Aus der Abteilung für tropenmedizinische Grundlagenforschung des Bernhard Nocht Institutes für Tropenmedizin

Variabilität im CD36-Gen in West-Afrika

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Humanmedizin der Universität Hamburg

> vorgelegt von Andreas Scheding aus Köln

Hamburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 23.10.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, de	er Vorsitzende:	Prof. Dr. R. Horstmann
Prüfungsausschuss:	2. Gutachter:	Prof. Dr. E. Tannich
Prüfungsausschuss:	3. Gutachter:	Prof. Dr. F. Nolte

1	EINLE	ITUNG	1
	1.1 Erlä	uterung der Thematik	1
	1.2 Erfa	ussung des wissenschaftlichen Umfeldes	1
	1.2.1	Einfluss genetischer Faktoren auf die Entwicklung von Infektionserkranku	ingen
	1211	Einfluss genetischer Faktoren auf die Entwicklung von Malaria	2
	1.2.2	Lebenszyklus der Plasmodien im menschlichen Wirt.	
	1.2.2.1	Infektion durch die <i>Anonheles</i> -Mücke	
	1.2.2.2	Leberstadium	
	1.2.2.3	Erythrozytäres Stadium	5
	1.2.2.3	8.1 Erythrozyteninvasionsmechanismen der Plasmodien	6
	1.2.2.3	8.2 Sequestration <i>Plasmodium falciparum</i> infizierter Erythrozyten	7
	1.2.3	Expressionsmuster und Funktion von CD36	9
	1.2.3.1	Bedeutung von CD36 in der Atherogenese	10
	1.2.3.2	CD36 und die antiangiogenetische Wirkung von TSP1	10
	1.2.4	Rolle des CD36 innerhalb der Pathogenese der Malaria tropica	11
	1.2.5	Organisation des CD36-Gens	11
	1.2.6	CD36-Transkription	12
	1.2.7	CD36-Proteinstruktur	14
	1.2.7.1	CD36-Bindungsdomänen	15
	1.2.8	Bekannte Polymorphismen im CD36-Gen	17
	1.2.8.1	CD36-Defizienz und Phänotyp der CD36-Defizienz	18
	1.3 Prob	plemstellung und Zielsetzung	19
2	MATE	RIAL & METHODEN	21
	2.1 Mat	erial	21
	2.1.1	Geräteliste	21
	2.1.2	Verwendete Chemikalien und verwendete Kits	21
	2.1.2.1	Längenstandard	22
	2.1.3	Zusammensetzung verwendeter Lösungen	22
	2.1.3.1	Nährmedien für Bakterienkulturen	23
	2.1.4	Verwendete Enzyme und Restriktionsenzyme	23
	2.2 Met	hoden	24
	2.2.1	Untersuchte Individuen der Studienpopulation	24
	2.2.2	Untersuchte Individuen der Kontrollpopulation	25
	2.2.3	Blutproben	25
	2.2.4	Isolierung genomischer DNA aus Vollblut	26
	2.2.4.1	DNA-Isolierung mittels Vakuumkammer	27
	2.2.5	Spektralphotometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes	27
	2.2.6	Ableitung spezifischer Oligonukleotide	
	2.2.6.1	Synthese von Oligonukleotiden	29
	2.2.0.2	Primersequenzen	30
	2.2.1	rorymerase-Neuenreaknon (PCK)	31 21
	2.2.1.1 2.2.0	Sianualu FUR	31
	ン.ン.ð つつり1	DNA Isolierung aus Agerosogolon	33
	2.2.0.1 2.2.0	Automatische DNA Sequenzanalyse	33
	2.2.9 2 2 10	Klonierung von DNA-Fragmenten mittele Diasmid Vektoren	54
	2.2.10	Restrictionsverdau von DNA	55
	2.2.11		

	0 0 1 0		~ ~
	2.2.12	Ligation eines DNA-Fragmentes in ein Plasmid	35
	2.2.13	Herstellung transformationskompetenter E. coli-Zellen	36
	2.2.14	Transformation kompetenter E. coli-Zellen	37
	2.2.15	DNA Präparation bei transformierten E. coli-Zellen	38
	2.2.16	Untersuchung von Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismen (RFLPs	s) 38
	2.2.17	Automatisierte Produktlängenbestimmung (Genescan)	41
	2.2.18	Schmelzkurvenanalyse (FRFT)	41
	2 2 19	Ermittlung nutativer Bindungsstellen für Transkrintionsfaktoren	42
	2.2.17 2.2.17	Errechnung der Nukleotidvariabilität	+2 /3
	2.2.20	Bereitstellung der Sequenzinformation in Datenbanken	43
	2.2.21	Derensenung der Sequenzinformation in Datenbarken	15
3	ERGE	BNISSE	44
3	1 An:	zahl untersuchter Nukleotide im CD36 Gen	11
3	$\frac{1}{2}$ Var	iantan in dar Dromotorragion	
2	$\frac{2}{2}$ Var	ianten in der Fromotoriegion	4J
3.	.5 var	Tanten in den Exons des CD30-Gens	48
	3.3.1	Ubersicht über identifizierte Varianten im CD36-Gen	48
	3.3.2	Varianten in Exon 2 des CD36-Gens	49
	3.3.3	Varianten in Exon 5 des CD36-Gens	50
	3.3.4	Varianten in Exon 6 des CD36-Gens	52
	3.3.5	Varianten in Exon 7 des CD36-Gens	53
	3.3.6	Varianten in Exon 9 des CD36-Gens	54
	3.3.7	Varianten in Exon 10 des CD36-Gens	55
	3.3.8	Varianten in Exon 14 des CD36-Gens	56
	3.3.9	Varianten in Exon 15 des CD36-Gens	57
	3.3.10	Exons des CD36-Gens ohne Nachweis von Varianten	59
3.	.4 Var	ianten in Intronbereichen des CD36-Gens	60
3.	.5 Ers	tmals beschriebene intronische Sequenzen	63
3.	.6 Nul	kleotid-Variabilität	67
3.	.7 Ver	teilung der Milzgrößen	68
4	DISKU	SSION	71
4.	.1 Mö	gliche Auswirkungen der nachgewiesenen Varianten	71
	4.1.1	Mögliche Auswirkungen der Varianten in der Promotor-Region des CD36- Gens	
	4.1.2	Mögliche Auswirkungen der Variante in Exon 5 des CD36-Gens	73
	4.1.3	Mögliche Auswirkungen der Variante in Exon 6 des CD36-Gens	74
	4.1.4	Mögliche Auswirkungen der Variante in Exon 7 des CD36-Gens	74
	415	Mögliche Auswirkungen der Variante in Exon 9 des CD26 Constitution	75
	416	Mögliche Auswirkungen der Variante in Exon 10 des CD36-Gens	, 5 76
Л	2 Fin	fluss der Varianten im CD36-Gen auf konservierte Aminosäuren	דר
-+. /	.2 Цал 3 Цал	ifigkait nachgewiesener Varianten im CD26 Can	، ، حر
4.	.) паl 121	Radautung dar großen Anzahl identifizierten Verienten im CD26 Car	70
A	4.3.1	Dededuung der großen Anzahl identifizierter varianten im CD30-Gen	19
4.	.4 Per	spekuven	80

5	ZU	USAMMENFASSUNG	
	5.1	Summary	
6	LI	ITERATUR	85
7	AN	NHANG	95

Abkürzungsverzeichnis

А	: Adenosin
AP-2	: Phorbolester <i>response</i> -Element
APS	: Ammoniumpersulfat
BNI	: Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin, Hamburg
bp	: Basenpaare
С	: Cytosin
CD	: Gruppe Leukozyten differenzierender Antigene
cDNA	: komplementäre DNA
C/EBP	: CCAAT/enhancer-Bindungsprotein
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
dNTP	: Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	: Ethylendiamin-Tetraessigsäure
G	: Guanin
g	: Gramm oder Erdbeschleunigung (bei Zentrifugation)
°C	: Grad Celsius
h	: Stunde
ICAM-1	: Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
INFγ	: Interferon γ
IRBC	: infizierte rote Blutzelle
IRBCs	: infizierte rote Blutzellen
kb	: Kilobasen
kDa	: Kilodalton
1	: Liter
Μ	: molar
max.	: maximal
mM	: millimolar
mRNA	: messenger-RNA
μg	: Mikrogramm
μl	: Mikroliter
n	: Anzahl
ng	: Nanogramm
OD	: optische Dichte
oxLDL	: oxidiertes Lipoprotein geringer Dichte

PatID	: Patienten Identifikationsnummer
PCR	: Polymerase Kettenreaktion
PuF	: Purinfaktor
RNA	: Ribonukleinsäure
RT	: Raumtemperatur
SNP	: Polymorphismus eines einzelnen Nukleotids
Т	: Tyrosin
Tab.	: Tabelle
U	: Unit, enzymatische Einheit
UTR	: untranslatierte Region
UV	: ultraviolettes Licht
wt	: Wildtyp
www	: world wide web

1 Einleitung

1.1 Erläuterung der Thematik

CD36 ist ein Rezeptor, der von verschiedenen Zellen exprimiert wird. Dazu gehören Thrombozyten, Erythroblasten, Monozyten, Makrophagen, Adipozyten, verschiedene epitheliale Zellen, dendritische Zellen und Endothelzellen der Blutgefäße. CD36 spielt unterschiedliche Rollen bei dem Transport von Lipiden, der Immunregulation, der Hämostase und bei der Angiogenese (Überblick in Greenwalt et al. 1992; Jiménez et al. 2000). Außerdem spielt CD36 eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Sichelzellerkrankung und der Malaria tropica, die durch das Protozoon Plasmodium falciparum verursacht wird. Sichelzellerythrozyten oder Erythrozyten, die von Plasmodium falciparum im asexuellen Blutstadium befallen sind, binden über CD36 an das Endothel der Blutgefäße (Oquendo et al. 1989; Sugihara et al. 1992). Auf diesem Weg kommt es zu schweren Störungen der Mikrozirkulation mit teilweise lebensbedrohlichen Folgen für den Erkrankten. Als Rezeptor auf dendritischen Zellen vermindert CD36 in der Interaktion mit infizierten roten Blutzellen die Immunreaktion gegenüber von Plasmodium-falciparum-Antigen (Urban et al. 1999). Polymorphismen im CD36-Gen sind möglicherweise ursächlich für Unterschiede im individuellen Verlauf dieser Infektionskrankheit. Die Identifizierung von Polymorphismen im CD36-Gen ist ein erster Schritt zum Nachweis derartiger Zusammenhänge. Ebenfalls wichtig ist die Identifizierung von Polymorphismen in der Promotor-Region des CD36-Gens, da die im Promotor liegenden putativen Bindungsregionen für verschiedene trans-aktive Transkriptionsfaktoren wie PuF, AP2 oder C/EBP die Transkription des CD36-Gens beeinflussen. Es ist denkbar, dass die Identifizierung solcher Polymorphismen und das Erlangen neuer Erkenntnisse über deren Wirkung innerhalb der Pathophysiologie der schweren Malaria neue Wege in der Entwicklung immunmodulatorischer und pharmazeutischer Behandlungsstrategien eröffnet.

1.2 Erfassung des wissenschaftlichen Umfeldes

1.2.1 Einfluss genetischer Faktoren auf die Entwicklung von Infektionserkrankungen

Der geschätzte Einfluss, den genetische Faktoren auf die Entwicklung oder Ausprägung von polygenischen Erkrankungen haben, wird für gewöhnlich mit dem λ_s -Wert

ausgedrückt. Dieser Wert beschreibt den Faktor, um den das Risiko einer Erkrankung im Vergleich zur Normalbevölkerung für eine Person ansteigt, wenn diese Erkrankung bereits bei einem Geschwister vorliegt. Bei Autoimmunerkrankungen wie dem Typ-I-Diabetes oder der Multiplen Sklerose liegen die λ_s -Werte bei ca. 15 bis 20 (Todd et al. 1996). Für die meisten Infektionserkrankungen liegt der λ_s -Wert zwischen eins und zehn.

Weitgehend frei von Umwelt- und Umgebungseinflüssen sind Schätzungen des genetischen Einflusses auf Infektionserkrankungen, die durch vergleichende Zwillingsstudien gewonnen werden. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass eineiige Zwillinge ein wesentlich höheres Risiko tragen, an einer Tuberkulose zu erkranken als zweieiige Zwillinge (Comstock 1978). Ähnliche Studien wurden auch für die Persistenz von Hepatitis-B-Virusinfektionen (Lin et al. 1989) und der Infektion mit *Helicobacter pylori* durchgeführt. Das Ergebnis zeigt, dass eineiige Zwillinge eine höhere Übereinstimmung im Krankheitsverlauf oder dem Infektionsstatus zeigen als zweieiige. Für die Erkrankung an Malaria zeigen vergleichende Zwillingsstudien, dass genetische Faktoren weniger das Risiko einer Infektion beeinflussen, sondern eher die klinische Ausprägung der Erkrankung (Jepson et al. 1995). In einer weiteren Studie wurde die Stärke der humoralen und zellulären Immunantwort erwachsener Zwillinge aus Gambia auf eine Vielzahl von *P.falciparum*-Antigenen sowie auf mykobakterielle, gereinigte Proteinderivate untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass die Ausprägungsstärke der humoralen und der zellulären Immunantwort durch vererbte Faktoren beeinflusst wird (Jepson et al. 1997).

1.2.1.1 Einfluss genetischer Faktoren auf die Entwicklung von Malaria

Malaria, verursacht durch das Protozoum *Plasmodium*, ist die weltweit wichtigste parasitäre Erkrankung mit jährlich 1,4 bis 2,6 Millionen Todesfällen (Butler et al. 1997). Sie ist in über 90 Ländern der Erde endemisch. Für den Menschen pathogen sind vier verschiedene *Plasmodium*-Arten, die verschiedene Formen der Malaria verursachen:

- Plasmodium vivax:	Malaria tertiana
- Plasmodium ovale:	Malaria tertiana
- Plasmodium malariae:	Malaria quartana
- Plasmodium falciparum:	Malaria tropica

Die meisten Todesfälle sind auf *Plasmodium falciparum* zurückzuführen, den Erreger der Malaria tropica.

Ausgehend von der Annahme, dass Infektionskrankheiten die größte selektive Kraft der letzten 5.000 Jahre darstellen (Haldane 1947), ist ein starker Einfluss einer Erkrankung wie Malaria auf das menschliche Genom zu erwarten, da die Opfer der Malaria tropica besonders Kinder und Jugendliche vor Erreichen der Geschlechtsreife sind (Miller 1994). Weiterhin sind auch schwangere Frauen besonders gefährdet, an Malaria zu sterben. Die sogenannte Malariahypothese beschreibt einen Genpolymorphismus, dessen Nachteil unter den gegebenen Lebensbedingungen durch die Infektionserkrankung balanciert ist.

Die vielfältigen Hinweise, die für einen genetischen Einfluss auf den Verlauf von Infektionserkrankungen sprechen, lassen die Suche nach Genpolymorphismen, die für diese Unterschiede verantwortlich sind, aussichtsreich erscheinen. Es bestehen grundsätzlich zwei unterschiedliche Ansätze für die Suche nach solchen Genpolymorphismen. Zum einen kann ein für eine bestimmte Eigenschaft verantwortliches Gen mittels einer genomweiten Suche identifiziert werden. Für diese Untersuchungen werden komplexe Segregegationsanalysen duchgeführt, mit denen mögliche Erbgänge identifiziert werden können. Mithilfe dieser Daten können Kopplungsanalysen durchgeführt werden, die der Eingrenzung chromosomaler Abschnitte dienen, auf denen das Gen mit der gesuchten Eigenschaft positioniert ist. Die anschließende positionelle Klonierung führt zur Identifikation eines Gens oder zur weiteren Eingrenzung einer Kandidaten-Region. Eine Alternative zur Kopplungskartierung in Familien stellt die statistische Assoziation zwischen einer Eigenschaft und einem Markergenotyp in der untersuchten Bevölkerung dar. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass Kopplung eine Beziehung zwischen Loci sowie Assoziation eine Beziehung zwischen Allelen darstellt (Strachan et al. 1996). Der zweite Ansatz besteht darin, ein bestimmtes und in seiner Funktion bekanntes Gen auf Varianten zu untersuchen. Dieses Verfahren, des Kandidatengenansatzes, ist insbesondere dann sinnvoll, wenn bereits Gene bekannt sind, deren Genprodukte in der Pathophysiologie der untersuchten Erkrankung eine wesentliche Rolle spielen. Das Wissen um die Pathophysiologie der Infektion mit Plasmodium falciparum ermöglicht die Identifikation von Proteinen und den zugehörigen Genen, die besondere Schlüsselpositionen im Ablauf der Erkrankung einnehmen. Solche Gene kommen als Kandidatengene für die Suche nach Varianten in Frage, da Varianten dieser Gene einen Einfluss auf den Verlauf oder die Ausprägung einer Infektionserkrankung haben können.

1.2.2 Lebenszyklus der Plasmodien im menschlichen Wirt

Abbildung 1-1: Wirtszyklus der Plasmodien (aus www.infektionsbiologie.ch) mit näheren Erläuterungen im folgenden Text.

> Stadium 1: Entwicklung in der weiblichen *Anopheles*-Mücke Stadium 2: Leberstadium Stadium 3: erythorzytäres Stadium



4

1.2.2.1 Infektion durch die Anopheles-Mücke

Die Ansteckung erfolgt durch den Stich weiblicher *Anopheles*-Mücken (Stadium 1 in Abbildung 1-1), die sich zuvor an einem *Plasmodien*-Träger infiziert haben. Bei einer erneuten Blutmahlzeit am Menschen inokulieren sie mit ihrem Speichel, die als Sporozoiten bezeichneten spindelförmigen, infektiösen Stadien, in die Blutbahn oder in Lymphspalten. Die Infektion mit sehr wenigen Sporozoiten (etwa zehn bei *Plasmodium falciparum*) ist ausreichend, um die Erkrankung auszulösen.

1.2.2.2 Leberstadium

Innerhalb von 15 bis 45 Minuten nach der Inokulation gelangen die Sporozoiten aller *Plasmodium*-Arten auf dem Blutweg zur Leber und dringen in die Hepatozyten ein (Stadium 2 in Abbildung 1-1), in denen eine asexuelle Vermehrung stattfindet. Das spezifische Eindringen der Sporozoiten in die Leberzellen wird durch Proteoglykane mit einem hohen Anteil an Heparansulfat und möglicherweise auch dem LDLRP (Low-densitiy-Lipoptrotein-Receptor-related-Protein) (Cerami et al. 1992, Shakibaei et al. 1996) ermöglicht, die als Rezeptoren auf den Leberzellen dienen. Von diesen Proteinen sind bislang keine Polymorphismen im Sinne der Malariahypothese beschrieben. In den Leberzellen entwickeln sich die Sporozoiten zu vielkernigen Schizonten, aus denen nach zytoplasmatischer Teilung je 2.000 (*P.malariae*) bis 30.000 (*P.falciparum*) Merozoiten hervorgehen. Diese Entwicklung dauert sechs (*P.falciparum*) bis 15 (*P.malariae*) Tage. Bei *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* entstehen zusätzlich sogenannte Hypnozoiten. Dabei handelt es sich um kleine, einkernige Gebilde, die in den Hepatozyten lange Zeit (Monate bis Jahre) persistieren können und sich erst später in zeitlich variierenden Schüben zu Schizonten entwickeln.

1.2.2.3 Erythrozytäres Stadium

Im nächsten Schritt des Lebenszyklus der Plasmodien befallen die aus den Leberzellen freigesetzten Merozoiten in der Blutbahn Erythrozyten, in denen weitere asexuelle Vermehrungszyklen stattfinden (Stadium 3 in Abb. 1-1). Merozoiten sind kleine, ovoide, etwa 1,5 µm lange und bewegliche Gebilde. Die Invasion in die Erythrozyten ist abhängig von verschiedenen Rezeptoren, welche die Anlagerung, Reorientierung und das Verschmelzen der Merozoitenmembran mit der Erythrozytenmembran ermöglichen. Die Plasmodien werden nach dem Eindringen ins Zytoplasma der Erythrozyten von einer membranbegrenzten parasitophoren Vakuole eingeschlossen. Von *Plasmodium malariae* werden vorwiegend ältere Erythrozyten befallen, von *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* Retikulozyten und von

Plasmodium falciparum junge sowie ältere Erythrozyten. Das erythrozytäre Stadium, bei dem sich die Erreger zu mehrkernigen Schizonten entwickeln, dauert bei Plasmodium malariae drei Tage, bei allen anderen humanpathogenen Plasmodien-Arten zwei Tage. Nach Vielfachteilung zerfallen die Schizonten in eine je nach Plasmodium-Art unterschiedliche Anzahl von Merozoiten. Durch Zerfall der Erythrozyten gelangen diese in die Blutbahn, wobei der Massenzerfall der Erythrozyten Fieber auslöst (Kayser et al. 1997). Die freigesetzten Merozoiten befallen erneut Erythrozyten und beginnen damit einen neuen Vermehrungszyklus. Plasmodium falciparum ist der einzige Erreger der Malaria beim Menschen, bei dem dieser Prozess nicht synchronisiert abläuft. Damit kommt es nicht zu dem malariatypischen Symptom des Wechselfiebers, sondern die Fieberattacken erfolgen in unregelmäßigen Abständen. Infizierte Erythrozyten können in der Milz eliminiert werden, da ihre Fließeigenschaften durch die Parasiten erheblich verändert werden. Die klinische Folge ist die große Milz (Splenomegalie) bei infizierten Patienten, eines der Leitsymptome der Malaria. Erythrozyten, die mit Plasmodium falciparum infiziert sind, können sich der Milzpassage entziehen, indem sie sich am Endothel der Kapillaren und der postkapillären Venolen anlagern. Dieser Vorgang wird Sequestration genannt und ist für viele schwere Symptome der Malaria tropica verantwortlich, wie etwa Niereninsuffizienz, Koma bei zerebraler Malaria oder Lungenödem. Die Vermeidung der Milzpassage durch Sequestration erlaubt dem Parasiten eine beinahe ungestörte Vermehrung.

Nach mehreren Wochen der erythrozytären Schizogonie entstehen die ersten Mikro- und Makrogamonten, welche die infektiösen Stadien für den Endwirt, die Anophelesmücke, darstellen.

1.2.2.3.1 Erythrozyteninvasionsmechanismen der Plasmodien

Bei *Plasmodium vivax* ist die Verschmelzung mit der Erythrozytenmembran abhängig von einem Chemokinrezeptor, der ursprünglich als Determinante der Duffy-Blutgruppe definiert war (Choudhuri et al. 1993; Horuk et al. 1993). Den Bewohnern großer Teile Westafrikas fehlt dieses Molekül vollständig. Sie sind daher gänzlich vor einer Infektion mit *Plasmodium vivax* geschützt. Daher kommt auch dieser Erreger der Malaria in den entsprechenden Gebieten nicht vor.

Plasmodium falciparum hat verschiedene Invasionsmechanismen entwickelt. Rezeptoren für die Membranverschmelzung zwischen Merozoit und Erythrozyt sind dabei Glykophorin A (Sim et al. 1994) und Glykophorin B (Dolan et al. 1994). In den Genen, die für diese beiden Rezeptoren kodieren, wurden in afrikanischen Populationen verschiedene Mutationen

nachgewiesen. So fehlt den sog. Dantu-Erythrozyten die extrazelluläre Domäne des Glykophorin A (Unger et al. 1997), wogegen einigen Pygmänen das Glykophorin B vollständig fehlt (Fraser et al. 1996). Ebenfalls in Afrika wurde eine strukturelle Variante des Glykophorin B beschrieben (Reid et al. 1995). Vermutlich können die Polymorphismen dieser Rezeptoren unabhängig voneinander einen gewissen Schutz vor Malaria vermitteln (Field et al. 1997). Neben den erwähnten Rezeptoren spielen offenbar weitere Proteine bei der Invasion in die Erythrozyten eine Rolle.

Eine weitere Voraussetzung für eine erfolgreiche Invasion von Plasmodium falciparum und Plasmodium ovale ist die Fluidität der Erythrozytenmembran. Strukturproteine des Erythrozyten beeinflussen die Beweglichkeit und Flexibilität der Membran. Diese Fluidität ist bei der südostasiatischen Ovalozytose gestört, indem die Verbindung zwischen Bande-3-Protein und Ankyrin fester ausgebildet wird, als bei Erythrozyten ohne Polymorphismen im Bande-3-Gen (Liu et al. 1990). Eine Deletion von neun Aminosäuren am Übergang von der Transmembrandomäne zur zytoplasmatischen Domäne im Bande-3-Protein wurde für die Starrheit und die reduzierte Lateralbeweglichkeit der ovalozytären Erythrozyten verantwortlich gemacht. Möglicherweise spielt auch eine zweite Mutation im zytoplasmatischen Teil des Proteins eine Rolle (Jarolim et al. 1991). Diese Mutationen scheinen einen Schutz vor tödlich verlaufender Malaria zu bieten. Obwohl die Ovalozytose bei Homozygoten letal verläuft, findet sich das Krankheitsallel in Papua-Neuguinea mit einer Häufigkeit von 30 % (Cattani et al. 1987), was sich durch einen Selektionsvorteil der Heterozygoten erklären lässt.

