhang zwischen den beiden bekannten Polymorphismen und der Manifestation der Malaria während der Schwangerschaft gibt, ist bisher nicht bekannt. Ob es andere *TLR4*-Polymorphismen in der Region gibt und ob sie in Zusammenhang mit der Manifestation der Malaria tropica stehen, ist ebenfalls nicht

bekannt. Daher wurden *TLR4-D299G* und *TLR4-T399I* (Schwangerschaftsmalaria) und *TLR4-E474K* und *TLR4-Q510H* (schwere Malaria) für diese Arbeit ausgewählt.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Es gibt zwei Lebensabschnitte in denen das Risiko an einer Malaria zu erkranken erhöht ist. Hierbei handelt es sich zum einen um die frühe Kindheit (0,5-5 Lebensjahre) und zum anderen um die Schwangerschaft, vor allem die Erste (1,9). Beide Lebensabschnitte sind durch ein sich noch im Aufbau befindliches oder unzureichend aufgestelltes erworbenes Immunsystem gekennzeichnet. Das hat zur Folge, dass die Immunabwehr über das angeborene Immunsystem in den Vordergrund rückt. Die Toll-Like-Rezeptoren (TLR) gehören zu einer Hauptklasse von Rezeptoren, die molekulare Strukturen von verschiedenen mikrobiellen Pathogenen im angeborenen Immunsystem erkennen und spielen eine Rolle in der Erkennung von *P. falciparum* (10, 25).

Es konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Polymorphismen in TLRs die Manifestation verschiedener Erkrankungen beeinflussen (34, 35, 37). Deshalb liegt die Hypothese nahe, dass Polymorphismen in den für die Malaria relevanten TLRs (TLR2, TLR4, TLR9) auf die Manifestation der Malaria einwirken können. Im Kindesalter könnte das die Manifestation der schweren Malaria betreffen, in der Schwangerschaft die mütterliche Anämie, fetale intrauterine Wachstumsretardierung, Frühgeburtlichkeit und niedriges Geburtsgewicht.

Eine vorangegangene Studie aus Ghana konnte zeigen, dass *TLR4-D299G* und *TLR4-T399I* das Risiko kindlicher schwerer Malaria erhöhen und bekannte *TLR9*-Polymorphismen (*TLR9-T-1237C*, *TLR9-T-1486*) mit hohen Prävalenzen vorliegen (20). Es gibt bisher keine Daten zur Auswirkung dieser *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen auf die Manifestation der Malaria bei Erstgebärenden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es daher, die Auswirkungen dieser Polymorphismen auf Risiko und Manifestation der Malaria in der ersten Schwangerschaft zu untersuchen.

Seltene *TLR4*-Polymorphismen, die mit einer verstärkten Manifestation der Meningokokkensepsis einhergehen, wurden vor allem bei Afroamerikanern und Kamerunern beobachtet (41). Zwei von diesen *TLR4-E474K* und *TLR4-Q510H* wurden ausgewählt, es soll untersucht werden, ob sie Auswirkungen auf Risiko und Manifestation der schweren Malaria im Kindesalter haben. Zusätzlich wurde die *TIR*-Domäne des TLR4 auf noch unbekannte Polymorphismen untersucht und auf einem Zusammenhang mit der Manifestation der schweren Malaria hin geprüft. Ziel war es hier, zur Aufklärung des Wirkmechanismus des TLR4 in Bezug auf die Manifestation der schweren Malaria beizutragen.

Zusammenfassend sollen in der vorliegenden Arbeit die *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen in Bezug auf die folgenden Fragen untersucht werden:

1. Besteht bei Erstgebärenden aus Ghana ein Zusammenhang zwischen den Polymorphismen *TLR4*-D299G und *TLR4*-T399I und dem Risiko bzw. der Manifestation der Malaria in der Schwangerschaft?
2. Haben die Polymorphismen *TLR9*-T-1237C und *TLR9*-T-1486C Einfluss auf Risiko und Manifestation der Malaria bei Erstgebärenden aus Ghana?
3. Finden sich die *TLR4*-Polymorphismen *TLR4*-E474K und *TLR4*-Q510H bei Kindern aus Nordghana?
4. Lässt sich ein Zusammenhang zwischen den beiden Polymorphismen und dem Risiko und der Manifestation der schweren Malaria im Kindesalter herstellen?
5. Finden sich Polymorphismen in der *TIR*-Domäne des *TLR4* und haben sie einen Einfluss auf die schwere Malaria?

2 Patienten, Material und Methoden

Die Proben, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, stammen aus zwei Studien zu Malaria: zum einen aus einer Querschnittstudie, die 2000/2001 in der Ashanti-Region in Ghana bei 893 gebärenden Frauen durchgeführt wurde; zum anderen aus einer Fall-Kontroll-Studie, die 2002 in Tamale, Nordghana, bei 870 Kindern durchgeführt wurde.

Die Verfasserin dieser Arbeit hat sich an der Typisierung der Gebärenden von *TLR4-D299G* und *TLR4-T399I*, sowie die des *TLR9-T-1237C* und *TLR9-T-1486C*, mittels Real-Time-PCR (Lightcycler) beteiligt (Eigenanteil ca. 30%; Gesamtergebnisse wurden von S. Röwer und Prof. Mockenhaupt zur Verfügung gestellt). Zudem hat die Verfasserin selbständig mittels Real-Time-PCR und Restriktionsverdau von 300 Kindern aus Ghana auf die Polymorphismen *TLR4-E474K* und *TLR4-Q510H* hin untersucht, die Sequenzierung auf neue Punktmutationen in der *TIR*-Domäne des TLR4 vorgenommen und die Daten ausgewertet.

2.1 Studienort und Studiendesigns der Studie zu schwangeren Frauen in Agogo

Die Proben der Erstgebärenden stammen aus dem holoendemischen Agogo in der Ashanti-Region, Ghana. Dort wurden zwischen Januar 2000 und Januar 2001 893 gebärende Frauen, im Rahmen eines Kooperationsprojektes des Institutes für Tropenmedizin Berlin und der University of Science and Technologie Kumasi und des Presbyterian Hospital Agogo, für eine Querschnittstudie rekrutiert (43). Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der School of Medicine, University of Science and Technologie Kumasi geprüft und freigegeben. Die Frauen wurden klinisch untersucht und ihre sozioökonomischen Daten dokumentiert. Ihnen wurde EDTA-Blut abgenommen und Blut aus dem intervillösen Raum der Plazenta gesammelt. Die Malariaparasiten wurden in plazentaren und in venösen Blutproben mikroskopisch am Giemsa gefärbten Dicken Tropfen auf 100 mikroskopische Felder (1000x) ausgezählt und das Leukozyten-assoziierte Hämozoïn wurde bestimmt. Für die Bestimmung der peripheren Parasitendichte wurden die Erreger am Giemsa gefärbten Dicken Tropfen bezogen auf 500 Leukozyten ausgezählt und in Parasiten/ μ L umgerechnet. Der Hämoglobinwert (Hb) wurde photometrisch gemessen (HemoCue) und eine Anämie als Hb <11mg/dl definiert. Das kindliche Gestationsalter wurde mittels dem morphologischen Finnström Score ermittelt und ein Gestationsalter von <37 Woche als Frühgeburtlichkeit definiert (44). Ein zu niedriges Geburtsgewicht lag bei <2500g vor. Für das zu niedrige Geburtsgewicht ergab sich eine weitere Einteilung in frühgeborene und termingerecht

geborene Kinder. Die genomische DNA peripherer und plazentarer Proben wurde mit einem Kit extrahiert (QIAmp, Qiagen). *P. falciparum* wurde in peripheren und plazentaren Blutproben mittels PCR nachgewiesen. Details der Untersuchungen, sowie die Charakteristika der Studiengruppe wurden bereits publiziert (43).

Von diesen 893 Gebärenden wurden für die vorliegende Arbeit 304 Erstgebärende untersucht, da bei diesen keine oder kaum Stamm-spezifische Immunität gegenüber den Plazenta-adärenten *P. falciparum*-Stämmen zu erwarten ist (17, 45).

2.2 Studienort und Studiendesigns der Fall-Kontrollstudie in Tamale, Nordghana

Die Patientenproben der Kinder stammen aus einer Fall-Kontroll-Studie, die von August bis November (Regenzeit) 2002 in Tamale, Nordghana vom Institut für Tropenmedizin Berlin in Kooperation mit dem Tamale Teaching Hospital, durchgeführt wurde. Die Studie wurde von der Ethikkommission der University for Development Studies in Tamale geprüft und freigegeben. Tamale ist die Provinzhauptstadt der *Northern Region* mit ungefähr 350 000 Einwohnern und liegt in einem Gebiet, welches hyperendemisch für *P. falciparum* ist (46).

Für diese Fall-Kontroll-Studie wurden 290 Kinder im Alter zwischen 0,5 und 9 Jahren, die im Tamale Teaching Hospital auf der Kinderstation behandelt wurden und die WHO Kriterien (WHO 2000) für schwere Malaria erfüllten, rekrutiert. Für jedes dieser Kinder wurden aus einem Pool von 2107 Kindern aus Tamale und sechs weiteren umliegenden Distrikten je zwei Kontrollen nach Alter und Geschlecht gematched: ein asymptomatisches Kind mit Nachweis von *P. falciparum* im Dicken Tropfen und ein gesundes Kind (28).

Es wurden die rektale Temperatur, die Herzfrequenz, die Atemfrequenz und der Blutdruck dokumentiert. Unterernährung wurde nach dem *weihgt-for age* (WAZ) *score* < -2 basierend auf der *National Center for Health Statistic* (Hyattsvill, MD) festgelegt. Schwere Malaria, Hypoglykämie und Hyperlaktatämie wurden wie folgt definiert: Hb < 5g/dL, Glukose < 40mg/dL, Laktat > 5mmol/L. Eine schwere Malaria wurde nach geltenden WHO-Kriterien (WHO 2000) festgelegt, nachdem ausgeschlossen wurde, dass keine andere Erkrankung für die vorliegenden Symptome verantwortlich war: 1. schwere Anämie, 2. Erschöpfung (definiert als Unfähigkeit zu sitzen oder zu essen, wenn sonst möglich), 3. Atemnotsyndrom (definiert als Nasenflügel, subcostale Einziehungen und Kussmaul-Artemung), 4. Krampfanfälle (definiert als Fallbezogene Anfälle innerhalb von 24h und ein beobachteter Anfall), 5. Bewusstseinstörungen (definiert nach dem Blantyre Score < 3), 6. klinische Gelbsucht, 7. Hämaturie (verifiziert durch Urinstick (Combur, Roche)) (28).

Bei den Kindern wurde eine venöse EDTA-Blutentnahme durchgeführt und daraus die DNA extrahiert (QIAmp, Qiagen) (28). Die Malaria-Parasiten wurden anhand des Giemsa gefärbten Dicken Tropfens im Bezug auf ≥ 200 Leukozyten ausgezählt und durch ein PCR-Verfahren verifiziert (28).

Patienten mit schwerer Malaria erhielten für 5 Tage Artesunat (Plasmodium; Mepha Pharma) in einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht mit der doppelten Dosis am ersten Tag. Die Kinder aus der parasitärischen Kontrollgruppe erhielten Sulfadoxin-Pyrimethamin, wenn die Parasitendichte > 5000 Parasiten/ μ l war (47).

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 300 Kinder untersucht, 100 pro beschriebener Gruppe (schwere Malaria, asymptomatische *P. falciparum*-Infektion, gesunde Kinder).

2.3 Nachweis der *TLR4*- und *TLR9*- Polymorphismen per Real-Time-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) ist ein Verfahren, das 1984 von Kary Mullis entwickelt wurde, um Doppelstrang-DNA zu vervielfältigen. Hierzu bringt man die zu replizierende DNA-Vorlage in einem Reaktionspuffer zusammen mit thermostabiler DNA-Polymerase, zwei Oligonukleotidprimern und Nukleotiden. Dieser Ansatz wird anschließend einer Reaktionskette von verschiedenen Temperaturschritten unterzogen: Denaturierung, Annealing und Elongation.

Denaturiert wird bei einer Temperatur über 90°C, dabei trennen sich die beiden DNA-Stränge voneinander. Anschließend wird die Temperatur schnell auf die festgelegte Annealing-Temperatur der Oligonukleotidprimer abgesenkt, damit diese mit dem ihnen komplementären 3'-Ende der Einzelstrang-DNA hybridisieren können. Im nächsten Schritt wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase erhöht (Elongation). Die DNA-Polymerase beginnt nun die im Überschuss vorhandenen Nukleotide an den jeweiligen Einzelstrang anzubauen, bis die DNA wieder in ihrem ursprünglichen Zustand vorhanden ist. Anschließend wird wieder auf über 90°C erhitzt und der Zyklus beginnt von vorne (48).

2.3.1 Real-Time-PCR

Die hier verwendete Methode ist eine modifizierte PCR, die sogenannte *Real-Time-PCR*. Das zugehörige Gerät ist der Roche Lightcycler. Die *Real-Time-PCR* hat es möglich gemacht, in nur einem Ansatz sowohl quantitativ zu amplifizieren als auch mittels einer Schmelzkurve Polymorphismen nachzuweisen. Hierzu hat man die ursprünglichen PCR-Geräte kombiniert mit Fluoreszenz-Detektion (engl. *Fluorescence resonance energy transfer*, FRET). Dem

PCR-Ansatz werden zusätzlich zwei Oligonucleotidsonden, eine Sensorsonde und eine Ankersonde, hinzugefügt. Die Sensorsonde ist so konstruiert, dass sie genau an den zu untersuchenden DNA-Abschnitt passt, die Ankersonde bindet 1 bis 10 Nukleotide weiter. Wenn sich beide Sonden gleichzeitig an der DNA anlegen, kann eine Lichtemission definierter Wellenlänge gemessen werden. Je mehr Anker- und Sensorsonden sich gleichzeitig anlagern, desto höher wird das gemessene Signal.

Um einen Polymorphismus zu bestimmen, wird, wie in dieser Arbeit, die Sensorsonde mutationsspezifisch gestaltet, das heißt sie kann nur spezifisch hybridisieren, wenn die Mutation vorliegt.

Die anschließend durchgeführte Schmelzkurvenanalyse beginnt wenig unterhalb der Annealingtemperatur der Sonden. Die Temperatur wird langsam gesteigert, bis die DNA denaturiert. Dies führt dazu, dass sich die Sonden zunächst anlegen und das Signal exponentiell ansteigt. Wird die Temperatur zu hoch, lösen sich die Sonden nacheinander, die Sensorsonde zuerst. Anhand des Ablösezeitpunktes kann zwischen Wildtyp und Mutation unterschieden werden, da der jeweilige Ablösungszeitpunkt bei unterschiedlichen Temperaturen liegt. Die Sensorsonde löst sich bei einer niedrigeren Temperatur ab, wenn sie nicht richtig an die DNA binden kann. (s. Abb. 3) Man erhält drei verschiedenen Kurven: Wildtyp, heterozygote Mutation und homozygot Mutation (49).

