

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

DISSERTATION

Der Einfluss der Polymorphismen -954G→C,
-1173C→T und des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten
in der *iNOS*-Promotorregion
auf die schwere Malaria in Nordghana

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité —
Universitätsmedizin Berlin

von

Jana Grabenhenrich
aus Dessau

Dekan:

Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Bienzle

2. Prof. Dr. med. F. von Sonnenburg

3. Priv.-Doz. Dr. med. vet. G. Poggensee

Datum der Promotion:

22. Januar 2007

*Ein Mensch, der die Fähigkeit zum Staunen verloren hat,
ist so gut wie tot.*

— von Albert Einstein —

Die vorliegende Arbeit ist Latifa gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorbemerkung	1
1.2	Grundlagen	2
1.2.1	Malaria	2
1.2.2	Protektion durch das Genom - Die Malaria-Hypothese	6
1.2.3	Stickstoffmonoxid (NO)	7
1.2.4	Die Nitrit Oxid Synthase (NOS)	9
1.3	Synopsis	13
1.4	Fragestellung und Zielsetzung	14
2	Patienten, Material und Methoden	15
2.1	Studienort und Studiendesign	15
2.2	Studienteil Tamale	16
2.2.1	Rekrutierung der Fallgruppe	16
2.2.2	Auswahl zweier Kontrollgruppen	19
2.2.3	Laborchemische Untersuchungen am Studienort	20
2.2.4	Therapie der schweren Malaria	21
2.2.5	Weiterverarbeitung der Blutproben	21
2.3	Untersuchungen am Tropeninstitut Berlin	22
2.3.1	Polymerase-Ketten-Reaktion	22
2.3.2	Nachweis des Amplifikats durch Agarose-Gel-Elektrophorese	23
2.3.3	Nachweis des Polymorphismus <i>iNOS</i> -954G→C	25
2.3.4	Nachweis des Polymorphismus <i>iNOS</i> -1173C→T	28
2.3.5	Nachweis des -2,5 kb CCTTT _(n) Mikrosatelliten	30
2.4	Statistische Berechnungen	34
2.4.1	Transformation der Werte für die Parasitendichte	34
2.4.2	Überprüfung von Unterschiedshypothesen	34
2.4.3	Überprüfung von Zusammenhangshypothesen	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Charakterisierung der Studiengruppen	37
3.1.1	Klinische Manifestation der schweren Malaria	38
3.2	Die SNPs, der -2,5 kb CCTTT _(n) Mikrosatellit und die schwere Malaria	40
3.2.1	Die SNPs <i>iNOS</i> -954G→C und <i>iNOS</i> -1173C→T	40

3.2.2	Der -2,5 kb CCTTT _(n) Mikrosatellit	42
3.3	Identifizierung von <i>iNOS</i> -Haplotypen	44
3.4	Haplotypen und die schwere Malaria	45
3.5	Polymorphismen bzw. Haplotyten und klinische Manifestation der schweren Malaria	47
4	Diskussion	50
4.1	Studiendesign und Methoden	50
4.1.1	Studiendesign	50
4.1.2	Ausgewählte Methoden	51
4.2	Diskussion der Ergebnisse	54
4.2.1	Die SNPs, der -2,5 kb CCTTT _(n) Mikrosatellit und die schwere Malaria	55
4.2.2	Identifizierung von <i>iNOS</i> -Haplotypen	57
4.2.3	Haplotypen und schwere Malaria	57
4.2.4	Polymorphismen bzw. Haplotyten und klinische Manifestation / Verlauf der schweren Malaria	58
4.3	Weitere Überlegungen und Schlußfolgerungen	59
4.3.1	Funktionelle Bedeutung von Polymorphismen	59
4.3.2	Relevanz von Haplotypen	60
4.3.3	Funktionelle Relevanz von NO bei der Malaria	60
4.3.4	Ausblick	61
4.3.5	Schlussfolgerungen	62
5	Zusammenfassung	63
	Materialien, Bezugsquellen	65
	Literaturverzeichnis	67
	Abbildungsverzeichnis	76
	Tabellenverzeichnis	77
	Eidesstattliche Erklärung	78
	Danksagung	79
	Lebenslauf	81