1.2.2.3.2 Sequestration Plasmodium falciparum infizierter Erythrozyten

Die Sequestration wird durch verschiedene Rezeptoren vermittelt. Als Ligand dient dabei das durch den Parasiten kodierte und auf der Oberfläche des infizieren Erythrozyten zur Expression gebrachte *Plasmodium-falciparum*-Erythrozytenmembran-Protein-1 (PfEMP1) (Baruch et al. 1995). Im Falciparumgenom wurde ein Komplex von 50 bis 150 Genen der sog. *var*-Genfamilie (variant antigen family) gefunden, die auf verschiedene Chromosomen verteilt sind und für diese hochvariablen Proteine kodieren (Su et al. 1995). Die Antigenvariabilität bei *P. falciparum* beträgt bis zu 2 % pro Generation. Die hohe Variabilität von PfEMP1 ist die Voraussetzung dafür, dass die Plasmodien sich einer massiven Immunantwort gegen dieses prominente Antigen entziehen können (Smith et al. 1995). Auf Seiten des Endothels sind verschiedene Membranproteine beschrieben, die die Sequestration vermitteln und die unter dem Begriff Adhäsine zusammengefasst werden (Roberts et al.

1993). Bei den Adhäsinen handelt es sich im Wesentlichen um Moleküle, die der Adhäsion von Leukozyten im Rahmen entzündlicher Prozesse dienen. Zu ihnen gehören das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), Thrombospondin, CD36 (veraltetes Synonym: platelet glycoprotein IV), das Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1 (ELAM-1) und das Vascular Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) (Springer 1994). Überdies gehören dazu weiterer Proteine, wie E-selectin und P-selectin. Deren Bedeutung ist allerdings wesentlich geringer. Dabei adhärieren die infizierten Erythrozyten nicht an alle Adhäsine in gleichem Maße und mit gleicher Stärke, abhängig sowohl vom Rezeptor als auch vom jeweiligen Parasitenstamm. Inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin 1 (IL1) und Interferon γ tragen wesentlich zur Adhärenz bei, indem sie die Expression von ICAM-1 auf den Endothelzellen steigern (Berendt et al. 1989). Afrikanische Kinder mit einer erhöhten Transkriptionsrate des TNF α -Gens haben ein siebenfach höheres Risiko an cerebraler Malaria zu versterben (McGuire et al. 1994), als Kinder mit einer niedrigen Transkriptionsrate dieses Gens. Diese Beobachtung konnte auf eine Mutation im TNF α -Promotor zurückgeführt werden (Wilson et al. 1997).

Die Anlagerung an das Endothel folgt einem Dreischrittmodell, bei dem die Schritte "lockeres Binden" (tether), "rollen" (rolling) und "festes Binden" (firm adhesion) aufeinander folgen (Cooke et al. 1994) (siehe Abb. 1-2). Die ersten beiden Schritte können durch Bindung zu CD36, ICAM-1, P-selectin und VCAM-1 zu Stande kommen, wogegen die feste Bindung (firm adhesion) unter Fließbedingungen nur durch CD36 vermittelt wird. Manche Parasitenstämme binden ausschließlich an CD36, auch ohne vorheriges lockeres Binden (tethering) und Rollen (rolling). Unter Fließbedingungen *in vitro* konnte keine Interaktion mit E-selectin nachgewiesen werden (Udomsangptech et al. 1997).

Abbildung 1-2: Bindung eines mit *P.falciparum* infizierten Erythrozyten an das Endothel der Kapillaren



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Adhäsion von infizierten Erythrozyten (infected red blood cells, IRBCs) zum Endothel synergistisch von hochvariablen Liganden auf den IRBCs einerseits und verschiedenen Rezeptoren auf dem Endothel der Kapillaren und postkapillären Venolen andererseits vermittelt wird. CD36 spielt dabei nach derzeitigem Kenntnisstand eine herausragende Rolle.

1.2.3 Expressionsmuster und Funktion von CD36

CD36 wurde vor mehr als 25 Jahren als integrales Membran-Glykoprotein von Thrombozyten (Glykoprotein IV) identifiziert. CD36 wird in unterschiedlichsten Geweben exprimiert. Dazu zählen das mikrovaskuläre Endothel (nicht jedoch das Endothel großer Gefäße), Adipozyten, Skelettmuskelzellen und Zellen der glatten Muskulatur, dendritische Zellen, Epithelien der Retina, der Brust und des Intestinums, Stammzellen der Hämatopoese, Thrombozyten, Makrophagen/Monozyten und Megakaryozyten. Es wurde bislang eine Vielzahl verschiedener Funktionen für CD36 beschrieben (eine Übersicht dazu in Febbraio et al. 2001).

CD36 vermittelt die Bindung zwischen Thrombozyten und Kollagen (Tandon et al. 1989) und dient als Rezeptor für Thrombospondin 1 (Asch et al. 1992; Leung et al. 1992). Es ist auf diese Weise eingebunden in Funktionen der Hämostase. Auf Erythroblasten exprimiertes CD36 ist vermutlich dafür verantwortlich, dass diese nicht aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden (Kieffer et al. 1998).

CD36 ist beteiligt an der Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen und T-Lymphozyten durch Makrophagen (Savill et al. 1992; Akbar et al. 1994; Ren et al. 1995).

1.2.3.1 Bedeutung von CD36 in der Atherogenese

CD36 dient als Rezeptor für oxidiertes Lipoprotein geringer Dichte (low density lipoprotein, oxLDL) auf Makrophagen (Endemann et al. 1993; Acton et al. 1994) und ist verantwortlich für die Bindung von langkettigen Fettsäuren sowie anionischen Phospholipiden und deren Transport in Schaumzellen (Abumrad et al. 1993). CD36 kommt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose zu (Nozaki et al. 1995). Es konnte nachgewiesen werden, dass 50 bis 70 % des oxLDL über CD36 in Makrophagen aufgenommen werden. Die von oxLDL abhängige Schaumzellbildung konnte dagegen mittels monoklonaler Antikörper gegen CD36 bis zu 80 % reduziert werden (Podrez et al. 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CD36 am Transport von langkettigen Fettsäuren in das Myokard beteiligt ist (Nozaki et al. 1999).

1.2.3.2 CD36 und die antiangiogenetische Wirkung von TSP1

Für Thrombospondin1 (TSP1), einem CD36-Liganden, wurde gezeigt, dass er ein wirksamer Inhibitor der tumorinduzierten Angiogenese ist (Good et al. 1990). Dawson et al. (1997) gelang der Nachweis, dass diese Wirkung von TSP1 tatsächlich durch CD36 vermittelt wird. Die Bindung von TSP1 führt mittels CD36 zu einer Aktivierung intrazellulärer Proteinkinasen. Diese Aktivierung kann zum programmierten Zelltod der mikrovaskulären Endothelzellen führen (Jimenez et al. 2000). Damit könnte CD36 ein interessantes Ziel bei der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien gegen Tumorerkrankungen oder gegen Erkrankungen wie der diabetischen Retinopathie sein.

1.2.4 Rolle des CD36 innerhalb der Pathogenese der Malaria tropica

CD36 hat eine Reihe von weiteren Funktionen in malaria-endemischen Gebieten. Das vom *Plasmodium falciparum* auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten zur Expression gebrachte Protein PfEMP1 bindet an CD36, das auf den Endothelzellen der Kapillaren und postkapillären Venolen exprimiert wird (Ockenhouse und Chulay 1988; Baumwell et al. 1988; Oquendo et al. 1989). Die mit *Plasmodium falciparum* infizierten roten Blutzellen (IRBC) entziehen sich auf diese Weise der Zirkulation und der Vernichtung in der Milz, wodurch den Plasmodien eine Vermehrung bis zu sehr hohen Parasitämien möglich ist.

Als Rezeptor, der auf dendritischen Zellen exprimiert wird, spielt CD36 eine weitere Rolle bei der *Plasmodium-falciparum*-Malaria. Auch hierbei steht die Bindung von CD36 zum PfEMP1 im Vordergrund, denn sie verhindert die Reifung der dendritischen Zellen. Da reife dendritische Zellen jedoch als einzige in der Lage sind, T-Zellen direkt zu aktivieren, unterbleibt diese Aktivierung (Urban et al. 1999). Auf diese Weise vermittelt CD36 eine vom Parasiten ausgehende immuninhibitorische Wirkung bei der *Plasmodium-falciparum*-Malaria. Die Bindung der IRBC an CD36 vermittelt möglicherweise Mikrozirkulationsstörungen, die Komplikationen der schweren Malaria darstellen, wobei die Komplikationen der cerebralen Malaria in erster Linie durch eine Bindung von PfEMP1 an ICAM-1 ausgelöst werden. CD36 spielt in diesem Zusammenhang keine bedeutende Rolle.

Des weiteren ist CD36 ein Rezeptor für Sichelzellerythrozyten und vermittelt deren Bindung an das Endothel von Kapillaren. Diese Bindung ist beteiligt an der Ausbildung von Mikrozirkulationsstörungen, eine der schweren Komplikationen, die bei homozygoten Trägern der Sichelzellanämie auftreten (Hebbel 1997).

1.2.5 Organisation des CD36-Gens

Das CD36-Gen gehört zu einer Genfamilie, zu der auch die Gene für CLA-1 und LIMPII gehören, die ebenfalls einkettige, membranständige Glykoproteine (Calvo et al. 1993) sind. Das menschliche Gen ist aus 15 Exons aufgebaut, die sich über einen Bereich von ca. 32 kB auf Chromosom 7q21 erstrecken. Insgesamt werden 2648 Nukleotide transkribiert. Wie in Abbildung 1-3 dargestellt, werden die Exons IV bis XIII vollständig translatiert. Im Gegensatz dazu werden die Exons III und XIV nur teilweise und die Exons I, II und XV nicht translatiert. Das Exon III ist das erste kodierende Exon.

1.2.6 CD36-Transkription

Humanes CD36 kann unterschiedlich transkribiert werden. Es konnten zwei verschiedene 5'UTR-Exons in der CD36-pre-mRNA nachgewiesen werden, bei denen entweder Exon IIa oder Exon IIb transkribiert werden (Taylor et al. 1993). Das Vorliegen zweier verschiedener CD36-pre-mRNAs, die auf verschiedene Art und Weise gespleisst werden, deutet auf komplexe Kontrollmechanismen zur Steuerung der Transkription von CD36 hin. Die spezifische Funktion der Exons IIa und IIb ist noch ungeklärt. Die Promotorregion des Gens enthält verschiedene cis-aktive regulatorische Elemente von eukaryonten Genen (Armesilla und Vega. 1994). Diese Promotorregion ist ca. 6 kb vor dem Translationsstartpunkt in Exon III gelegen. Funktionelle Studien haben gezeigt, dass die Sequenz vom Basenpaar –158 bis –90, die in 5'-3' Leserichtung vor Exon I liegt, in monozytären Zellen für eine optimale Transkription von CD36 benötigt wird (Armesilla et al. 1996).

CD36 wird als 74 bis 81-kDa Vorläuferform am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Nach der Glykosilierung wird die reife 88-kDa Form zur Zelloberfläche transportiert (Kashiwagi et al. 1995; Alessio et al. 1996).



Abbildung 1-3: Strukturelle Organisation des CD36-Gens

1.2.7 CD36-Proteinstruktur

Strukturell gehört CD36 zur Superfamilie der Immunoglobuline. Das CD36-Molekül besteht aus 471 Aminosäuren und bildet ein Protein mit einer Masse von 78 bis 88 kDa (Vega et al. 1991).

Die aus der Aminosäuresequenz abgeleitete Sekundärstruktur von CD36 zeigt zwei hydrophobe Domänen, wovon sich die eine nahe dem NH₂-Terminus, Aminosäurepositionen 7 bis 34, und die zweite in der Nähe des COOH-Terminus, Positionen 440 bis 466, befindet. Beide Domänen liegen transmembran und verankern so das Protein (Tao et al. 1996). Sowohl der NH2-Terminus, GCDRNC-, als auch der COOH-Terminus, -CACRSKTIK, liegen dadurch intrazellulär. Durch Bildung von Mutanten, denen entweder eine oder beide Domänen fehlten, konnte nachgewiesen werden, hydrophobe dass die duale Transmembranlage notwendig für die richtige Faltung des Proteins ist (Gruarin et al. 2000). Der größere Teil des Proteins, die Aminosäuren 35 bis 439, bildet die stark glykosylierte extrazelluläre Domäne (Vega et al. 1991; Oquendo et al. 1989). Neben den beiden transmembranen Domänen bilden die Aminosäuren 184 bis 204 einen Bereich der membranassoziiert vorliegt.

Abbildung 1-4: CD36; Sekundärstruktur (Ikeda 1999)



1.2.7.1 CD36-Bindungsdomänen

Innerhalb der extrazellulären Domäne konnten verschiedene Bereiche kartiert werden, die als Bindungsstellen unterschiedlicher Liganden dienen. So bindet Thrombospondin an die Aminosäurepositionen 93 bis 120, oxidiertes LDL an die Positionen 28 bis 93, sowie möglicherweise an die Aminosäuren 120 bis 155 (ox-LDL; Pearce et al. 1995, 1998). Kollagen bindet an die Positionen 415 bis 427 (Mercier et al. 1995) und mit *Plasmodium falciparum* infizierte Erythrozyten (IRBCs) binden an die Aminosäuren 8 bis 21, 97 bis 110, 145 bis 171 und 146 bis 164 (Asch et al. 1993; Baruch et al. 1999).

Tabelle 1-1:

Position und Funktion der CD36 Bindungsdomänen

Aminosäuren	Funktion	Exon	Referenz
003 + 007	palmitolierte Cysteine	3	Tao et al. (1996)
007 - 034	membranassoziierte Domäne		Armesilla und Vega
	Transmembradomäne		(1994)
008 - 021	Adhäsion von PfIRBZ		Asch et al. (1993)
087 – 099	Thrombospondin-/ Kollagen-	4 - 5	Asch et al. (1993)
	Bindungsstelle		
093 - 110	induzierbare Bindungsstelle für	5	Leung et al. (1992)
	Thrombospondin		
093 – 120	Ca ²⁺ abhängige TSP-Bindungsstelle		Frieda et al. (1995)
097 – 110	Adhäsion von PfIRBZ		Asch et al. (1993)
127 – 279	möglicherweise Bindungsstelle für	5 - 7	Baillie et al (1996)
	langkettige Fettsäuren (nicht eindeutig)		
139 – 155	primäre TSP-Bindungsstelle (enthält TSP-	5 - 6	Leung et al. (1992),
	Bindungsstelle hoher Affinität)		Li et al. (1993)
139 – 184	erweiterte multifunktionale	5 - 6	Baruch et al. (1999)
	immundominante Domäne		
145 – 171	Adhäsion von PfIRBZ		Baruch et al. (1999)
146 – 164	Adhäsion von PfIRBZ		Baruch et al. (1999)
155 – 169	Erkennung apoptotischer Neutrophiler	6	Navazo et al. (1996)
155 – 183	Epitop, das durch anti Nak ^a Seren erkannt		Daviet et al. (1995b)
	wird.		
	Inhibiert ADP- induzierte		Daviet et al. (1997)
	Thrombozytenaktivierung		
	Adhäsion von PfIRBZ		Daviet et al. (1997)
	Bindungsregion von oxLDL		Navazo et al. (1996)
311 - 333	Cystein Cluster mit unbekannter Funktion	14	Armesilla und Vega
440 - 466	Transmembrandomäne		(1994)
464 + 466	palmitolierte Cysteine		Tao et al. (1996)
480 - 496	mögliche alternative		Kern et al. (1999)
	Transmembrandomäne		

1.2.8 Bekannte Polymorphismen im CD36-Gen

Es sind CD36-Defizienzen beschrieben worden, die Thrombozyten und Monozyten betreffen. Dabei wird unterschieden zwischen der Typ-I-Defizienz, bei der Thrombozyten und Monozyten betroffen sind und der Typ-II-Defizienz, bei der nur Monozyten betroffen sind (Yamamoto et al. 1994). So führen die Mutationen an den Positionen 539 bis 540 in Exon V und 1159 in Exon X jeweils zu einem veränderten Leserahmen und zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation in der Aminosäurekette (Kashiwagi et al. 1994, 1996). Der Aminosäureaustausch P90S (Kashiwagi et al. 1993), der durch die Punktmutation 478C>T verursacht wird (Kashiwagi et al. 1995), führt durch eine defekte posttranslationale Modifikation zu einer CD36 Defizienz. Es wird angenommen, dass Homozygotie für diese Mutation eine Typ-I-Defizienz verursacht, wogegen die Heterozygotie zu einer Typ-II-Defizienz führt. Eine weitere Variante im CD36-Gen, die zu dem Austausch der Aminosäuren V154F führt, wurde bei einer Studie entdeckt, die die Identifikation von sogenannten "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) zum Ziel hatte (Cargill et al. 1999). In dieser Arbeit wurden kodierende Bereiche von Genen untersucht, die eine Rolle bei Erkrankungen des Menschen spielen. Dabei wurden jedoch keine Phänotypen untersucht, so dass keine Aussage über eine mögliche Auswirkung der Variante V154F gemacht werden konnte.

Tabelle 1-2:

Bekannte Varianten des CD36-Gens

Variante	Auswirkung	Referenz	
331-491del141bp	Тур І	Kashiwagi H. et al. 1994	
539-540del	Тур I		
478C>T	Typ I + II	Kashiwagi H. et al. 1995	
839-841del>insAAAAC		Kashimari II at al 2001	
959-1028del	турт	Kashiwagi H. et al. 2001	
670G>T	n.b.	Concill M. et al. 1000	
783G>A	n.b.	Cargini M. et al. 1999	
1159-1160insA	Тур І	Kashiwagi H. et al. 1996	
T188G (=1264T>G)	Тур І	Pain A. et al. 2001	
1438-1449del	Тур І	Kashiwagi H. et al. 2001	
1264T>G	Тур І		
1439G>C	n.b.		
1444delA	Тур II	Aitman TL at al 2000	
1530ins14bp	n.b.	Alunan 1J, et al. 2000	
missense mutation 1	n.b.		
missense mutation 2	n.b.		
n.b.:	nicht bestimmt		
Typ I bzw. Typ II:	Typ I bzw. Typ II: CD36 -Typ-I-, bzwTyp-II-Defizienz		
missense mutation 1 bzw. 2: die Mutation wurde in der entsprechenden Publikation nicht r			

bezeichnet.

1.2.8.1 CD36-Defizienz und Phänotyp der CD36-Defizienz

CD36 definiert eine der menschlichen Blutgruppeneigenschaften, die sogenannte Nak^a Eigenschaft. Personen bei denen CD36 nicht exprimiert wird, sind erstmals durch Transfusionszwischenfälle aufgefallen. Diese Personen bilden nach einem erstmaligen Kontakt mit CD36-positivem Spenderblut einen Autoantikörper, den sogenannten Nak^a-Antikörper. Bei einem weiteren Kontakt mit CD36-positivem Blut ist dieser Autoantikörper für Transfusionszwischenfälle verantwortlich (Daviet et al. 1995). Auch nach einer Schwangerschaft kann es zur Bildung von Nak^a-Autoantikörpern kommen. Klinisch kann dabei eine neonatale Thrombozytopenie entstehen. Ansonsten ist das klinische Erscheinungsbild CD36-defizienter Individuen unauffällig. Bei Mäusen, die nicht in der Lage sind, CD36 zu exprimieren (CD36 null mice), wurde die wichtige Rolle von CD36 beim Stoffwechsel von Fettsäuren und Lipoproteinen nachgewiesen (Febbraio et al. 1999). Veränderungen im Glukoseund Fettstoffwechsel, wie z.B. eine verminderte Glukosetoleranz, eine Zunahme der Triglyceride und eine Abnahme des HDL-Cholesterins konnte für Individuen mit einer Typ-I-CD36-Defizienz nachgewiesen werden (Kashiwagi et al. 2001). Ebenso ist ein Akkumulationsdefekt für langkettige Fettsäuren im Myokard nachgewiesen. Dagegen konnte eine Kopplung der CD36-Defizienz mit einer hypertrophen Kardiomyopathie nicht bestätigt werden. Dennoch ist das Fehlen von CD36 offenbar innerhalb der physiologischen Abläufe, an denen es beteiligt ist, zu kompensieren. Über den Einfluss von CD36-Defizienzen auf Krankheiten wie Malaria oder Sichelzellämie ist wenig oder nichts bekannt. Es gibt lediglich einen einzelnen Fall-Bericht, bei dem ein Patient mit einer Typ-I-CD36-Defizienz und zwei Patienten mit einer Typ-II-Defizienz beschrieben wurden, die an einer mild verlaufenden Plasmodium falciparum Malaria erkrankten (Yamamoto et al. 1993). Der Einfluss der CD36-Defizienz auf den Verlauf der schweren Malaria ist bislang noch nicht gezielt untersucht worden.

Bei Kaukasiern und in der US-amerikanischen Bevölkerung ist die CD36-Defizienz selten (0,3 %). Wesentlich häufiger ist sie in asiatischen Bevölkerungsgruppen (Ikeda et al. 1989; Santoseo et al. 1993; Lin et al. 1993). Die stärkste Häufung von CD36-negativen Individuen wurde bislang in einer Population südlich der Sahara lebender Afrikaner nachgewiesen. Hier lag die Rate der CD36-Defizienz bei 7,77 % (Lee et al. 1999).

1.3 Problemstellung und Zielsetzung

Zu Beginn dieser Studie war das CD36-Gen noch nicht gezielt bei einer afrikanischen Bevölkerung untersucht worden. Bislang lagen nur durchflusszytometrisch bestimmte Ergebnisse über die Häufigkeit von CD36-Defizienzen vor. Das Interesse, das dieser Untersuchung zu Grunde lag, galt insbesondere solchen Varianten im CD36-Gen, die in anderen ethnischen Gruppen nicht nachzuweisen waren. Für eben diese Varianten lässt sich die These aufstellen, dass sie in einem Zusammenhang mit der hohen Prävalenz der Malaria in Westafrika stehen. Um solche Varianten identifizieren zu können, ist es notwendig, die vollständige genomische DNA der Individuen zu untersuchen, da ansonsten Varianten in nicht translatierten Bereichen des Gens nicht erfasst werden. Ebenso ist die Untersuchung genomischer DNA die Voraussetzung dafür, dass auch der Promotorbereich eines Gens mit untersucht wird. Die Auswahl der hier untersuchten Individuen war durch eine vorausgegangene Studie gegeben, die zum Ziel hatte, einen möglichen Zusammenhang zwischen der individuellen Milzgröße und dem Ausmaß der individuell vorangegangenen Parasitämien herzustellen. Der Grundgedanke bestand in der Überlegung, dass eine hohe individuelle Suszeptibilität gegenüber *Plasmodium-falciparum*-Malaria durch eine hohe Parasitämie reflektiert wird. Diese wiederum führt über die große Anzahl in der Milz eleminierter infizierter Erythrozyten zu einer Splenomegalie. Somit würde die Größe der Milz zu einem gewissen Grad das Ausmaß der individuellen Suszeptibilität gegenüber *Plasmodium-falciparum*-Malaria wiederspiegeln.