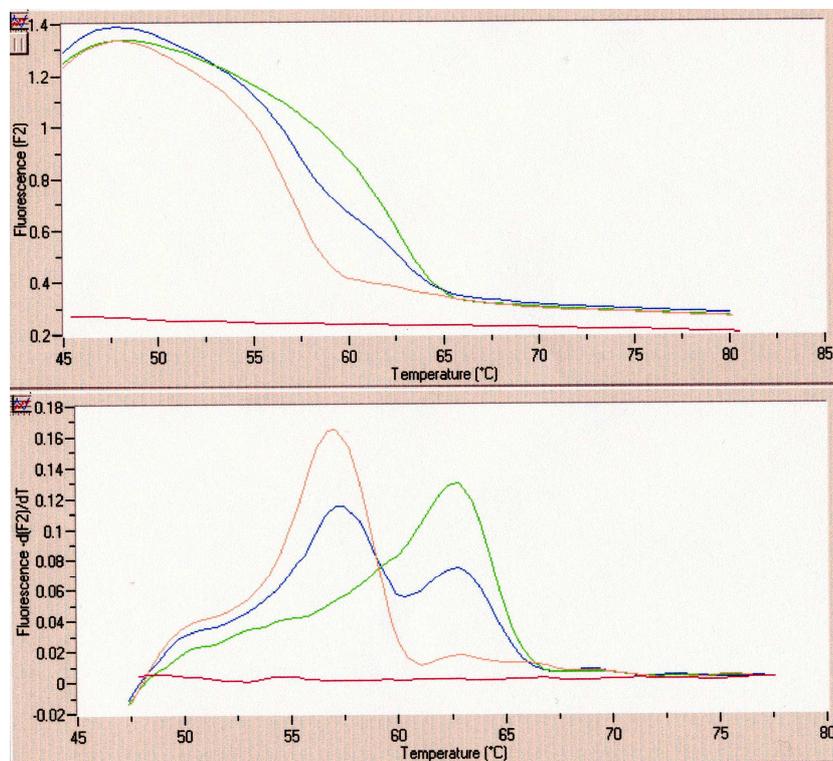


Abbildung 3: Darstellung einer Schmelzkurve

Orange: Wildtyp, blau: heterozygot; grün homozygot; rot: Kontrolle

2.3.2 Lightcyclerprotokoll für die Genotypisierung von *TLR9-T-1237C* und *TLR9-T-1486C*

Die durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis der Polymorphismen *TLR9-T-1237C* und *TLR9-T-1486C* orientieren sich an der Arbeit von Hamann *at al.* (50). Bei *T-1237C* und *T-1486C* handelt sich um eine Punktmutation in der Promoter Region des *TLR9*-Gens an den Basenpaaren (bp) der Positionen -1237 und -1486 mit einem Basenaustausch von Thyrosin zu Cytosin (T→C). Der Nachweis beruht auf der Eigenschaft der mutationsspezifischen Sensorsonde (Sensor 1, Sensor 2), nur an die Mutation binden zu können. Liegt diese nicht vor, sinkt das Temperaturmaximum der Schmelzkurve in der Real-Time-PCR ab.

Für den Nachweis der Polymorphismen *TLR9-T-1237C* und *TLR9-T-1486C* wurde der entsprechende DNA-Abschnitt mittels der Primer
TLR9 sens: TCCCAGCAGCAACAATTCATTA
TLR9 antisens: CTGCTTGCAGTTGACTGTGT
amplifiziert.

Für die Schmelzkurve von *T-1237C* wurden die Sonden
T9-Sensor 1: GGAGTTTCCAGGCAGAGG-FL (Sensorsonde)
T9-Anchor 1: LC640-ACAGCACATCCCAAGGCCCT (Ankersonde)
eingesetzt.

Für die Schmelzkurve von *T-1486C* wurden die Sonden:
T9-Sensor 2: ATCACTGCCCTCAAGAAGCT-FL (Sensorsonde)
T9-Anchor 2: LC640-ACATTCCAGCAGGGGAATAAGACGATA (Ankersonde)
eingesetzt.

Das Sondensystem wurde mit Fluorescein/LCRed640 markiert. Primer und Sonden wurden bei TIB MOLBIOL hergestellt.

Die Tabellen 1 und 2 geben einen Überblick über die verwendeten Chemikalien und das Lightcycler Programm:

Tabelle 1: Lightcycler Ansatz *TLR9-T-1237C* und *TLR9-T-1486C*

Chemikalien	V für 1x Ansatz à 20µl	Konzentration im Ansatz
Destilliertes Wasser	5,2 µl	
10x GenTerm buffer(ohne MgCl ₂)	2,0 µl	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 µl	2 mM
BSA (1 mg/ml)	3,0 µl	0,15 mg/ml
dNTP (2,5 mM)	1,0 µl	0,125 µM x 4
TLR9 sens (5 µM)	0,3 µl	0,25 µM
TLR9 reverse (5 µM)	2,0 µl	0,25 µM
T9 Sensor 1 oder 2 (0,02 µM)	1,0 µl	0,8 nM
T9 Anker 1 oder 2 (0,02 µM)	1,0 µl	0,8 nM
Gentherm Taq (5 u/µl)	0,5 µl	0,5 U
DNA-Vorlage	2,0 µl	
Gesamtvolumen	20 µl	

V= Volumen

Tabelle 2: Lightcycler-Programm für *TLR9-T-1237C* und *TLR9-T-1486C*:

Programm	Denaturierung			Zyklen
Segment Nummer	Temperatur °C	Zeit (sec)	Slope (C°/sec)	1
1	95	240	20	

Programm	Amplifikation			Zyklen
Segment Nummer	Temperatur °C	Zeit (sec)	Slope (C°/sec)	40
1	95	0,5	20	
2	57	20	20	
3	72	30	20	

Programm	Schmelzkurve			Zyklen
Segment Nummer	Temperatur °C	Zeit (sec)	Slope (C°/sec)	1
1	95	2	20	
2	40	30	20	
3	95	0	0,1	

Programm	Kühlung			Zyklen
Segment Nummer	Temperatur °C	Zeit (sec)	Slope (C°/sec)	1
1	40	30	20	

2.3.3 Lightcyclerprotokoll für die Genotypisierung von *TLR4-D299G* und *TLR4-T399I*

Die durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis der Polymorphismen *TLR4-D299G* und *TLR4-T399I* orientieren sich an der Arbeit von Hamann *et al.* (50). Bei *D299G* handelt sich um eine Punktmutation im Exon drei des *TLR4*-Gens an der Position -12874 bp mit einem Basenaustausch von Adenosin zu Guanin zu (A→G). Bei *T399I* handelt ebenfalls sich um

eine Punktmutation im Exon drei des *TLR4*-Gens an der Position -13174 bp mit einem Basenaustausch von Cytosin zu Thyrosin zu (C→T).

Für den Nachweis der Polymorphismen D299G und T399G wurde der entsprechende DNA-Abschnitt mittels der Primer

TLR4 sens: ATTTAAAGAAATTAGGCTTCATAAGCT

TLR4 reverse: CCAAGAAGTTTGAACATCATGGTAA

amplifiziert.

Für die Schmelzkurve von D299G wurden die Sonden

TLR4-Sensor1: CTACTACCTCGATGATATTATTGACTTATT-FL (Sensorsonde)

TLR4-Anker1: LC640-AATTGTTTGACAAAGTTTCTTCATTTTCC (Ankersonde)

eingesetzt.

Für die Schmelzkurve von T399I wurden die Sonden:

TLR4-Sensor2: LC610-ATTTTGGGACAACCAGCCTAAAGTAT (Sensorsonde)

TLR4-ANKER2: CTTGAGTTTCAAAGGTTGCTGTTCTCAAAGT-FL (Ankersonde)

eingesetzt.

Das Sondensystem wurde mit Fluorescein/LCRed640 markiert. Primer und Sonden wurden von TIB MOLBIOL hergestellt.

Die Tabellen 3 und 4 geben einen Überblick über die verwendeten Chemikalien und das Lightcycler Programm:

Tabelle 3: Lightcycler Ansatz *TLR4*-D299G und *TLR4*-T399I

Chemikalien	V für 1x Ansatz à 20µl	Konzentration im Ansatz
Destilliertes Wasser	5,3 µl	
10x GenTerm buffer(ohne MgCl ₂)	2,0 µl	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	1,2 µl	2 mM
BSA (1 mg/ml)	3,0 µl	0,15 mg/ml
dNTP (2,5 mM)	1,0 µl	0,125 µM x 4
TLR4 sens (5 µM)	1,0 µl	0,25 µM
TLR4 reverse (5 µM)	2,0 µl	0,25 µM
Sensor 1 oder 2 (0,02 µM)	1,0 µl	0,8 nM
Anker 1 oder 2 (0,02 µM)	1,0 µl	0,8 nM
Gentherm Taq (5 u/µl)	0,5 µl	0,5 U
DNA-Vorlage	2,0 µl	
Gesamtvolumen	20 µl	

V= Volumen

Tabelle 4: Lightcycler-Programm für *TLR4*-D299G und *TLR4*-T399I:

Programm	Denaturierung			Zyklen
Segment Nummer	Temperatur °C	Zeit (sec)	Slope (C°/sec)	1
1	95	240	20	

Programm	Amplifikation			Zyklen
Segment Nummer	Temperatur °C	Zeit (sec)	Slope (C°/sec)	40
1	95	0,5	20	
2	58	20	20	
3	72	30	20	

Programm	Schmelzkurve			Zyklen
Segment Nummer	Temperatur °C	Zeit (sec)	Slope (C°/sec)	1
1	95	10	20	
2	45	30	20	
3	95	0	0,1	

Programm	Kühlung			Zyklen
Segment Nummer	Temperatur °C	Zeit (sec)	Slope (C°/sec)	1
1	40	30	20	

2.3.4 Lightcyclerprotokoll für die Genotypisierung von *TLR4*-E474K

Die durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis des Polymorphismus E474K orientieren sich an den Arbeiten von Smirnova *et al.* (37, 41). Bei *TLR4*-E474K handelt es sich um eine Punktmutation im Exon drei des *TLR4*-Gens an der Position –13398 bp mit einem Basenaustausch von Guanin zu Adenosin (G→A). Der Nachweis beruht auf der Eigenschaft der mutationsspezifischen Sensorsonde (474SenA), nur genau dann an der DNA zu binden, wenn die Veränderung vorliegt. Liegt diese nicht vor, sinkt das Temperaturmaximum der Schmelzkurve in der Real-Time-PCR ab.

Für den Nachweis des Polymorphismus E474K wurde der entsprechende DNA-Abschnitt mittels der Primer

hTLR4-se: CAgTATTCCTATCACTCAgAAACCTC

hTLR4-as: TATTTAgTACCTgAAgACTggAgAgTg

amplifiziert.

Für die Schmelzkurve wurden die Sonden

474SenA: 640-TgTCCAgTCTCAAAGTCTTgAAAAT p (Sensorsonde)

474Anch: gAgTTgCTTTCAATggCATCTTCAATggC X (Ankersonde)

eingesetzt. Das Sondensystem wurde mit Fluorescein/LCRed640 markiert. Primer und Sonden wurden von TIB MOLBIOL hergestellt.

Die Tabellen 5 und 6 geben einen Überblick über die verwendeten Chemikalien und das Lightcycler Programm:

Tabelle 5: Lightcycler Ansatz *TLR4-E474K*

Chemikalien	V für 1x Ansatz à 20µl	Konzentration im Ansatz
Destilliertes Wasser	7,5 µl	
10x GenTerm buffer(ohne MgCl ₂)	2,0 µl	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	0,8 µl	2 mM
BSA (1 mg/ml)	3,0 µl	0,15 mg/ml
dNTP (2,5 mM)	1,0 µl	0,125 µM x 4
HTLR4-se (5 µM)	1,0 µl	0,25 µM
HTLR4-as (5 µM)	1,0 µl	0,25 µM
474SenA (0,02 µM)	0,8 µl	0,8 nM
474Anch (0,02 µM)	0,8 µl	0,8 nM
Gentherm Taq (5 u/µl)	0,1 µl	0,5 U
DNA-Vorlage	2,0 µl	
Gesamtvolumen	20 µl	

V= Volumen

Tabelle 6: Lightcycler-Programm für *TLR-E474K*:

Programm	Denaturierung			Zyklen
Segment Nummer	Temperatur °C	Zeit (sec)	Slope (C°/sec)	1
1	95	240	20	

Programm	Amplifikation			Zyklen
Segment Nummer	Temperatur °C	Zeit (sec)	Slope (C°/sec)	40
1	95	0,5	20	
2	59	10	20	
3	72	16	20	

Programm	Schmelzkurve			Zyklen
Segment Nummer	Temperatur °C	Zeit (sec)	Slope (C°/sec)	1
1	95	10	20	
2	45	30	20	
3	80	0	0,1	

Programm	Kühlung			Zyklen
Segment Nummer	Temperatur °C	Zeit (sec)	Slope (C°/sec)	1
1	40	30	20	

2.4 Untersuchung des Polymorphismus TLR4Q510H mittels Restriktionsverdau

Beim Verfahren des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus PCR-generierter Amplicons (PCR-RFLP) wird die zu untersuchende DNA mittels eines Restriktionsenzym verdaut. Dieses Restriktionsenzym hat die Eigenschaft, die Doppelstrang-DNA an einer spezifischen Basensequenz zu schneiden. Liegt ein Polymorphismus vor, erkennt das Enzym z.B. die Sequenz nicht mehr und schneidet nicht. Daraus resultiert eine Veränderung im Bandenmuster der verdauten DNA, welches unter UV-Licht sichtbar gemacht wird. Für den Standardverdau werden die DNA-Vorlage (0,2 - 1 µg), das spezifische Restriktionsenzym und der dazugehörige Reaktionspuffer für eine bestimmte Zeit bei einer enzymabhängigen Temperatur (meist 37°C) inkubiert. Anschließend wird die verdaute DNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Man vergleicht unter UV-Licht die Bandenmuster von Kontroll- und untersuchter DNA. Veränderungen im Bandenmuster weisen auf Mutationen hin (49).

2.4.1 Prinzip der Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, um DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 kb Länge zu trennen und zu identifizieren. Ihr Prinzip besteht darin, dass DNA-Moleküle, durch ihre Phosphatgruppen bedingt, bei neutralem pH-Wert negativ geladen sind und somit im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandern. Die Beschaffenheit der Agarosegele, die sogenannte Siebstruktur, führt dazu, dass kleinere Fragmente schneller und größere Fragmente langsamer auf die Anode zulaufen. So erreicht man im Spannungsfeld die Aufteilung der verschiedenen Fragmente eines Gemisches. Um die Größen der Fragmente abschätzen zu können, lässt man einen DNA-Größenmarker mitlaufen. Die Konzentration der Agarose im Gel, die angelegte Spannung und die Zeit, in der das elektrische Feld anliegt, beeinflussen die Trennschärfe. Um die Fragmente im Gel sichtbar zu machen, versetzt man die Agarose mit Ethidiumbromid. Dieses interagiert während der Elektrophorese mit den DNA-Fragmenten und fluoresziert im ultravioletten Licht (49).

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Sorten von Agarose für die Herstellung der Gele verwendet.

Für den Nachweis des Amplifikates im Restriktionsverdau wurden 0,5 g SeaKem® LE Agarose (Cambrex Bio Science Rockland; Biozym Scientific GmbH) mit 50 ml TBE Puffer (Protokoll s. Anhang) und 1 µl Ethidiumbromid [1 mg/ml] versetzt und gelöst. Anschließend wurde es in die zusammengesetzte Laufkammer gegossen und zum Auskühlen und Aushärten

für 30 min in den Kühlschrank gestellt. Währenddessen wurden je 8 µl des PCR-Produktes auf einer Tüpfelplatte mit 1 µl Bromphenolblau (Farbstoffmarker, Protokoll s. Anhang) versetzt. Schließlich wurden das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und die Proben sowie der Marker (100 bp-Ladder, Invitrogen GmbH) in die Geltaschen pipettiert. Als Laufpuffer diente TBE Puffer. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente im ultravioletten Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm dargestellt und mit Polaroidfotos dokumentiert.