Materialien, Bezugsquellen

Studienmaterialien in Tamale, Ghana

- Scala Digital Clinical Thermometer SC 35 T (*Scala Electronic GmbH*, Stahnsdorf)
- Blutdruckmessgerät boson carat (*BOSCH und SOHN GmbH*, Ungingen)
- S-Monovetten-Kanülen, Multify[®]-Kanülen mit Multi-Adapter (*Sarstedt AG & Co.*, Nümbrecht)
- S-Monovetten[®] Kalium-EDTA, 2,7ml (*Sarstedt AG & Co.*, Nümbrecht)
- 595 $\frac{1}{2}$ S & S Faltenfilter 100 Stück \varnothing 240mm (*Schleicher & Schuell MicroScience GmbH*, Dassel)
- Giemsa (*Merck KGaA*, Darmstadt)
- Titrisol[®] Puffer-Konzentrat für Pufferlösung nach WEISE (*Merck KGaA*, Darmstadt)
- Pipetman[®] P20, P100, P200, P1000 (*Gilson International B.V.*, Bad Camberg)
- Rotilabo[®]-Einkanal-Fixvolumenpipette, 10 μ l und Pipettenspitzen (*Carl Roth GmbH & Co.*, Karlsruhe)
- Pipettenspitzen 200 μ l und 1000 μ l (*Sarstedt AG & Co.*, Nümbrecht)
- Safe-Lock Tubes 2 ml (*Eppendorf AG*, Hamburg)
- MENZEL Superfrost[®] Objektträger, MENZEL Deckgläser (*Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG*, Braunschweig)
- Combur10 Test[®] M test strips (*Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim)
- Lichtmikroskop (*Carl Zeiss*, Stuttgart)
- Vario-Photometer und Messreagenzien für Hämoglobin, Glucose, Lactat (*Diaglobal GmbH*, Berlin)
- HemoCue[®] Photometer und Küvetten (*HemoCue AB*, Ängelholm, Schweden)
- Buffer AS1 (*Quiagen GmbH*, Hilden)

Studienmaterialien in Berlin, Deutschland

- Pipetman[®] P20, P100, P200, P1000 (*Gilson International B.V.*, Bad Camberg)
- Safe-Lock Tubes 2ml (*Eppendorf AG*, Hamburg)
- PCR SoftTubes[®] 0,5ml (*Biozym Scientific GmbH*, Hess. Oldendorf)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (250) (*Quiagen GmbH*, Hilden)
- Primer (20 μ M, *MWG Biotech GmbH*, Ebersberg):
 - NOS F 5'-CAT ATG TAT GGG AAT ACT GTA TTT CAG-3'
 - NOS 4 5'-TCT GAA CTA GTC ACT TGA GG-3'
 - MS-P3R 5'-GCA TTT TTC CAT CAT AAA AGT AA-3'
 - MS-P2F 5'-GAC AAG AAG GAA ATG AGT GGA CAC AGG
TAG CAA AGT GTT GAG AC-3'
 - MS-P4F 5'GTG GTA GCA AAT GTT GGA AT-3'
 - NOS2-MSF^L 5'-ACC CCT GGA AGC CTA CAA CTG CAT-3'
 - NOS2-MSR 5'-GCC ACT GCA CCC TAG CCT GTC TCA-3'
- dNTPs, 25 mM pro Base (*Invitrogen GmbH*, Karlsruhe)
- *Taq* DNA Polymerase (5 U/ μ l), Buffer, MgCl₂ (*Amersham Biosciences Europe GmbH*, Freiburg)
- HotStarTaq[®] DNA Polymerase (5 U/ μ l), Buffer, MgCl₂ (*Quiagen GmbH*, Hilden)
- T3 Thermocycler (*Biometra GmbH*, Göttingen)
- Bromphenolblaulösung 6 \times (Ansatz für 100ml):
 - add 100 ml H₂O
 - 250 mg Bromphenol Blue (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, München)
 - 40ml UltraPure Glycerol (*Invitrogen GmbH*, Karlsruhe)
 - 250mg Xylencyanol (*Merck KGaA*, Darmstadt)