Ziel dieser Arbeit war es eine möglichst große Anzahl bislang nicht identifizierter Varianten im CD36-Gen nachzuweisen. Die Auswahl von Individuen mit auffällig großen bzw. kleinen Milzen in der hier vorliegenden Untersuchung diente dazu, die Chance zu erhöhen, im untersuchten Gen Varianten vorzufinden. Der Nachweis bislang unbekannter Varianten bietet die Grundlage für weitere Untersuchungen, in denen ein möglicher Zusammenhang zwischen neu erkannten Varianten und veränderter Suszeptibilität gegenüber Malaria untersucht werden kann.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräteliste

Unterdruckkammer zur DNA Isolation, Macherey und Nagel Zentrifuge, Eppendorf 5414 C Zentrifuge, Sigma 4 K 10 Thermomixer, Eppendorf 5436 Wasserbad, JULABO UC, Julabo Labortechnik Trio Thermoblock, Biometra DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer T3 Thermocycler, Biometra UV-Flächenstrahler, Konrad Bender Photometer, Pharmacia Sequenzierautomaten, ABI 373 und ABI 377, Perkin Elmer LightCyclerTM, Roche Diagnostics

2.1.2 Verwendete Chemikalien und verwendete Kits

DNA-Sequenzier-Kit, Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction mit AmpliTaq-DNA-Polymerase, PE Biosystems Agarose-Gelextraktions-Kit, Boehringer QIAamp Blood Kit, Qiagen QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen QiaGen PCR Purification Kit, Qiagen High Pure PCR Template Preparation Kit, Boehringer PCR Purification Kit, Boehringer NucleoSpin Blood L, Macherey-Nagel Agarose Low EEO, Biomol

2.1.2.1 Längenstandard

100bp-Leiter, Pharmacia

2.1.3 Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Ethidiumbromid Stammlösung:

 $10 \text{ mg Eth. Br} / \text{ml } ddH_2O$

DNA-Auftragspuffer 6fach konzentriert:

0,1 % Bromphenolblau
0,1 % Xylen Cyanol
40 % Saccharose (w/v) in ddH₂O
Lagerung bei 4°C

TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA) 50fach konzentriert:

242 g Tris-base57 ml Eisessig100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0ad 1000 ml H₂O, autoklavieren, Lagerung bei RT

O.P.A. (One-Phor-All Buffer) 10fach konzentriert:

100 mM Tris-Acetat pH 7.5
100 mM Mg-Acetat
500 mM Ka-Acetat
Lagerung bei 4°C
Hersteller: Pharmacia

TBE (Tris/Borat/EDTA) 10fach Konzentriert

108 g Tris-base
55 g Borsäure
40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1000 ml H₂O, autoklavieren, Lagerung bei RT

Taq-Puffer 10fach konzentriert: 500 mM KCl 100 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei RT 15 mM MgCl₂ 1 mg/ml Gelatine Lagerung bei –20 °C

2.1.3.1 Nährmedien für Bakterienkulturen

Luria-Bertani (LB)-Medium:

10 g NaCl 10 g Bacto-Tryptone 5 g Hefeextrakt pH 7,2 mit 10 M NaOH einstellen ad 1000ml H₂O am gleichen Tag autoklavieren, Lagerung bei 4 °C

LB-Ampicillin-Agar:

1000 ml LB-Medium
15 g Agar
autoklavieren und abkühlen lassen auf ca. 50 °C
50 μg/ml Ampicillin (= 0,5 ml aus Stock 100 mg/ml)
Platten gießen, fest werden lassen, Lagerung bei 4 °C

2.1.4 Verwendete Enzyme und Restriktionsenzyme

Taq-DNA-Polymerase: aus Thermus aquaticus, 5 U/µl (Pharmacia)

T4-DNA-Ligase: aus E.coli Lambda Lysogen NM 989, 4 U/µl (Pharmacia)

Alu I: aus *Arthrobacter luteus*, 8 U/µl (New England BioLabs)

Ase I: aus Aquaspirillum serpens, 10 U/µl (New England BioLabs)

BstN I: aus Bacillus stearothermophilus N (NEB 197), 10 U/µl (New England BioLabs)

BstZ17 I: aus Bacillus stearothermophilus Z17, 5 U/µl (New England BioLabs)

Dde I: aus Desulfovbrio desulfuricans, 10 U/µl (New England BioLabs) Hinf I: aus Haemophilus influenzae Rf, 10 U/µl (New England BioLabs) Mse I: aus Micrococcus species (NEB 446), 4 U/µl (New England BioLabs) Nde I: aus Neisseria denitrificans, 2 U/µl (New England BioLabs) NIa IV: aus Neisseria lactamica, 1 U/µl (New England BioLabs) Ssp I: aus Sphaerotilus species, 5 U/µl (New England BioLabs) Sty I: aus E. coli WA921/pST27 hsd⁺, 10 U/µl (New England BioLabs) Tsp 45 I: aus Thermus species, 4 U/µl (New England BioLabs)

2.2 Methoden

2.2.1 Untersuchte Individuen der Studienpopulation

Im Frühjahr 1998 wurden im Asante Akim North District der Ashanti Region Ghanas 3500 Kinder in eine Studie einbezogen, um die Endemizität von Malaria in dieser Region zu bestimmen. Bei der von Prof. Dr. Burchard (BNI, Hamburg) geleiteten Studie wurde, wurden die Milzgrößen der 3500 untersuchten Kinder durch Palpation und durch Ultraschallverfahren bestimmt. Die Beziehung zwischen der gemessen Milzfläche in cm² und der Körpergröße des untersuchen Kindes ermöglichte die Auswahl von extrem großen und kleinen Milzen und die Bestimmung solcher Individuen, deren Milzgröße etwa dem durchschnittlichen Mittel entsprach. Die Auswahl der Individuen mit extremen und durchschnittlichen Milzgrößen geschah für jedes untersuchte Dorf einzeln, um störende Einflussgrößen durch Umweltfaktoren, wie etwa eine regional unterschiedliche Prävalenz für Plasmodium falciparum Malaria, möglichst gering zu halten. Insgesamt wurden Blutproben von 100 Individuen mit besonders kleinen, 50 Blutproben von solchen mit durchschnittlich großen und 100 Blutproben von Individuen mit extrem großen Milzen ausgewählt. Neben den Blutproben wurden auch Urinproben gesammelt und untersucht, um die eventuelle Einnahme des Anti-Malaria-Medikamentes Chloroquin nachweisen zu können. Elektrophoretisch und mit Hilfe von PCR-Methoden wurden die Blutproben auf das Vorhandensein von hämatologischen Erkrankungen wie Sichelzellanämie und α-Thalassämie getestet. Diese Arbeit wurde unter der Leitung von PD Dr. Meier am Berliner Tropeninstitut durchgeführt. Zudem wurde eine ausführliche Anamnese erhoben, bei der die Häufigkeit von Krankenhauseinweisungen zur Malariatherapie, die Anzahl stattgefundener ambulanter Malariatherapien, die Anzahl von Fieberepisoden ohne Malariabehandlung und die Art und Menge der eingenommenen Antimalariamedikamente erfragt wurden. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die erhobenen Daten rechnerisch für die Einflussgrößen Alter, Geschlecht und Körpergröße korrigiert. Weiterhin wurde berücksichtigt, dass sich die Infektionsrate in den einzelnen untersuchten Dörfern unterscheiden kann. Daher wurden die Milzgrößen auch in Bezug auf diese Einflussgröße, durch Errechnung eines spezifischen Dorfmittelwertes korrigiert. Als Ergebnis dieser Berechnungen entstand ein Datensatz, der es ermöglichte, für die ca. 3500 untersuchten Individuen eine absolute Rangfolge hinsichtlich der Milzgröße festzulegen. Diese Arbeiten wurden von PD Dr. Müller-Myhsok (BNI, Hamburg) durchgeführt. In diese Berechnungen wurden nur Individuen im Alter zwischen zwei und neun Jahren einbezogen.

Aus der so gewonnenen Verteilung wurden Individuen mit extrem großen sowie extrem kleinen Milzen ausgewählt. Aus der zwölf Personen umfassenden Studienpopulation gehörten acht zur Gruppe mit extrem kleinen Milzen und vier zur Gruppe mit extrem großen Milzen. Wurden Teilabschnitte des CD36-Gens bei einer größeren Anzahl von Individuen untersucht, so wurden dafür solche Individuen mit den in der errechneten Rangfolge nächst großen und kleinen Milzen ausgewählt. Nicht in die Auswahl mit einbezogen wurden Proben von Patienten, bei denen anamnestisch die Einnahme von Antimalariamedikamenten vorlag, solche, bei denen Chloroquin im Urin nachgewiesen wurde und alle, bei denen eine Hämopathie im Sinne einer Sichelzellanämie oder einer α -Thalassämie nachgewiesen wurde.

2.2.2 Untersuchte Individuen der Kontrollpopulation

Aus einer Gruppe von 3550 erwachsenen Ghanaern, die an einer weiteren Studie teilnahmen, wurden zufällig 50 Individuen ausgewählt. Sie dienten in dieser Studie als afrikanische Kontrollpopulation.

Als kaukasische Kontrollpopulation dienten Blutproben von Mitarbeitern des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin in Hamburg. Insgesamt wurden von 50 zufällig ausgewählten Mitarbeitern dazu Blutproben entnommen.

2.2.3 Blutproben

Die Blutproben wurden im Frühjahr 1998 aus oberflächlichen Armvenen der Individuen entnommen, die an der Studie von Prof. Burchard (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg) teilnahmen. Die Blutproben wurden in EDTA-enthaltenden Röhrchen entnommen und mit Puffer X (Qiagen, Chatsworth, USA) konserviert. Durch diese Konservierung war eine Lagerung bei Raumtemperatur möglich. Weiterhin wurde ein Blutstropfen auf Filterpapier gegeben, der zur späteren elektrophoretischen Untersuchung von Hämoglobinvarianten verwendet wurde. Die Blutproben erreichten das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin im Mai 1998.

Die Blutproben der afrikanischen Kontrollpopulation wurden im Jahr 2000 entnommen. Sie wurden im Rahmen einer von der hier vorliegenden Untersuchung unabhängigen Studie gewonnen. Die Blutproben wurden ebenso behandelt und gelagert wie die der Studienpopulation.

Bei der kaukasischen Kontrollpopulation wurden im Jahr 2001 die Blutentnahmen durchgeführt. Es wurden dazu EDTA-Blutentnahmeröhrchen verwendet. Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung gekühlt aufbewahrt.

2.2.4 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut

Genomische DNA aus Vollblut wurde mit der Methode nach Gelhaus gewonnen (Gelhaus et al. 1995). Hierbei wurden zuerst die Zellkerne von den übrigen Blutbestandteilen separiert. Der dazu verwendete Kernextraktionspuffer (KEP) enthielt Saccharose, die für die osmotische Zelllyse sorgte sowie MgCl₂ zum Schutz der Kernmembran. In einem zweiten Schritt wurde durch einen Lysepuffer (LP) die Kernmembran aufgelöst. Das im Puffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkte dabei eine Proteindenaturierung. Zugabe von Proteinase K (PK) sorgte für den weiteren Abbau von Proteinen. Nach Zentrifugation befand sich die von ihren Kernhüllen befreite DNA im Überstand. Die DNA wurde mit absolutem Alkohol ausgefällt und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen.

Im Einzelnen wurde wie folgt verfahren: Die ca. 10 ml EDTA-Blut wurden von den Monovetten in 50 ml Falcon Röhrchen überführt, diese mit KEP aufgefüllt und der Ansatz durch mehrmaliges Stürzen in den Gefäßen gemischt. Anschließend wurde so oft für 10' bei 4°C mit 1600 x g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit 45 ml KEP resuspendiert, bis der Überstand klar war. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit der Pipette gründlich in 1 ml 0,15 M NaCl resuspendiert und 2,5 ml LP sowie 200 µl von einer Proteinase-K-Stocklösung (10 mg/ml) dazugegeben. Es folgte die Inkubation für 2 h bei 60 bis 65 °C unter leichtem Schütteln im Wasserbad. Anschließend wurden die Röhrchen mit 1 ml gesättigter NaCl-Lösung (350 g NaCl in 1 l Aqua bidest.) versetzt, 2' geschwenkt und für

15´ bei 4 °C mit 2200 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und das Pellet verworfen. Durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol abs. wurde die DNA im Überstand ausgespindelt und als geknäulter Faden mit der Pipette in ein 1,5-ml-Safelock-Eppendorf-Gefäß überführt. Es wurde für 15´ mit 1200 x g zentrifugiert, zum Waschen der Probe 1 ml Ethanol 70 % dazugegeben und weitere 10´ zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und der letzte Waschschritt nochmals wiederholt. Die Trocknung des Pellets erfolgte für 10´ im Wärmeblock bei 36 °C.

2.2.4.1 DNA-Isolierung mittels Vakuumkammer

Zur DNA-Isolierung einer größerern Anzahl von Blutproben wurde eine Vakuumkammer von Macherey-Nagel in Verbindung mit dem NucleoSpin Blood L Kit, ebenfalls Macherey-Nagel, verwendet. Im ersten Schritt wurden dabei die zellhaltigen Blutbestandteile unter Verwendung von Proteinase-K lysiert. Das Lysat wurde dann in eine NucleoSpin-Säule (Macherey-Nagel) gegeben. Diese Säulen besitzen eine Membran, die spezifisch DNA binden kann. Andere Bestandteile des Lysates passieren die Membran ohne zu binden. Die Säulen waren so auf der Vakuumkammer angebracht, dass durch den Unterdruck in der Kammer das Lysat durch die Membran gesogen wurde. Der Unterdruck ersetzte also lediglich den Schritt des Zentrifugierens und erlaubte damit eine vereinfachte und schnellere Bearbeitung der Proben. In weiteren Schritten wurden Zell- und Proteinreste durch waschen entfernt und in einem abschließenden Schritt die an die Säulenmembran gebundene DNA wieder gelöst und in ein steriles und DNA-freies Gefäß gesogen. Im Einzelnen wurden die Schritte nach Anweisungen des Herstellers der NucleoSpin-Säulen durchgeführt.

Genomische DNA wurde in kleineren Mengen und bei Vorversuchen auch unter Verwendung des QIAamp Blood Kit (Qiagen) gewonnen, wobei im Einzelnen nach Herstellerangaben verfahren wurde.

2.2.5 Spektralphotometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes

Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Konzentration der genomischen DNA im Photometer gemessen (OD 260 nm / 280 nm). Das Prinzip dieser Bestimmungsmethode besteht darin, dass die DNA als Makromolekül in der Lage ist, Licht der Wellenlängen von ca. 200 bis 400 nm (ultraviolettes Licht) zu absorbieren. Wasser dagegen absorbiert Licht im Bereich zwischen 260 bis 280 nm in nur sehr geringem Maße, weshalb sich im Bereich dieser Wellenlängen die Stärke der Absorbtion proportional zum DNA-Gehalt der Lösung verhält. Die Stärke der Absorbtion wird als optische Dichte (OD) angegeben. Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml Lösungsmittel (H₂O). Für die Messung der OD wurde 1 µl der in 100 µl Aqua bidest. aufgenommenen genomischen DNA im Verhältnis 1 zu 100 mit Wasser verdünnt und in eine Quarzküvette pipettiert. Eine zweite Küvette wurde als Referenzprobe ausschließlich mit Aqua bidest. befüllt und diente der Bestimmung des Nullwertes. Die Absorbtion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zur Berechnung der aktuellen DNA-Konzentration wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{OD_{260} \times 100 \times 50}{1000} = y$$

 $y = Konzentration der DNA (\mu g/\mu l)$

2.2.6 Ableitung spezifischer Oligonukleotide

Spezifische kurze Oligodesoxyribonukleotide, sogenannter Primer, sind notwendig zur Durchführung einer Polymerase Kettenreaktion (PCR). Die Primer stellen dabei eine synthetische DNA dar. Die zwei in einer PCR eingesetzten Primer sind komplementär zu je einem Strang der Ziel-DNA-Sequenz. Die verwendeten Primer hatten eine Länge von 18 bis 26 Nukleotiden. Bei der Ableitung der Primer wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Basen Adenin (A) und Thymin (T) in etwa in der gleichen Anzahl im Primer vorlagen, wie die Basen Guanin (G) und Cytosin (C). Um eine Bildung von Primer-Dimeren zu verhindern, wurde außerdem Wert darauf gelegt, die Primersequenzen so auszuwählen, dass sich die Primer nicht untereinander binden konnten. Ebenfalls wurde versucht Bindungsmöglichkeiten innerhalb eines Primers, sog. "hairpins" oder "loops", zu vermeiden. Des Weiteren müssen die Primer ausreichend spezifisch sein, so dass sie ausschließlich an die Zielsequenz binden. Letzteres wurde mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) Algorithmus (Altschul et al. 1990) kontrolliert. Die Primer wurden aus bereits bekannten Exonsequenzen (Armesilla und Vega 1994) oder aus zuvor bestimmten Intronsequenzen abgeleitet. Die Temperatur, bei der 50 % der Oligonukleotide einzelsträngig vorliegen, wird Schmelztemperatur (T_m) genannt. Bei dieser Temperatur findet auch der Prozess des Anhaftens der Primer, das sog. "annealing", bei der PCR statt. Diese Temperatur ist abhängig von dem Anteil an C und G am Oligonukleotid. Diese Nukleotide bilden im DNA-Molekül drei Wasserstoffbrückenbindungen aus, im Gegensatz zu nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen, wie sie bei der Bindung von A und T vorliegen. Es wurde daher weiterhin darauf geachtet, dass die T_m , der in derselben PCR verwendeten Oligonukleotide, nicht um mehr als 4 °C differierten und dass die T_m beider Primer möglichst zwischen 50 und 60 °C lag (siehe Tabelle 2-1).

2.2.6.1 Synthese von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide wurden durch Phosphoamidit-Synthese auf einem Gerät der Firma Applied Biosystems von der Arbeitsgruppe Biochemie im BNI synthetisiert. Überschüssiger Ammoniak wurde über Nacht bei Raumtemperatur verdampft.

Die zur Amplifikation der 15 Exons sowie des Promotors verwendeten Primer sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.
2.2.6.2 Primersequenzen

Tabelle 2-1:

Primersequenzen

Amplifiziertes Exon und korespondierende cDNA Nukleotide		Primer Sequenz ^{a, b}	Position des Primers	Länge des Produktes	"annealing" Temperatur
Promotor [-273-(-1)]		5'- CTGGCCTCTGACTTACTTGG 5'- ATAGGATCAAATGGTATTCTGC	Promotor Exon 1	320 bp	55°C
1	[1-106]	5′-TGCATATGTAAACTCTCACGC 5′-AAAGAAAAATCATACAACTTACC	Promotor Intron 1	160 bp	55 °C
2	[107-200]	5′-ACCCATGCTTTTCTTATTTTCACAG 5′-AATCTTATCTAAGGAGAACTCTCAC	Intron 1 Intron 2	322 bp	55 °C
3	[201-409]	5′-TTCTGTTTTATGATCTCTTTCTAATG 5′-ATGAGAGGATATTCTTTGACTACTTG	Intron 2 Intron 3	268 bp	50 °C
4	[410-570]	5'-CATAACCCAAACTTATTTTCTTTTCC 5'-TGTCTCATATTTGTGGGCACTCAC	Intron 3 Intron 4	219 bp	50 °C
5	[571-718]	5′-TGAATTTTGTTTACTGCTGTTTC 5′-ATAACTTTGTTGTTTGTCTACTC	Intron 4 Intron 5	201 bp	50 °C
6	[719-898]	5′-TATTCTTGTCTTAAACAGTGAC 5′-ATAATATTGCCATTCATATTTGG	Intron 5 Intron 6	245 bp	50 °C
7	[899-990]	5′-ACATTTTCCCATACATATATTTCAG 5′-TAGAGTACCCTAGTAACATACATGC	Intron 6 Intron 7	163 bp	50 °C
8	[991-1037]	5′-AATGGCATCAGGTACATTGC 5′-GACCACAAAACAAATATTCTTAC	Intron 7 Intron 8	266 bp	50 °C
9	[1038-1107]	5′-ATTTGCCACTCGATTTTTAAACAG 5′-TCTTCCTCTGCATTTTGTCACC	Intron 8 Intron 9	160 bp	54 °C
10	[1108-1295]	5′-TAAGTTCAGGTTCCTGGAATGC 5′-CAAATTATGGTATGGACTGTGC	Intron 9 Intron 10	275 bp	55 °C
11	[1296-1414]	5′-GAAATCAATGACATAATTCTTCC 5′-TAAACCATAGGAAGAAATCGACC	Intron 10 Intron 11	430 bp	50 °C
12	[1415-1488]	5′-ATTGTGTGTGTATCTATATGGATGC 5′-GAAGATACTACGATACTACAG	Intron 11 Intron 12	313 bp	50 °C
13	[1489-1543]	5′-TAGAAGACATATAAGAGCAAAGG 5′-CATTCTTTTGAAACATCAAGAGC	Intron 12 Intron 13	308 bp	55 °C
14	[1544-1977]	5′- AACGTACCCAAATAATGTTGA 5′- AATTGAGAAATGAACCAGTCA	Intron 13 Intron 14	499 bp	50 °C
15	[1978-2601]	5′-CCACAACTGAATTGATTTCCG 5′-AGGAACTAGAAAAAGCACAGG	Intron 14 Intron 15	680 bp	50 °C

^a Primer wurden aus Sequenzen abgeleitet, die von Armesilla und Vega (1994) publiziert wurden oder aus neu definierten Intronsequenzen der Introns 2, 7, 9, 10, 11, 12 und 13.

^bZu Exonsequenzen komplementäre Nukleotide sind *krusiv* dargestellt.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur spezifischen Amplifikation einer definierten Ziel-DNA-Sequenz aus einem heterologen DNA-Gemisch (Saiki et al. 1988). Sie besteht aus aufeinanderfolgenden Zyklen mit jeweils drei Schritten. Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die DNA-Doppelstränge durch Erhöhung der Temperatur voneinander getrennt. Anschließend hybridisieren kurze, als Primer bezeichnete DNA-Oligonukleotide spezifisch an komplementäre Sequenzen der einzelsträngig vorliegenden DNA, welche die zu amplifizierende DNA-Region einrahmen. Dieser Prozess wird "annealing" genannt. Von den Primern ausgehend werden im nächsten Schritt in beide Richtungen komplementäre DNA-Stränge neu synthetisiert (Extension). Voraussetzung für diesen Schritt ist die Anwesenheit einer hitzestabilen DNA-Polymerase sowie der vier Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Dieser Reaktionsablauf wird in derselben Reaktionsmischung zyklisch wiederholt. Schon nach dem dritten Zyklus bilden sich Doppelstränge, deren Länge dem Abstand der Primer entspricht. Ihr Anteil erhöht sich mit jedem Zyklus exponentiell.

2.2.7.1 Standard PCR

Zusammensetzung eines 100 µl Reaktionsansatzes:

Matrizen-DNA:	100 ng
Primer:	je 100 ng
PCR-Puffer:	1 x
Desoxynukleosidtriphosphate:	je 200 µM
<i>Taq</i> -Polymerase:	1 U

Um eine Kontamination durch Fremd-DNA nachweisen zu können, wurden bei jeder PCR auch Kontrollansätze untersucht, die keine Matritzen-DNA enthielten. Die PCR-Reaktionen wurden in einem automatischen Thermocycler (Trio-Thermoblock, Biometra) nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Begonnen wurde mit einem Denaturierungsschritt von 95 °C für fünf Minuten. Danach begannen die sich zyklisch wiederholenden Einzelschritte. Zuerst ein 30 Sekunden dauernder Denaturierungsschritt bei 92 °C. Der anschließende Annealingschritt wurde in Temperatur und Länge den jeweils verwendeten Primern angepasst (Tabelle 2-2) und lag zwischen 45 °C

und 60 °C, die Dauer betrug zwischen 15 Sekunden und 2 Minuten. Die anschließende Extension wurde bei einer Temperatur von 72 °C durchgeführt. Die Dauer wurde in Abhängigkeit der Länge des zu amplifizierenden DNA-Stranges verändert und betrug zwischen 30 sek. und 1 min. 30 sek. Die Amplifikation erfolgte in 30 bis 35 Zyklen. Die Zyklen wurden mit einem letzten Extensionsschritt bei 72 °C für fünf Minuten abgeschlossen, der sicherstellen sollte, dass es zu einer vollständigen Synthese aller DNA-Stränge kommt. Der Erfolg der PCR wurde kontrolliert, indem 10 % des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese analysiert wurden.

Tabelle 2-2:

PCR-Bedingungen

amplifiziertes Exon	korespon- dierende cDNA Nukleotide	Hybridisierungs -temperatur	Hybridisierungs- dauer (sek.)	Extensions- dauer (sek.)	Anzahl der Zyklen	Länge des Produktes
Promotor	[-273-(-1)]	55 °C	60	60	35	320 bp
1	[1-106]	55 °C	60	60	35	160 bp
2	[107-200]	50 °C	60	50	35	322 bp
3	[201-409]	50 °C	70	40	35	268 bp
4	[410-570]	55 °C	60	30	35	219 bp
5	[571-718]	50 °C	60	60	35	201 bp
6	[719-898]	51 °C	60	40	35	245 bp
7	[899-990]	55 °C	60	30	35	163 bp
8	[991-1037]	55 °C	60	30	35	266 bp
9	[1038-1107]	55 °C	60	30	35	160 bp
10	[1108-1295]	55 °C	60	60	35	275 bp
11	[1296-1414]	50 °C	60	60	35	430 bp
12	[1415-1488]	50 °C	60	30	35	313 bp
13	[1489-1543]	55 °C	60	60	35	308 bp
14	[1544-1977]	58 °C	60	60	35	499 bp
15	[1978-2601]	58 °C	60	60	35	680 bp

Vor einer weiteren Charakterisierung (Klonierung, Sequenzierung) wurden die PCR-Produkte entweder mittels "High Pure PCR Product Purification" Kit (Boehringer, Mannheim) direkt aus dem Reaktionsansatz aufgereinigt oder sie wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus Agarosegelen isoliert und anschließend aufgereinigt.

2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle wandern bei der Agarose-Gelelektrophorese im elektrischen Feld in Richtung des positiv geladenen Pols. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge. Bei der Wanderung durch eine Agarosematrix lassen sich daher unterschiedlich lange Nukleinsäuremoleküle voneinander trennen. Der optimale Trennbereich eines Agarosegels lässt sich über die Agarosekonzentration bestimmen, da sich mit zunehmender Agarosekonzentration die Porengröße verkleinert. Eine Agarosekonzentration von 1,2 % ist Ideal zur Auftrennung von DNA-Molekülen mit einer Länge zwischen 400 und 600 Basenpaaren. Diese Agarosekonzentration wurde in der vorliegenden Arbeit am häufigsten verwendet. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde der Agaroselösung Ethidiumbromid in einer Konzentration von $0,1\mu$ g/ml zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert ausschließlich in doppelsträngiger DNA und ist in der Lage, die kurzen doppelsträngigen DNA Stücke, wie sie im Agarosegel vorliegen, anzufärben. Die Fotografie der Gele erfolgte bei retrograder Beleuchtung durch einen UV-Licht Transluminator.

2.2.8.1 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die DNA-Isolierung aus Agarosegelen erlaubt die weitere Bearbeitung von PCR-Produkten definierter Größe, wie sie beim Prozess der Gelelektrophorese sichtbar werden. Mit Hilfe dieses Arbeitsschrittes kann aus einer Anzahl unspezifischer Banden in der Gelelektrophorese die DNA einer einzelnen Bande isoliert werden. Die unter retrograder Beleuchtung mit UV-Licht ausgeschnittene Bande eines Agarosegels wurde zunächst bei –20 °C eingefroren, wodurch die Agarosestruktur gebrochen wurde. Die DNA übersteht das Einfrieren dagegen unbeschadet. Nach dem Auftauen des für mindesten 20 Minuten eingefrorenen Agarosegels wurde der Agaroseblock durch zwei Lagen eines Filterpapiers gepresst. Die ausgepresste Flüssigkeit wurde in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß aufgefangen. Um die Ausbeute an DNA zu erhöhen wurde anschließend 200 μ l ddH₂O durch das gleiche Filterpapier gepresst. Die enthaltene DNA wurde dann mittels Na-Acetat ausgefällt. Zu einem Volumen von 250 μ l wurde 25 μ l Na-Acetat (jeweils 1/10 des Ausgangsvolumens) zugefügt. Anschließend wurde so viel eiskaltes, reines Ethanol zugegeben, dass die Endkonzentration des Ethanols 70 % betrug. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Lösung für 30 Minuten in der Tiefkühltruhe auf –20 °C abgekühlt, dann für 30 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert, dekantiert und die am Boden des Gefäßes befindliche DNA wiederum in 70%igem eiskalten Ethanol aufgenommen. Anschließend wurde nochmals für 30 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert und abschließend dekantiert. Die am Boden befindliche DNA wurde getrocknet und in 150 μ l ddH₂O aufgenommen. Eine alternative Methode bestand in der DNA-Isolierung mittels des "Agarose Gel Extraction Kit" von Boehringer Mannheim. Hier erfolgte die DNA-Isolierung nach den Angaben des Herstellers.