Für die Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus mit HpyCH4III wurde ein 3%iges GTG-Gel (NuSieve® GTG® Agarose, Cambrex Bio Science Rockland) hergestellt. Hierzu wurden 1,5 g GTG-Agarose in 50 ml TBE Puffer gelöst, mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt, abgekühlt und anschließend mit 15 µl Verdau-Produkt beladen.

Für die Gele der Sequenzierung wurde GTQ-Agarose (Roti-Agarose, Carl-Roth GmbH und Co. KG) genutzt. Hier wurden 0,5 g GTQ-Agarose in 50 ml TBE Puffer gelöst, mit 3 µl Ethidiumbromid versetzt und abgekühlt. In der Zwischenzeit wurden je 5 µl PCR-Produkt mit 1 µl Bromphenolblau versetzt und anschließend das Gel beladen.

2.4.2 Restriktionsverdau mit *HpyCH4III*

Die Durchführung der Untersuchung zum Nachweis des *TLR4*-Polymorphismus Q510H orientiert sich an den Arbeiten von Smirnova *et al.* (41). Danach handelt es sich bei Q510H um eine Punktmutation im Exon 3 des *TLR4*-Gens an der Position –13507 bp mit einem Basenpaaraustausch von Guanin zu Thymin (G→T). Der Nachweis dieses Polymorphismus beruht auf seiner Eigenschaft, eine Schnittstelle des Restriktionsenzym *HpyCH4III* aufzuheben. *HpyCH4III* ist eine aus dem Bakterium *Helicobacter pylori* CH4 isolierte Restriktionsendonuclease, die homologe DNA schneidet.

Für den Nachweis des Polymorphismus Q510H wurde der entsprechende DNA- Abschnitt mittels der Primer

TLR4mm For 5'CCTTCCTggACCTCTCTCAgTgTCAACTggAAC3'

TLR4_3R3 5'CCACACCgggAATAAAgTCTCTgTAgTg3'

amplifiziert. Die Tabelle 7 gibt einen Überblick über die verwendeten Chemikalien und Reaktionsbedingungen, sowie über die anschließende Gelelektrophorese zur Darstellung des 654 bp langen Amplifikates (siehe Abb.7).

Tabelle 7: Ansatz für den Restriktionsverdau von *TLR4-Q510H*

Chemikalien	V für 1x Ansatz á 50 µl	Konzentration pro Ansatz
Destilliertes Wasser	42,5 µl	
10xBuffer	5,0 µl	1,5 mM MgCl ₂
DNTP's	0,2 µl	100 µM
TLR4 mm For (20 µM)	0,5 µl	200 nM
TLR4_3R3 (20 µM)	0,5 µl	200 nM
Biotherm Taq (5 U/µl)	0,3 µl	1,5 U
DNA-Vorlage	1,0 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	
PCR-Programm:	Denaturierung: 94°C 5' Amplifikation: 40 Zyklen 94°C 1' 62°C 1' 72°C 1'30'' terminale Elongation: 72°C 10' Kühlung: 4°C ∞ PCR-Produkt 654 bp	
Gelelektrophorese:		
Agarose-Gel-Konzentration	1%SeaKem® LE Agarose	
Elektrophoresebedingungen	30 min bei 100 V	
PCR-Produkt	Bande bei 654 bp Marker 100 bp DNA Ladder	

V=Volumen

Verdau mit *HpyCH4III*:

Nach der Amplifikation erfolgte der Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *HpyCH4III*. *HpyCH4III* schneidet einen DNA-Doppelstrang mit der

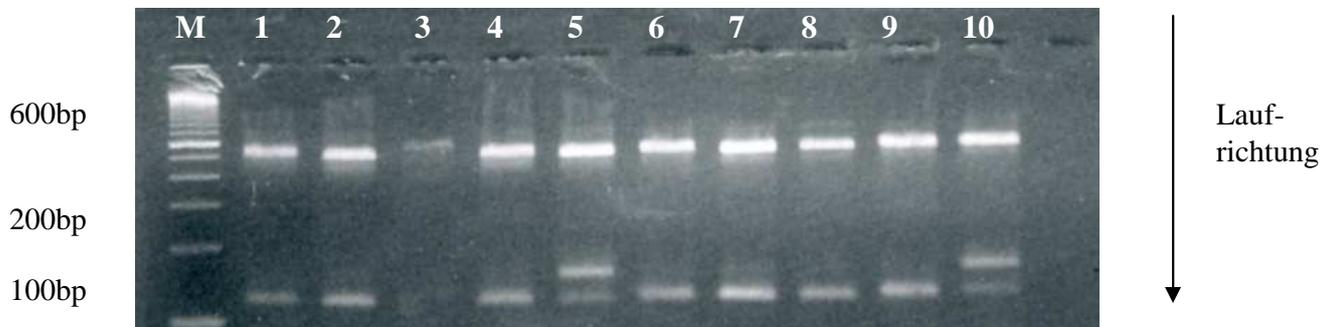
Sequenz



Für einen Ansatz von 30 µl wurden 16 µl destilliertes Wasser, 3 µl 10 x NEBuffer (New England Biolabs GmbH), 1 µl *HpyCH4III* (5 U/µl) und 10 µl PCR-Produkt verwendet. Dieser Ansatz wurde für 6 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 3 µl Bromphenolblau versetzt. Für die anschließende Gelelektrophorese wurden 15 µl des Verdau-Produkts auf ein 3% GTG-Gel aufgetragen. Die Laufzeit betrug 50 min bei 80 V.

Abbildung 4: Gelelektrophorese nach dem Restriktionsverdau.

Dargestellt ist das typische Bandenmuster nach dem Restriktionsverdau. M: Marker (100 bp DNA Ladder); 1-10 = Proben; 1 = Wildtyp, 5 = Polymorphismus heterozygot



Es gab folgende Banden:

1. drei Banden bei 495 bp, 125 bp und 34 bp (hier nicht sichtbar): der Wildtyp liegt vor
2. vier Banden bei 495 bp, 159 bp, 125 bp und 34 bp (hier nicht sichtbar): der Polymorphismus liegt heterozygot vor
3. zwei Banden bei 495 bp und 159 bp: der Polymorphismus liegt homozygot vor.

2.5 Sequenzierung der *TIR-Domäne* von *TLR4*

Es gibt zwei klassische Methoden für die Sequenzierung: die Methode nach Sanger sowie die Methode nach Maxam-Gilbert. Beide Methoden arbeiten nach dem gleichen Prinzip: Die DNA wird auf vier Sätze radioaktiv markierter Fragmente reduziert. Die Reaktion ist basenspezifisch, so dass die Fragmentlänge den Positionen einer bestimmten Base in der DNA-Sequenz entspricht. So entstehen beispielsweise aus einem Oligonucleotid mit der Sequenz pAATCGACT, welches am 5'-Ende markiert ist, bei einer Reaktion, in der die DNA nach jedem C-Rest abbricht, zwei Fragmente, eines nach 4 und eines nach 7 Nucleotiden. Bei einer Reaktion, die nach dem G-Rest abbricht, entsteht ein Fünfer-Nucleotid und so weiter. Das Prinzip in der anschließenden Gelelektrophorese ist, dass die Fragmente nur am 5'-Ende radioaktiv markiert sind, so dass man nur das Fragment auf der 5'-Seite des Bruches detektiert. Die Größe der Fragmente entspricht den relativen Positionen der Nukleotide in der Sequenz. Trennt man die vier Ansätze, die den vier Basen entsprechen, nebeneinander auf, so bilden sie eine Bandenfolge, die man direkt ablesen kann (48).

Im Laufe der Jahre hat sich die Sanger-Methode durchgesetzt. Sie war auch der Grundstein für die Entwicklung von automatischen Sequenziergeräten, von denen eines in dieser Arbeit verwendet wurde.

2.5.1 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Diese Methode nutzt den zelleigenen Mechanismus von DNA-Polymerase zur Synthese von DNA. Im Zellkern reagiert die 3'-Hydroxylgruppe der DNA mit einem neu hinzukommenden Desoxynucleotidtriphosphat (dNTP) und bildet eine neue Phosphatdiesterbindung. Bei der Sanger-Methode verwendet man Didesoxynucleotidtriphosphate (ddNTP)-Analoge, um die DNA-Synthese zu unterbrechen. Sobald ein ddNTP anstelle von einem dNTP in die Kette eingebaut wird, bricht die Kette ab. Die DNA, die sequenziert werden soll, dient als Matrix, an die ein kurzer radioaktiver oder mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter Primer angelagert wird. Es wird für jede Base ein eigener Ansatz erstellt. Anschließend werden diese, wie unter 2.5 beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt. Man erhält so ein dem zu sequenzierenden Strang komplementäres Abbild (48).

2.5.2 Strategie der automatischen Sequenzierung

Jedes Didesoxynucleotid, das bei der Sanger-Methode verwendet wird, wird an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Sämtliche Fragmente, die mit einem der markierten Nucleotide enden, haben eine bestimmte Farbe. Die markierten DNA-Fragmente werden der Größe nach durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die Kapillarelektrophorese ist eine sehr leistungsfähige elektrophoretische Variante, die eine rasche Trennung erlaubt. Alle Fragmente einer bestimmten Länge wandern zusammen durch das Kapillargel und bilden einen einzigen Ausschlag. Die Farben, die mit diesem Ausschlag assoziiert sind, werden mithilfe eines Laserstrahls registriert. Der Detektor zeichnet Vier-Farben-Kurven auf. Die Reihenfolge, in der die Farben in den Ausschlägen den Detektor passieren, ist spezifisch für die DNA-Sequenz. Diese Information wird direkt in den Computer eingespeist, welcher dann die Sequenz ermittelt (48).

Als Sequenzierer diente in dieser Arbeit der CEQ™ 8000. Die DNA wurde zunächst mit den Primern

TIR-For: 5'TgTCggTCCTCAgTgTgCTTgTAgTATCTg3'

TIR-Rev: 5'TAgTgCACCATGgAATTACTCACCTTAgC3'

amplifiziert und anschließend mittels eines GTQ-Agarosegels (Protokoll s. vorheriges Kapitel) überprüft. Eine Übersicht über die Chemikalien bietet Tabelle 8:

Tabelle 8: Darstellung des Ansatzes für die Sequenzierung der *TLR4*-TIR-Domäne

Chemikalien	V für 1x Ansatz á 50 µl	Konzentration pro Ansatz
Destilliertes Wasser	38,4 µl	
10xBuffer	5,0 µl	
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl	1,5 mM MgCl ₂
DNTP's	3,0 µl	150 µM
TIR-For (20 µM)	0,4 µl	8p nM
TIR-Rev (20 µM)	0,4 µl	8p M
Gentherm Taq (5 U/µl)	0,3 µl	1,5 U
DNA-Vorlage	1,0 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	
PCR-Programm:	Denaturierung: 94°C 5' Amplifikation: 40 Zyklen 94°C 1' 62°C 1' 72°C 1'30'' terminale Elongation: 72°C 10' Kühlung: 4°C∞	
Gelelektrophorese:		
Agarose-Gel-Konzentration	1% GTQ Agarose	
Elektrophoresebedingungen	30 min bei 100 V	
PCR-Produkt	Bande bei 743 bp Marker 100 bp DNA Ladder	

Anschließend wurde die DNA mit der Silica-Methode gewaschen. Hierzu wurde die amplifizierte DNA-Vorlage zusammen mit 100 µl 6 M Natriumjodid (s. Anhang) und 6 µl Silica-Matrix (Sigma) geschüttelt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 100 µl Silica-Waschpuffer (s. Anhang) gewaschen. Das Präzipitat wurde dann in 40 µl destilliertem Wasser gelöst und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei 16.000 g 1 min zentrifugiert, der Überstand in ein Q-Biogene-Spin-Modul überführt und 2 min bei 16.000 g zentrifugiert. Um festzustellen, ob nach dem Waschen noch genug DNA für die Sequenzierung vorhanden ist, wurde zur Kontrolle eine Gelelektrophorese durchgeführt. (s. Tab. 8).

Für die Sequenzierreaktion wurden 1 µl Primer (TIR-Rev 3,3 pmol), 4 µl Mastermix (CEQ™DTCS Quick Start Mix, Beckman Coulter™), 5 µl DNA und 10 µl destilliertes Wasser in 200 µl PCR-Tubes angesetzt und mit folgendem Programm sequenziert:

- 96°C 20''
- 50°C 20''
- 60°C 4'
- Für 30 Zyklen, danach bei 4°C Kühlen

Aufreinigung der Sequenzierprodukte mit der Clean SEQ Methode mit Magnetplättchen:

Zunächst wurde ein Belegungsschema für den CEQ™ 8000 erstellt. Daraufhin wurden die Magnetplättchen sanft aufgeschüttelt und mit einer Multipette 10 µl pro Vertiefung der Sequenzierplatte pipettiert. Hinzu kamen 62 µl 85%iges Ethanol sowie das ganze Sequenzierprodukt. Die Platte wurde für 3 min auf die Magnetplatte gestellt und im Anschluss mit 100 µl 85%igem Ethanol gewaschen und nochmals für 30 sec auf die Platte gestellt. Anschließend wurden das Ethanol abpipettiert und der Ansatz 15 min getrocknet und mit 40 µl SLS (sample loading solution), CEQ™DTCS, Beckman Coulter™) resuspendiert, sowie mit Öl luftblasenfrei überschichtet. Nach 10 min wurde der Ansatz in den CEQ 8000 Sequenzierer (Beckman Coulter™) gestellt und der Sequenziervorgang mittels Kapillarelektrophorese gestartet. Nach Abschluss der Sequenzierung wurden die Sequenzen am Computer analysiert und ausgewertet (Programme s. Anhang).

Die gefundenen Polymorphismen wurden nochmals mit Primern (TIR-For, TIR-Rev) aus beiden Richtungen nachsequenziert und ein weiteres Mal ausgewertet.

2.7 Statistische Berechnungen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie der Charité- Universitätsmedizin Berlin. Die Grundlagen der in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Berechnung basieren auf den Lehrbüchern von Lothar Sachs und Christel Weiß (51, 52). Für die Berechnung der Ergebnisse wurden die Programme Microsoft Excel und SPSS V11.0 verwendet.

2.7.1 Berechnung der Parasitendichte

Die Werte für die Parasitendichte wurden nach der Formel

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

berechnet. Diese Werte wurden dann mit Hilfe der \log_{10} -Funktion transformiert, so dass sie eine symmetrische Verteilung ergeben. Daraus wurden der geometrische Mittelwert der Parasitendichte (*Geometric mean parasite density*, GMPD) und das entsprechende 95% Konfidenzintervall in den verschiedenen Studiengruppen errechnet und miteinander verglichen (53).