- TBE Puffer 10× (Ansatz für 1000ml)
 - add 1000 ml H₂O
 - 108,0g UltraPure Tris (*Invitrogen GmbH*, Karlsruhe)
 - 55,0g Borsäure (*Merck KGaA*, Darmstadt)
 - 40ml 0,5M NA-EDTA (Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure), pH 8,0 (*Merck KGaA*, Darmstadt)
- SeaKem[®] LE Agarose, (*Cambrex Bio Science Rockland; Biozym Scientific GmbH*, Hess. Oldendorf)
- Ethyidiumbromid, 1mg/dl (*Merck KGaA*, Darmstadt)
- DNA Ladder (Ansatz für 400 µl)
 - 290 µl TBE Puffer 0,5× (s.o.)
 - 90 µl Bromphenolblaulösung 6× (s.o.)
 - 20 µl 100 bp DNA Ladder, 1 µg/µl (*Invitrogen GmbH*, Karlsruhe)
- Restriktionsenzym BsaI (5 U/µl) und NEBuffer 3 (*New England Biolabs GmbH*, Frankfurt a. M.)
- SequaGel XRTM (*Biozym Technik GmbH*, Hess. Oldendorf)
- 50-300 bp Sizing Standart (*LI-COR Biosciences GmbH*, Bad Homburg)
- LI-COR DNA Sequencer Model 4000 (*LI-COR; MWG Biotech GmbH*, Ebersberg)

Software

- Gene ImagIRTM (*LI-COR Biosciences GmbH*, Bad Homburg) für OS/2
- Tabellenkalkulation Microsoft Excel für Windows 2000
- Tabellenkalkulation OpenOffice.org 1.1.0 für Linux
- Statistiksoftware SPSS V11.0 für Windows 2000
- Textverarbeitungssoftware Latex 2 ϵ für Linux

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der ersten 2500 bp des <i>iNOS</i> -Promotors	11
2.1	Darstellung der PCR-Produkte zum Nachweis von <i>iNOS</i> -954G→C	26
2.2	Darstellung nach Restiktionsverdau mit <i>Bsa</i> I	27
2.3	Darstellung der PCR-Produkte zum Nachweis von <i>iNOS</i> -1173C→T	30
2.4	Darstellung der PCR-Produkte zum Nachweis des Mikrosatelliten	33
3.1	Verteilung der CCTTT-Kopien des -2,5 kb CCTTT _(n) Mikrosatelliten	42
3.2	Verteilung der CCTTT-Kopienanzahl des -2,5 kb CCTTT _(n) Mikrosatelliten für <i>iNOS</i> -954G→C und <i>iNOS</i> -1173C→T	44
4.1	Übersicht zum Aufbau der Diskussion	54

Tabellenverzeichnis

2.1	PCR-und Elektrophoresebedingungen für <i>iNOS</i> -954G→C	26
2.2	PCR-und Elektrophoresebedingungen für <i>iNOS</i> -1173C→T	29
2.3	PCR-und Elektrophoresebedingungen für -2,5 kb CCTTT _(n) Mikrosatellit . .	31
3.1	Charakterisierung der Studiengruppen	37
3.2	Symptome und klinische Bedingungen der schweren Malaria	38
3.3	Prädiktoren für Letalität bei Kindern mit schwerer Malaria	39
3.4	Genotyp- und Allelhäufigkeiten für <i>iNOS</i> -954 und <i>iNOS</i> -1173	40
3.5	Allel- und Genotyphäufigkeiten für den -2,5 kb CCTTT _(n) Mikrosatelliten . .	43
3.6	Genotyphäufigkeiten für die Haplotypen <i>iNOS</i> -954G→C/CCTTT ₍₈₎ und <i>iNOS</i> - 1173C→T/CCTTT ₍₁₃₎	45
3.7	Letalität für ausgewählte <i>iNOS</i> -Genotypen in der Fallgruppe im Vergleich .	47
3.8	Symptome und klinische Bedingungen der schweren Malaria für verschiedene genetische Variationen in der <i>iNOS</i> -Promotorregion	48
3.9	Logistische Regressionsanalyse für Letalitätsprädiktoren und den Haplotyp <i>iNOS</i> -1173C→T/CCTTT ₍₁₃₎	49