2.2.9 Automatische DNA-Sequenzanalyse

Die Nukleotid-Sequenz der DNA wurde bestimmt nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger et al. 1977). Diese Methode basiert auf der Neusynthese von DNA an einer einzelsträngigen Matrize und dem zufälligen Einbau von basenspezifischen Didesoxynukleotiden, die zu einem Abbruch der Synthese führen. Die verwendeten Didesoxynukleotide sind spezifisch für das jeweilige Nucleotid mit verschiedenfarbig fluoreszierenden chemischen Gruppen markiert. Durch den zufälligen Einbau der markierten Didesoxynukleotide entstehen einzelsträngige DNA-Moleküle unterschiedlicher Länge, deren jeweils letztes Nukleotid spezifisch farblich markiert ist.

Im einzelnen lief die Sequenzierungs-PCR wiefolgt ab: Die Amplifikationsprodukte einer zuvor durchgeführten PCR wurden unter Verwendung des BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Warrington, UK) direkt sequenziert. Dazu wurde eine PCR mit nur einem Primer durchgeführt. Es entstehen DNA-Einzelstränge, die – wie oben beschrieben – an einer zufälligen Position abbrechen. Die Reaktionsansätze dieser Einzelstrangnukleotidsynthese werden im nächsten Schritt auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (7M Harnstoff, 6 % Polyacrylamid) aufgetragen und dort nach dem Prinzip der Elektrophorese aufgetrennt. Die Sequenziergerätes (377 und 373 DNA-Sequenzer, Applied Biosystems, ABI, Weiterstadt). So erhaltene DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogrammes DNAsis (Pharmacia) weiter analysiert. Ein Sequenzvergleich mit

Referenzsequenzen oder anderen bereits veröffentlichten Sequenzen wurde mit dem Basic Local Alignment Search Tool-Algorithmus (BLAST) (Altschul et al. 1990) durchgeführt.

2.2.10 Klonierung von DNA-Fragmenten mittels Plasmid-Vektoren

Wurde bei der Untersuchung einer DNA-Sequenz ein Nukleotidaustausch gefunden, so wurde eine erneute PCR durchgeführt. Das gewonnene PCR-Produkt wurde mittels eines Plasmidvektors in kompetente *E.coli*-Bakterien kloniert. Nur ein einzelner Doppelstrang der Fremd-DNA kann in den Plasmidvektor eingebracht werden, d.h. es wird jeweils nur ein Alell untersucht. Liegt der zuvor gefundene Nukleotidaustausch heterozygot vor, so ist die Klonierung eine der Möglichkeiten, um die bei der Sequenzierung gewünschte Eindeutigkeit zu erzielen. Das Sequenzierergebnis einer klonierten Probe zeigt immer eindeutig Mutation oder Wildtyp, in Abhängigkeit davon welches Allel einkloniert wurde.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass ein Plasmid als Vektor Fremd-DNA in Bakterien einführen kann. In das Plasmid kann jeweils nur ein Allel als Fremd-DNA eingebracht werden. In den Bakterien wird die Fremd-DNA zusammen mit dem Plasmid unabhängig vom Wirtsgenom vermehrt. Nach der Öffnung des DNA-Ringes eines Plasmids durch Restriktionsenzyme wird das DNA-Fragment so in diesen Vektor ligiert, dass der Ringschluss wiederhergestellt ist. Das um die Insertion erweiterte Plasmid wird anschließend in Bakterien transformiert.

2.2.11 Restriktionsverdau von DNA

Das Schneiden von DNA wird mit Hilfe sogenannter Restriktionsendonukleasen vorgenommen. Diese Enzyme erkennen bestimmte, meist aus vier bis sechs Nukleotiden bestehende Sequenzen, an denen sie die Phosphodiesterbindungen zwischen zwei bestimmten Mononukleotiden spalten. Diese sogenannten Restriktionsschnittstellen sind für jede Restriktionsendonuklease spezifisch.

2.2.12 Ligation eines DNA-Fragmentes in ein Plasmid

Für die Ligation wird das Enzym T4 DNA-Ligase eingesetzt. Dieses Enzym katalysiert die Verknüpfung von zwei DNA-Enden, die über die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5´-Phosphatrest und einer 3´-Hydroxylgruppe erfolgt. Die Ligase kann also auch zwei Restriktionsfragmente miteinander verbinden. Besitzen die

Fragmente ergänzend komplementäre überstehende Enden, kommt es zwischen diesen zu Basenpaarungen. Durch die so geschaffene räumliche Nähe wird die Ligation erleichtert. Dieses ist gegeben, wenn ein Vektor und ein DNA-Fragment wie beschrieben präpariert wird: Die Enden des geschnittenen DNA-Fragmentes sind mit denen des aus dem Plasmid herausgeschnittenen DNA-Stückes identisch und damit komplementär zu den Enden des Plasmids. Das Fragment kann sich an diesen überhängenden Enden hybridisieren und durch die Ligase-Aktivität wird ein erneuter Ringschluss des Plasmids herbeigeführt. Da durch den Einsatz von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen auch zwei unterschiedliche Enden erzeugt wurden, ist der Einbau des DNA-Fragmentes in den Vektor gerichtet. Man spricht von gerichteter Ligation mit kohäsiven Enden.

Für die Durchführung wurden 2 μ l des geschnittenen PCR-Produktes, 2 μ l des präparierten Vektors (pBS M13, 0,5 μ g/ μ l), 2 μ l 5x Ligationspuffer, 0,5 μ l ATP (10mM), 0,5 μ l T4 DNA-Ligase (8U/ μ l) und 3 μ l Aqua bidest. in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß pipettiert und über Nacht bei 14 °C im Wasserbad inkubiert. Vor der weiteren Verarbeitung wurde der Ansatz bei -20 °C für einige Stunden eingefroren.

2.2.13 Herstellung transformationskompetenter E. coli-Zellen

Zur Aufnahme von rekombinanten Plasmiden musste die Zellwand der Bakterien durchlässig, d.h. die Bakterien transformationskompetent gemacht werden. Dieses wurde durch die Behandlung der Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) erreicht. Die Methode wurde auf den *E-coli*-Stamm DH5α angewendet.

Ein 15-ml-Falcon-Röhrchen wurde mit 5 ml SOB-Medium und 2 μ l aus einem Stock DH5 α -Zellen über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 100 ml SOB-Medium in einem 1 l-Erlemeyerkolben wurden dann mit 100 μ l aus der Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 (entspricht einer Zellkonzentration von 5 bis 8 x 10⁷/ml) unter Schütteln inkubiert (ca. 2 bis 3 h). Alle weiteren Arbeiten wurden auf Eis und mit vorgekühlten (4 °C) Materialien und Lösungen durchgeführt: Die Zellen wurden 15' auf Eis gekühlt, dann in zwei 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt und bei 4 °C für 10' mit 1600 x g zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Sediment in 17 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert, die Suspension für 15' auf Eis gestellt, wieder wie oben zentrifugiert und danach dekantiert. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte in 4 ml FSB-Puffer mit anschließender Inkubation auf Eis für 15'. Danach wurden 140 μ l DMSO dazugegeben, gleich darauf gut geschüttelt und der Ansatz für 5 bis 10 min. auf Eis gestellt. Es erfolgte die

erneute Zugabe von 140 μ l DMSO und die Durchmischung der Suspension, die dann in Portionen von je 200 μ l auf gefrierbeständige 5-ml-Falcon-Röhrchen verteilt wurde. Anschließend wurde die Suspension mit den transformationskompetenten Zellen auf Trockeneis schockgefroren. Diese waren anschließend über mehrere Monate bei -70 °C lagerungsfähig.

2.2.14 Transformation kompetenter E. coli-Zellen

Nach Insertion eines DNA-Fragmentes in ein Plasmid kann dieses unter geeigneten Bedingungen von E.coli-Zellen aufgenommen werden und sich in der Wirtszelle zusammen mit der Fremd-DNA vermehren. Zur Unterscheidung von transformierten zu nichttransformierten Zellen ist auf den Plasmiden ein Gen für Ampicillinresistenz lokalisiert. Daher sind nur Zellen, die ein Plasmid aufgenommen haben, in der Lage auf einem Nährboden mit Ampicillinzusatz zu wachsen. Um unter den heranwachsenden Kolonien die Klone mit rekombinantem Plasmid eindeutig identifizieren zu können, wird sich einer Farbreaktion bedient: Da die Insertionsstelle für die Fremd-DNA zwischen dem Struktur-Gen für β-Galaktosidase (lac Z-Gen) und seinem Promotor liegt, unterbricht der Einbau eines DNA-Fragmentes das Operon. Das Enzym kann nicht mehr exprimiert werden. Ist das lac-Operon intakt, wird nach Zugabe eines Induktors (IPTG, Isopropylthio-β-Galaktosid), der einen lac-Repressor hemmt, β-Galaktosidase gebildet. In der Folge wird das farblose Substrat 5-Brom-4-Chor-3-Indolyl-β-Galaktosid (X-gal) in ein blaues Produkt verwandelt. Blaue Kolonien zeigen die Expression des Enzyms an. Weiße Kolonien, bei denen die Expression des Enzyms fehlt, sprechen somit für die Aufnahme eines rekombinanten Plasmids.

Für je zwei Transformationsansätze wurde eine Portion (200 μl) DH5α-Zellen auf Eis aufgetaut und 100 μl davon in ein frisches, vorgekühltes 5-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Zu je 100 μl Zellsuspension wurden 5 μl aus einer Ligation pipettiert und die Röhrchen 30´ auf Eis gestellt. Danach erfolgte die Inkubation der Transformationsansätze für exakt 90´´ bei genau 42 °C im Wasserbad und die Abkühlung auf Eis für 2´. Es wurden dann je 900 μl LB-Medium zugefügt, die Röhrchen für 30´ bei 37 °C geschüttelt und anschließend 5´ mit 500 x g zentrifugiert. Von jedem Überstand wurden 700 μl verworfen und die restlichen 300 μl mit je 40 μl X-gal (2%ig) und IPTG (100 mM) versetzt. Je 250 μl dieser Zellsuspensionen wurden auf vorgewärmten (37 °C) Nährböden mit Ampicillinzusatz (100 mg/ml) ausplattiert. Nachdem die Suspensionen auf den Nährböden bei 37 °C angetrocknet waren, wurden die Platten mit Deckel umgedreht und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Um die Blaufärbung der Kolonien zu intensivieren, wurden die Platten anschließend einige Stunden bei 4 °C gelagert.

2.2.15 DNA Präparation bei transformierten E. coli-Zellen

Von allen weißen Kolonien wurden "gekochte Klone" angefertigt, d. h. die Kolonien wurden mit sterilen Pipettenspitzen angepickt und die Pipettenspitzen wurden anschließend in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße mit je 500 μ l aqua dest. gegeben. Nach 5-minütigem Erhitzen auf 95 °C und Abzentrifugieren von Bakterienproteinen lag die DNA der Zellen in dem destillierten Wasser gelöst vor. Von den Überständen wurden 5 μ l als DNA-Matrize in 50 μ l-PCR-Ansätzen mit vektorspezifischen , die Insertstelle flankierenden M₂₄-Primern eingesetzt.

M₂₄forward (5´-3´) ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT M₂₄reverse (5´-3´) CATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGT

Um die Fragmentgrößen der PCR-Produkte zu bestimmen, wurden je 3 µl der PCR-Ansätze auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Der das Insert flankierende Vektoranteil betrug 228 Basenpaare inklusive der 48 Basenpaare für die Primer. Waren die PCR-Produkte um die Größe der eingebrachten Fremd-DNA größer, so wurden sie sequenziert.

2.2.16 Untersuchung von Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismen (RFLPs)

PCR-Produktes Neben der Klonierung eines und dessen anschließender Sequenzierung, gibt es eine weitere Methode zur Überprüfung von gefundenen Nukleotidaustauschen, nämlich die Untersuchung von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen. Dieser Methode liegt zu Grunde, dass Restriktionsenzyme in der Lage sind, doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen zu binden und zu spalten. Die entstehenden Restriktionsfragmente haben eine definierte Länge und können mit der Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Bei dieser Untersuchung wurden die Restriktionsendonukleasen so ausgesucht, dass die gefundenen Nukleotidaustausche genau in der spezifischen Schnittstelle lagen. So kommt es bei Vorliegen eines Austausches entweder zum Verlust oder zur Einfügung einer Schnittstelle für Restriktionsendonukleasen. Es entstehen unterschiedlich lange, spezifische Fragmente, je nachdem ob die Variante oder der Wildtyp vorliegt. Nachdem der Restriktionsverdau durchgeführt wurde, kann das Vorliegen

oder der Verlust einer spezifischen Schnittstelle durch eine einfache Gelelektrophorese des verdauten PCR-Produktes nachgewiesen werden.

Das Ansatzvolumen für den Restriktionsverdau betrug 10µl, wobei zwischen 3µl und 6µl PCR-Produkt mit 1 oder 2 U des Enzyms verdaut wurden. Der gesamte Ansatz wurde mit Ladepuffer versetzt, auf ein Agarosegel aufgetragen und anschließend analysiert.

Die Untersuchung von RFLPs bei der afrikanischen und kaukasischen Kontrollpopulation wurde von Birgit Förster (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg) durchgeführt.

Die für diese Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme und ihre jeweiligen Schnittstellen sind in der Tabelle 2-3 gezeigt.

Tabelle 2-3:

Verwendete Restriktionsenzyme und deren Erkennungssequenzen

Enzym	Erkennungssequenz				
BstN I	5´ 3´	A CC*T GG GG A*CC T	3´ 5´		
NIa IV	5 ´	CATG*	3´		
	3 ´	*GTAC	5´		
Alu I	5 ´	AG*CT	3 ´		
	3 ´	TC*GA	5 ´		
Ssp I	5 ´	AAT*ATT	3 ´		
	3 ´	TTA*TAA	5 ´		
Dde I	5 ´	C*TNA G	3 ´		
	3 ´	G ANT*C	5 ´		
Nde I	5 ´	CA*TA TG	3 ´		
	3 ´	GT AT*AC	5 ´		
Ase I	5 ´	AT*TA AT	3 ´		
	3 ´	TA AT*TA	5 ´		
Hinf I	5´	G*ANT C	3 ´		
	3´	C TNA*G	5 ´		
Sty I	5´ 3´	AA C*CTTG G G GAAC*C TT	3´ 5´		
Mse I	5 ´	T*TA A	3 ´		
	3 ´	A AT*T	5 ´		
Tsp 45 I	5´ 3´	C *GTGAC CACTG* G	3´ 5´		
BstZ17 I	5 ´	GTA*TAC	3 ´		
	3 ´	CAT*ATG	5 ´		

N:

*: Schnittstelle des Restriktionsenzyms

Übereinander platzierte Buchstaben:

an dieser Position kann sich eine beliebige Nukleinsäure befinden. an diesen Positionen muss eine der angeführten Nukleinsäuren platziert sein, damit das Restriktionsenzym schneiden kann.

2.2.17 Automatisierte Produktlängenbestimmung (Genescan)

Zur Untersuchung von Polymorphismen, bei denen sich die Variante vom Wildtyp durch eine Insertion oder Deletion von Nukleotiden unterschied, wurde auch die Genescan-Methode verwand. Beim Genescan handelt es sich um eine hochauflösende Elektrophoresemethode. Die Sensitivität ist dabei hoch genug, um Oligonukleotide voneinander zu trennen, deren Länge sich lediglich um ein Nukleotid unterscheidet. Analog zum Vorgehen bei der automatisierten Sequenzierung wird das PCR-Produkt auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (7M Harnstoff, 6 % Polyacrylamid) aufgetragen. Die Auslesung erfolgt automatisiert durch einen Genescan-Automaten (ABI 377 oder ABI 373, Applied Biosystems, Weiterstadt). Um die automatisierte Auslesung zu ermöglichen, wird in der vorausgehenden PCR ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter Primer eingesetzt. Der von einem Laser angeregte Fluoreszenzfarbstoff sendet Licht aus, das beim Passieren des Detektors registriert wird. Zur Analyse der vom Genescan-Automaten produzierten Daten wurde die Genescan 672 Software (PE-Biosystems, Weiterstadt) verwendet.

2.2.18 Schmelzkurvenanalyse (FRET)

Bei <u>Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Technik</u> (FRET) der wird unter Verwendung einer allelspezifischen Sonde (im Weiteren als Sensor bezeichnet) und eines in unmittelbarer Nachbarschaft gelegenen Ankers eine PCR durchgeführt. Bei Sensor und Anker handelt es sich um Oligonukleotide. Der Anker ist mit einem Fluoreszin-Farbstoff und die Sonde ist mit dem ebenfalls fluoreszierenden Farbstoff LC440 markiert. Während der PCR hybridisieren Sonde und Anker an der einzelsträngig vorliegenden DNA. Dabei geraten der fluoreszierende Farbstoff des Ankers und der Farbstoff LC440 in direkte Nachbarschaft. Der fluoreszierende Farbstoff regt den Farbstoff LC440 zur Aussendung von Licht an. Das emittierte Licht wird vom LightCyclerTM ständig gemessen. Nach Abschluss der PCR wird die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Bindungen zwischen dem PCR-Produkt, dem Sensor und dem Anker besitzen einen jeweils spezifischen Schmelzpunkt. Dieser ist Abhängig von der Länge der Oligonukleotide, deren Anteil an Cytosin und Guanin und von möglicherweise vorliegenden Basenfehlpaarungen. Beim Erhitzen der Probe und Erreichen des Schmelzpunktes kommt es zur Trennung von Sensor und PCR-Produkt. Der Sensor löst sich früher vom PCR-Produkt als der Anker, da es sich bei dem Sensor um ein deutlich kürzeres Oligonukleotid handelt, das dementsprechend einen niedrigeren Schmelzpunkt besitzt. In dem Moment der Trennung von PCR-Produkt und Sensor kommt es durch die räumliche Trennung von Sensor und Anker zu einer deutlichen Verringerung der abgestrahlten Lichtmenge. Die Intensität der abgestrahlten Lichtmenge wird als Kurvenverlauf dargestellt. Wird die Steigung der Kurven über die zweite Ableitung berechnet (dSignal/dZeit), so ist bei der Abschmelztemperatur des Sensors ein Gipfelpunkt zu erkennen. Der Schmelzpunkt des Sensors liegt am höchsten bei vorliegen des Wildtyps, dem der Sensor in der Basenfolge entspricht. Liegt ein Nukleotidaustausch vor, so sinkt der Schmelzpunkt um einen für den Austausch spezifischen Wert. Mittels dieser Schmelzpunktanalyse lässt sich so eine gesuchte Variante nachweisen.

Standard-Ansatz zur Schmelzpunktanalyse

- 3,85 μl H2O
- $1 \mu l$ MgCl₂ (25 mM)
- $1 \mu l$ 10 x PCR-Puffer
- 1 µl Forward-Primer (10 pmol/µl)
- $0,5 \,\mu l$ Reverse-Primer (10 pmol/ μl)
- $je 0,5 \mu l$ Anker und Sensor (3 pmol/ μl)
- $0,25 \,\mu l$ BSA (20 mg/ml)
- $0,2 \mu l$ dNTPs (je 10 mmol)
- $0,2 \mu l$ Taq-Polymerase (5 U/ μl)
- ca. 2 µl DNA (PCR-Produkt)

Die Untersuchungen bei den Kontrollpopulationen mittels Schmelzpunktanalyse wurden von Jürgen Sievertsen (BNI, Hamburg) durchgeführt.

2.2.19 Ermittlung putativer Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren

Putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurden unter Verwendung der Tfsitescan Option der "object-oriented Transcription Factors Database" (ooTFD) ermittelt. Dieses Programm ist über die IFTI-MIRAGE Internetseite: www.ifti.org (Gosh, 2000) erhältlich.

2.2.20 Errechnung der Nukleotidvariabilität

Die Nukleotidvariabilität wurde nach Angaben von Halushka et al., 1999 berechnet.

2.2.21 Bereitstellung der Sequenzinformation in Datenbanken

Alle DNA-Sequenzen sind in der GeneBank Datenbank unter den Zugriffsnummern AF300630 bis AF300642 abgelegt. Die Nomenklatur der neu beschriebenen Polymorphismen richtet sich nach den Richtlinien der Nomenclature Working Group (Antonarakis SE and the Nomenclature Working Group, 1998).

3 Ergebnisse

3.1 Anzahl untersuchter Nukleotide im CD36 Gen

Bei Individuen eines für Malaria endemischen Gebietes in West Afrika wurden alle Exons des CD36-Gens sowie der 5'untranslatierte Bereich sequenziert. 253 Nukleotide (nt) der Promotor-Region, 2601 nt aller 15 Exons und 1203 nt von angrenzenden Intronsequenzen wurden dabei bei jedem Individuum untersucht. Die durch Amplifikation und anschließende Sequenzierung beider Allele des jeweiligen Individuums entstandenen Mischsequenzen erlauben eine Aussage über die Sequenz auf beiden Chromosomen. Bei uneindeutigen Sequenzierergebnissen ließen sich mittels Klonierung und anschließender erneuter Sequenzierung auch heterozygote Varianten nachweisen. Es liegt nicht für jedes untersuchte Individuum die vollständige Sequenzinformation des CD36-Gens vor. Insgesamt wurden ca. 174000 Nukleotide des CD36-Gens untersucht.

Die in der Untersuchung gewonnenen Sequenzen wurden mit den bereits publizierten CD36 Sequenzen verglichen. Als Referenz dienten dabei die von Armesilla und Vega publizierten CD36 Sequenzen (Armesilla und Vega, 1994).

Tabelle 3-1:Anzahl untersuchter Nukleotide im CD36-Gen

	Größe des Exons, bzw. Promotors ^a	Anzahl sequenzierter, 5´- flankierender Nukleotide	Anzahl sequenzierter, 3'- flankierender Nukleotide	Anzahl untersuchter Individuen
Promotor	253 bp	-	25 bp ^b	22
Exon 1	106 bp	-	-	20
Exon 2	94 bp	-	178 bp	23
Exon 3	209 bp	4 bp	3 bp	23
Exon 4	161 bp	4 bp	4 bp	16
Exon 5	148 bp	5 bp	2 bp	30
Exon 6	180 bp	13 bp	7 bp	35
Exon 7	92 bp	-	21 bp	27
Exon 8	47 bp	176 bp	-	20
Exon 9	70 bp	-	44 bp	28
Exon 10	188 bp	23 bp	20 bp	19
Exon 11	119 bp	126 bp	139 bp	17
Exon 12	74 bp	162 bp	33 bp	15
Exon 13	55 bp	153 bp	54 bp	16
Exon 14	434 bp	18 bp	5 bp	20
Exon 15	624 bp	9 bp	-	37

^a: Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren 253 bp der Promotorregion publiziert.

^b: Die 3'-flankierenden Nukleotide lagen im Exon 1.

3.2 Varianten in der Promotorregion

Bei jedem untersuchten Individuum wurden 253 Nukleotide der Promotorregion untersucht, die in 5'-Richtung vor dem Transkriptionsstartpunkt liegt (Tabelle 3-2). Repetitive Sequenzabschnitte im Promotor, insbesondere Poly-dA, Poly-dG oder Poly-dT Wiederholungen, erschwerten die zweifelsfreie Beurteilung der Sequenzierergebnisse bei 73 der 253 bp. Diese sind in Tabelle 3-2 grau hinterlegt.

Es wurden bei insgesamt 22 untersuchten Individuen fünf Varianten in der Promotorregion identifiziert (Tabelle 3-3). Von diesen liegen vier im Bereich putativer Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren PuF (purine factor), AP-2 (phorbol ester-responsive element), C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) und IFN γ (interferon- γ response element) (Armesilla und Vega, 1994).

Die Variante -220A>G wurde einmalig nachgewiesen. Bei dem Individuum liegt die Variante heterozygot vor. Da die Variante -220A>G nicht in einem Abschnitt putativer Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren liegt wurde auf eine Untersuchung der Kontrollpopulationen hinsichtlich dieser Variante verzichtet.

Der Nukleotidaustausch -144G>T lag im Vergleich zur verwendeten Referenzsequenz von Armesilla und Vega bei allen 22 sequenzierten Individuen homozygot vor. Ebenso zeigte die Untersuchung dieser Variante mittels PCR-RFLP (Restriktionsenzym: *Bst*N I) bei je 100 Chromosomen der afrikanischen und der kaukasischen Kontrollpopulationen ausnahmslos das Vorliegen dieses Genotyps. -144G>T fügt in die Promotorregion des CD36-Gens ein Erkennungsmotiv für PuF ein; gleichzeitig geht durch diese Substitution das Erkennungsmotiv für AP-2 verloren.

Die Variante -53G>T lag bei einem der 22 sequenzierten Individuen homozygot und bei vier Individuen heterozygot vor. Mittels Light-Cycler-Technik wurde diese Substitution bei 29 von 100 untersuchten Chromosomen der afrikanischen Kontrollpopulation nachgewiesen. In der kaukasischen Population fand sich dieselbe Substitution sogar bei 42 der 100 untersuchten Chromosomen. -53G>T bewirkt in der Promotorregion einen Verlust des Bindungsmotivs für AP-2.