2.7.2 Überprüfung von Unterschiedshypothesen

Die Häufigkeit der untersuchten *TLR*-Varianten bei den Erstgebärenden mit oder ohne Malaria (*TLR4*-D299G, *TLR4*-T399I, *TLR9*-T-1486C, *TLR9*-T-1237C) bzw. mit oder ohne bestimmte Manifestationsformen (Anämie, niedriges Geburtsgewicht, intrauterine Wachstumsretardierung und Frühgeburt) wurden durch die Anwendung des 4-Felder- χ^2 -Tests verglichen. Die Häufigkeiten der jeweiligen Punktmutation (*TLR4*-E474K, *TLR4*-Q510H) der Kinder mit schwerer Malaria wurden mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe durch die Anwendung des exakten Tests nach Fischer verglichen. Die genannten Testverfahren dienen der Analyse dichotomer Merkmale. Für den 4-Felder- χ^2 -Test werden große Stichproben vorausgesetzt (alle erwarteten Einzelhäufigkeiten > 5) (54). Für den exakten Test nach Fischer können auch kleinere Stichproben eingesetzt werden. Beide Verfahren dienen der Untersuchung der Wahrscheinlichkeit für nicht zufällige entstandene unterschiedliche Häufigkeiten einer Merkmalsausprägung. Durch die Festlegung eines entsprechenden Signifikanzniveaus kann eine Aussage über die Irrtumswahrscheinlichkeit getroffen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Nullhypothese (H_0) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von $p \leq 0,05$ formuliert: Zwischen den Gruppen liegt hinsichtlich des untersuchten Merkmals kein Unterschied vor. Ausgehend von der H_0 lautet die Alternativhypothese (H_1): Die Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich des zu untersuchenden Merkmals.

Die H_0 muss zugunsten der H_1 verworfen werden, wenn die Berechnungen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% ergeben, dass der Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich des Auftretens des untersuchten Merkmals nicht zufällig ist. Dies setzt bei der Anwendung des 4-Felder- χ^2 -Tests voraus, dass der empirisch ermittelte Wert über dem

jeweiligen kritischen Wert liegt, der aus Tabellen über die Verteilungsfunktion der χ -Verteilung entnommen wird.

Als Maß für die Stärke eines Zusammenhangs zweier Merkmale, die nach dem 4-Felder- χ^2 -Test bzw. dem exakten Test nach Fischer assoziiert sind, wurde die Odds Ratio (OR) berechnet. Man errechnet dabei das Verhältnis der Häufigkeit des eingetretenen zu dem des nicht eingetretenen Ereignisses. Stetige und normalverteilte Variablen wie die logarithmisierten Werte der Parasitendichte wurden durch parametrische Tests verglichen (Student's t-Test). Zur Unterschiedsprüfung von Merkmalen wie Hämoglobin und Körpertemperatur wurden nicht-parametrisch Testverfahren herangezogen (Mann-Whitney U-Test, Kruskal-Wallis Test).

Assoziationen zwischen einzelnen Genotypen und Manifestationsformen der Malaria in der ersten Schwangerschaft wurden für bekannte Risikofaktoren (Anämie, geringes Geburtsgewicht, intrauterine Wachstumsretardierung und vorzeitige Geburt) adjustiert (43). Hierfür wurden multiple logistische Regressionsmodelle verwendet. Faktoren wurden in das Modell eingegeben und schrittweise entfernt, wenn sie in multivariater Analyse keine signifikanten Assoziationen zeigten ($p > 0,05$). Diese Methode dient der Untersuchung des Einflusses eines Faktors unter der Berücksichtigung des Einflusses von Ko-Faktoren auf die Manifestation einer Erkrankung. Um das Ausmaß abzuschätzen, mit dem die Zielvariable von den einzelnen Einflussfaktoren im Rahmen des angewendeten Regressionsmodells verändert wird, wurde die adjustierte Odds Ratio berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung der Basisdaten der 304 Erstgebärenden aus Agogo

Bei den Erstgebärenden lagen eine plazentare Parasitämie und plazentares Hämozoin zu 46% bzw. 42% vor. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der plazentaren Parasitämie (GMPD, 1,2 [0,01-1,60] Parasiten im Blickfeld) und der mütterlichen Anämie hergestellt werden (OR, 3,0 [95% CI, 1,8-4,9]), nicht aber zwischen der plazentaren Parasitämie und einem niedrigen Geburtsgewicht (*low birth weight*, LBW) (OR, 1,2 [95% CI, 0,7-2,1]), oder der Frühgeburtlichkeit (OR, 1,1 [95% CI, 0,6-1,9]). Im Gegensatz dazu war das plazentare Hämozoin sowohl mit erhöhtem Risiko für Anämie als auch mit LBW assoziiert (s. Tab. 10). Die beiden Infektionsparameter in ein logistisches Regressionsmodell einschließend, zeigt sich, dass plazentares Hämozoin mit Anämie (OR, 2,3 [95% CI, 1,2-4,8]), mit LBW (OR, 2,3 [95% CI, 1,2-4,8]) und grenzwertig mit vorzeitiger Geburt (OR, 1,9 [95% CI, 1,0-3,9]) verbunden ist, es aber keine signifikante Assoziation für plazentare Parasitämie gibt. Es waren bei der Anwesenheit von plazentarem Hämozoin der Hämoglobinwert (10,4 [4,6-15,6] vs. 11,8 [5,8-16,4] g/dl; $p < 0,0001$), das Geburtsgewicht (2645 [1280-3800] vs. 2831 [1420-4000] Gramm; $p = 0,0006$) und das Gestationsalter (37,9 [30,0-53,5] vs. 38,2 [29,1-42,2] Wochen; $p < 0,0001$) reduziert. In den folgenden Analysen wurde Hämozoin daher als der klinisch relevante Marker der *P. falciparum* Infektion eingesetzt. Die Basisdaten der 304 Erstgebärenden wurden in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Charakteristika der Erstgebärenden, dargestellt in % und Absolutzahlen

Parameter	Alle %, (Anzahl)	Hämozoin positiv %, (Anzahl)	Hämozoin negativ %, (Anzahl)	p
Gruppe	100 (304)	42,4 (129)	57,6 (175)	...
Mittleres Alter in Jahren (Bereich)	21,4 (15-36)	21,0 (16-30)	21,7 (15-36)	0,24
Mütterliches Fieber (Axilläre Temperatur $\geq 37^{\circ}\text{C}$)	4,0 (12/301)	5,5 (7/127)	2,9 (5/174)	0,25
Plazentare Parasitämie	46,1 (140/304)	84,5 (109/129)	17,7 (31/175)	<0,0001
Mütterliche Anämie	38,5 (117/304)	56,6 (73/129)	25,1 (44/175)	<0,0001
Geringes Geburtsgewicht	26,0 (79/304)	32,6 (42/129)	21,1 (37/175)	0,02
Intrauterine Wachstumsretardierung	10,5 (32/304)	12,4 (16/129)	9,1 (16/175)	0,36
Frühgeburten	26,3 (80/304)	31,0 (40/129)	22,9 (40/175)	0,11
Frühgeburten mit geringem Geburtsgewicht	15,5 (47/304)	20,2 (26/129)	12,0 (21/175)	0,05

3.2 Häufigkeit der *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen bei Erstgebärenden aus Agogo

Die Typisierungen der *TLR4*-Polymorphismen gelangen bei 297 Frauen und die des *TLR9*-Polymorphismen bei 301 Frauen. Es hat sich gezeigt, dass ein Fünftel der untersuchten Frauen die Mutation *TLR4*-D299G aufwiesen (Tab. 9). Sechs von diesen trugen zudem die Mutation *TLR4*-T399I heterozygot (Tab. 9). Der Polymorphismus *TLR9*-T1237C trat bei zwei Drittel der Frauen und *TLR9*-T1486C bei der Hälfte der Frauen auf (Tab. 10).

Tabelle 10: Häufigkeit der *TLR4*- und *TLR9*- Polymorphismen.

Parameter	Erstgebärende (%, Anzahl)
<i>TLR4</i> -D299G	21,2 (63/297)
Heterozygot (%, Anzahl)	19,9 (59/297)
Homozygot (%, Anzahl)	1,3 (4/297)
<i>TLR4</i> -T399I heterozygot	2,0 (6/297)
<i>TLR9</i> -T1237C (%, Anzahl)	65,4 (197/301)
Heterozygot (%, Anzahl)	52,1 (157/301)
Homozygot	13,3 (40/301)
<i>TLR9</i> -T1486C	50,2 (151/301)
Heterozygot	39,9 (120/301)
Homozygot	10,3 (31/301)

3.3 Zusammenhänge zwischen *TLR*-Polymorphismen und Malaria bei Erstgebärenden

Insgesamt erhöhten *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen das Risiko für die plazentare Malaria und eine erhöhte Parasitendichte nicht (Tab.11). Eine Anämie schien häufiger bei Frauen mit der *TLR4*-D299G-Mutation (31/115), als bei denen mit dem Wildtyp (32/182; $p = 0,05$) vorzukommen, allerdings erreichte dieser Unterschied nicht das Signifikanzniveau. Es ergaben sich ebenso wenig signifikante Unterschiede zwischen den Prävalenzen von geringem Geburtsgewicht, intrauteriner Wachstumsretardierung und Frühgeburt von nicht erkrankten Frauen mit und ohne *TLR*-Variante.

Tabelle 11: Verteilung von *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen bei Erstgebärenden mit bzw. ohne plazentarem/-s Hämozoin.

Parameter	Hämozoin Positiv (%, Anzahl)	Hämozoin Negativ (%, Anzahl)	P
<i>TLR4</i> -D299G	18,9 (24/127)	22,9 (39/170)	0,40
Heterozygot	17,3 (22/127)	21,8 (37/170)	0,34
Homozygot	1,6 (2/127)	1,2 (2/170)	1,0
<i>TLR4</i> -T399I Heterozygot	1,6 (2/127)	2,4 (4/170)	0,64
<i>TLR9</i> -T-1237C	64,8 (83/128)	65,9 (114/173)	0,85
Heterozygot	51,6 (66/128)	52,6 (91/173)	0,86
Homozygot	13,3 (17/128)	13,3 (23/173)	1,0
<i>TLR9</i> -T-1486C	47,7 (61/128)	52,0 (90/173)	0,45
Heterozygot	33,6 (43/128)	52,0 (90/173)	0,06
Homozygot	14,1 (18/128)	7,5 (13/173)	0,06

Allerdings verstärkten die Polymorphismen *TLR4*-D299G und *TLR9*-T-1486C die Manifestation der Infektion mit *P. falciparum* (Tab. 12). Infizierte Erstgebärende mit den Polymorphismen *TLR4*-D299G und *TLR9*-T-1486C wiesen ein 6-fach erhöhtes Risiko für ein niedriges Geburtsgewicht bei termingerechten Kindern auf (Tab.12).

Bei Erstgebärenden, die heterozygot oder homozygot für die Mutation *TLR9*-T-1486C und mit *P. falciparum* infiziert waren, konnte eine Häufung von intrauteriner Wachstumsretardierung beobachtet werden. So lag eine intrauterine Wachstumsretardierung bei 6,0% (4/67) der Frauen mit Wildtyp, bei 18,6% (8/43) der heterozygoten und bei 22,2% (4/18) der homozygoten Frauen vor ($\chi^2_{\text{trend}} = 5,1$; $p = 0,02$). Schließt man die Daten in ein logistisches Regressionsmodell ein, um die Schwangerschaftsvorsorgeuntersuchungen der Frauen mit einzubinden, zeigt sich eine Odds Ratio für intrauterine Wachstumsretardierung von 2,9 (95% CI [0,9-9,7]; $p = 0,08$) und 4,4 (95% CI [1,1-17,1]; $p = 0,03$) bei infizierten Frauen mit *TLR4*-D299G bzw. *TLR9*-T-1486C. Zusätzlich war das Risiko einer Anämie bei infizierten Frauen mit *TLR4*-D299G 5-fach höher als bei den Frauen mit dem Wildtyp (Tab. 12).

Die Polymorphismen *TLR4*-Thr399Gly und *TLR9*-T-1237C zeigten keinen Zusammenhang mit der Manifestation von Malaria in der Schwangerschaft.

Tabelle 12: Assoziation zwischen den *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen und der Manifestation plazentarer Malaria

	Prävalenz , % (Anteil)	Nicht adjustiert OR (95% KI);p	adjustiert ^a
Mütterliche Anämie			
<i>TLR4</i>			
Wildtyp	50,5 (52/103)	1	
D299G	79,2 (19/24)	3,7 [1,2-13,6]; 0,1	4,7 [1,5-14,4]; 0,007
<i>TLR9</i>			
Wildtyp	52,2 (35/67)	1	
T-1486C	60,7 (37/61)	1,4 [0,7-3,0]; 0,3	1,2 [0,5-2,5]; 0,7
Niedriges Geburtsgewicht (LBW)			
<i>TLR4</i>			
Wildtyp	30,1 (31/103)	1	
D299G	45,8 (11/24)	2,0 [0,7-5,3]; 0,14	2,1 [0,8-5,5]; 0,14
<i>TLR9</i>			
Wildtyp	25,4 (17/67)	1	
T-1486C	41,0 (25/61)	2,0,[0,9-4,6]; 0,06	1,8 [0,8-4,0]; 0,15
LBW bei termingerechten Kindern			
<i>TLR4</i>			
Wildtyp	13,9 (10/72)	1	
D299G	40,0 (6/15)	4,1 [1,0- 16,7];0,03	5,7 [1,3-23,9]; 0,02
<i>TLR9</i>			
Wildtyp	8,5 (4/47)	1	
T-1486C^b	29,3 (12/41)	4,5 [1,2-20,5]; 0,01	6,5 [1,2-27,8]; 0,01
Frühgeburten			
<i>TLR4</i>			
Wildtyp	30,1 (31/301)	1	
D299G	37,5 (9/24)	1,4 [0,5-3,9]; 0,5	1,4 [0,5-3,7]; 0,5
<i>TLR9</i>			
Wildtyp	29,9 (20/67)	1	
T-1486C	32,8 (20/61)	1,2 [0,5-2,6]; 0,7	1,0 [0,5-2,1]; 1,0

Anmerkung: Ungefähr die Hälfte der Frauen (153/304) waren < 3-mal bei der Schwangerschaftsvorsorge. Bei ihnen traten häufiger Anämie (48% (74/153)) vs. (27% (38/141)) und LBW (32% (49/153)) vs. (20% (28/141))

auf als bei Frauen die > 3-mal in der Schwangerschaftsvorsorge waren. Auf die Prävalenzen von plazentarem Hämozoin (47% vs. 38%; P = 0,1) und von frühzeitiger Geburt (29% vs. 24%; P = 0,3) hatte dies keinen Effekt. Konfidenzintervall (KI): 95%; LBW, *Low birth weight* = niedriges Geburtsgewicht; OR, *odds ratio*.

a) adjustiert für Alter, die betreffenden TLR-Polymorphismen und das Ausmaß der Schwangerschaftsvorsorgen (< 3 Besuche oder > 3 Besuche).

b) ORs (95% KIs) für Frauen heterozygot und homozygot für *TLR9-T-1486C* waren 5,9 [1,3-27,8] and 7,9 [1,3-48,0].