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die im Fachbereich Humanmedizin der Humboldtuniversität zu Berlin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Der Einfluss der Polymorphismen -954G→C, -1173C→T und des
-2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten in der *iNOS*-Promotorregion
auf die schwere Malaria in Nordghana

im *Institut für Tropenmedizin Berlin, Medizinische Fakultät Charité der Humboldtuniversität zu Berlin* unter Leitung von Prof. Dr. med. Ulrich Bienzle ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Ich bestätige, bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der angeführten Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt und die entsprechende Literatur vollständig angegeben zu haben.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Anmerkung: Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht [96,109].

Danksagung

*If you don't go over the top,
you can't see what's on the other side.*

— by Jim Steinman —

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. U. Bienzle möchte ich für die Überlassung des Themas danken.

Besonderer Dank gilt meinen Betreuern Dr. med. Frank Mockenhaupt und Dr. med. Jakob Cramer für ihre konstruktive Kritik und ihre wissenschaftliche und persönliche Unterstützung über den Zeitraum meiner Promotion. Einige anregende Diskussionen halfen mir dabei, die Fragestellungen meiner Arbeit besser zu durchdringen, weckten neue Ideen für die Bearbeitung des Themas

Liebe Franzi (Cand. med. Franziska Mylius) und Katha (Cand. med. Katharina Goltz), lieber Jonas (Cand. med. Jonas Schreiber) und liebe Nassti (Cand. med. Nasstasja Wasilew). Die Erinnerung an ein halbes Jahr Tamale wird sicherlich auch in Zukunft nicht verblassen. Während dieser Zeit haben Eure ehrlichen, freundschaftlichen und ermutigenden Worte mir oft über Durststrecken hinweggeholfen. Ich wünsche Euch viel Erfolg bei der eigenen Promotion.

Für Ihre hilfreiche Unterstützung während der Rekrutierungsphase in Tamale danke ich dem gesamten Personal der Kinderstation des *Tamale Teaching Hospitals* — besonders Frau Dr. med. Sabine Gellert.

Meine Arbeit im Labor des *Tropeninstitut Berlin* betreffend bleiben mir die medizinisch Technischen Assistentinnen Frau Bärbel Jakob und Frau Suse Römer in Erinnerung. Ihre freundlichen und geduldigen Einweisungen in die molekularbiologischen Untersuchungsmethoden bei meiner Arbeit waren eine große Hilfe.

Weiterhin ein herzliches Dankeschön an Linus für die vielen ermutigenden Zeilen während meines Auslandsaufenthalts sowie die vielen motivierenden Gespräche während meiner Arbeit in Berlin. Lieber Linus, sicherlich habe ich Dir mit dieser Arbeit zu oft in den Ohren gelegen — Du bist dem stets mit großer Geduld und Gelassenheit begegnet.

Schließlich gilt meinen Eltern Doris & Jens Burkhardt — ohne deren Unterstützung mein Studium und die Anfertigung dieser Arbeit nahezu unmöglich gewesen wäre — ein besonderer Dank.

An alle rekrutierten Kinder und deren Eltern sowie an alle nicht namentlich Genannten, die mir während der Promotion hilfreich waren — Danke.

Die hier vorgestellte Fall-Kontroll-Studie wurde im Rahmen des *Northern Region Malaria Project (NORMAP)* durchgeführt und wurde durch Drittmittel der *Medizinischen Fakultät der Charité der Humboldtuniversität zu Berlin* finanziell unterstützt.

Jana Grabenhenrich

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.