-50G>T lag bei einer der 22 sequenzierten Proben heterozygot vor. Diese Variante wurde mittels Light-Cycler-Technik bei acht von 100 untersuchten Chromosomen der afrikanischen Kontrollpopulation nachgewiesen, fand sich jedoch in keinem der 100 untersuchten kaukasischen Kontrollchromosomen. Die Variante -50G>T fügt ein zusätzliches Bindungsmotiv für den Transkriptionsfaktor PuF in die Promotorregion ein.

Die Variante -2A>C liegt innerhalb einer putativen Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren C/EBP und INFγ und führt zu einem Verlust des Bindungsmotivs von C/EBP. Diese Variante lag bei 5 der 22 sequenzierten Individuen heterozygot vor. Aufgrund des Fehlens einer Schnittstelle für ein Restriktionsenzym konnten die Kontrollpopulationen nicht mittels PCR-RFLP untersucht werden. Auf eine Untersuchung dieser Populationen durch Light-Cycler-Technik wurde verzichtet.

Fabelle 3-2:
Sequenz der Promotorregion des CD36-Gens und der darin nachgewiesenen Varianten

Position					Varianten
-253	ATG	GGAAATAGCC	ААААААААА	AAAATGCTGA	
-220	A TATCTCAGA	TATAGGTAAT	GGGTCTTCAC	CAGAACATAA	
	G				-220A>G
-180	AAATAGACCC	TTATTAGCCA	TATCAGTAAT	GTGCTG <u>G</u> GTG	
				т	-144G>T
-140	GGGGATTTTT	TTTTTTCTTTC	AATTCCTCTG	GCAACAAACC	
-100	ACACACTGGG	ATCTGACACT	GTAGAGTGCT	TTCTCTTCTC	
- 60	TTTTTTT <u>G</u>GG	<u>G</u> GGGGGAGGG	GGTGTGGTTG	CATATTTAAA	
	Т	I			- 53G>T
		Т			- 50G>T
- 20 bis - 1	CTCTCACGCA	TTTATGTA <u>A</u> T			
		С			-2A>C

grau hinterlegt : Die zweifelsfreie Sequenzbestimmung der Nukleotide war durch repetitive Sequenzabschnitte erschwert.

Tabelle 3-3:Varianten in der Promotorregion des CD36-Gens

	Nucleotid-	Effekt der Nucleotid-	Anzah Indivi	l der duen	Kontroll	gruppen
Promotor ^d	n	substitution	hom ^a het ^b		% A	% C
	-220A>G	un	-	1	nb	nb
(PuF, AP-2)	-144G>T	^E PuF, ^V AP-2	22	-	100	100
(AP-2)	-53G>T	^V AP-2	1	4	29	42
(AP-2)	-50G>T	^E PuF	-	1	8	0
(C/EBP, INFy)	-2A>C	^V C/EBP	-	5	nb	nb

^a: Die untersuchte Variante lag homozygot vor.

^b: Die untersuchte Variante lag heterozygot vor.

% A: Prozentualer Anteil betroffener Chromosomen in der afrikanischen Kontrollpopulation.

% C: Prozentualer Anteil betroffener Chromosomen in der kaukasischen Kontrollpopulation.

^d: Liegt eine Variante in einem transkriptionsfaktorenbindenden Motiv, so wird dieses in Klammern angegeben.

un: Effekt der Nukleotidsubstitution unklar.

nb: Nicht bestimmt.

^E: Ein transkriptionsfaktorbindendes Motiv wird eingefügt.

^v: Verlust eines transkriptionsfaktorbindenden Motivs.

3.3 Varianten in den Exons des CD36-Gens

3.3.1 Übersicht über identifizierte Varianten im CD36-Gen

Insgesamt wurden im Vergleich zu der von Armesilla und Vega publizierten CD36-Sequenz zwölf Polymorphismen in transkribierten Bereichen des CD36-Gens nachgewiesen. Fünf dieser Polymorphismen verändern dabei direkt die Polypeptidstruktur des CD36-Proteins: Drei Austausche einzelner Nukleotide verursachen einen nicht konservativen Aminosäureaustausch in Exon 5 (E123K), Exon 6 (T174A) und Exon 9 (I271T). Eine Insertion von drei Basenpaaren (bp) in Exon 7 fügt die Aminosäure Asparagin ein (N232-233ins). Ein Austausch in Exon 10 (Y325X) führt ein Stopp-Codon ein.

Von den sieben Varianten, die in dem untranslatierten exonischen Bereich des Gens gefunden wurden, befand sich ein Austausch in Exon 2, zwei Austausche einzelner Nukleotide, eine Deletion von vier Basenpaaren im untranslatierten Anteil des Exons 14 und drei weitere Austausche im Exon 15. Die Variante in Exon 2 wurde bereits zuvor beschrieben (Kashiwagi et al., 1993). Die 4-bp-Deletion, die in Exon 14 nachgewiesen wurde, ist auch in einer publizierten CD36 cDNA Sequenz beschrieben (Oquendo et al., 1989). Einen Überblick über alle Varianten in den Exons des CD36 Gens, die in dieser Untersuchung nachgewiesen wurden, gibt Tabelle 3-4.

	Nukleotid-	Effekt der Nukleotid-		Anzah Individ	l der duen	Kontroll	gruppen
Exon	substitution	substitution	Gesamt ^a	hom ^b	het ^c	% A	% C
Exon 2	158C>A	nt	23	14	8	69	52
Exon 5	656G>A	E123K	30	-	1	0	0
Exon 6	809A>G	T174A	35	-	1	0	0
Exon 7	985^986insAAT	N232-233ins	27	-	1	5	0
Exon 9	1101T>C	I271T	28	-	1	0	0
Exon 10	1264T>G	Y325X	19	-	1	6	0
Exon 14	1712- 1715delAGTA	nt	20	-	3	1	0
	1910G>T	nt	20	-	3	nb	nb
	1934A>G	nt	20	-	1	1	0
Exon 15	2065C>T	nt	37	-	3	7	0
	2512A>C	nt	32	-	1	0	0
	2549G>A	nt	28	4	7	25	51

Tabelle 3-4: Varianten in den Exons des CD36-Gens

^a: Anzahl der Individuen, bei denen das Exon sequenziert wurde.

^b: Die untersuchte Variante lag homozygot vor.

^c: Die untersuchte Variante lag heterozygot vor.

% A: Prozentualer Anteil der betroffenen Chromosomen in der afrikanischen Kontrollpopulation.

% C: Prozentualer Anteil der betroffenen Chromosomen in der kaukasischen Kontrollpopulation.

nt: Die Variante befindet sich in einem nicht translatierten Exon.

nb: Nicht bestimmt.

x: Stopp-Codon.

3.3.2 Varianten in Exon 2 des CD36-Gens

Die in Exon 2 gelegene Variante 158C>A wurde bei insgesamt 14 von 23 Individuen in homozygoter und bei acht Individuen in heterozygoter Form mittels Sequenzierung nachgewiesen. Keine weitere Variante lag in einer so großen Häufigkeit vor. Innerhalb der westafrikanischen Kontrollpopulation wurde 158C>A bei 69 % der untersuchten Chromosomen nachgewiesen. Dabei lag die Variante in 24 Fällen homozygot und in 21 Fällen heterozygot vor. Der Wildtyp fand sich bei fünf Individuen. Bei der kaukasischen Kontrollpopulation lag diese Variante auf 52 % der untersuchten Chromosomen vor, davon bei 16 Individuen homozygot und bei 20 Individuen heterozygot. Der Wildtyp lag bei 14 Individuen vor. Eine Übersicht dazu bietet Tabelle 3-5. Die Kontrollpopulationen wurden mittels PCR- RFLP-Technik untersucht.

Tabelle 3-5:

Exon 2 des CD36-Gens, Sequenz und identifizierte Variante

Position		Variante
107	ATAGCTTTCC AATGATTAGA CGAATTGATT CTTTCTGTGA	
147	CTCATCAGTT C \underline{C} TTTCCTGT AAAATTCATG TCTTGCTGTT	
	Α	158C>A
187 bis 200	GATTIGIGAA TAAG	

3.3.3 Varianten in Exon 5 des CD36-Gens

Das Exon 5 wurde bei insgesamt 30 Individuen vollständig sequenziert, wobei bei einem Individuum die Variante 656G>A (E123K) identifiziert wurde. Sie lag bei diesem Individuum heterozygot vor. Durch Klonierung und anschließende Sequenzierung des frischen PCR-Produktes ließ sich diese Variante bestätigen (Abbildung 3-1). Ebenfalls bestätigen ließ sich 656G>A durch einen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym TagI (RFLP). Liegt die Mutation 656G>A vor, resultiert ein ca. 200 bp langes Fragment, da die Schnittstelle des Restriktionsenzyms verloren geht. Liegt der Polymorphismus heterozygot vor, so sind zwei Banden auf dem Agarosegel zu sehen, da die beiden kurzen Fragmente (ca. 100 bp) etwa gleich lang sind und deshalb als eine Bande auf dem Elektrophoresegel erscheinen. Exemplarisch für die in dieser Untersuchung häufig verwendete PCR-RFLP-Technik wird ein Untersuchungsergebnis für Exon 5 in Abbildung 3-2 dargestellt. Mit Hilfe der PCR-RFLP-Untersuchung wurden 17 weitere Individuen der westafrikanischen Studienpopulation sowie die afrikanische und kaukasische Kontrollpopulation untersucht. Somit wurden insgesamt 258 Chromosomen hinsichtlich dieser Variante charakterisiert. Der Austausch 656G>A wurde dabei kein weiteres Mal nachgewiesen. Bei der Translation bewirkt 656G>A einen Einbau von Glutaminsäure an Stelle von Lysin.

Abbildung 3-1:

Die dargestellte Sequenz zeigt die Variante 656G>A in Exon 5 des CD36-Gens.



Abbildung 3-2:

Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus der Variante 656A>G in Exon 5 des CD36-Gens im Vergleich zum Wildtyp. Die Abbildung zeigt die Agarosegelelektrophorese, aufgenommen unter ultraviolettem Licht, bei Färbung mit Ethidiumbromid.



Tabelle 3-6:

Exon 5 des CD36-Gens, Sequenz und identifizierte Variante

Position					Variante
571	AGTTCGTTTT	CTAGCCAAGG	AAAATGTAAC	CCAGGACGCT	
591	GAGGACAACA	CAGTCTCTTT	CCTGCAGCCC	AATGGTGCCA	
651	тсттс <u>б</u> аасс	TTCACTATCA	GTTGGAACAG	AGGCTGACAA	
	A				656G>A
691 bis 718	CTTCACAGTT	CTCAATCTGG	CTGTGGCA		

3.3.4 Varianten in Exon 6 des CD36-Gens

Die Variante 809G>A (T174A) lag bei einem Individuum der Studienpopulation heterozygot vor. Insgesamt wurde bei 35 Individuen aus dieser Population das Exon 6 vollständig sequenziert. Analog zum Vorgehen beim Nachweis der Variante 656G>A in Exon 5 wurde auch hier die Variante mittels Klonierung und anschließender Sequenzierung eines PCR-Produktes bestätigt. Die afrikanischen und kaukasischen Kontrollpopulationen wurden mit Hilfe der PCR-RFLP-Technik (Enzym: *Alu*I) auf das Vorliegen dieser Variante untersucht, die aber auch hier kein weiteres Mal nachgewiesen wurde. Auf diese Weise wurde eine Gesamtzahl von 294 Chromosomen auf diese Variante getestet, wobei der Nachweis nur ein Mal gelang. Im Vergleich zur Referenzsequenz (Armesilla und Vega, 1994) führt der Austausch der Nukleotide G>A an Position 809 des CD36-Gens auf Proteinebene zum Austausch von Threonin gegen Alanin (T174A). Weitere Polymorphismen wurden in Exon 6 nicht identifiziert.

Abbildung 3-3:

Sequenzierergebnis der Variante 809A>G (heterozygot) in Exon 6 des CD36-Gens



Tabelle 3-7:

Position					Variante
719	GCTGCATCCC	ATATCTATCA	AAATCAATTT	GTTCAAATGA	
759	TCCTCAATTC	ACTTATTAAC	AAGTCAAAAT	CTTCTATGTT	
799	CCAAGTCAGA	<u>A</u>CTTTGAGAG	AACTGTTATG	GGGCTATAGG	
		G			809A>G
839	GATCCATTTT	TGAGTTTGGT	TCCGTACCCT	GTTACTACCA	
879 bis 898	CAGTTGGTCT	GTTTTATCCT			

Sequenz des Exon 6 des CD36-Gens und die identifizierte Variante

3.3.5 Varianten in Exon 7 des CD36-Gens

Das Exon 7 wurde bei 27 Individuen der Studienpopulation vollständig sequenziert. Die Insertion von drei Nukleotiden: 985^986insAAT (N232-233ins) wurde bei einem Individuum identifiziert und lag dort heterozygot vor (Tabelle 3-8). Bestätigt wurde die Variante durch Klonierung eines PCR-Produktes und anschließende Sequenzierung (Abbildung 3-4). Mittels Genescan-Technik wurden die afrikanische und kaukasische Kontrollpopulation auf diese Variante untersucht. Bei den 100 kaukasischen Kontrollchromosomen gelang kein weiterer Nachweis dieser Variante. Dagegen fand sich in der afrikanischen Kontrollpopulation diese Variante bei insgesamt fünf von 100 untersuchten Chromosomen. 985^986insAAT lag bei einem Individuum homozygot und bei drei weiteren heterozygot vor. Die Insertion der drei Nukleotide AAT zwischen die Positionen 985 und 986 der Nukleinsäuresequenz führt auf Proteinebene zu einer Insertion von Asparagin zwischen die Aminosäuren 232 (Glycin) und 233 (Lysin).

Abbildung 3-4:

Sequenzierergebnis der Insertion 985^986insAAT

Die bei dieser Variante in die Sequenz eingefügten Nukleotide sind durch die Klammer gekennzeichnet.



Tabelle 3-8:

Die Sequenz des Exon 7 des CD36-Gens und die identifizierte Variante

Position		Variante
899	TACAACAATA CTGCAGATGG AGTTTATAAA GTTTTCAATG	
939	GAAAAGATAA CATAAGTAAA GTTGCCATAA TCGACACATA	
979 bis 990	TAAAGGTAAA AG	
	AAT	985^986insAAT

3.3.6 Varianten in Exon 9 des CD36-Gens

Das Exon 9 wurde bei 28 Individuen der Studienpopulation vollständig sequenziert (Tabelle 3-9). Die Variante 1101T>C fand sich heterozygot bei einem Patienten. Die Bestätigung der Variante erfolgte durch Klonierung eines PCR-Produktes und anschließende Sequenzierung (Abbildung 3-5). Die Kontrollpopulationen wurden durch PCR-RFLP Technik auf das Vorliegen dieser Variante untersucht. Dabei wurde das Enzym *SspI* als Restriktionsenzym verwendet. Weder bei der afrikanischen noch bei der kaukasischen Kontrollpopulation wurde 1101T>C ein weiteres Mal nachgewiesen. Insgesamt wurde also bei 256 untersuchten Chromosomen diese Variante nur ein Mal gefunden. Der Nukleotidaustausch 1101T>C verursacht auf Proteinebene den Austausch von Isoleucin gegen Threonin an Position 271.

Abbildung 3-5:

Sequenzierergebnis der Variante in Exon 9 des CD36-Gens

Die Variante 1101T>C lag bei der hier sequenzierten Probe heterozygot vor. Daher kommen in der Auswertung zwei etwa gleich hohe Fluoreszenz-Intensitätsgipfel zur Darstellung. Die entsprechende Position ist mit N gekennzeichnet.



Tabelle 3-9:

Sequenz und identifizierte Variante des Exon 9 des CD36-Gens

Position		Variante
1038	ATGCAGCCTC ATTTCCACCT TTTGTTGAGA AAAGCCAGGT	
1078 bis1107	ATTGCAGTTC TTTTCTTCTG ATA ${f T}$ TTGCAG	
	С	1101T>C

3.3.7 Varianten in Exon 10 des CD36-Gens

Das Exon 10 wurde bei 19 Individuen der Studienpopulation vollständig sequenziert (Tabelle 3-10). Dabei fand sich bei einer Person die Variante 1265T>G. Diese Variante lag hier heterozygot vor. Durch Klonierung und anschließende Sequenzierung des frischen PCR-Produktes ließ sich diese Variante bestätigen. Unter Anwendung der PCR-RFLP-Technik wurden die Kontrollpopulationen auf das Vorliegen dieser Variante untersucht (Restriktionsenzym: *NdeI*). Bei den 100 untersuchten kaukasischen Chromosomen wurde 1265T>G kein weiteres Mal nachgewiesen. Dagegen fand sich die gesuchte Variante auf sechs der 100 Chromosomen der afrikanischen Kontrollpopulation. Bei zwei der entsprechenden Individuen lag 1265T>G homozygot vor, bei zwei weiteren heterozygot. Die

Mutation führt zum Verlust von Tyrosin, kodiert durch das Triplett TAT. Das variierte Triplett (TAG) stellt ein Stopp-Codon dar.

Tabelle 3-10:

Die Sequenz des Exon 10 des CD36-Gens und die identifizierte Variante

Position					Variante
1108	GTCAATCTA	TGCTGTATTT	GAATCCGACG	TTAATCTGAA	
1147	AGGAATCCCT	GTGTATAGAT	TTGTTCTTCC	ATCCAAGGCC	
1187	TTTGCCTCTC	CAGTTGAAAA	CCCAGACAAC	TATTGTTTCT	
1227	GCACAGAAAA	AATTATCTCA	AAAAATTGTA	CATCATA <u>T</u> GG	
				G	1264T>G
1267 bis 1295	TGTGCTAGAC	ATCAGCAAAT	GCAAAGAAG		

3.3.8 Varianten in Exon 14 des CD36-Gens

Das Exon 14 wurde bei 20 Personen der Studienpopulation vollständig sequenziert (Tabelle 3-11). Insgesamt fanden sich dabei drei verschiedene Varianten. Es handelt sich um die Deletion von vier Nukleotiden 1712-1715delAGTA und um zwei Austausche einzelner Nukleinsäuren, 1919G>T und 1934A>G. Die Varianten 1712-1715delAGTA und 1919G>T fanden sich jeweils bei drei Individuen. Dort lagen sie heterozygot vor. Die zur Bestätigung der Varianten durchgeführte Klonierung zeigte, dass beide Varianten jeweils in dem gleichen Allel lokalisiert sind. Die Deletion der vier Basenpaare wurde zudem bei einem von 100 untersuchten Chromosomen der afrikanischen Kontrollpopulation nachgewiesen. Dazu wurde die PCR-RFLP-Technik eingesetzt (Restriktionsenzym: DdeI). In der kaukasischen Kontrollpopulation wurde diese Deletion nicht nachgewiesen. Die Suche nach der Variante 1910G>T mittels PCR-RFLP innerhalb der beiden Kontrollpopulationen wurde in dieser Studie nicht durchgeführt. Die Variante 1934A>G fand sich bei den 20 vollständig sequenzierten Exons der Studienpopulation ebenfalls ein Mal und lag dort heterozygot vor. Diese Variante ließ sich ein weiteres Mal in den 100 Chromosomen der afrikanischen Kontrollpopulation nachweisen. Bei der kaukasischen Population fand sich diese Variante dagegen nicht. Das Exon 14 gehört zu den untranslatierten Exons des CD36-Gens. Aus diesem Grund führen die hier genannten Varianten zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz.

Abbildung 3-6:

Sequenzierergebnis der heterozygot vorliegenden Variante 1934A>G in Exon 14 des CD36-Gens



Tabelle 3-11:

Die Sequenz und die identifizierten Varianten in Exon 14 des CD36-Gens

Position					Varianten
1544	ACTGGGACCA	TTGGTGATGA	GAAGGCAAAC	ATGTTCAGAA	
1584	GTCAAGTAAC	TGGAAAAATA	AACCTCCTTG	GCCTGATAGA	
1624	AATGATCTTA	CTCAGTGTTG	GTGTGGTGAT	GTTTGTTGCT	
1664	TTTATGATTT	CATATTGTGC	ATGCAGATCG	ААААСААТАА	
1704	aataagta <u>ag</u>	<u>TA</u> TGTACCAA	AAAATATTGC	TTCAATAATA	
				1712-1	715delAGTA
1744	TTAGCTTATA	TATTACTTGT	TTTCACTTTA	TCAAAGAGAA	
1784	GTTACATATT	AGGCCATATA	TATTTCTAGA	CATGTCTAGC	
1824	CACTGATCAT	TTTTAAATAT	AGGTAAATAA	ACCTATAAAT	
1864	ATTATCACGC	AGATCACTAA	AGTATATCTT	TAATTCTGGG	
1904	AGAAAT <u>G</u> AGA	TAAAAGATGT	ACTTGTGACC	<u>A</u> TTGTAACAA	
	Т			T	1910G>T
				G	1934A>G
1944 bis 1977	TAGCACAAAT	AAAGCACTTG	TGCCAAAGTT	GTCC	

3.3.9 Varianten in Exon 15 des CD36-Gens

Repetitive Sequenzabschnitte im Exon 15, insbesondere Poly-dT Wiederholungen führten zu einer Ungenauigkeit in den gewonnen Sequenzen. Daher liegt nicht die vollständige Sequenzinformation für das gesamte Exon bei allen untersuchten Proben vor. Nur 580 der insgesamt 624 sequenzierten Nukleotide des Exons 15 konnten sicher ausgewertet werden. In Exon 15 wurden die Varianten 2065G>T, 2512A>C und 2549G>A nachgewiesen (Tabelle 3-12).

Die Variante 2065G>T fand sich bei drei Individuen, bei denen sie heterozygot vorlag. Mittels PCR-RFLP (Restriktionsenzym: *MseI*) wurde die Variante bei sieben von 100 Chromosomen der afrikanischen Kontrollpopulation identifiziert. Diese Variante lag hier bei zwei Individuen homozygot und bei drei weiteren heterozygot vor. Dagegen fand sich 2065G>T nicht auf den 100 untersuchten Chromosomen der kaukasischen Kontrollgruppe.

Der Nukleotidaustausch an Position 2512 (A>C) wurde mittels Sequenzierung bei einem Individuum der Studienpopulation nachgewiesen und lag dort heterozygot vor. In den mittels PCR-RFLP untersuchten Kontrollpopulationen (Restriktionsenzym: *TaqI*) lag diese Variante nicht vor.

Häufiger wurde die Variante 2549G>A nachgewiesen. Sie lag bei vier der 28 sequenzierten Exons der Studienpopulation homozygot und bei weiteren sieben Individuen heterozygot vor. Bei der Untersuchung der afrikanischen Kontrollpopulation fand sich diese Variante auf 25 von 100 Chromosomen (31 x Wildtyp [wt], 6 x homozygote Variante [hom], 12 x heterozygote Variante [het]). In der kaukasischen Kontrollpopulation fand sich 2549G>A auf 51 von 100 untersuchten Chromosomen (9 wt, 10 hom, 31 het). Das Exon 15 gehört ebenso wie das Exon 14 zu den untranslatierten Exons des CD36-Gens. Aus diesem Grund führen die hier genannten Varianten zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz.

Tabelle 3-12:

Position					Variante
1978	ACCTGGCTCA	AGCACAAACC	AATTTGTGTT	GTTCTGATTC	
2018	AATAATTGGT	TTCTGGGTGG	CCAATTCAGA	AGAAGAGTGT	
2058	acatgct <u>c</u>aa	CAAATCCTAG	GCCCTGCATT	CCTGTCATCC	
	Т				2065C>T
2098	TCATCCGGGG	GAAACACCAT	CATCCCAGTA	GCTGCCCTAT	
2138	TCAACTGCAA	CAGTCTCCAG	GACCATCAGT	ATACTGCATT	
2178	TCATGTGCAC	CAAATATTTT	GAAAGACATT	TATAAATAAT	
2218	TGGCTTATGA	CTCATATTTC	TCTATGAATA	CCTTCATACA	
2258	GCAGGTATAA	CTCTTTTCTT	TATGGGCTTA	AATATTTTGT	
2298	CACTGATCCT	GCAAATGGAC	ATCATTTTAG	CACACTAGCG	
2338	GTTTATATTT	TAAGGACCTT	CATTCTCTGT	TCTGCACCTC	
2378	TTCTGGAAAT	TGAGTAAATT	TTGCTTTTTT	TTTTTTACTC	
2418	AGTTGCAACT	TACGCTTGGC	ATCTTCAGAA	TGCTTTTCTA	
2458	GCATTAAGAG	ATGTAAATGA	TAAAGGAATT	ATTGTATGAA	
2498	ATATTACAAA	gcgt a gacta	TGCATTGTTA	TTCATTATAA	
		С			2512A>C
2538	TATTTTTTGC	T G TCATAATC	GCCTCATAAA	GACAGGTTTC	
		A			2549G>A
2578 bis 2601	ААССАТТААА	ATATGTTCTT	CCTT		

Die Sequenz und die Varianten im Exon 15 des CD36-Gens

3.3.10 Exons des CD36-Gens ohne Nachweis von Varianten

In allen weiteren sequenzierten Exons wurden keine Varianten identifiziert (Tabelle 3-13). Die gesamte Anzahl der Nukleotide, die in Exons gelegen sind und in denen keine Varianten nachgewiesen wurden, betrug ca. 62000 bp. Die Sequenzierergebnisse stimmten hier ausnahmslos mit der von Armesilla und Vega publizierten Referenzsequenz überein.