Die Varianzanalyse ergab, dass der Effekt der *P.falciparum*-Infektion auf den Hb-Wert bei Frauen mit *TLR4-D299G* (-2,4g/dl) signifikant größer war, als bei jenen mit dem Wildtypallel (-1,2g/dl; F = 5,9; p = 0,02). Zudem führte die Infektion zu Verminderung des Geburtsgewichtes um 314 g bei Erstgebärenden mit *TLR4-Gly299Asp* und um 157 g bei Erstgebärenden mit dem Wildtyp (F = 1,2; p = 0,3). Bei termingerechten Kindern lag der Unterschied bei 280 g und 112 g (F = 1,4; p = 0,2). Bei Vorliegen des Polymorphismus *TLR9-T-1486C* führte die Infektion zu einer Reduktion des Geburtsgewichtes um 295 g im Gegensatz zu 78 g bei Erstgebärenden mit dem Wildtypallel (F = 3,7; p = 0,06). Bei termingerechten Kindern war dieser Unterschied signifikant (-252 g vs. -29 g [F = 4,1; p = 0,04]). Für Frühgeburtlichkeit zeigte sich kein Unterschied.

Zusammenfassend konnte eine verstärkte Manifestation der *P.falciparum*-Infektion bezogen auf ein erhöhtes Risiko für Anämie, intrauterine Wachstumsretardierung und ein niedrigeres Geburtsgewicht bei Vorliegen der Polymorphismen *TLR4-D299G* und *TLR9-T-1486C* gezeigt werden.

3.4 Darstellung der Basisdaten der Kinder aus Tamale

In der Gesamtgruppe der 290 Patienten mit schwerer Malaria, die in dem Zeitraum von August bis November 2002 rekrutiert wurden, lag der Altersmedian bei 24 Monaten (Spannweite (SW) 6-102 Monate). In dieser Gruppe befanden sich 155 Mädchen und 135 Jungen. Durch das merkmalsbezogene Matching der Kontrollgruppen, sind alle Gruppen identisch in Bezug auf Geschlechts- und Altersverteilung.

Die Fallgruppe, Kinder mit schwerer Malaria, wies bei der Betrachtung der klinischen Parameter im Vergleich zur ersten Kontrollgruppe, Kinder mit asymptomatischer Parasitämie, eine wesentlich höhere Parasitendichte (GMPD) auf (29,512/µl vs. < 5,000/µl). Die Mittelwerte des Hämoglobinwerts (Hb) und der Körpertemperatur (KT) betragen bei den Kindern mit schwerer Malaria 4,9 g/dl bzw. 38,6°C. Die zweite Kontrollgruppe bestand aus gesunden Kindern.

3.5 Klinische Manifestation der schweren Malaria

Die schwere Anämie definierte die schwere Malaria in mehr als der Hälfte der Fälle (55%), gefolgt von Erschöpfung (33%) und Atemnot (23%). In jeweils ca. 20% der Fälle traten multiple Krampfanfälle und Bewusstlosigkeit auf. Es konnte beobachtet werden, dass sich die Prävalenz von Anämie mit zunehmendem Alter verringerte, wohingegen Erschöpfung, Ikterus, Hämoglobinurie und Hyperparasitämie zunahmen. Zudem zeigten ältere Kinder vermehrt Krampfanfälle und Bewusstlosigkeit. Der Altersmedian für Kinder mit schwerer Anämie aber ohne zerebrale Beteiligung (n = 88), lag bei 21,5 Monaten (6-97 Monate). Der Altersmedian für Kinder mit zerebraler Beteiligung lag im Vergleich dazu bei 27,5 Monaten (6-102 Monate, n = 186; P = 0,0001). Die schwere Anämie war bei 24% der Kinder (n = 69) die einzige Manifestation der schweren Malaria (siehe Tab.13).

Tabelle 13: Symptome und klinische Manifestation der schweren Malaria.

	Gesamt	Altersgruppen		
		< 2Jahre	2-4 Jahre	> 4Jahre
Anzahl	290	99	129	62
Diagnosekriterien (Anzahl)	%			
Erschöpfung	33,4 (97)	26,3 (26)	34,9 (45)	41,9 (26)* ¹
Bewusstseinsverlust	19,3 (56)	14,1 (14)	20,9 (27)	24,2 (15)
Atemnot	22,8 (66)	30,3 (30)	17,8 (23)*	21 (13)
Krampfanfälle	20,3 (59)	17,2 (17)	20,9 (27)	24,2 (15)
Kreislaufkollaps	3,4 (10)	4,0 (4)	2,4 (3)	4,8 (3)
Lungenödem	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Blutungsneigung	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Gelbsucht	11,7 (34)	2,0 (2)	12,4 (16)*	25,8 (16)* ¹
Hämoglobinurie	2,3 (8)	0 (0)	4,1 (4)	6,5 (4)* ¹
Schwere Anämie	55,2 (160)	77,8 (77)	47,3 (61)*	35,8 (22)* ¹
Sonstige Kriterien				
Zerebrale Malaria	16,9 (49)	11,1 (11)	19,4 (25)	21,0 (13)
Hyperparasitämie ($\geq 250.000\mu\text{l}$)	22,1 (64)	15,2 (15)	22,5 (29)	32,3 (20)* ¹
Hypoglykämie (<2,2 mmol/l)	16,9 (49)	10,1 (10)	19,4 (25)	22,6 (16)* ¹
Hyperlaktatämie (≥ 5 mmol/l)	39,3 (114)	42,4 (42)	32,6 (42)	48,4 (30)
Hyperpyrexie (>40°C)	8,1 (23)	8,2 (8)	9,6 (12)	4,9(3)

*= signifikanter Unterschied zu Altergruppe < 2Jahre (p < 0,05)

¹ = signifikanter Trend mit den Altersgruppen (χ^2_{trend} -Test, $p < 0,05$)

In 48% der Fälle präsentierten die erkrankten Kinder nur ein Diagnosekriterium der schweren Malaria (WHO 2000), bei 52% der Kinder waren es 2, 3 oder 4.

3.6 Häufigkeit der *TLR4*-Polymorphismen *TLR4-E474K* und *TLR4-Q510H* bei Kindern aus Tamale

Die Typisierung gelang bei 300 Kindern für *TLR4-Q510H* und bei 299 Kindern für *TLR4-E474K*. Die Polymorphismen verteilten sich auf die Fallgruppe und die beiden Kontrollgruppen zu fast gleichen Anteilen und lagen bis auf jeweils eine Ausnahme heterozygot vor. Die Kinder mit schwerer Malaria wiesen die *TLR4-Q510H* Variante zu 15% (15/102) auf und es lag hier die einzige homozygote Punktmutation für den *TLR4-Q510H* vor. Bei den gesunden Kindern trat der Polymorphismus zu 13% (13/100) auf, bei den mit *P. falciparum* infizierten aber asymptomatischen Kindern zu 11% (11/99).

Der *TLR4-E474K* fand sich am häufigsten mit 12% (12/100) bei den asymptomatischen aber mit *P. falciparum* infizierten Kinder. In dieser Gruppe lag auch die einzige homozygote Variante für diese Punktmutation vor. *TLR4-E474K* wurde jeweils mit 9% bei den gesunden Kindern (9/99) und bei jenen mit schwerer Malaria (9/100) beobachtet.

3.7 Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von *TLR4-E474K* und *TLR4-Q510H* und der schweren Malaria

Um einen Zusammenhang der Polymorphismen mit der Manifestation der schweren Malaria zu untersuchen, wurde der 4-Felder-Chi²-Test angewendet. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Manifestation der schweren Malaria und den *TLR4*- Polymorphismen *Q510H* und *E474K* in den drei Gruppen festgestellt werden (s. Tab. 14).

Tabelle 14: Assoziation von *TLR4-Q510H* und *TLR4-E474K* mit der Manifestation von Malaria.

<i>TLR4-Q510H</i>	OR (KI 95%)	P
Schwere Malaria vs. beide Kontrollen	1,257 (0,628-2,518)	0,518
Schwere Malaria vs. gesunde Kinder.	1,154 (0,518- 2,568)	0,726
Schwere Malaria und parasit. Kinder vs. gesunde Kinder.	0,994 (0,487-2,030)	0,987
parasit. Kinder vs. gesunde Kinder.	0,837 (0,355-1,969)	0,683

<i>TLR4-E474K</i>	OR (KI 95%)	P
Schwere Malaria vs. beide Kontrollen	0,838 (0,369-1,905)	0,674
Schwere Malaria vs. gesunde Kinder	0,989 (0,375-2,606)	0,982
Schwere Malaria + parasit. Kinder vs. gesunde Kinder	1,173 (0,516-2,666)	0,703
Parasit. Kinder vs. gesunde Kinder	1,364 (0,547-3,397)	0,505

OR = Odds Ratio, KI = Konfidenzintervall, vs. = versus

Zusammenfassend konnten für *TLR4-E474K* und *TLR4-Q510H* gezeigt werden, dass die Polymorphismen in der Studienbevölkerung zu $\geq 9\%$ vorliegen, es aber keinen Zusammenhang mit der Manifestation der schweren Malaria gibt.

3.8 Identifizierung neuer *TLR4*-Polymorphismen

Durch die Sequenzierung konnten zwei bisher unbekannte Polymorphismen in der TIR-Domäne des TLR4 entdeckt werden. Beide fanden sich in der Gruppe der schwer an Malaria erkrankten Kinder und lagen heterozygot vor.

Nach der für Punktmutation üblichen Benennung handelt es sich um ***TLR4-M659T*** und ***TLR4-R804P***. Beide führen zu einem Aminosäureaustausch. Bei dem *TLR4-M659T* befindet sich an Stelle der Base Thymin die Base Cytosin, was zum Tausch der Aminosäure Methionin gegen Threonin führt.

Bei dem *TLR4-R804P* findet man anstelle der Base Guanin die Base Cytosin, was zum Austausch der Aminosäure Arginin zu Prolin führt.

Da beide Polymorphismen nur einmal mal nachgewiesen wurden (1%) konnte keine Aussage über eine Mögliche Auswirkung auf die Manifestation der schweren Malaria getroffen werden.

4 Diskussion

Es wird in der Literatur immer wieder die Frage aufgeworfen, welche Bedeutung TLRs für die Erkennung von *P. falciparum* im angeborenen Immunsystem haben und ob Polymorphismen in den TLRs zu Veränderung in der Abwehr und auch hinsichtlich der Malaria führen. TLR4 und TLR9 konnten neben TLR2 als Hauptrezeptoren für die Erkennung von *P. falciparum* identifiziert werden, deshalb wurden für diese Arbeit häufige und seltene *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen untersucht. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Kontext mit den derzeitigen Erkenntnissen über die Auswirkungen von Polymorphismen in *TLR4* und *TLR9* unter besonderer Berücksichtigung von Auswirkungen auf das Risiko und die Manifestation der Malaria diskutiert.

4.1 Kritische Beurteilung von Studiendesigns und Methoden

Vor der Diskussion der Ergebnisse und den sich ergebenden Schlussfolgerungen werden zunächst die vorangegangenen Studien und durchgeführten Methoden kritisch bewertet.

4.1.1 Studiendesign der Querschnittstudie zu schwangeren Frauen in Agogo

Bei der in Agogo durchgeführten Studie handelt es sich um eine Querschnittstudie. Im Rahmen einer Querschnittstudie werden in der Regel Aussagen zur Häufigkeit eines oder mehrerer Faktoren gemacht. Sie bietet die Möglichkeit, in relativ kurzer Zeit und bei lückenhafter Infrastruktur eine große Anzahl von Probanden zu rekrutieren. Innerhalb eines Jahres konnten so 893 Frauen untersucht werden. Durch die große Anzahl der Probandinnen ist ein hoher Grad von Repräsentativität gewährleistet. In der Studie wurden auch plazentare Untersuchungsmethoden mit einbezogen, deshalb konnte das Untersuchungsmaterial erst nach der Geburt gewonnen werden. Eine z. B. hinsichtlich der Infektionsdauer aussagekräftige Langzeitstudie zur plazentaren Malaria ist zwar denkbar, wäre jedoch ohne Intervention unethisch und nicht akzeptabel. Es konnten durch mikroskopische Untersuchungen des plazentaren Blutausriches Rückschlüsse auf die Infektionsdauer gezogen werden, abhängig von der Präsenz und Ausbreitung des Parasiten und des Malariapigments, gab es 4 Gruppen: die aktive Infektion, die chronisch-aktive Infektion, die durchgemachte Infektion und die nicht infizierten (53). Von den rekrutierten 893 Gebärenden wurden in diese Studie 304 Erstgebärende eingeschlossen, da man davon ausgeht, dass diese noch keine oder kaum Stamm-spezifische Immunität gegenüber den plazentar-adärenten *P. falciparum*-Stämmen ausgebildet haben (16). Folglich sollte hier das angeborene Immunsystem von größerer Bedeutung sein.

4.1.2 Studiendesign der Fall-Kontroll-Studie zu schwerer Malaria in Tamale

Die Untersuchungsergebnisse des Teils der vorliegenden Arbeit aus Tamale basieren auf der Datenerhebung im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie. Bei diesem Studiendesign, wird die Stichprobe nach dem Auftreten eines bestimmten Zielereignisses (hier: schwere Malaria) in eine Fallgruppe (Probanden mit Zielereignis) und eine Kontrollgruppe (Probanden ohne Zielereignis) unterteilt. Daran schließt sich die Untersuchung verschiedener Expositionen an (hier: *TLR4-E474K*, *TLR4-Q510H* und neue Punktmutationen). So weisen unterschiedliche Anteile von exponierten Personen in der Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf einen Zusammenhang zwischen Zielereignis und Exposition hin (51).

Der Vorteil einer Fall-Kontroll-Studie liegt in erster Linie darin, dass sie geeignet ist, seltene Ereignisse, wie hier die schwere Malaria, aufzuzeigen und vergleichbar zu machen. Weitere Vorteile sind eine unkomplizierte Durchführung, da der Zugang zu erkrankten Personen relativ einfach ist und lange Beobachtungszeiten, wie bei einer prospektiven Studie, entfallen. Die Nachteile einer Fall-Kontroll-Studie liegen in der Auswahl der Kontrollen, welche gematched werden, hier für Alter und Geschlecht, und der schwierigen Kontrolle möglicher Störgrößen, wie z.B. zusätzlichen Infektionen oder erblich bedingter Erkrankungen (52). Das führt eventuell zu mangelnder Datenqualität und zur Nicht-Nachweisbarkeit von Kausalität. Um die möglichen Fehler (Bias) gering zu halten und um das Kriterium der Repräsentativität zu wahren, wurde das Gebiet für die Rekrutierung der Kontrollgruppe in mehrere Einheiten unterteilt. Anschließend wurde eine randomisierte Strichprobenziehung aus diesen Einheiten durchgeführt. Zusätzlich korrespondiert das Rekrutierungsgebiet der Kontrollgruppe mit dem Einzugsgebiet des Tamale Teaching Hospitals, so dass die Auswahl der Fälle weitgehend repräsentativ erfolgt ist (28).

Um den Fehler klein zuhalten, dass der Zusammenhang zwischen der Exposition und einem Ergebnis möglicherweise auf eine dritte Variable (Confounder) zurückzuführen ist wurde ein paarweises Matching durchgeführt (28).

4.1.3 Nachweis der Plasmodium falciparum-Infektion und der Parasitendichte

Die *P.-falciparum*-Infektion wurde primär mikroskopisch nachgewiesen. Der Goldstandard der Malariadiagnostik ist der gefärbte Blutaussstrich oder der Dicke Tropfen. Er zeichnet sich durch unkomplizierte Durchführung an Ort und Stelle sowie geringe Materialkosten aus (3). Bei der Beurteilung des Dicken Tropfen werden pro Blickfeld mehrere übereinander gelagerte Erythrozytenschichten auf Malariaerreger hin kontrolliert, wobei die Erythrozyten bereits lysiert sind. Die Anzahl der Parasiten wird auf 200-500 Leukozyten ermittelt (9).

Die Nachweisgrenze liegt bei einer Parasitendichte von ca. 0,0003% mit dem Giemsa gefärbten Dicken Tropfen aus dem peripheren Blut (54). Zur Sicherung der Diagnose erfolgte zusätzlich ein Nachweis mittels PCR. Die geschätzte Parasitendichte bei Infektionen die nur mittels PCR nachgewiesen werden können liegt bei $\geq 0,00005\%$ (55).

Aufgrund der regelhaften Sequestrierung von *P. falciparum* im plazentaren, intervillösen Raum ist bei Schwangeren die Mikroskopie Dicker Tropfen aus peripher-venösen Blut wenig aussagekräftig; falsch negative Ergebnisse sind sehr häufig (56). Aus diesem Grund wurde die mikroskopische Diagnostik bei Schwangeren anhand plazentarer Blutproben gestellt. Aufgrund der häufig, Malaria assoziierten chronischen Intervillositis mit stark schwankender, lokaler Leukozytenzahlen ist eine Parasitenausählung bezogen auf die Leukozytenzahl nicht valide (16). Daher erfolgte hier die Ausählung der Parasiten bezogen auf 100 mikroskopische Felder (1000 x Vergrößerung). Als grobes Korrelat für die Chronizität der Infektion wurde Leukozyten assoziiertes Pigment erfasst; in Fibrin eingelagertes Pigment wurde dabei nicht berücksichtigt (53). Um interindividuelle Variationen bei der Beurteilung der Artefakt-reichen Präparate zu minimieren, erfolgte die Mikroskopie der plazentaren Dicken Tropfen durch einen Untersucher (F. Mockenhaupt). Submikroskopische Infektionen wurden wiederum durch spezifische PCR-Verfahren erfasst (57).

4.1.4 Diagnosestellung schwerer Malaria

Die Diagnosestellung einer schweren Malaria erfolgt aus der mikroskopischen Parasitenbestimmung und anhand von klinischen Kriterien streng nach WHO-Einteilung ohne sekundäre Zusatzkriterien. Aufgrund der primär klinisch gestellten Diagnosestellung gab es die Möglichkeit der Fehldiagnose, z.B. einer Sepsis. Eine zusätzliche Schwierigkeit der Definition liegt in der mikroskopischen Bestimmung des Parasiten, denn die Parasitendichte weist während der Infektion eine hohe Varianz auf. So kann sich die Anzahl der im Dicken Tropfen zu findenden Parasiten innerhalb von sechs Stunden um das 100 fache und mehr, unterscheiden. Als Gründe für die Schwankungen werden die Sequesterbildung der infizierten Erythrozyten in den Venolen sowie das massive Freiwerden der Parasiten aus den Sequestern diskutiert (58). In der Fall-Kontroll-Studie wurden die Kinder mit klinischer Diagnose ohne mikroskopischen Befund aus der Fallgruppe ausgeschlossen (28).

4.2 Vor- und Nachteile der angewendeten Labormethoden

Im Vergleich zum bislang einzigen Verfahren zur Genotypisierung von *TLR*-Polymorphismen, dem Sequenzieren wie von Lazarus *et al.* (27) beschrieben, weist die neu

entwickelte *Real-time-PCR* vielfältige Vorteile auf. Das Sequenzieren umfasst mehrere Arbeitsschritte: die PCR, die Überprüfung der PCR-Produkte am Gel, die Reinigung der PCR-Produkte, das Cycle Sequencing, die Fällung der Cycle-Sequencing-Produkte sowie den eigentlichen Sequenzierlauf. Diese Methode ist daher sowohl personal- als auch zeitaufwendig. Vom ersten Arbeitsschritt bis zum Ergebnis vergehen bei der Sequenzierung ca. 12 Stunden, wohingegen bei der real-time-PCR die Resultate bereits nach 90 Minuten vorliegen. Die real-time-PCR erfordert nur einen Arbeitsschritt und weist weniger Fehlermöglichkeiten und damit weniger „Verschleiß“ von wertvollem Patientenmaterial auf. Die Materialkosten der Genotypisierung mittels real-time-PCR mit dem von uns entwickelten Mix liegen bei ca. 1,50 Euro, die Sequenzierung kostet etwa das Fünffache (50). Der höhere Arbeitsaufwand beim Sequenzieren und die damit verbundenen Personalkosten dürften die Ersparnis bei Anwendung des real-time-PCR-Verfahrens noch deutlich steigern.

Der Vorteil des Sequenzierens liegt allerdings in seiner höheren Auflösung. Die Abfolge der einzelnen Basen kann bestimmt werden und dies ermöglicht auch den Nachweis noch unbekannter Polymorphismen, die mit der *Real-Time-PCR* und Hybridisierungs sonden nicht erfasst werden. Allerdings erfordert die Auswertung der Sequenzierergebnisse einen erheblichen Zeitaufwand und ist mit mehr Fehlermöglichkeiten behaftet, weshalb sie in dieser Arbeit nur für die Untersuchung der TIR-Domäne auf unbekannte Punktmutation genutzt wurde.

Für *TLR4-Q510H* musste ein anders Verfahren, das des RFLP durchgeführt werden, da sich eine Lightcycler-PCR aufgrund einer Schleife (Loop) in der Genstruktur nicht etablieren ließ. Der Nachteil liegt zum einen in den verschiedenen Arbeitsschritten, die wie oben die Fehlermöglichkeiten erhöhen, zum anderen im hohen Zeitaufwand. Der Vorteil liegt in der Genauigkeit des Schneideenzym, sodass der Anteil von falsch positiven Ergebnissen gering ist.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Methoden verwendet. Die erste (*Real-Time-PCR*) erlaubt eine einfache und schnelle Genotypisierung der *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen, die zweite (RFLP) wurde aufgrund des Loops, der keine Etablierung einer *Real-Time-PCR* möglich machte, für *TLR4-Q510H* eingesetzt und die dritte (Sequenzierung) diente der Entdeckung noch unbekannter Polymorphismen.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Typisierung von häufigen *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen (*TLR4*-D299G, *TLR4*-T399I, *TLR9*-T1236C, *TLR9*-T1486C) bei Erstgebärenden in Ghana durchgeführt und auf einen Zusammenhang mit dem Risiko und der Manifestation der Malaria in der Schwangerschaft geprüft, die bisher in der Literatur nicht beschrieben ist. Es konnte kein Zusammenhang mit der Infektion per se gezeigt werden, bei infizierten Frauen aber ein erhöhtes Risiko für mütterliche Anämie, intrauterine Wachstumsretardierung und ein niedrigeres Geburtsgewicht bei Vorliegen der Polymorphismen *TLR4*-D299G und *TLR9*-T-1486C. Für *TLR4*-T399I und *TLR9*-T-1237C bestanden keinerlei Zusammenhänge. Zudem wurde das Vorkommen seltener *TLR4*-Polymorphismen (*TLR4*-E474K und *TLR4*-Q510H) bei Kindern in Ghana untersucht. Es konnte eine Prävalenz von jeweils $\geq 9\%$ gezeigt werden, jedoch kein Zusammenhang mit der schweren Malaria.

Außerdem wurden 2 bisher nicht beschriebene Polymorphismen in der *TIR*-Domäne des TLR4 gefunden, *TLR4*-M659T und *TLR4*-R804P. Da beide Polymorphismen nur einmal nachgewiesen wurden, konnte keine Aussage über eine mögliche Auswirkung der schweren Malaria getroffen werden. Festzuhalten ist aber, dass beide Polymorphismen in der Gruppe der an schwerer Malaria erkrankten Kinder vorlagen.

4.3.1 Die Bedeutung von *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen für die Malaria in der Schwangerschaft und die schwere Malaria in der Kindheit

Diese Ergebnisse unterstützen die bisherigen Erkenntnisse zur Auswirkung von *TLR4*-Polymorphismen auf die Manifestation von Malaria und andere Erkrankungen. TLR4 reagiert spezifisch auf bakterielle LPS, die Bestandteil der gram-negativen Zellwand sind (37). Auf die Erkennung des LPS folgt eine Signalinduktion durch TLR4, aus welcher eine Expression von Genen (z.B. IL-6, TNF- α), die zu Inflammation und zur Induktion der antimikrobiellen Antwort führt, folgt. Weiter konnte gezeigt werden, dass TLR4 auch an der Erkennung von *Aspergillus fumigatus* und viralen Proteinen beteiligt ist (39). Oliveira *et al.* konnten 2004 zeigen, dass TLR4 eine entscheidende Rolle in der Erkennung des Glycoinositolphospholipiden (GIPs) von *Trypanosoma cruzi* spielt, welches eng verwandt ist mit dem *P. falciparum* GPI (38). 2005 beschrieben Krishnegowda *et al.* in einer *in vitro* Studie zum ersten Mal, dass neben TLR2 auch TLR4 in die Erkennung von *P. falciparum* über GPI beteiligt ist (10).

Die häufigen Polymorphismen *TLR4-D299G* und *TLR4-T399I* erhöhen das Risiko für eine gramnegative Infektion und für einen septischen Schock (40). Seltene *TLR4*-Polymorphismen (*TLR4-E474K*, *TLR4-Q510H*) erhöhen das Risiko an einer Meningokokkensepsis zu versterben und liegen vor allem bei Afrikanern vor (38). Ein defekter TLR4 bei Mäusen führt zu einem erhöhten Risiko an einer *Trypanosoma cruzi*-Infektion zu sterben (38).

Mockenhaupt *et al.* zeigten 2006, dass *TLR4-D299G* und *TLR4-T399I* das Risiko, an einer schweren Malaria zu erkranken, um das 1,5- und 2,6-fache erhöhen und das *TLR4-D299G* in ca. 21% in Ghana vorliegt (20). In der vorliegenden Arbeit konnte die hohe Prävalenz von 21% bestätigt werden und für *TLR4-D299G* eine Assoziation mit mütterlicher Anämie und intrauteriner Wachstumsretardierung bei Erstgebärenden mit plazentarer Malaria gezeigt werden. Die Vermutung ist, dass ein veränderter TLR4 (*TLR4-D299G*) nicht nur zu einer eingeschränkten Erkennung von bakteriellem LPS führt, sondern auch zu einer modifizierten Aktivierung des TLR4 durch *P. falciparum* oder GPI. Die modifizierte Aktivierung könnte zu einer reduzierten Aktivierung der proinflammatorischen Signalkaskade am Anfang der *P.-falciparum*-Infektion führen und zu einer insuffizienten Immunantwort während des Fortschreitens und der Etablierung der Erkrankung. Wie bei der vorangegangenen Studie von Mockenhaupt *et al.* beeinflusste *TLR4-D299G* weder die Empfänglichkeit für eine *P.-falciparum*-Infektion noch die Parasitendichte, *TLR4-D299G* verstärkte aber die Manifestation der Malaria in der Schwangerschaft (20). In hochendemischen Gebieten sind *P.-falciparum*-Infektionen häufig chronisch und in der Schwangerschaft mitverantwortlich für die Pathogenese von mütterlicher Anämie und intrauteriner Wachstumsretardierung (59). Moormann *at al.* beschrieben 1999, dass eine plazentare Malaria zu einer Imbalance in der plazentaren Zytokinausschüttung führt und so zur intrauteriner Wachstumsretardierung und vermutlich mütterlicher Anämie beiträgt (18). Im Hinblick auf die von Moormann *et al.* beschriebene Zytokinimbalance könnte eine eingeschränkte Signalinduktion durch *TLR4-D299G* zusätzliche Auswirkungen auf die proinflammatorische Antwort haben und durch weitere Verschiebungen in der Zytokinausschüttung eine intrauterine Wachstumsretardierung und mütterliche Anämie begünstigen.

In Ghana konnten Polymorphismen im TLR2 nicht nachgewiesen werden. TLR2 gilt als Hauptmediator für die Erkennung des *P. falciparum* GPI (20). Polymorphismen im TLR2 scheinen in hochendemischen Malaria-Gebieten nachteilig und aufgrund des starken Evolutiondrucks de-selektiert worden zu sein. Es stellt sich die Frage, warum die *TLR4* Polymorphismen *TLR4-D299G*, *TLR4-E474K* und *TLR4-Q510H* mit ca. 21% und > 10% in Ghana vorliegen. Für *TLR4-E474K* und *TLR4-Q510H* konnte kein Zusammenhang mit der

schweren Malaria gezeigt werden. Eine Bedeutung in Bezug auf andere Infektionskrankheiten ist allerdings nicht auszuschließen, da die Polymorphismen, wie bei Smirnova *et al.* beschrieben zu einer verstärkten Manifestation der Meningokokkensepsis bei Kaukasiern führen (37). Patienten mit der Variante *TLR4-D299G* zeigen tendenziell eine reduzierte Letalität bei schwerer Malaria, was möglicherweise an einer verringerten Zytokinausschüttung liegt und folglich zu einer reduzierten proinflammatorischen Antwort führt, die ihrerseits bei tödlichen Verläufen beobachtet wird (20). Die dahinterstehende Theorie ist, dass *TLR4-D299G* zwar das Risiko schwerer Malaria erhöht, aber gleichzeitig einen fatalen Ausgang verhindert und sich deshalb evolutionsbiologisch gehalten hat (20). Im Gegensatz dazu steht eine Studie von Greene *et al.* die 2008 in Kenia und Papua Neu Guinea durchgeführt wurde (60). Diese Studie hat gezeigt, dass *TLR2*-, *TLR4* und *TLR9* Polymorphismen zu gleichen Teilen in Populationen mit unterschiedlicher Malaria-Exposition vorkommen (60). Greene *et al.* schließen daraus, dass diese Signalwege im angeborenen Immunsystem nicht unter starkem evolutionären Druck durch die Malaria stehen können, sondern eher durch Gendrifts zustande gekommen sind (60). Ob ein selektiver Vorteil durch *TLR4*-Polymorphismen für die Malaria vorliegt, bleibt also offen. Ein Bezug zu anderen Infektionskrankheiten wäre aber denkbar. Rocha-Ramírez *et al.* haben gezeigt, dass das Mycobakterium tuberculosis Lipid die Zytokinausschüttung und die Expression von *TLR2*, *TLR4* sowie die MHC Klasse II Expression reguliert (61). Dhiman *et al.* konnten zeigen, dass *TLR4-D299G* und *TLR4-T399I* mit einer erhöhten Interleukin 4 Ausschüttung, nach einer Masernimpfung, einhergehen (62). Inwiefern die *TLR4*-Polymorphismen zu einer Verstärkung der Manifestation von Tuberkulose oder Masern führen, oder das Gegenteil, einen Schutz vor den Erkrankungen, bewirken, ist bisher noch nicht geklärt, sollte aber Gegenstand weiterer Forschung sein.

Für *TLR9*-Polymorphismen konnte bisher kein Zusammenhang mit der Malaria gezeigt werden. *TLR9* erkennt nicht-methylierte CpG DNA, welche Bestandteil von Viren und Bakterien ist (32). Die Erkennung von *P. falciparum* durch *TLR9* ist hier eine Ausnahme, da die Parasiten-DNA nicht CG- sondern AT-reich ist mit einzelnen kleinen CG-Abschnitten (32). Parroche *et al.* konnte zeigen, dass diese AT-reiche DNA mittels Hämozoïn (HZ), das durch den Verdau von Hämoglobin in den befallenen Erythrozyten zu hydrophoben Hämopolymeren entsteht, dem *TLR9* präsentiert wird (30). In der Schwangerschaft kommt es zu einer Akkumulation von Hämozoïn in der Plazenta.