Tabelle 3-13:

	Gesamt	Größe des Exons
Exon 1	20	156 bp
Exon 3	23	260 bp
Exon 4	16	210 bp
Exon 8	20	260 bp
Exon 11	17	425 bp
Exon 12	15	310 bp
Exon 13	16	300 bp

Die Exons des CD36-Gens, in denen keine Varianten nachgewiesen wurden

Gesamt: Gesamtzahl der Individuen, bei denen dieses Exon sequenziert wurde.

3.4 Varianten in Intronbereichen des CD36-Gens

Die intronischen Sequenzabschnitte wurden nicht systematisch untersucht. Je nach Lage der Primer wurden jedoch Teilbereiche der Introns sequenziert. Die von Armesilla und Vega (1994) publizierte Referenzsequenz zeigt jeweils 30 bp der Introns, die in 5' und 3'-Leserichtung die Exons flankieren. Zusätzlich zu diesen 30 bp waren zum Zeitpunkt dieser Untersuchung keine weiteren Intronsequenzen publiziert oder in öffentlichen Datenbanken zugänglich. In Abhängigkeit der Lage der PCR-Primer war die Anzahl der untersuchten Nukleotide einzelner Introns unterschiedlich groß. Bei den Introns 1 und 8 wurde aus diesem Grund keine zusätzliche Sequenzinfomation gewonnen. Die Introns 10 und 12 wurden vollständig sequenziert, um aus den gewonnenen Intronsequenzen Primer zur Amplifikation der jeweiligen Exons ableiten zu können. Weitere Introns wurden teilweise sequenziert. Diese erstmals bestimmten Intronsequenzen wurden nicht in öffentlichen Datenbanken publiziert, da die Sequenzen nicht verifiziert wurden. Die Richtigkeit der Sequenzen wurde nur in soweit bestätigt, als dass sich mit den davon abgeleiteten Primer tatsächlich die jeweiligen Exons amplifizieren ließen.

Bei der Analyse der intronischen 1203 Nukleotide, die von jedem Chromosom untersucht wurden, konnten fünf Varianten im Vergleich zur Referenzsequenz von Armesilla und Vega (1994) identifiziert werden. Zusätzlich wurden zwei Positionen gefunden, die im Vergleich zu den veröffentlichten Intronsequenzen (Armesilla und Vega, 1994) bei allen untersuchten Individuen verändert vorlagen. In den Kontrollpopulationen wurden die Varianten in Intron 7,

9, 10, 11 und 12 mittels PCR-RFLP oder der Genescan-Methode untersucht. Eine Übersicht über alle in den Introns nachgewiesenen Varianten zeigt Tabelle 3-14.

Tabelle 3-14:

	Nukleotidsubstitution	Anzah Indivi	ll der duen	Kontrollgruppen	
		hom ^a	het ^b	% baC	% bcC
Intron 7	990+7^8insAGTA	-	2	nb	nb
Intron 9	1107+29-30CT>TC	12	-	100	100
Intron 10	1296-119T>C	1	-	2	0
Intron 11	1414+13C>A	1	-	10	0
	1415-150A>C	4	4	nb	nb
Intron 12	1489-121A>T	-	2	0	0
	1489-5^6insAT	12	-	100	100

Varianten in den Intronbereichen des CD36-Gens

^a: Die untersuchte Variante lag homozygot vor.

^b: Die untersuchte Variante lag heterozygot vor.

% baC: Der prozentuale Anteil an betroffenen Chromosomen in der afrikanischen Kontrollpopulation

% bcC: Der prozentuale Anteil an betroffenen Chromosomen in der kaukasichen Kontrollpopulation

nb: Nicht bestimmt

In den Tabellen 3-15 bis 3-20 sind die Sequenzen der Introns dargestellt, in denen Varianten nachgewiesen wurden.

Tabelle 3-15:

Variante im Intron 7 des CD36-Gens

Position				Variante
899	ТАСААСААТА	CTGCAGATGG	AGTTTATAAA	GTTTTCAATG
939	GAAAAGATAA	CATAAGTAAA	GTTGCCATAA	TCGACACATA
979 bis 990	TAAAGGTAAA	AGgtaagta ^ t	tctggtaaaa	tgtgcatgta
		^a(gta	990+7^8insAGTA
990+30	tg			

Die Großbuchstaben bezeichnen Exonsequenzen, klein geschriebene Buchstaben kennzeichnen Intronsequenzen.

Tabelle 3-16:

Varianten im Intron 9 des CD36-Gens

Position					Varianten
990 bis 1029	ATGCAGCCTC	ATTTCCACCT	TTTGTTGAGA	AAAGCCAGGT	
1030 bis 1059	ATTGCAGTTC	TTTTCTTCTG	ATA T TTGCAG	gtaagacaga	
			С		1101T>C
	tactgaagta	taagtatg ct			
		tc		11	07+29-30CT>TC

Die Großbuchstaben bezeichnen Exonsequenzen, klein geschriebene Buchstaben bezeichnen Intronsequenzen.

Tabelle 3-17:

Variante im Intron 10 des CD36-Gens

Position					Variante
				ccaccc	
	a <u>t</u> gttaaaaa	ccatgtattt	tttaatgcaa	gaagctttag	
	С				1296-119T>C
	ttttgtggaa	atatttttg	agttatatgt	gaaatgaagg	
	aagttattaa	ttccaattga	ctcttaaaac	ttgtcttcag	
1296	GGAGACCTGT	GTACATTTCA	CTTCCTCATT	TTCTGTATGC	
1336	AAGTCCTGAT	GTTTCAGAAC	CTATTGATGG	ATTAAACCCA	
1376 bis 1414	AATGAAGAAG	AACATAGGAC	ATACTTGGAT	ATTGAACCT	

Die Großbuchstaben bezeichnen Exonsequenzen, klein geschriebene Buchstaben bezeichnen Intronsequenzen.

Tabelle 3-18:

Variante im Intron 11 des CD36-Gens

Position					Variante
1296 (Exon 10)	GGAGACCTGT	GTACATTTCA	CTTCCTCATT	TTCTGTATGC	
1336	AAGTCCTGAT	GTTTCAGAAC	CTATTGATGG	ATTAAACCCA	
1376 bis 1414	AATGAAGAAG	AACATAGGAC	ATACTTGGAT	ATTGAACCTg	
	taagaaaaca	c c ttattgat	ctgatttgg		
		a			1414+13C>A

Die Großbuchstaben bezeichnen Exonsequenzen, klein geschriebene Buchstaben bezeichnen Intronsequenzen.

Tabelle 3-19:

Variante im Intron 11 des CD36-Gens

Position					Variante
		attgt	gtgtatctat	atggatgcct	
	gtgtatataa	<u>a</u> tataactat	atatgcagtt	ttaaaagttt	
		С			1415-150A>C
	caattagtcc	tgtttaacct	taagttacta	ccttctcttc	
	tgctgtaaga	aaaataagtt	ttgaatagta	taaaataatg	
	tttttaaaag	ttggtaatta	tttagttgtt	ctctttttag	
1415 (Exon 12)	ATAACTGGAT	TCACTTTACA	ATTTGCAAAA	CGGCTGCAGG	
1455 bis 1488	TCAACCTATT	GGTCAAGCCA	TCAGAAAAAA	TTCA	

Die Großbuchstaben bezeichnen Exonsequenzen, klein geschriebene Buchstaben bezeichnen Intronsequenzen.

Tabelle 3-20:

Varianten im Intron 12 des CD36-Gens

Position					Varianten
	aag	tcaaaaacaa	ctatattaaa	atttaaatg <u>a</u> t	1489-121A>T
	gtcattacag	gaacaaaatc	aaattagcaa	cagcaactaa	
	tttatgaaca	tttattttaa	agtttgttat	atataaatat	
	tagtttatat	gttcataatt	attttcaacg	tat tacag	
				at	1489-5^6insAT
1489 (Exon 13)	AGTATTAAAG	AATCTGAAGA	GGAACTATAT	TGTGCCTATT	
1529 bis 1543	CTTTGGCTTA	ATGAG			

Die Großbuchstaben bezeichnen Exonsequenzen, klein geschriebene Buchstaben bezeichnen Intronsequenzen.

3.5 Erstmals beschriebene intronische Sequenzen

Die folgenden Tabellen stellen die neu gewonnenen Sequenzen in einzelnen Introns dar. Einschränkend muss betont werden, dass diese Sequenzen nur durch einmaliges oder mehrfaches Sequenzieren einzelner Proben gewonnen wurden. Eine weitere Verifikation fand nicht statt. In den bislang publizierten Sequenzen waren höchstens 30 bp der Intronsequenzen veröffentlicht, die direkt an die Exons angrenzen.

Tabelle 3-21:

Position	Sequenz			
1286 bis 1295	TGCAAAGAAG	gtgagtaaat	aacctcagta	gcacagtcca
	taccataatt	tgtgatattc	tttaagatga	gaactttacc
	ataatccttt	agcaaccaaa	atttaaaata	tatcataatt
	tgtgatattc	tttaaaatga	gaactttacc	ataatccttt
	agcaaccaaa	atttaaaatt	aaagtaagaa	agtaattagg
	gcagaagaag	aatggtggca	gaaaatttta	gtgctgattt
	tgtattttgg	gaagatccca	cttgtgtttc	agtattacaa
	aatttagtta	aaaccacacc	agtatttcct	tgtggctgct
	tttagattta	gggtgaaatg	aaaataattc	cgagaacaca
	ttaaacatcc	tgtattcatc	atctgcctaa	cttttcactc
	gaaatggtac	aggtaaatgt	attttcagta	tgtatctaag
	ctagagtaac	ataattgaga	ctagcttatc	ctgtacatat
	ttatcatact	aacgtgggtg	tggaagaaga	aagaaaaaac
	tagcgttaaa	taaattctta	gtccatagac	atattactgc
	ctgaaagctt	tacatattga	aaattaatac	tgaaggagtt
	tatagtagaa	tcaactgaca	taattcttcc	ccacccatgt
	taaaaaccat	gtattttta	atgcaagaag	ctttagtttt
	gtggaaatat	tttttgagtt	atatgtgaaa	tgaaggaagt
1296	<i>tattaa</i> ttcc	aattgactct	taaaacttgt	cttcagGGAG
1300 bis 1309	ACCTGTGTAC			

Die Großbuchstaben bezeichnen Exonsequenzen, klein geschriebene Buchstaben bezeichnen Intronsequenzen. Erstmalig beschriebene Intronsequenzen sind in kleinen *kursiven* Buchstaben dargestellt.

Tabelle 3-22:

Die vollständige Sequenz des Introns 12 des CD36-Gens

Position	Sequenz			
bis 1488+26	AACCTATTGG	TCAAGCCATC	AGAAAAAATT	CAgtgagtct
	cttgaaaatg	gttattttga	tatgatctgt	agtatcgtag
	tatcttcttg	taagaacatg	agtaaatcta	tgtaagtaag
	tggaaataac	atctgatatc	aacttatctt	tagcttaatg
	tcaccaatca	ttattaaatg	cttatgacta	atttcacaga
	ttttggaatg	gttttatggt	tttatttgag	catttgatag
	catctcttat	tttgttagct	gcccaaatat	ttctatgaca
	ataattaatt	tttggaattc	atatttcagt	tccccgagaa
	tttattgaaa	ggaaaaatcc	acacttgtga	aaaaaatca
	atgtgattag	aagacatata	agagcaaagg	aagtcaaaaa
	caactatatt	aaaatttaaa	tgagagtcat	tacaggaaca
	aaatcaaatt	agcaacagca	actaatttat	gaacatttat
	tttaaagttt	gttatatata	aatattagtt	<i>tatat</i> gttca
	taattattt	caacgtatta	caggAGTATT	AAAGAATCTG
1489-17 bis 1510	AAGAGGAA			

Die Großbuchstaben bezeichnen Exonsequenzen, klein geschriebene Buchstaben bezeichnen Intronsequenzen. Erstmalig beschriebene Intronsequenzen sind in kleinen *kursiven* Buchstaben dargestellt.

Tabelle 3-23:

Unvollständige Sequenz des Introns 7 des CD36-Gens

Position	Sequenz
981 bis 990+30	AAGGTAAAAG gtaagtattc tggtaaaatg tgcatgtatg
(Exon 7)	ttactagggt actcttaagc aggaatagta ttcatttaac
	ateteataag gacataggea teaacetata gaacagaeet
	ggttataatt cagctctgga aactcctgtt ctgctaggta
	ttaactcttt agttgtggta actggtgagt tcacaccagt
	gcatagctgc tgactatcag ctccacttta aggtttggtt
	cacctttctg cacaggttat ggttgtgtta cataaa

Die Großbuchstaben bezeichnen Exonsequenzen, klein geschriebene Buchstaben bezeichnen Intronsequenzen. Erstmalig beschriebene Intronsequenzen sind in kleinen *kursiven* Buchstaben dargestellt.
Tabelle 3-24:

Unvollständige Sequenz des Introns 9 des CD36-Gens

Position	Sequenz
1098 bis 1107+30	ATATTTGCAG gtaagacaga tactgaagta taagtatgct
(Exon 9)	gagtcanacc ccaggtgaca aaatgcagac caagaaactt
	aaacacagca taggaaattc atcatgttta ttaactaact
	ctttgcaaaa tgttcttctg catcttccaa tttttaatag
	tacaaatttt ttttttttg gcc
	{ca. 550 bp}
	atagttcatg cttggctatn gagttttagt atgtgttaaa
	atttcccaat cactttttt tctaagaatg aaacaagaat
	ttaaaagagt atatgatgtt tctaagttaa aacaagaata
(Exon 10)	agaaaaaatg aatctccaga atgtaagttc aggttcctgg
1108-28 bis 1117	aatgcagctc ttttttctct gtatttagGT CAATCTAT

Die Großbuchstaben bezeichnen Exonsequenzen, klein geschriebene Buchstaben bezeichnen Intronsequenzen. Erstmalig beschriebene Intronsequenzen sind in kleinen *kursiven* Buchstaben dargestellt.

Tabelle 3-25:

Unvollständige Sequenz des Introns 11 des CD36-Gens

Position	Sequenz
1405 bis 1414+30	IATTGAACCT gtaagaaaac accttattga tctgatttgg
(Exon 11)	ttgatanttt taaaaatnca attgaaataa aaataatctt
	gtcnatgatt atttattcaa taaataatca tatttattga
	atcacatnct tgaaagttac tgaaacttag gtcgatttct
	ncctatggtt tatgaagtga ttctaattgg cttaaaataa
	ttttatataa atatttatgt ttagatgagg agttattgta
	tattatgcaa aagtcaaaga gtatatgtga gtttgactat
	acttattgtc aaaatctata aaattgttgt

Die Großbuchstaben bezeichnen Exonsequenzen, klein geschriebene Buchstaben bezeichnen Intronsequenzen. Erstmalig beschriebene Intronsequenzen sind in kleinen *kursiven* Buchstaben dargestellt.

Tabelle 3-26:Unvollständige Sequenz des Introns 13 des CD36-Gens

Position	Sequenz			
1535 bis 1544+30	GCTTAATGAG	gtttgtattt	gcagctgtta	gtcattaaaa
(Exon 13)	acaaccttct	ttgtatataa	acaagctctt	gatgtttcaa
	aagaatgtat	agtatttaaa	gctatatgta	tttccattac
	ccatatggat	gagtatacat	ttatttaacc	tatttgagat
	gatccaattg	aacaaaaaca	tttcctatca	tttaagattt
	tcttcaaaaa	tgcatctatt	aaacacattt	tcttgttgta
	acatttgtct	tctattgcct	gacaaggtat	ttttactata
	aatccatgca	ttgatagcta	taaaaatagg	aaaaacattg
	aataagtctt	tggagcaaat	gaaactgttg	accctttgat
	agttctgaag	agcaaatgaa	tcctagtaca	ttgaagagta
	ccgtactcta	tctggcactt	aattgccttt	cttgacttgc
	aaaaggaatt	ccattaactt	gccttataga	tactgatgac
	taacaccaat	agaggtgtta	gaaaaaaggg	tgataggcaa
	ttgaagggta	tt		

Die Großbuchstaben bezeichnen Exonsequenzen, klein geschriebene Buchstaben bezeichnen Intronsequenzen. Erstmalig beschriebene Intronsequenzen sind in kleinen *kursiven* Buchstaben dargestellt.

3.6 Nukleotid-Variabilität

Die Nukleotid-Variabilität ($\theta x 10^4$) beträgt 80.1 +/- 45.9 für die Promotor Region, 12.7 +/- 6.7 für die kodierenden Anteile der Exons, 22.1 +/- 10.4 für die nicht translatierten Anteile der Exons und 15.0 +/- 7.9 für die intronischen Sequenzabschnitte.

3.7 Verteilung der Milzgrößen

Bei zwölf Individuen der Studienpopulation wurde das gesamte CD36-Gen einschließlich der Promotorregion sequenziert. Davon gehörten acht zu der Gruppe mit kleinen Milzen und vier zu der mit großen Milzen. Von den fünf Nukleotidsubstitutionen, die direkt die Aminosäurensequenz des Proteins verändern, bzw. zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führen, wurden vier in der Gruppe mit kleinen Milzen gefunden und eine bei einem Individuum der Gruppe mit großen Milzen. Einer der Polymorphismen, die in der Promotorregion des Gens liegen, wurde homozygot bei allen untersuchten Individuen aus der Gruppe mit großen Milzen sowie der Gruppe mit kleinen Milzen nachgewiesen. Nur bei zwei Individuen aus der Gruppe mit kleinen Milzen fanden sich keine weiteren Mutationen im Promotor, die putative Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren verändern. Tabelle 3-27 zeigt die Gesamtheit aller nachgewiesenen Varianten in den Exons des CD36-Gens und die Milzgrößen der Patienten, bei denen die jeweilige Variante gefunden wurde. Die Angabe der Milzgröße erfolgt dabei als sog. "standard residual", was die Abweichung vom rechnerischen Mittelwert angibt. So bedeutet ein negatives Vorzeichen, dass die bezeichnete Milz kleiner ist als der jeweilige Durchschnittswert ist.

Tabelle 3-27:

CD36-Varianten und Milzgrößen der jeweiligen Individuen

Variante	Pat. ID.* der homozygot nachgwiesen Varianten	Milzgröße, stand. residual	Pat. ID.* der heterozygot nachgwiesen Varianten	Milzgröße, stand. residual
158C>A	62	3,974	20	4,627
	1262	-1,737	396	-1,305
	1295	4,556	864	-1,713
	1626	1,5	903	3,235
	1673	-1,197	1955	-1,408
	1926	1,927	1997	2,231
	2105	-1,548	2185	-1,227
	2629	2,928	2603	-1,272
	2844	-1,465		
	3071	2,942		
	3076	-1,497		
	3170	1,548		
	3304	1,752		
	3393	4,206		
656G>A			1262	-1,737
809A>G			929	-1,493
985-986insA	AT		1955	-1,408
1101T>C			2603	-1,493
1264T>G			3170	1,548
1712-			864	-1,713
1715delAGT	A		2555	-1,516
			3304	1,752
1910G>T			864	-1,713
			2555	-1,516
			3304	1,752
1934A>G			1262	-1,737
2065C>T			1626	1,5
			1673	-1,197
			1955	-1,408
2512A>C			1626	1,5
2549G>A	1380	-1,134	864	-1,713
	1626	1,5	929	-1,451
	1955	-1,408	1262	-1,737
	2068	2,421	1997	2,231
			2555	-1,516
			1673	-1,197
			3368	-1,626

PatID*: Patienten-Identifikations-Nummer

Tabelle 3-28:

Zusammenfassung aller bekannten und aller in dieser Arbeit neu identifizierten Varianten im CD36-Gen

X 7 .			_	-	_
variante	Phanotyp		-	-	-
-220A>G					
-144G>T					
-53G>T					
-50G>T					
-2A>C					
158C>A	Tun I				
331-491de1141bp	Typ I + H				
4/8C>1	Typ I + II Typ II				
539-540del	i yp ii				
050G>A					
0/0G>1					
/83G>A					
830 841 dalsing A A A A C	Typ I				
959-1028del	Typ I				
999-10280c1	i jp i				
985^986ins & A T					
1101T>C					
1107+29-30CT>TC					
1159-1160insA	Тур І				
1264T>G	Typ I				
1296-119T>C					
1414+13C>A					
1415-150A>C					
1438-1449del	Typ I	0 .			
1439G>C		fett	und	und grau hinte	und grau hinterlegt: Die Va
1444delA	Typ II			wurde in di	wurde in dieser Arbeit er
1489-121A>T				identifiziert	identifiziert.
1489-5^6insAT		fett un	d	d kursiv: Die	d kursiv: Die Variante wur
1530ins14bp				dieser als a	dieser als auch in andere
1712-1715delAGTA				idantifiziert	identifiziert
1910G>T					
1934A>G		Typ I	bz	bzw. Typ II: C	bzw. Typ II: CD36-Typ-I-,
2065C>T				Typ-II-Defi	Typ-II-Defizienz
2512A>C		mis	sens	ssense mutation 1	ssense mutation 1 bzw. 2: Die
2549G>A				wurde in de	wurde in der entspreche
missense mutation 1				Publikation	Publikation nicht näher l
missense mutation 2				1 donkation	i ublikation ment haner (

4 Diskussion

4.1 Mögliche Auswirkungen der nachgewiesenen Varianten

Über die Prävalenz von CD36-Varianten auf DNA-Ebene war 1997, zu Beginn dieser Untersuchung, wenig bekannt. Inzwischen wurden 16 verschiedene Varianten des CD36-Gens beschrieben (siehe auch Tabelle 1-2). Vierzehn dieser Varianten wurden bei Patienten gefunden, die aufgrund ihrer CD36-Defizienz untersucht wurden. Unter diesen fand sich eine nicht konservative Mutation (Kashiwagi et al., 1993), eine 1-bp Insertion (Kashiwagi et al., 1996) und eine 2-bp Deletion (Kashiwagi et al., 1994). Diese Mutationen konnten als ursächlich für die beobachteten CD36-Defizienzen ausgemacht werden. Zwei weitere Mutationen, die in jenen Studien identifiziert wurden, schienen die Expression von CD36 nicht zu beeinflussen (Kashiwagi et al., 1993). Zwei andere Mutationen, ein nichtkonservativer Austausch und eine nicht-informative Substitution, wurden in einer Untersuchung identifiziert, die die Identifikation von SNPs in klinisch relevanten Genen zum Ziel hatte (Cargill et al., 1999). Insgesamt sieben Mutationen wurden in einer Studie identifiziert, die den Zusammenhang der Suszeptibilität gegenüber Malaria und Veränderungen im CD36-Gen untersuchte (Aitman et al., 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 24 CD36-Varianten in West Afrika nachgewiesen. Fünf der Varianten bewirken im Vergleich zur verwendeten Referenzsequenz von CD36 (Armesilla und Vega, 1994) eine informative Veränderung der Nukleotidsequenz. Diese Varianten bewirken entweder einen nicht-konservativen Austausch von Aminosäuren, führen zur Insertion einer zusätzlichen Aminosäure oder bewirken einen vorzeitigen Synthesestopp der Aminosäurekette.

4.1.1 Mögliche Auswirkungen der Varianten in der Promotor-Region des CD36-Gens

Innerhalb der Promotor-Region von CD36 kommt die größte Bedeutung vermutlich den Basen von Position –158 bis –90 zu. Bei ihnen konnte nachgewiesen werden konnte, dass sie für die optimale Transkription von CD36 in monozytären Zellen notwendig sind (Armesilla et al., 1996). In allen von anderen Arbeitsgruppen bislang durchgeführten Studien konnten in diesem als Promotor-Region bezeichneten Bereich noch keine Varianten nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden 253 Basen in 5'-Richtung vor dem Transkriptionsstartpunkt untersucht. Dabei wurden fünf Varianten nachgewiesen, die

unterschiedliche putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren verändern, und die sich unterschiedlich häufig in den untersuchten Populationen fanden. Die Variante –220G>A liegt bei einem Individuum heterozygot vor. Sie liegt außerhalb des für die optimale Transkription des Gens notwendigen Bereichs des Promotors. Auch beeinflusst sie keine Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren. Daher wurde auf die Untersuchung der Kontrollpopulationen hinsichtlich dieser Variante verzichtet.

Im Gegensatz dazu führt der Polymorphismus –144G>T dazu, dass das Bindungsmotiv für den Transkriptionsfaktor PuF eingefügt wird und das Bindungsmotiv für den Transkriptionsfaktor AP-2 verloren geht. Diese Variante ist die einzige von fünf in dieser Studie identifizierten Varianten, die in dem für die Transkription wichtigen Bereich zwischen den Basenpaaren –158 und –90 liegt. Da sich diese Variante bei allen der 44 untersuchten Chromosomen fand und außerdem bei allen Individuen der kaukasischen und afrikanischen Kontrollpopulation (n=100) nachzuweisen war, ist davon auszugehen, dass es sich dabei um den vorherrschenden Genotyp handelt. Insgesamt fand sich –144G>T bei allen 244 untersuchten Chromosomen. Die von Armesilla und Vega (1994) beschriebene Sequenz scheint dagegen eine seltene Variante darzustellen. Aufgrund der hier gewonnen Daten ist davon auszugehen, dass –144G>T dem Wildtyp entspricht. Daher erübrigen sich Spekulationen hinsichtlich einer veränderten Expression des CD36-Gens durch die in dieser Studie erstmals identifizierten Sequenz.

Die Variante -53G>T führt zum Verlust der putativen Bindungsregion für den Transkriptionsfaktor AP-2. Diese fand sich bei sechs der 44 untersuchten Chromosomen, wobei sie bei einem Individuum homozygot vorlag. In enger Nachbarschaft zu -53G>T wurde die Variante -50G>T nachgewiesen. Diese Variante konnte auf einem der 44 untersuchten Chromosomen innerhalb der Studienpopulation nachgewiesen werden. -50G>T verändert die Nukleotidsequenz so, dass eine weitere Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor PuF eingeführt wird. Diese Variante ist die einzige von fünf im Gen-Promotor, die eine zusätzliche Bindungsstelle einführt. Auch ist sie die einzige, die in der kaukasischen Kontrollpopulation (42 % der untersuchten Chromosomen) häufiger nachgewiesen wurde als in der afrikanischen Population (29 % der untersuchten Chromosomen). Die Varianten, deren Häufigkeit sich zwischen den zwei Kontrollpopulationen unterscheiden, sind für weitere Untersuchungen von Interesse. Denn hier kann angenommen werden, dass der Selektionsdruck, der auf die verschiedenen Populationen unterschiedlich wirkt, zur Ausprägung der verschiedenen Häufigkeiten geführt hat. Auch lassen sich solche SNPs unter Umständen für populationsgenetische Studien verwenden.

Dicht am Transkriptionsstartpunkt liegt die Variante –2A>C. Diese wurde bei fünf der untersuchten Chromosomen nachgewiesen und führt zum Verlust der Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor C/EBP.

Insgesamt wurden bei ca. 11000 sequenzierten Basenpaaren der Promotorregion 57 Varianten gefunden. Lässt man die 44 Chromosomen außer Acht, bei denen der –144G>T Typ vorlag, der vermutlich dem Wildtyp entspricht, so gelang die Identifikation von 13 Varianten bei ca. 11000 untersuchten Nukleotiden. Damit liegt die Rate der Varianten bei ca. 1/850 bp in etwa in dem zu erwartenden Bereich von einer Variante pro 1000 untersuchten Nukleotiden.

4.1.2 Mögliche Auswirkungen der Variante in Exon 5 des CD36-Gens

Die Variante E123K in Exon 5 wurde in dieser Untersuchung erstmals nachgewiesen. Sie liegt zwischen zwei Epitopen des Proteins, die die Adhäsion von IRBCs an CD36 vermitteln. Diese Epitope erstrecken sich über die Aminosäurepositionen 97 bis 110 (Asch et al., 1993) und 145 bis 171 (Baruch et al., 1999), siehe auch Tabelle 1-1. E123K liegt außerdem dicht vor einem Epitop, das möglicherweise an der Bindung langkettiger Fettsäuren beteiligt ist (Baillie et al., 1996). Glutaminsäure (E) gehört mit der Carboxygruppe in der Seitenkette zu den sauren Aminosäuren. Bei physiologischen pH-Werten liegen diese Seitenketten vollständig ionisiert vor. Dagegen gehört Lysin (K) zu den basischen Aminosäuren. Aufgrund der Unterschiedlichkeit der hier gegeneinander ausgetauschten Aminosäuren erscheint eine Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins wahrscheinlich. Bei den 294 auf diese Variante hin untersuchten Chromosomen wurde E123K nur auf einem Chromosom der Studienpopulation identifiziert. Die Häufigkeit dieser Variante ist daher annäherungsweise mit 0,4 % zu beziffern, weshalb in diesem Zusammenhang von einer seltenen Variante gesprochen werden sollte. Nach derzeit gültiger Definition muss für die Bezeichnung einer Variante als SNP eine Häufigkeit von größer 1 % gegeben sein (Brookes, 1999), was für E123K nicht zutrifft. Die hier beschriebene Variante kann ebenfalls nicht als Mutation bezeichnet werden, da für diesen Begriff vorausgesetzt wird, dass die Variante ursächlich für einen veränderten Phänotyp ist. Im Rahmen dieser Studie wurden die Auswirkungen der Varianten auf den Phänotyp jedoch nicht untersucht.

4.1.3 Mögliche Auswirkungen der Variante in Exon 6 des CD36-Gens

In Exon 6 wurde die Variante T174A nachgewiesen. Sie ist eine von drei in Exons gelegenen Varianten, die lediglich auf dem Austausch eines Nukleotids beruhen und in dieser Untersuchung neu identifiziert wurden. Möglicherweise übt T174A von allen in dieser Untersuchung neu nachgewiesenen Varianten die stärkste Wirkung auf den Phänotyp aus, da T174A in einem Epitop lokalisiert ist, das direkt an der Bindung von verschiedenen Liganden an CD36 beteiligt ist. Zu den Liganden, die direkt innerhalb dieses Epitops binden, gehören durch *P. falciparum* infizierte Erythrozyten (Daviet et al., 1997). Außerdem konnten Peptide, die an von den Nukleinsäuren 145-171 und 156-184 codierten Aminosäuren banden, die Adhäsion von infizierten Erythrozyten an CD36 verhindern (Baruch et al., 1999). T174A liegt in der erweiterten immunodominanten Domäne, die von Baruch et al. (1999) beschrieben wurde. Sechs von sieben monoklonalen Antikörpern gegen CD36, die in der Lage waren, die Funktionen von CD36 zu behindern oder zu unterbrechen, banden in der Region, die sich über die Nukleotide 155–183 erstreckte (Daviet et al., 1995 a; Puente Navazo et al., 1996). Durch diese monoklonalen Antikörper wurde die Rezeptorfunktion für Thrombospondin und für oxidiertes Lipoprotein geringer Dichte (oxLDL) gestört.

Der Austausch von der neutralen Aminosäure Threonin (T), die in der Seitenkette eine Hydroxy-Gruppe trägt, gegen Alanin (A), einer ausgeprägt unpolaren und aliphatischen Aminosäure, bewirkt möglicherweise eine funktionell relevante Veränderung einer solchen Domäne. Daher ist besonders hier ein Einfluss dieser Variante auf die Bindung von IRBCs an CD36 denkbar. Bei insgesamt 70 durch Sequenzierung untersuchten Chromosomen, wurde T174A nur einmal nachgewiesen. Ebenso wurde T174A nicht in den Kontrollpopulationen gefunden. Ähnlich wie bei E123K liegt daher die Häufigkeit dieser Variante deutlich unter 0,5 %.

4.1.4 Mögliche Auswirkungen der Variante in Exon 7 des CD36-Gens

Die Variante N232-233ins liegt in einer Region von Nukleinsäuren im CD36-Gen, die für einen Anteil des CD36-Proteins codieren, in dem bislang keine Epitope nachgewiesen werden konnten, die spezifische Funktionen des Proteins vermitteln. Die Insertion des Triplets AAT in Exon 7 bewirkt, dass bei der Translation die Aminosäure Asparagin (N) zwischen den Aminosäuren Glycin (G) an Position 232 und Lysin (K) an Position 233 eingefügt wird. Auf DNA-Ebene bleibt der Leserahmen unverändert. Bei insgesamt 54 untersuchten Chromosomen wurde diese Variante einmal gefunden. Das Einfügen einer zusätzlichen Aminosäure kann zu einer wesentlichen Konformationsänderung des Moleküls führen. Ebenso ist es denkbar, dass die Interaktion mit einem Chaperon-Molekül gestört wird, welches zum Transport des unreifen CD36-Proteins zum Golgiapparat notwendig sein könnte. So wurde für eine andere Deletion im CD36-Gen der Nachweis erbracht, dass zwar eine Translation am endoplasmatischen Retikulum stattfindet, es jedoch nicht mehr zur Bildung des reifen Proteins am Golgiapparat kommt (Kashiwagi et al., 2001). Auffällig ist bei der Variante N232-233ins, dass sie ausschließlich innerhalb der afrikanischen Population vorlag. Während sie dort mit einer Häufigkeit von 5 % vorgefunden wurde, fand sie sich jedoch in den 100 Chromosomen der kaukasischen Kontrollpopulation nicht. Es handelt sich nach den hier vorliegenden Ergebnissen also um einen für die ghanaische Population spezifischen SNP. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob und inwiefern der Phänotyp durch diesen SNP verändert wird und ob ein Zusammenhang von diesem SNP und einer veränderten Suszeptibilität gegenüber Malaria besteht.

4.1.5 Mögliche Auswirkungen der Variante in Exon 9 des CD36-Gens

Die dritte Variante, die auf dem Austausch eines Nukleotids beruht, wurde in Exon 9 nachgewiesen. Auch I271T liegt in einer Region des CD36-Gens, die für Aminosäuren codieren, für die bislang keine spezifischen Funktionen identifiziert wurden. Bei 56 sequenzierten Chromosomen wurde diese Variante einmal gefunden. Nicht nachgewiesen wurde diese Variante in den beiden Kontrollpopulationen. Rechnerisch ergibt sich daraus eine Häufigkeit von weniger als 0,5 %. Daher kann auch in diesem Fall nicht von einem SNP gesprochen werden. Die Eigenschaften der Aminosäuren Isoleucin (I) und Threonin (T) hinsichtlich ihrer Wirkungen in einem Protein sind so unterschiedlich, dass funktionelle Auswirkungen auf das CD36-Protein auch hier denkbar sind. Isoleucin trägt eine ausgeprägt unpolare und hydrophobe Seitenkette. Threonin dagegen trägt eine hydrophile Seitenkette. Ein Austausch dieser Aminosäuren, die beide in einer extrazellulären Domäne des CD36-Moleküls liegen, kann eine Konformationsänderung innerhalb der Tertiärstruktur des Proteins bewirken. Inwiefern diese funktionell bedeutsam ist, bleibt spekulativ und wurde in dieser Studie nicht weiter untersucht. Bei einer 2001 erstmalig beschriebenen Mutation, die ebenfalls im Exon 9 liegt (959-1028del), wurde nachgewiesen, dass die Translation zwar ungestört abläuft. Dennoch kommt es nicht zur Expression des CD36-Proteins auf der Zelloberfläche, da vermutlich die Glykosilierung durch die Deletion gestört ist (Kashiwagi et al., 2001). Es ist denkbar, dass die hier erstmals nachgewiesene Variante im Exon 9 ebenfalls die Glykosilierung und die Expression des Proteins beeinflusst.

4.1.6 Mögliche Auswirkungen der Variante in Exon 10 des CD36-Gens

Die Mutation 1265G>T innerhalb des Exon 10 war zu Beginn dieser Untersuchung noch nicht bekannt und wurde von Aitman et al. (2000) erstmalig beschrieben. 2001 wurde sie in einer weiteren Publikation beschrieben (Pain et al., 2001), wobei für die gleiche Mutation dort eine andere Nomenklatur verwendet wurde. In letzterer wird sie als [T188G (Exon 10)] bezeichnet. Es handelt sich dabei um den Austausch von Thymin gegen Guanin an der Position 1265 des CD36-Gens. Das Triplett TAT, das für Tyrosin codiert, wird verändert in TAG, einem Stopp-Codon. Diese Mutation führt daher zu einem stark verkürzten und veränderten Protein. Durch den vorzeitigen Abbruch des Proteins an dieser Stelle geht die am 3'-Terminus gelegene Transmembrandomäne sowie der intrazellulär liegende COOH-Terminus vollständig verloren. Ebenfalls kommt es zum Verlust der von Kern et al. (1999) beschriebenen alternativen Transmembrandomäne sowie der Region des Proteins, die die Bindung von CD36 an Kollagen vermittelt. Diese Region spannt sich über die Aminosäurepositionen 415-427. Die Mutation 1265G>T liegt direkt innerhalb eines Cystein-Clusters, für das bislang noch keine Funktion beschrieben wurde (Armesilla und Vega, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass Individuen, bei denen die 1265G>T-Mutation homozygot vorlag, eine CD36-Defizienz aufweisen (Aitman et al., 2000). Auch Pain et al. (2001) wiesen dieselbe Mutation nach, indem sie gezielt das Exon 10 zweier Individuen sequenzierten, bei denen eine CD36-Defizienz bekannt war. Die Kombination mit einer weiteren bei Aitman et al. (2000) beschriebenen Mutation (1144delG) mit 1265G>T führte zur CD36-Defizienz-Typ-II, sofern Heterozygotie für jede einzelne der Mutationen vorlag. Letztere Mutation (1144delG) wurde in der hier vorliegenden Untersuchung nicht gefunden. 1265G>T wurde bei einer aus Gambia stammenden Bevölkerung mit einer Häufigkeit für Heterozygote von 5 % bestimmt (n=415). Das Auffinden von einem heterozygoten Individuum bei 38 sequenzierten Chromosomen deckt sich mit der erwarteten Häufigkeit. Ebenfalls stimmt die Häufigkeit von 6 % innerhalb der afrikanischen Kontrollgruppe mit den Beobachtungen von Aitman et al. (2000) überein. Nicht nachweisen ließ sich 1265G>T in der kaukasischen Kontrollpopulation.

Aitman et al. (2000) gelang der Nachweis einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Malaria bei Vorliegen dieser Mutation. Zu erwarten gewesen wäre der Nachweis von Mutationen, die zu einer verminderten Suszeptibilität gegenüber schwer verlaufenden Formen der Malaria führen. Erklärt werden diese Ergebnisse, in dem durch Aitman et al. (2000) argumentiert wird, dass in den für Malaria endemischen Gebieten, die Malaria nur einen Teil des Selektionsdruckes ausmacht. Insbesondere im ersten Lebensjahr sind die dort lebenden Menschen einer Vielzahl von infektiösen und nichtinfektiösen Erkrankungen ausgesetzt. Zudem kommen häufig weitere Faktoren wie Mangelernährung hinzu. Innerhalb der komplex zusammenwirkenden Selektionsfaktoren ist es daher denkbar, dass ein Faktor, der gegenüber schwerer Malaria prädisponiert, zugleich einen Schutz gegenüber anderen Erkrankungen bieten kann und auf diese Weise in einer Population balanciert ist. Möglicherweise kann aber auch eine weitere Funktion von CD36 eine Rolle bei der Erklärung dieses Studienergebnisses spielen. McGilvray et al. (2000) konnten nachweisen, dass CD36 die Phagozytose nicht opsonierter P.falciparum-infizierter Erythrozyten vermittelt. Eine CD36-Defizienz würde auf diesem Weg die immunologische Reaktion auf die Infektion vermindern und für eine schwer verlaufende Malaria prädisponieren. Im Widerspruch zu den Ergebnissen von Aitman et al. (2000) stehen die Ergebnisse der Untersuchung von Pain et al. (2001). Ihnen gelang der Nachweis einer verminderten Suszeptibilität gegenüber schwerer Malaria bei Vorliegen der Mutation 1265G>T. Erklärt werden die unterschiedlichen Ergebnisse unter anderem durch die Heterogenität der untersuchten Populationen sowie durch die Heterogenität der verschiedenen Parasitenstämme, die zur Infektion in der jeweiligen Population mit Malaria führten.

Für keine weitere in dieser Arbeit nachgewiesenen Variante, ist der Effekt auf das Protein und den Phänotyp so exakt beschrieben, wie für 1265G>T. Die Häufigkeit mit der diese Mutation in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde, entspricht der Häufigkeit, mit der sich auch die Varianten in Exon 7 und 15 identifizieren ließen. So fand sich das veränderte Allel jeweils mit einer Häufigkeit von 5 % bis 8 % in der afrikanischen Kontrollpopulation, während es sich in der kaukasischen Population nicht nachweisen ließ. Möglicherweise haben die Varianten in Exon 7 und 15 vergleichbare Einflüsse auf die Suszeptibilität gegenüber schwerer Malaria und sind durch die gleichen Selektionsmechanismen balanciert, die auch auf die Mutation 1265G>T wirken.

4.2 Einfluss der Varianten im CD36-Gen auf konservierte Aminosäuren

Werden die Aminosäuresequenzen der Glykoproteine, die zur CD36-Genfamilie gehören, untereinander verglichen, so lässt sich feststellen, dass einige Aminosäuren innerhalb von CD36, CLA-1 und LIMPII hochkonserviert sind. Diese Aminosäuren finden sich bei diesen Glykoproteinen sowohl bei Nagern als auch beim Menschen an der gleichen Position, was die funktionelle Bedeutung dieser Aminosäuren unterstreicht (Calvo et al., 1995). Von den 473 Aminosäuren des humanen CD36 sind 186 Aminosäuren hochkonserviert. Von den fünf in dieser Arbeit beschriebenen Varianten, die die Aminosäuresequenz verändern, betreffen drei eben diese hochkonservierten Aminosäuren. Bei diesen Varianten handelt es sich um E123K in Exon 5, T174A in Exon 6 und N232-233 ins in Exon 7. Diese Varianten wurden alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig beschrieben. Zwar ist der Nachweis noch nicht erbracht, dass bei den betreffenden Personen ein auffälliger Phänotyp, wie beispielsweise eine CD36-Defizienz, vorliegt, doch ist die Wahrscheinlichkeit dafür bei diesen Varianten besonders hoch.

4.3 Häufigkeit nachgewiesener Varianten im CD36-Gen

Die Nukleotid-Variabilität liegt mit Werten von $80.1 + 45.9 (\theta x 10^4)$ für die Promotorregion deutlich höher als zu erwarten. Dagegen entsprechen Werte von 12.7 + 6.7, wie sie für die kodierenden Anteile der Exons bestimmt wurden, etwa der Größenordnung die auch in anderen Publikationen angegeben wird (Halushka et al., 1999).

In vorausgegangenen Studien wurde überwiegend die Variabilität des CD36-Gens bei Personen untersucht, deren Phänotyp eine CD36-Defizienz zeigte. (Yamamoto et al., 1990; Curtis und Alster, 1996; Lee et al., 1999). Bei Afrikanern lässt sich die CD36-Defizienz mit einer Prävalenz von 3 % bis über 7 % nachweisen, was mehr als zehn mal häufiger ist, als die Prävalenz der CD36-Defizienz bei Kaukasiern, die etwa 0,3 % beträgt (Lee et al., 1999).

Bei 68500 untersuchten und in Exons gelegenen Nukleotiden der 12 Individuen, von denen die gesamte Sequenzinformation aller 15 Exons des CD36-Gens vorliegt, fanden sich 33 Varianten gegenüber der gewählten Referenzsequenz (Armesilla und Vega, 1994). Das entspricht einem Verhältnis von einer Variante auf ca. 2075 untersuchte Nukleotide (1/2075). In einer Studie, in der 106 verschiedene Gene auf 114 Chromosomen auf SNPs untersucht wurden, konnte eine Häufigkeit von nicht-konservativen Polymorphismen von 1/2058 nachgewiesen werden (Cargill et al., 1999). Bei den Individuen in der Studie von Cargill und Mitarbeitern (1999) handelte es sich um Europäer (n=30), Asiaten (n=14), afrikanischstämmige Amerikaner (n=10) und afrikanische Pygmänen (n=7). Damit wurden also vier ethnische Gruppen miteinander verglichen. Unter Beachtung, dass in der hier vorliegenden Studie nur zwei Ethnien hinsichtlich der Unterschiede in einem Gen untersucht wurden, erscheint die Anzahl der nachgewiesenen Varianten eher hoch auszufallen.

4.3.1 Bedeutung der großen Anzahl identifizierter Varianten im CD36-Gen

Es ist anzunehmen, dass die für die vorliegende Studie getroffene Auswahl der Individuen zur Identifikation dieser hohen Anzahl von Varianten im CD36-Gen geführt hat. Die Auswahlkriterien stützten sich dabei auf folgende Überlegungen: Zum einen spiegeln die durch Ultraschalluntersuchungen festgestellten Milzgrößen die individuelle Suszeptibilität gegenüber Malaria wieder. Zum anderen können CD36-Varianten die Suszeptibilität gegenüber Malaria verändern. Daher müsste sich in der Folge dieser Annahmen eine veränderte Suszeptibilität gegenüber Malaria in einer veränderten Milzgröße wiederspiegeln. Die Splenomegalie ist eines der Hauptsymptome der Malaria. Sie wird hervorgerufen durch die Zerstörung einer großen Anzahl von infizierten Erythrozyten in der Milz. Insofern können kleine Milzen bei Individuen mit gleicher Exposition gegenüber Malaria bedeuten, dass es bei diesen Personen nicht zu so hohen Parasitämien kommt, wie bei jenen mit großen Milzen. Das würde bedeuten, dass bei diesen Personen eine verminderte Suszeptibilität gegenüber Malaria vorliegt. Andererseits ist jedoch auch denkbar, dass eine überdurchschnittlich große Milz ein Zeichen für eine starke immunologische Reaktion des Patienten auf die Erkrankung darstellt und insofern ebenfalls eine geringere Suszeptibilität des Individuums wiederspiegelt. Diese Untersuchung erlaubt durch die geringe Anzahl der untersuchten Chromosomen keine statistisch ausreichend sichere Aussage, ob sich Varianten im CD36-Gen bei Induviduen mit kleinen Milzen häufiger nachweisen lassen, als bei solchen mit durchschnittlichen oder großen Milzen. Wenngleich sich in dieser Studie kein Zusammenhang von Milzgröße und Vorkommen bestimmter CD36-Varianten nachweisen lässt, ist die hohe Anzahl der gefunden Varianten als Hinweis darauf zu deuten, dass die ausgewählte west-afrikanische Population einerseits, als auch die Auswahlkriterien nach extremen Milzgrößen andererseits, dazu beigetragen haben, so viele Varianten identifizieren zu können. Von fünf nachgewiesenen Varianten, die die Aminosäuresequenz verändern, wurden vier bei Patienten gefunden, die zur Gruppe mit kleinen Milzen gehörten. Das stärkt die Annahme, dass eine kleine Milz in Zusammenhang mit einer niedrigen Parasitämie steht, die durch eine verminderte individuelle Suszeptibilität bedingt ist. Diese These wird ebenfalls durch die Beobachtung gestärkt, dass die Mutation Y325X, die zu einem Abbruch der Proteinkette führt, bei einem Patienten mit großer Milz nachgewiesen wurde. Für diese Mutation ist nachgewiesen worden, dass sie mit einer erhöhten Suszeptibilität für Malaria einhergehen kann (Aitman et al., 2000).

4.4 Perspektiven

Die Erkenntnisse der letzten 25 Jahre konnten zeigen, dass CD36 ein Rezeptor mit vielen Liganden und vielen Funktionen ist. Die Herausforderung zukünftiger Studien wird darin liegen, die Mechanismen zu verstehen, mit denen CD36 eine solche Vielzahl von Interaktionen und Funktionen ausführen kann. Mit der hier vorliegenden Arbeit konnte die Anzahl der bei CD36 bekannten Varianten fast verdreifacht werden: von 15 in bisherigen Publikationen beschriebenen Varianten auf jetzt 38 bekannte Varianten.

In weiteren Untersuchungen wird zu prüfen sein, inwiefern die hier erstmals beschriebenen Varianten einen auffälligen Phänotyp hinsichtlich der CD36-Expression oder Funktion zeigen. Eine weitere Möglichkeit für die Durchführung einer solchen Studie ergäbe sich durch die erneute Untersuchung derjenigen Patienten dieser Studie, bei denen eine bislang unbekannte Variante des CD36-Gens identifiziert werden konnte. Mithilfe der Druchflusszytometrie kann nachgewiesen werden, ob diese Personen CD36 auf den Monozyten exprimieren oder nicht. Dabei binden fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper gegen CD36 an das CD36 auf der Oberfläche von Monozyten. Mit indirekten Thrombozytensuspensions-Immunofluoreszenztests kann CD36 auf der Oberfläche von Thrombozyten nachgewiesen werden. Damit ließe sich bestimmen, ob eine Typ I oder Typ II CD36-Defizienz bei den Individuen vorliegt. So würden die in dieser Arbeit bestehenden Lücken hinsichtlich einer funktionellen Bedeutung der erstmals beschriebenen Varianten reduziert.

Mit verschiedenen Modellen lässt sich das Bindungsverhalten von IRBCs an Endothelzellen *in vitro* studieren. Es erscheint daher vielversprechend, CD36-Moleküle, die die in dieser Untersuchung beschriebenen Varianten tragen, hinsichtlich dieser Eigenschaften zu untersuchen. Auf diese Weise ließen sich Hinweise auf den Einfluss von CD36-Varianten auf die Pathophysiologie der Infektion mit *Plasmodium falciparum* gewinnen.

Ebenfalls denkbar wären größer angelegte prospektive Kohortenstudien. Dabei kann längerfristig die Inzidenz, Prävalenz und Mortalität von *P-falciparum*-Malaria bei Personen untersucht werden, die eine Variante im CD36-Gen zeigen. Die gewonnen Daten würden mit einer Kontrollpopulation ohne Varianten im CD36-Gen verglichen. Ein solches Studiendesign wäre in der Lage, eine solide Bestätigung der Bedeutung von Varianten zu liefern, die in Studien, wie der hier vorliegenden, nachgewiesen wurden.

Bereits mehrfach konnte nachgewiesen werden, dass CD36 eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der schweren Malaria spielt. Baruch et al. (2002) konnten zeigen, dass die Immunisierung von *Aotus*-Affen mit einer Komponente des *P. falciparum*-variant-antigens (PfEMP1) einen Schutz vor Malaria vermitteln kann. Die Kenntnis von veränderten Bindungseigenschaften zwischen PfEMP1 und CD36 durch die Untersuchung der hier neu beschriebenen Varianten, kann eine Hilfe bei der Identifizierung weiterer konservierter, funktioneller Domänen des PfEMP1 sein. Die Identifizierung solcher Domänen spielt eine entscheidende Rolle auf dem Weg, der letztlich zu der Entwicklung einer wirksamen Vakzine gegen *P-falciparum*-Malaria führen soll. Auch Gruarin et al. (2001) konnten zeigen, dass CD36 ein mögliches Ziel für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien ist. So wurde nachgewiesen, dass die Behandlung mit reduzierenden Agenzien (N-Acetylcystein) das CD36-Protein in der Konformation so verändern kann, dass es zu keiner Bindung zwischen CD36 und IRBCs mehr kommt und bestehende Bindungen gelöst werden.