Lazarus *et al.* konnten vier Punktmutation identifizieren, die häufig vorkommen, *TLR9-T-1486C*, *TLR9-T-1237C*, *TLR9-G-1174A* und *TLR9-G-2848A* (34) und zeigen das *TLR9-T-*

1237C zu einem erhöhten Risiko für Asthma führt (33, 34). Zudem werden Zusammenhänge zwischen den vier Punktmutationen und systemischen Lupus erythematodes sowie Morbus Crohn vermutet (35).

Für *TLR9-T-1486C* konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang mit dem Risiko, wohl aber mit der Manifestation der Malaria gezeigt werden. Es sind vor allem die Erstgebärenden, die durch eine Malaria in der Schwangerschaft malariabedingte intrauterine Wachstumsretardierung, ein niedriges Geburtsgewicht, Frühgeburtlichkeit und mütterliche Anämie aufweisen. In der ersten Schwangerschaft können sich zum ersten Mal plazentaadhärente *P. falciparum*-Stämme im Wirt etablieren, die dann zu relevanten Parasitendichten anwachsen und zu einer Immunantwort führen (18). Die plazentaadhärenten *P. falciparum*-Stämmen sind relativ immununfremd, so dass die erworbene Semiimmunität nicht greifen kann (16). Durch die Plazentaadhärenz kommt es vor allem zu einer lokalen Infektion an der Plazenta und dadurch zur Akkumulation von Hämozoin beladenen Makrophagen. Durch *TLR9-T-1486C* scheint die lokale Signalinduktion beeinträchtigt zu sein, sodass es zu einer Verstärkung der plazentaren Malaria kommt, jedoch nicht zu systemischen Effekten wie der Anämie.

Für *TLR9-T-1486C*, *TLR9-T-1237C* zeigen sich noch höhere Prävalenzen 65,4% (T-1237C) und 50,2% (T-1486C) in Ghana als für die *TLR4*-Polymorphismen. Für *TLR9-T-1486C* und den *TLR9-T-1237C* finden sich in der Literatur auch andere Beispiele für hohe Prävalenzen. Lazarus *et al.* und Carvalho *et al.* konnten in den USA und Portugal ebenfalls Prävalenzen von über 20% und z.T. auch 50% feststellen, sodass nicht in erster Linie von einem Zusammenhang mit der Malaria ausgegangen werden kann (34, 63). Vielmehr ist es denkbar, dass es sich im Falle von *TLR9-T-1237C* um eine balancierte Mutation handelt, die unter bestimmten Voraussetzungen zu einer verstärkten Manifestation von Asthma führt (35). Bei *TLR9-T1486C* scheint es ähnlich zu sein (35).

4.3.2 Mögliche Auswirkungen von *TLR-4* und *TLR9*-Polymorphismen auf die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien gegen Malaria

Malaria während der Schwangerschaft ist nach wie vor ein bedeutendes Problem mit erheblichem Risiko für die Mutter, ihren Fetus und das Neugeborene. Jedes Jahr werden ca. 50 Millionen Frauen, die in Endemiegebieten leben, schwanger und sind dem Risiko einer Infektion ausgesetzt. Etwa die Hälfte dieser Frauen lebt in Afrika südlich der Sahara, die meisten von ihnen in Gebieten mit hoher *P. falciparum*-Transmission. In Gebieten mit niedriger Transmissionsrate von *P. falciparum*, in denen die erworbene Immunität nur gering

ausgeprägt ist, sind Schwangere während Malariaepisoden besonders gefährdet. Malaria in der Schwangerschaft kann zu mütterlicher Anämie, intrauteriner Wachstumsretardierung, Frühgeburtlichkeit und einem niedrigen Geburtsgewicht führen (59). Malaria in der Schwangerschaft führt so Jahr für Jahr zum Tod von 75000-200000 Säuglingen (1, 59).

Neben den schwangeren Frauen sind vor allem Kinder von der Malaria betroffen. Ungefähr 60% der klinischen Malariafälle und 80% der Malaria assoziierten Todesfälle ereignen sich in Afrika südlich der Sahara. Die Leidtragenden sind vor allem Kinder unter 5 Jahren, die an schwere Malaria erkranken und sterben (3, 9, 64). Warum einige Kinder schwer an Malaria erkranken, andere asymptomatisch bleiben oder gar nicht erkranken ist bisher nur sehr unzureichend geklärt.

Die WHO hat, gemeinsam mit der Organisation *Roll Back Malaria*, verschiedene Strategien zur effektiven Kontrolle der Malaria während der Schwangerschaft und in der frühen Kindheit entwickelt (2, 3). Hierzu gehören die Ausgabe von mit Insektiziden behandelten Moskitonetzen an die Schwangeren und die Aufklärung der Mütter ihre Kinder möglichst unter den Moskitonetzen schlafen zu lassen, die intermittierend präventive Behandlung von Schwangeren und Kleinkindern mit Malariamedikamenten und das effektive Management von Malariaerkrankungen und mütterlicher Anämie in der Schwangerschaft durch regelmäßige Schwangerschaftsvorsorge (1). Hiermit konnte in manchen Ländern ein Rückgang der Malaria um 50% erreicht werden (1). Doch die Mehrzahl der Länder kämpft nach wie vor mit den Auswirkungen der Malaria nicht nur in der Schwangerschaft und frühen Kindheit sondern auf die gesamte Gesundheit der Bevölkerung und die Auswirkung auf deren Arbeitskraft (59).

Auf der einen Seite steht eine Vielzahl logistischer Probleme, wie eine schlechte Infrastruktur, ein häufig marodes Gesundheitswesen und Korruption. Auf der anderen Seite herrscht in Malariaregionen vielerorts eine große Armut und Unwissenheit der Menschen (59). Dies ist eine Situation, die umfassende medizinische Betreuung fast unmöglich macht. Deshalb gehen die Bemühung der Forschung in Richtung neuer einfacher Therapiemöglichkeiten die auch in diesen Ländern leicht zur Anwendung kommen können (65).

Das Problem der heute verwandten Malariamedikamente liegt zum einen in der hohen Resistenzrate (59), zum anderen daran, dass die Behandlung an ein Gesundheitssystem gekoppelt ist, das die Menschen erst erreicht, wenn sie schon Symptome aufweisen. Ein Versuch, das System zu durchbrechen ist die intermittierend, präventiv Behandlung von Kleinkindern (0,5-6 Lebensjahre) und von Schwangeren (1, 6, 47).

Neben der Entwicklung von neuen Medikamenten auf der Basis von Artemisia gehen die Bemühungen in Richtung einer Impfung, da Impfungen in ressourcenarmen Gebieten eine gute Alternative zur Infektionskontrolle darstellen, wie es sich bereits für Hepatitis und Masern gezeigt hat (65, 66). Auf dem Gebiet der Impfung, hat sich bisher eine im *Walter Reed Army Institute of Research* entwickelte Impfung wirksam gezeigt und befindet sich in weiterer klinischer Erprobung (66). Es handelt sich hierbei um ein hybridkombinantes Protein des *P. falciparum* Zirkumsporozoiten zusammengesetzt mit dem Hepatitis B Virus S-Antigen, zusammen mit dem Adjuvans ASO2D, das die Immunantwort steigert (66). ASO2D gehört zu den TLR4-Agonisten (67). Es handelt sich um Monophosphoryl Lipid A, das aus *Salmonella minnesota* gewonnen wird und als sicheres Impfangsadjuvans gilt (67). Chloroquin, ein zunehmend seltener verwendetes Medikament, supprimiert die Hämozoin vermittelte TLR9 Antwort im angeborenen Immunsystem (29).

Diese Arbeit und einige andere konnten zeigen, dass es eine erhöhte Prävalenz von *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen in Malariagebieten gibt (20, 68). *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen scheinen, wie genau bleibt unklar, zu Funktionseinschränkung der TLRs zu führen (20, 37). Im Hinblick auf diese Ergebnisse sollte ein Augenmerk auf die Möglichkeit gelegt werden, dass der Reaktionsweg über das Adjuvanz ASO2D aber auch andere Medikamente, z.B. Choloquin beeinflusst sein könnte. Inwiefern die in Afrika häufige *TLR4*-Defizienz für die Anwendung des Impfstoffes von Relevanz ist, müssen zukünftige Studien zeigen.

Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass Veränderungen in der TLR Signalkaskade vor der Entwicklung von Erkrankungen schützen. Khor *et al.* untersuchten 2007, das *TIRAP* Gen, welches das Mal-Protein kodiert, das eine essentielle Bedeutung im Signalweg von TLR2 und TLR4 hat. Sie konnten zeigen, dass ein Polymorphismus im *TIRAP* Gen vor der Infektion mit Malaria, TBC und Pneumokokken schützt (69). Bezogen auf die Beobachtung, dass TLR4-Polymorphismen zwar das Risiko einer schweren Malaria erhöhen, aber die Kinder weniger daran versterben, sollte der TLR4 Signalweg in dieser Hinsicht weiter untersucht werden (20). Anhand dieser Beispiele zeigt sich bereits, wie wichtig es ist, mehr über die Mechanismen der *P. falciparum* Infektion zu erfahren, um die Therapieoptionen zu erweitern. Weitere Studien sind notwendig um das Verständnis zu vergrößern.

5 Zusammenfassung

Die Malaria ist nach wie vor eines der größten globalen Probleme. Risikogruppen für die potentiell tödliche Infektion mit dem Erreger *Plasmodium falciparum* sind Kleinkinder und Erstgebärende, die südlich der Sahara leben. Jedes Jahr erkranken 350-500 Millionen Menschen und ca. 1 Million versterben. Dennoch verläuft die Erkrankung in Endemiegebieten, nach Erlangen einer Semiimmunität, häufig asymptomatisch. Welche Faktoren dazu führen, dass einige Menschen an schwerer Malaria erkranken, wird nur unzureichend verstanden.

Bei Erstgebärenden führt die Malaria zu mütterlicher Anämie, intrauteriner Wachstumsretardierung, Frühgeburtlichkeit, niedrigem Geburtsgewicht und zu einer erhöhten Säuglingssterblichkeit. Das erhöhte Risiko Erstgebärender für eine *P.-falciparum*-Infektion ist primär auf relativ immunfremde, plazentaadhärente Stämme zurückzuführen. Wie bei Kleinkindern steht in diesem Falle das angeborene Immunsystem im Vordergrund.

Wichtige Vermittler einer proinflammatorischen Antwort im angeborenen Immunsystem sind die Pathogen-erkennenden Toll-Like-Rezeptoren (TLR). Für die Malaria sind TLR 2, 4 und 9 von Bedeutung. TLR2 und TLR4 erkennen das *P. falciparum* Glykosylphosphatidylinositols (GPI), TLR9 die parasitäre DNA. Häufige Polymorphismen (*TLR2*-Arg677Trp, *TLR2*-Arg753Gln, *TLR4*-D299G, *TLR4*-T399I, *TLR9*-T-1486C, *TLR9*-T-1237C) erhöhen dabei das Risiko für inflammatorische und Infektionskrankheiten. Eine vorangegangene Studie aus Ghana zeigte, dass *TLR4*-D299G und *TLR4*-T399I das Risiko für eine pädiatrische, schwere Malaria erhöhen und dass *TLR9*-Polymorphismen (*TLR9*-T-1237C, *TLR9*-T-1486) mit hohen Prävalenzen vorliegen. Für TLR2, den Hauptrezeptor für *P. falciparum*, waren aber keine bekannten Polymorphismen nachweisbar. Die Bedeutung von *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen für Risiko und Manifestation der Malaria bei der weiteren Risikogruppe der Erstgebärenden ist bislang unbekannt. Gleiches gilt für bei Afrikanern beschriebenen, seltenen *TLR4*-Polymorphismen (E474K, Q510H) hinsichtlich der schweren Malaria im Kindesalter.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Auswirkungen der häufigen *TLR4*- und *TLR9*-Polymorphismen auf Risiko und Manifestation der Malaria in der ersten Schwangerschaft zu untersuchen. Zudem sollte geklärt werden, ob auch seltene *TLR4*-Polymorphismen in Ghana die schwere Malaria im Kindesalter beeinflussen. Dafür sollte zusätzlich die *TIR*-Domäne des TLR4 auf noch unbekannte Polymorphismen untersucht werden.

Proben von 304 Erstgebärenden (46% mit placentarer Parasitämie) aus einem Hochendemiegebiet in Ghana wurden dafür mittels Schmelzkurvenanalyse auf die Polymorphismen *TLR4*-D299G, *TLR4*-T399I, *TLR9*-T-1486C und *TLR9*-T-1236C hin untersucht. Eine zweite Studiengruppe bestand aus 300 Kindern aus Nordghana (100 Patienten mit schwerer Malaria, 100 asymptomatisch Infizierte, 100 gesunde Kontrollen). Bei diesen wurden mittels Schmelzkurvenanalyse und Restriktionsverdau die Polymorphismen *TLR4*-E474K und *TLR4*-Q510H. Zudem wurde die *TLR4*-*TIR*-Domäne sequenziert, um noch unbekannt Polymorphismen zu identifizieren. Anschließend wurde geprüft, ob diese Polymorphismen Auswirkungen auf das Risiko und die Manifestation der Malaria haben.

Bei den Erstgebärenden lagen *TLR4*-Polymorphismen in >20% und *TLR9*-Polymorphismen in >50% vor. Die Polymorphismen beeinflussten das Risiko einer placentare Malaria oder die Parasitendichte nicht. Bei bestehender Infektion verstärkten *TLR4*-D299G und *TLR9*-T-1468C allerdings die Manifestation. Infizierte Erstgebärende mit *TLR4*-D299G oder *TLR9*-T-1486C wiesen ein 6-fach erhöhtes Risiko für niedriges Geburtsgewicht bei termingerechten Kindern auf. *TLR4*-D299G war zudem mit einem 5-fach erhöhtem Risiko für eine mütterliche Anämie assoziiert.

Bei den Kindern wiesen jeweils ca. 9 % die *TLR4*-Varianten E474K bzw. Q510H auf. Zusammenhänge mit Risiko und Manifestation der schweren Malaria konnten nicht beobachtet werden. Bei zwei Kindern mit schwerer Malaria wurden bislang unbekannte *TLR4*-Polymorphismen identifiziert (M659T, R804P).

Die hier vorgelegten Ergebnisse zur stärker ausgeprägten Manifestation einer *P. falciparum*-Infektion bei Gebärenden mit einem häufigen *TLR4*-Polymorphismus unterstützen vorliegende Befunde bei Kleinkindern. Erstmals wurde die vergleichbare Bedeutung des *TLR9*-Promoterpolymorphismus T-1486C bei der Malaria gezeigt. Beide Befunde legen die Vermutung nahe, dass *TLR*-Polymorphismen zu einer modifizierten Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch *P. falciparum* oder GPI führen. Dies könnte zu einer reduzierten Aktivierung der proinflammatorischen Signalkaskade am Anfang der *P. falciparum*-Infektion und zu einer insuffizienten Immunantwort während des Fortschreitens und der Etablierung der Erkrankung führen.