Die Kenntnis einzelner SNPs oder Mutationen ist Voraussetzung, um deren Einfluss auf die komplexe Interaktion eines Rezeptors wie CD36 mit seinen Liganden weiterführend untersuchen zu können. Mit einem wachsenden Verständnis der Interaktionen zwischen einem multifunktionellen Rezeptor wie CD36 und seinen Liganden, können sich neue Ansätze und Möglichkeiten für Therapien verschiedenster Erkrankungen ergeben.

5 Zusammenfassung

CD36 ist ein Rezeptor, der von verschiedenen Zellen exprimiert wird. Dazu gehören Thrombozyten, Erythroblasten, Monozyten, Makrophagen, Adipozyten, verschiedene epitheliale Zellen, dendritische Zellen und Endothelzellen der Blutgefäße. CD36 spielt unterschiedliche Rollen beim Transport von Lipiden, der Immunregulation, Hämostase und Angiogenese. Außerdem ist es beteiligt an der Pathogenese der Malaria tropica, die durch das Protozoon *Plasmodium falciparum* verursacht wird, und an der Entstehung der Sichelzellerkrankung. Sichelzellerythrozyten oder mit *Plasmodium falciparum* infizierte Erythrozyten binden über CD36 an das Endothel der Blutgefäße. Auf diesem Weg kommt es zu schweren Störungen der Mikrozirkulation mit teilweise lebensbedrohlichen Folgen für den Erkrankten. Als Rezeptor auf dendritischen Zellen vermittelt CD36 immunsuppressive Eigenschaften der Malaria-Parasiten.

In der hier vorliegenden Untersuchung wurden 24 Varianten im CD36-Gen nachgewiesen. 23 dieser Varianten sind zuvor nicht beschrieben worden. Zu den hier nachgewiesenen Varianten gehören drei nicht konservative Austausche einzelner Nukleotide, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz im CD36-Protein führen: E123K, T174A und I271T. Außerdem konnte eine Insertion von drei Basenpaaren nachgewiesen werden, die zu einer Insertion von Asparagin in die Aminosäurekette führte (N232-233ins). Die Variante E123K ist in einer putativen Bindungsdomäne für oxidiertes Lipoprotein geringer Dichte lokalisiert. Andere in dieser Studie nachgewiesene Varianten lagen außerhalb der für CD36 bekannten Bindungsdomänen. Zwölf Austausche einzelner Nukleotide (SNPs) konnten in nichttranslatierten Exons sowie in Introns nachgewiesen werden. Fünf weitere SNPs wurden in der Promotorregion des CD36-Gens nachgewiesen. Davon verändern -144G>T, -53G>T und -2A>G putative Bindungselemente für die Transkriptionsfaktoren "purine factor" (PuF), "phorbol ester-responsive element" AP-2 und "CCAAT/enhancer-binding protein". Der Austausch von A>G an Position -50 im CD36 Promotor fügt eine neue Erkennungssequenz für PuF ein. Die Berechnung der Nukleotid Abweichungsrate ergab hohe Werte für alle Anteile des untersuchten CD36-Gens, was zu einem gewissen Anteil mit der Auswahl der Studienpopulation in Zusammenhang stehen kann. Die Untersuchung afrikanischer und kaukasischer Kontrollchromosomen zeigte, dass Varianten, die die Struktur des CD36-Moleküls beeinflussen, ausschließlich in der afrikanischen Population gefunden wurden. Das deutet darauf hin, dass in der untersuchten afrikanischen Population möglicherweise eine

Selektion solcher Varianten aufgrund besonderer Umweltbedingungen (wie beispielsweise Malaria) stattgefunden hat.

5.1 Summary

CD36 is a scavenger receptor expressed by platelets, monocytes, macrophages, different epithelial cells, dendritic cells and endothelial cells. It may be involved in a variety of functions in lipids transport, immune regulation, hemostasis and angiogenesis. CD36, in addition, is involved in the pathogenesis of sickle cell disease and Plasmodium falciparum malaria by acting as an endothelial-cell receptor for sickling or parasitized erythrocytes. Thereby CD36 mediates life-threatening microcirculatory disturbances. As a receptor on dendritic cells, it may also mediate immunosuppressive activities of malaria parasites.

Studying 12 selected individuals from a malaria-endemic area in West Africa, 24 variants of the CD36 gene were found, 21 of them novel ones. These included three single-nucleotide substitutions causing non-conservative amino acid exchanges E123K, T174A, and I271T as well as a three base pair (bp) insertion resulting in the addition of an asparagine residue (N232-233ins). The E123K variant was located within the putative ligand-binding domain for oxidized low density lipoprotein, while the other substitutions resided outside any of the binding sites for reaction partners mapped on CD36 so far. Twelve single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified in introns and in untranslated parts of the exons. Five additional SNPs were located in the promoter region whereby -144G>T, -53G>T, and -2A>G alter putative binding sites for the transcription factors purine factor (PuF), phorbol esterresponsive element AP-2 and CCAAT/enhancer-binding protein. A G>T exchange at position -50 appears to introduce a new recognition site for PuF. Calculations of nucleotide diversity revealed extraordinarily high numbers for all parts of the gene, which may, however, to some extent be due to the selection of individuals studied. All variants affecting the structure of the molecule were found exclusively among Africans. This may indicate that they have some functional relevance related to conditions in Africa, possibly malaria.

6 Literatur

- Abumrad NA, El-Maghrabi MR, Amri E, Lopez E, Grimaldi PA. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. J Biol Chem 268:17665-17668.
- Acton SL, Scherer PE, Lodisch HF, Krieger M. (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. J Biol Chem 269:21003-21009.
- Aitman TJ, Cooper LD, Norsworthy P, Wahid FN, Gray JK, Curtis BR, McKeigue PM, Kwiatkowski D, Greenwood BM, Snow RW, Hill AV, Scott J. (2000). Malaria susceptibility and CD36 mutation. Nature 405:1014-1015.
- Akbar AN, Savill J, Gomber W, Bofill M, Borthwick NJ, Withelaw F, Grundy J, Janossy G, Salmon M. (1994). The specific recognition by macrophages of CD8+, CD45RO+ T cells undergoing apoptosis: a mechanism for T cell clearance during resolution of viral infections. J Exp Med 180:1943-1947.
- Alessio M, De Monte L, Scirea A, Gruarin P, Tandon NN, Sitia R. (1996). Synthesis, processing, and intracellular transport of CD36 during monocytic differentiation. J Biol Chem 271:1770-1775.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-10.
- Antonarakis SE, and the Nomenclature Working Group. (1998). Recommondations for a Nomenclature System for Human Gene Mutations. Human Mutation 11:1-3.
- Armesilla AL and Vega MA. (1994). Structural Organization of the Gene for Human CD36 Glycoprotein. J Biol Chem 269:18985-18991.
- Armesilla AL, Calvo D, Vega MA. (1996). Structural and functional characterisation of the human CD36 gene promoter; identification of a proximal PEBP2/CBF site. J Biol Chem 271:7781-7787.
- Asch AS, Liu I, Briccetti FM, Barnwell JW, Kwakye-Berko F, Dokun A, Goldberger J, Pernambuco M. (1993). Analysis of CD36 binding domains: Ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. Science 262:1436-1440.
- Baillie AGS, Coburn CT, Abumrad NA (1996). Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. Membr Biol 153:75-81.

- Barnwell JW, Asch AS, Nachman RL, Yamaya M, Aikawa M, Ingravallo P. (1988). A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J. Clin. Inves. 84, 765-772.
- Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, Taraschi TF, Howard RJ. (1995). Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. Cell 82:77-87.
- Baruch DI, Ma XC, Pasloske B, Howard RJ, Miller LH. (1999). CD36 peptides that block cytoadherence define the CD36 binding region for Plasmodium falciparum-infectet erythrocytes. Blood 94:2121-2127.
- Baruch DI, Gamain B, Barnwell JW, Sullivan JAS, Stowers A, Galland GG, Miller LH, Collins WE. (2002). Immunization of *Aotus* monkeys with a fuctional domain of the Plasmodium falciparum variant antigen induces protection against a lethal parasite line. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS). 99:3860-3865.
- Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K. (1989). Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. Nature 341:57-59.
- Brookes AJ. (1999). The essence of SNPs, Review. Gene 234:177-186.
- Butler D, Maurice J, O'Brien C. (1997). Time to put malaria control on the global agenda. Nature 386:535-536.
- Calvo D, Dopazo J, Vega MA. (1995). The CD36, CLA-1(CD36L1), and LIMPII (CD36L2). gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. Genomics 25:100-106.
- Calvo D und Vega MA. (1993). Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. J Biol Chem 268:16818-16824.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES. (1999). Characterisation of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. Nat Genet 22:231-238.
- Cattani JA, Gibson FD, Alpers MP, Crane GG. (1987). Hereditary ovalocytosis and reduced susceptibility to malaria in Papua New Guinea. Trans R Soc Trop Med Hyg 81:705-709.

- Cerami C, Frevert U, Sinnis P, Takacs B, Clavijo P, Santos MJ, Nussenzweig V. (1992). The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum sporozoites. Cell 70:1021-1033.
- Choudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Williams K, Gulati S, Pogo AO. (1993). Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the duffy blood group system and the receptor for the Plasmodium vivax malaria parasite. Proc Natl Acad Sci USA 90:10793-10797.
- Comstock GW. (1978). Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Prophit survey. Am Rev Respir Dis 117:621-624.
- Cooke BM, Berendt AR, Craig AG, MacGregor J, Newbold CI, Nash GB. (1994). Rolling and stationary cytoadhesion of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum: seperate roles for ICAM-1, CD36, and thrombospondin. Br J Haematol 87:162-170.
- Daviet L, Buckland R, Puente Navazo MD, McGregor JL. (1995 a). Identification of an immunodominant functional domain of human CD36 antigen using human-mouse chimaeric proteins and homologue-replacement mutagenesis. Biochem J 305:221-224.
- Daviet L, Morel-Kopp MC, Kaplan C, McGregor JL. (1995 b). A structural/functional domain of CD36 is involved in the binding of anti-Nak^a antibodies. Thromb Haemost 73:543-545.
- Daviet L, McGregor JL. (1997). Vascular biology of CD36: roles of this new adhesion molecule family in different disease states. Thromb Haemost 78:65-9.
- Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. (1997). CD36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. The Journal of Cell Biology 11;138:707-17.
- Dolan SA, Procter JL, Alling DW, Okubo Y, Wellems TE, Miller LH. (1994). Glycophorin B as an EBA-175 indipendent Plasmodium falciparum receptor of human erythrocytes.
 Mol Biochem Parasitol 64:55-63.
- Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. The Journal of Biological Chemistry 268:11811-11816.
- Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SF, Silverstein RL. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. J Biol Chem 274:19055-62.

- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involveld in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. The Journal of Clinical investigation. 108:785-791.
- Field SP, Hempelmann E, Mendelow BV, Fleming AF. (1994). Glycophorin variants an *Plasmodium falciparum*: protective effect of the Dantu phenotype on vitro. Hum Genet 93:148-150.
- Fraser GR, Giblett ER, Motulsky AG. (1966). Population genetic studies in the Congo. III. Blood Groups (ABO, MNSs, Rh, Js^a). Am J Hum Genet 18:546-552.
- Frieda S, Pearce A, Wu J, Silverstein RL. (1995). Recombinant GST/CD36 fusion proteins define a thrombospondin binding domain. Evidence for a single calcium-dependent binding site on CD36. J Biol Chem 270(7):2981-6.
- Gelhaus A, Urban B, Pirmez C. (1995). DNA extraction from urea-preserved blood or blood clots for use in PCR. Trends Genet 11:41.
- Gelhaus A, Scheding A, Browne E, Burchard GD, Horstmann RD. (2001). Variability of the CD36 Gene in West Africa. Human Mutation 18:444-450.
- Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. Proceedings of the National Acadamy of Sciences of the United States of America 87:6624-6628.
- Gosh D. (2000). Object-oriented transcription factors database (ooTFD). Nuclei Acid Res 28:308-310.
- Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. (1992). Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adhaerence, signal transduction, and transfusion medicine. Blood 80:1105-1115.
- Gruarin P, Thorne RF, Dorahy DJ, Burns GF, Sitia R, Alessio M. (2000). CD36 es a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport. Biochem Biophys Res Commun. 275:446-454.
- Gruarin P, Primo L, Ferrandi C, Bussolino F, Tandon NN, Arese P, Ulliers D, Alessio M. (2001). Cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is mediated by a redox-dependent conformational fraction of CD36. The Journal of Immunology, 167:6510-6517.
- Haldane JBS. (1947). Disease and evolution. Hereditas 35:267-273.

- Halushka DE, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A. (1999). Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. Nat Genet 22:239-247.
- Hebbel RP. (1997). Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. J. Clin. Invest. 100:83.
- Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH. (1993). A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: The erythrocyte chemokine receptor. Science 261:1182-1184.
- Ikeda H, Mitani T, Ohnuma M, Haga H, Ohtzuka S, Kato T, Nakase T, Sekiguchi S. (1989). A new platelet-specific antigen, Nak^a, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion. Vox. Sang. 57:213-217.
- Ikeda H. (1999). Platelet Membrane Protein CD36. Hokkaido J Med Sci 74:99-104.
- Jarolim P, Palek J, Amato D, Hassan K, Sapak P, Nurse GT, Rubin HL, Zhai S, Sahr KE, Liu S-C. (1991). Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis. Proc Natl Acad Sci USA 88:11022-11026.
- Jepson AP, Banya WAS, Sissay-Joof F, Hassan-King M, Bennet S, Whittle HC. (1995). Genetic regulation of fever in Plasmodium falciparum malaria in gambian twin children. J. of Infect. Diseas. 172:316-319.
- Jepson AP, Banya WAS, Sissay-Joof F, Hassan-King M, Nunes C, Bennet S, Whittle HC. (1997). Quantification of the relative contribution of major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC genes to human immune responses to foreign antigens. Infect. Immun. 65:872-876.
- Jiménez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularisation by thrombospondin-1. Nat Med 6:41-48.
- Kashiwagi H, Honda S, Tomiyama Y, Mizutani H, Take H, Honda Y, Kosugi S, Kanayama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y. (1993). A novel polymorphism in glycoprotein IV (replacement of proline-90 by serine) predominates in subjects with platelet GPIV deficiency. Thromb Haemost 69:481-484.
- Kashiwagi H; Tomiyama Y, Kosugi S, Shiraga M, Lipsky RH, Kanayama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y. (1994). Identification of molecular defects in a subject with type I CD36 deficiency. Blood 83:3545-3552.
- Kashiwagi H, Tomiyama Y, Honda S, Kosugi S, Shiraga M, Nagao N, Sekiguchi S, Kanayama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y. (1995). Molecular basis of CD36 deficiency.

Evidence that a 478C>T substitution (poline90>serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency. J Clin Invest 95:1040-1046.

- Kashiwagi H, Tomiyama Y, Nozaki S, Honda S, Kosugi S, Shiraga M, Nakagawa T, Nagao N, Kanakura Y, Kurata Y, Matsuzawa Y. (1996). A single nucleotide insertion in codon 317 of the CD36 gene leads to CD36 deficiency. Arterioscler Thromb Vasc Biol 16:1026-1032.
- Kayser FH, Kurt A, Bienz JE, Zinkernagel RM. (1997). Medizinische Mikrobiologie. Thieme,9. Aufl. 530-541.
- Kern P, Kolowos W, Hagenhofer M, Frank C, Kalden JR, Herrmann M. (1999). Alternatively spliced mRNA molecules of the thrombospondin receptor (CD36) in human PBMC. Eur J Immunogenet 26:337-42.
- Kieffer N, Bettaieb A, Legrand C, Coulombel L, Vainchenker W, Edelman L, Breton-Gorius J. (1989). Developmentally regulated expression of a 78 kDa erythroblast membrane glycoprotein immunologically related to the platelet thrombospondin receptor. Biochem J 262:835-842.
- Lee K, Godeau B, Fromont P, Plonquet A, Debili N, Bachir D, Reviron D, Gourin J, Fernandez E, Galacteros F, Bierling P. (1999). CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans. Transfusion 39:873-879.
- Leung LL, Li WX, McGregor JL, Albrecht G, Howard RJ. (1992). CD36 peptides enhance or inhibit CD36-thrombospondin binding. A two-step process of ligand-receptor interaction. J Biol Chem 267:18244-18250.
- Lin M, Shieh SH, Yang TF. (1993). Frequency of platelet-specific antigens among Chinese in Taiwan. Transfusion 33:155-157.
- Lin TM, Chen CJ, Wu MM, Yang CS, Chen YS, Lin CC, Kwang TY, Hsu ST, Lin SY, Hsu LC. (1989). Hepatitis B virus markers in Chinese twins. Anticancer Res. 9:737-741.
- Liu SC, Zhai S, Palek J, Golan DE, Amato D, Hassan K, Nurse GT, Badona D, Coetzer T, Jarolim P, Zaik M, Borwein S. (1990). Molecular defect of the band 3 protein in southeast Asian ovalocytosis. N Eng J Med 323:1530-1538.
- McGilvray ID, Serghides L, Kapus A, Rotstein OD, Kain KC. (2000). Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearence. Blood 80:2634-2642.
- McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D. (1994). Variation of TNFa promotor region associated with susceptibility to cerebral malaria. Nature 371:508-511.

- Mercier N, Catimel B, Reck MP, Pellecchia D, McGregor JL. (1995). Identification of a functional site on CD36 involved in the interaction between platelets and collagen. Platelets 6:139-145.
- Miller LH. (1994). Impact of malaria on genetic polymorphism and genetic disease in Africans and African Americans. Proc Natl Acad Sci USA 91:2415-2419.
- Navazo MD, Daviet L, Savill J, Ren Y, Leung LL, McGregor JL. (1996). Identification of a domain (155-183) on CD36 implicated in the phagocytosis of apoptotic neutrophils. J Biol Chem 271:15381-15385.
- Nozaki S, Kashiwagi II, Yamashita S, Nakagawa T, Kostner B, Tomiyami Y, Nakata A, Ishigami M, Miyagawa J-I, Kameda-Takemura K, Kurata Y, Matsuzawa Y. (1995). Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. J Clin Invest 96:1859-1865.
- Nozaki S, Tanaka T, Yamashita S, Sohmiya K, Yoshizumi T, Okamoto J, Kitaura Y, Kotake C, Nishida H, Nakata A, Nakagawa T, Matsumoto Y, Kameda-Takemura K, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kaamura K, Matsuzawa Y. (1999). CD36 mediates long-chain fatty acid transport in human myokardium: complete myocardial accumulation defect of radiolabeld long-chain acid analog in subjects with CD36 deficiency. Mol Cell Biochem 192:129-135.
- Ockenhouse CF, Chulay JD. (1988). Plasmodium falciparum sequestration: OKM5 antigen (CD36) mediates cytoadherence of parasitized erythrocytes to a myelomonocytic cell line. J Infect Dis 157:584-588.
- Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B. (1989). CD36 directly mediates cytoadhaerence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. Cell 58:95-101.
- Pain A, Urban BC, Kai O, Casals-Pascual C, Shafi J, Marsh K, Roberts DJ. (2001). A nonsense mutation in CD36 gene is associated with protection from severe malaria. The Lancet 357:1502-1503.
- Pearce SFA, Roy P, Nicholson AC, Hajjar DP, Febbraio M, Silverstein RL. (1998). Recombinant glutathion S-transferase/CD36 fusion proteins difine an oxidized low density lipoprotein-binding domain. J Biol Chem 273:34875-34881.
- Pearce SFA, Wu J, Silverstein RL. (1995). Recombinant GST/CD36 fusion proteins define a thrombospondin binding domain. Evidence for a single calcium-dependent binding site on CD36. J Biol Chem 270:2981-2986.
- Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, Cohen PA, Frazier WA, Hoff HF, Hazen SL. (2000). Macrophage scavenger receptor CD36 is the

major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. The Journal of Clinical Investigation 2000. 105:1095-108.

- Puente Navazo MD, Daviet L, Ninio E, McGregor JL. (1996). Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL). Arterioscler Thromb Vasc Biol 16:1033-9.
- Reid ME, Lomas-Francis C, Daniels GL, Chen V, Shen J, Ho YC, Hare V, Batts R, Yacob M, Smart E. (1995). Expression of the erythrocyte antigen Hensshaw (He; MNS6): serological and immunochemical studies. Vox Sang 68:811-821.
- Ren Y, Silverstein RL, Allen J, Savill J. (1995). CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. J Exp Med 181:1857-1862.
- Roberts DJ, Biggs B-A, Brown G, Newbold CI. (1993). Protection, pathogenesis and phenotypic plasticity in Plasmodium falciparum. Int Immunol 4:1055-1063.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-91.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74:5463-7.
- Santoso S, Santoso S, Kiefel V, Masri R, Mueller-Eckhardt C. (1993). Frequency of plateletspecific antigens among Indonesians. Transfusion 33:739-741.
- Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. (1992). Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. J Clin Invest 90:1513-1522.
- Shakibaei M, Frevert U. (1996). Dual interaction of the malaria cicumsporozoite protein with low density lipoprotein receptor related protein (LRP) and heparan sulfate proteoglycans. J Exp Med 184:1699-1711.
- Sim BKL, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ, Miller LH. (1994). Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. Science 264:1941-1944.
- Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, Pinches R, Newbold CI, Miller LH. (1995). Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. Cell 82:101-10.
- Springer TA. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell 76:301-314.

- Strachan T, Read AP. (1996). Molekulare Humangenetik. Spektrum, Akad. Verl. 1. Aufl.: 590-591.
- Sugihara K, Sugihara T, Mohandas N, Hebbel RP. (1992). Thrombospondin mediates adherence of CD36+ sickle reticulocytes to endothelial cells. Blood 80:2634-2642.
- Su X-Z, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, Ravetch JA, Wellems TE. (1995). The large diverse gene family *var* encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Cell 82:89-100.
- Tandon NN, Lipsky RH, Burgess WH, Jamieson GA. (1989). Identification of GP IV (CD36) as a primary receptor for platelet collagen adhesion. J. Biol. Chem. 264:7570-7575.
- Tao N, Wagner SJ, Lublin DM. (1996). CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. J Biol Chem 271:22315-22320.
- Taylor KT, Tang Y, Sobieski DA, Lipsky RH. (1993). Characterisation of two alternatively spliced 5'-untranslated exons of the human *CD36* gene in different cell types. Gene 133:205-212.
- Udomsangpetch R, Reinhardt PH, Schollaardt T, Elliott JF, Kubes P, Ho M. (1997). Promiscuity of clinical Plasmodium falciparum isolates for multiple adhesion molecules under flow conditions. J Immunol 158:4358-4364.
- Unger P, Procter JL, Moulds JJ, Moulds M, Blanchard D, Guizzo MC, McCall LA, Cartron JP, Dahr W. (1987). The Dantu erythrocyte phenotype of the NE variety. II. Serology, immunochemistry, genetics, and frequency. Blood 55:33-43.
- Urban BC, Ferguson DJ, Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM, Roberts DJ. (1999). Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. Nature 400:73-77.
- Vega MA, Segui-Real B, Garcia JA, Cales C, Rodriguez F, Vanderkerckhove J, Sandoval IV. (1991). Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, an novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. J Biol Chem 266:16818-16824.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promotor on transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci USA 94:522-525.
- Yamamoto N, Akamatsu N, Sakuraba H, Yamazaki H, Tanoue K. (1994). Platelet gycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. Blood 83:392-397.

Internetseiten

http://www.embl-heidelberg.de http://www.genome.iastate.edu http://www.ncbi.nlm.nih.gov http://www.infektionsbiologie.ch

7 Anhang

Diese Arbeit wurde unterstützt von der Volkswagenstiftung.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen sehr herzlich danken, die mich während dieser Arbeit so zuverlässig unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. R.D. Horstmann danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg.

Frau Dr. A. Gelhaus danke ich für Einarbeitung in die Arbeitstechniken der Molekularbiologie und für die Betreuung während allen Phasen der Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Abteilung für tropenmedizinische Grundlagenforschung im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin gilt mein besonderer Dank. Dem guten Arbeitsklima verdanke ich die angenehmen Erinnerungen an die Arbeit im Labor. Besonders erwähnen möchte ich in diesem Zusammenhang Dr. Markus Hess, Dr. Karin Rottengatter, Thorsten Thye, Jürgen Sievertsen, Birgit Förster und Birgit Muntau.

Meinen Eltern danke ich für die bedingungslose Unterstützung in allen Phasen meines Studiums und auch der Doktorarbeit. Ohne sie wäre das Medizinstudium und diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meiner Freundin Pamela Brandt danke ich für die treue Begleitung durch alle Höhen und Tiefen in den letzten Jahren.

Lebenslauf

Name:	Andreas Scheding
Geburtsdatum:	19. April 1973
Geburtsort:	Herford, Deutschland
Eltern:	Martin Scheding
	Christa Scheding
Schulabschluss	
1992:	Abitur am Städtischen Gymnasium Löhne
Zivildienst	
1992 – 1994:	Zivildienst bei Paramedic e.V. in Hamburg, Ausbildung zum
	Rettungssanitäter
Studium	
1994 bis 2002:	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
September 1996:	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
September 1997:	Erstes Staatsexamen
September 2000:	Zweites Staatsexamen
April 2002:	Drittes Staatsexamen
	Abschluss des Medizinstudiums mit der Gesamtnote: gut (1,66)
seit Septemter 2002:	AIP in der I. Medizinischen Klinik des Krankenhauses Köln-Merheim

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Zudem erkläre ich hiermit, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.