Diese Arbeit bestätigte die erhöhte Prävalenz der *TLR4*-Defizienzvariante D299G in Malariagebieten. Dies kann von Bedeutung für die derzeit laufende klinische Erprobung der RTS,S Malariavakzine in Endemiegebieten sein, da dabei ein *TLR4*-Agonist als Adjuvans

genutzt wird. Inwiefern die in Afrika häufige *TLR4*-Defizienz für die Anwendung des Impfstoffes von Relevanz ist, müssen zukünftige Studien zeigen.

Letztendlich bleibt unklar, warum die untersuchten und hinsichtlich der Malaria nachteiligen Polymorphismen in den Endemiegebieten mit hohen Prävalenzen vorliegen. Zuvor wurde beobachtet, dass Patienten mit schwerer Malaria und *TLR4*-D299G tendenziell eine reduzierte Letalität aufweisen. Die daraus abgeleitete Hypothese besagt, dass *TLR4*-D299G zwar das Risiko schwerer Malaria erhöht, aber gleichzeitig einen fatalen Ausgang verhindert und sich deshalb evolutionsbiologisch gehalten hat. Der TLR4-Signalweg sollte in dieser Hinsicht weiter untersucht werden. Es sollte auch Gegenstand weiterer Forschung sein, ob die Polymorphismen Vor- oder Nachteile gegenüber anderen Infektionskrankheiten, wie z.B. der Tuberkulose, vermitteln, da Variationen im TLR-Signalweg auch hier von Bedeutung sind.

Materialien und Bezugsquellen

Allgemein

- Eppendorfpipetten 1-10, 10-100, 100-1000 (Research®, variabel, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH)
- Safe-Lock Tubes 2ml (Eppendorf AG, Hamburg)
- PCR Soft Tubes® 0,2ml (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldenburg)
- T3 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen)
- 10x TBE:
 - 108,0g Tris Base (Appli Chem)
 - 55,0g Borsäure (Merck)
 - 40,0ml 0,5M Na₂EDTAx 2H₂O (Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure) pH 8,0 (Lancaster)
- Bromphenolblaupuffer:
 - 0,05g Bromphenol Blue (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
 - 10,0g Glycerol ((Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
 - 20,0ml 0,5xTBE
- 100bp DNA-Ladder:
 - 170µl 0,5xTBE
 - 20,0µl BPB-Puffer
 - 10µl Stocklösung Marker (100bp Maker, Invitrogen)
- Ethidiumbromid 1mg/ml (Merck)

Material für E474K:

- Primer:
 - hTLR4-se: CAgTATTCCTATCACTCAgAAACCTC
 - hTLR4-as: TATTTAgTACCTgAAgACTggAgAgTg(20µM TIB MOLBIOL GmbH, Berlin)
- Sonden:
 - 474SenA: 640-TgTCCAgTCTCAAAGTCTTgAAAAT p (Sensorsonde)
 - 474Anch: gAgTTgCTTTCAATggCATCTTCAATggC X (Ankersonde)(0,02µM TIB MOLBIOL GmbH, Berlin)
- dNTPs 2,5mM pro Base (Rapidozym, Biolaps new England)

- Genthern Taq® DNA-Polymerase 5U/μl, Buffer, MgCl₂ (Rapidozym ,Biolabs new England)
- Eppendorf Zentrifuge 5403
- Lightcycler (Roche)
- Light cycler® Capillaris, 20μl (Roche)
- Light Cycler Zentrifuge Adapter (Roche)

Material für Q510H:

- Primer:
TLR4mm For 5´CCTTCCTggACCTCTCTCAgTgTCAACTggAAC3´
TLR4_3R3 5´CCACACCgggAATAAAgTCTCTgTAgTg3
(20μM, MWG-Biotech AG, Ebersberg)
- Biotherm Taq® DNA-Polymerase 5U/μl, Buffer (GeneCraft GmbH, Lüdinghausen)
- Restriktionsenzym *HYPCH4III* 5U/ml, NEBuffer (Biolabs new England)
- dNTPs 25mM pro Base (Invirtogen GmbH, Karlsruhe)
- SeaKem® LE Agarose (Cambrex Bio Science Rockland; Bioenzym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)
- NuSieve® GTG® Agarose (Cambex Bio Science Rockland; Bioenzym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)

Material für die Sequenzierung der TIR-Domain:

- Primer:
TIR-For: 5´TgTCggTCCTCAgTgTgCTTgTAgTATCTg3´
TIR-Rev: 5´TAgTgCACCATGgAATTACTCACCTTAgC3´
(20μM, MWG-Biotech AG, Ebersberg)
- Natriumjodid-Lösung:
 - 22,4g NaJ (Merck)
 - 25ml destilliertes Wasser
- Silica-Matrix (Sigma Bestell-Nr.: S5631)
- Silica-Waschpuffer:
 - 50mM NaCl
 - 10mM Tris pH 7,5
 - 2,5mM EDTA

- 50% v/v Ethanol
- Q-Biogene-Spin-Modul (Eppendorf)
- Eppendorfzentrifuge (5403)
- CEQ™ 8000 (Beckman Coulter®,USA)
- CEQ™ DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter®,USA):
- Quick Start Mix 80µl, Mineröl 5ml, Sempel Loading Solution (SLS) 6ml
- GenomeLab Separation Gel-LPA1(Beckman Coulter®,USA)
- Separation Buffer (Beckman Coulter®,USA)
- CleanSEQ® (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly)
- Zellkulturplatten 96U (TPP, Switzerland)
- GTQ-Agerose (Carl-Roth GmbH & CoAG, Karlsruhe)

Software:

- LightCycler Data Analysis
- Programme CEQ 8000:
 - Laufparameter LFR1000
 - Batch Analyse, Auswerteprogramm „Cordula“
- Tabellenkalkulation Microsoft für Windows 2000
- Statistiksoftware SPSS V11.0 für Windows 2000

Literaturverzeichnis

- (1) Skeet J. WHO global report on malaria indicates progress on prevention. *Nurs Times* 2005;
- (2) World Health Organization, Roll Back Malaria, UNICEF. *World Malaria Report* 2005.
- (3) Roll Back Malaria, World Health Organization. *Malaria* 2007.
- (4) World Health Organisation. *Malaria Report* 2007
- (5) Hahn, Falke, Kaufmann, Ullmann. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, pages 769-773. 2000
- (6) Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today* 2000; 16(11):469-476.
- (7) Chang KH, Stevenson MM. Effect of anemia and renal cytokine production on erythropoietin production during blood-stage malaria. *Kidney Int* 2004; 65(5):1640-1646.
- (8) Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002; 415(6872):673-679.
- (9) White NJ. Malaria. In G.C. Cook e. Manson's Tropical Diseases, pages 1087-1165. WB Saunders, London, 20th edition. 1996.
- (10) Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 2005; 280(9):8606-8616.
- (11) Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menendez C, Verhoeff FH, McGready R et al. The sick placenta-the role of malaria. *Placenta* 2004; 25(5):359-378
- (12) Lipa JJ. [Twentieth report from the WHO Expert Committee on Malaria. WHO technical report No. 892, Geneva, 2000, 71 pp]. *Wiad Parazytol* 2000; 46(4):523-524.
- (13) Menendez C. Malaria during pregnancy. *Curr Mol Med* 2006; 6(2):269-273.

- (14) Beck S, Mockenhaupt FP, Bienzle U, Eggelte TA, Thompson WN, Stark K. Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(5):631-636.
- (15) Himeidan YE, Elbashir MI, Adam I. Attractiveness of pregnant women to the malaria vector, *Anopheles arabiensis*, in Sudan. *Ann Trop Med Parasitol* 2004; 98(6):631-633
- (16) Fried M, Duffy PE. Maternal malaria and parasite adhesion. *J Mol Med* 1998; 76(3-4):162-171
- (17) Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE. Maternal antibodies block malaria. *Nature* 1998; 395(6705):851-852.
- (18) Moormann AM, Sullivan AD, Rochford RA, Chensue SW, Bock PJ, Nyirenda T et al. Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *J Infect Dis* 1999; 180(6):1987-1993.
- (19) Ismail MR, Ordi J, Menendez C, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E et al. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Hum Pathol* 2000; 31(1):85-93.
- (20) Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR et al. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *J Commun Dis* 2006; 38(3):230-245.
- (21) Coban C, Ishii KJ, Uematsu S, Arisue N, Sato S, Yamamoto M et al. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immunol* 2007; 19(1):67-79.
- (22) Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 311:1-16
- (23) Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216
- (24) Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2(8):675-680.
- (25) Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:335-376

- (26) Akira S, Sato S. Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis* 2003; 35(9):555-562.
- (27) Lazarus R, Vercelli D, Palmer LJ, Klimecki WJ, Silverman EK, Richter B et al. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev* 2002; 190:9-25.
- (28) Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Cramer JP, Otchwemah RN, Anemana SD, Goltz K et al. Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children. *J Infect Dis* 2004; 190(5):1006-1009
- (29) Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 2005; 201(1):19-25.
- (30) Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(6):1919-1924.
- (31) Adachi K, Tsutsui H, Kashiwamura S, Seki E, Nakano H, Takeuchi O et al. *Plasmodium berghei* infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J Immunol* 2001; 167(10):5928-5934.
- (32) Latz E, Visintin A, Espevik T, Golenbock DT. Mechanisms of TLR9 activation. *J Endotoxin Res* 2004; 10(6):406-412.
- (33) Lazarus R, Raby BA, Lange C, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, Vercelli D et al. TOLL-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two independent samples. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170(6):594-600.
- (34) Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* 2003; 81(1):85-91.

- (35) Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(11):1760-1766.
- (36) Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168(9):4531-4537.
- (37) Smirnova I, Mann N, Dols A, Derkx HH, Hibberd ML, Levin M et al. Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(10):6075-6080.
- (38) Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* 2004; 173(9):5688-5696
- (39) Kirschning CJ, Bauer S. Toll-like receptors: cellular signal transducers for exogenous molecular patterns causing immune responses. *Int J Med Microbiol* 2001; 291(4):251-260.
- (40) Smirnova I, Poltorak A, Chan EK, McBride C, Beutler B. Phylogenetic variation and polymorphism at the toll-like receptor 4 locus (TLR4). *Genome Biol* 2000
- (41) Smirnova I, Hamblin MT, McBride C, Beutler B, Di Rienzo A. Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans. *Genetics* 2001; 158(4):1657-1664.
- (42) Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25(2):187-191
- (43) Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, von Gaertner C, Boye R, Fricke K, Hannibal I et al. Detection and clinical manifestation of placental malaria in southern Ghana. *Malar J* 2006; 5:119.

- (44) Finnström O. Studies on maturity in newborn children. *Acta Paediatr Scand* 1977; 66: 60 1-4
- (45) Fried M, Duffy PE. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* 1996; 272(5267):1502-1504.
- (46) Ehrhardt S, Burchard GD, Mantel C, Cramer JP, Kaiser S, Kubo M et al. Malaria, anemia, and malnutrition in african children--defining intervention priorities. *J Infect Dis* 2006; 194(1):108-114.
- (47) Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Dzisi SY, Teun BJ, Wassilew N, Schreiber J et al. A randomized, placebo-controlled, double-blind trial on sulfadoxine-pyrimethamine alone or combined with artesunate or amodiaquine in uncomplicated malaria. *Trop Med Int Health* 2005; 10(6):512-520.
- (48) Nelson, Cox, 3.Auflage, Seiten 370-372. *Lehninger Biochemie*. 2001
- (49) Cornel Mülhardt. *Der Experimentator Molekularbiologie/ Genomics* 4.Auflage. 2003.
- (50) Hamann L, Hamprecht A, Gomma A, Schumann RR. Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, and -9 genes. *J Immunol Methods* 2004; 285(2):281-291
- (51) Lothar Sachs. *Angewandte Statistik Anwendung statistischer Methoden*, Auflage 9. 1999
- (52) Chirstel Weiß. *Basiswissen Medizinische Statistik* 3. Auflage. 2005.
- (53) Bulmer JN, Rasheed FN, Francis N, Morrison L, Greenwood BM. Placental malaria. I. Pathological classification. *Histopathology* 1993; 22(3):211-218.
- (54) Clendennen TE, III, Long GW, Baird JK. QBC and Giemsa-stained thick blood films: diagnostic performance of laboratory technologists. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89(2):183-184.
- (55) Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do R, V et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61(2):315-320.

- (56) Mockenhaupt FP, Rong B, Till H, Eggelte TA, Beck S, Gyasi-Sarpong C et al. Submicroscopic Plasmodium falciparum infections in pregnancy in Ghana. *Trop Med Int Health* 2000; 5(3):167-173.
- (57) Mockenhaupt FP, Ulmen U, von Gaertner C, Bedu-Addo G, Bienzle U. Diagnosis of placental malaria. *J Clin Microbiol* 2002; 40(1):306-308.
- (58) Delley V, Bouvier P, Breslow N, Doumbo O, Sagara I, Diakite M et al. What does a single determination of malaria parasite density mean? A longitudinal survey in Mali. *Trop Med Int Health* 2000; 5(6):404-412.
- (59) Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64(1-2 Suppl):28-35.
- (60) Greene JA, Moormann AM, Vulule J, Bockarie MJ, Zimmerman PA, Kazura JW. Toll-like receptor polymorphisms in malaria-endemic populations. *Malar J* 2009; 8:50.
- (61) Rocha-Ramirez LM, Estrada-Garcia I, Lopez-Marin LM, Segura-Salinas E, Mendez-Aragon P, Van Soolingen D et al. Mycobacterium tuberculosis lipids regulate cytokines, TLR-2/4 and MHC class II expression in human macrophages. *Tuberculosis (Edinb)* 2008; 88(3):212-220.
- (62) Dhiman N, Ovsyannikova IG, Vierkant RA, Ryan JE, Pankratz VS, Jacobson RM et al. Associations between SNPs in toll-like receptors and related intracellular signaling molecules and immune responses to measles vaccine: preliminary results. *Vaccine* 2008; 26(14):1731-1736.
- (63) Carvalho A, Marques A, Maciel P, Rodrigues F. Study of disease-relevant polymorphisms in the TLR4 and TLR9 genes: a novel method applied to the analysis of the Portuguese population. *Mol Cell Probes* 2007; 21(4):316-320.
- (64) Samba EM. The burden of malaria in Africa. *Afr Health* 1997
- (65) Alonso PL. Malaria: deploying a candidate vaccine (RTS,S/AS02A) for an old scourge of humankind. *Int Microbiol* 2006; 9(2):83-93.

- (66) Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364(9443):1411-1420
- (67) Baldrige JR, McGowan P, Evans JT, Cluff C, Mossman S, Johnson D et al. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4(7):1129-1138
- (68) Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N et al. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(42):16645-16650
- (69) Khor CC, Chapman SJ, Vannberg FO, Dunne A, Murphy C, Ling EY et al. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet* 2007; 39(4):523-528

Lebenslauf:

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Danksagung

Ich danke meinen Betreuern Herrn Professor Dr. med. Frank Mokenhaupt (Tropeninstitut Berlin) und Herrn Prof. emerit. Ulrich Bienzle (ehemals Charité Berlin), den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schuhmann aus dem Institut für Mikrobiologie und insbesondere Susanne Röwer, Moritz Hanisch sowie meiner Familie und meinen Freunden für die unterschiedliche und vielfältige Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

Erklärung

„Ich, Cordula von Kleinsorgen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Der Einfluss von Polymorphismen der Toll-Like-Rezeptoren 4 und 9 auf die Malaria in der Schwangerschaft und die schwere Malaria in Ghana“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift