

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Vorstandsvorsitzender: Prof. Dr. med. Rolf D. Horstmann

## **Einfluss von CD14-Genvarianten auf die Infektionsdynamik von *Plasmodium falciparum* bei Kleinkindern aus einem Malaria-endemischen Gebiet in Ghana**

### **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Kathrin Fiene Bruch, geboren 24.03.1981  
aus Gifhorn

Hamburg 2011

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 09.02.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität  
Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. J. May**

**Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. G.-D. Burchard**

**Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. H.-W. Mittrücker**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 Problemstellung.....	5
1.2 Malaria tropica.....	6
1.2.1 Schwere Malaria tropica.....	6
1.2.2 Immunreaktion gegenüber einer Plasmodium-falciparum-Infektion.....	8
1.3 CD14.....	10
1.3.1 DNS-Lokalisation .....	10
1.3.2 Funktion .....	10
1.3.3 Der Polymorphismus <i>CD14</i> <sup>-260</sup> .....	11
1.3.4 Assoziation von CD14 mit Malaria.....	12
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
2.1 Studiendesign.....	14
2.1.1 Studiengebiet.....	14
2.1.2 Studienaufbau .....	14
2.1.3 Klinische Definitionen .....	17
2.1.4 Laborarbeiten in Ghana .....	17
2.2. Laboranalysen des <i>CD14</i> -Promotors .....	18
2.2.1 PCR-Amplifikation des <i>CD14</i> -Promotors .....	18
2.2.2. Zyklische Sequenzierung und Analyse der erfassten SNP durch SeqScape®.....	20
2.2.3 Genotypisierung durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode (FRET) ...	21
2.4 Statistische Auswertungen.....	23
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
3.1 Polymorphismen der <i>CD14</i> -Promotorregion und Genotypfrequenzen.....	25
3.2 Verteilung der <i>CD14</i> -Genotypen in der Untersuchungsgruppe .....	27
3.2.1 Verteilung der <i>CD14</i> -Genotypen und Allelen in der SP- und Placebogruppe.....	27
3.2.2 <i>CD14</i> -Genotypen und verschiedene Charakteristika der Studienpopulation .....	28
3.3 Assoziation der <i>CD14</i> -Genotypen mit Plasmodium-falciparum-Parasitämie .....	30
3.3.1 Assoziation von <i>CD14</i> <sup>-260</sup> mit Plasmodium-falciparum-Parasitämie .....	31
3.3.2 Assoziation von <i>CD14</i> <sup>-481</sup> mit Plasmodium-falciparum-Parasitämie .....	34
3.4 Assoziation der <i>CD14</i> -Genotypen mit Malaria tropica .....	36
3.4.1 Assoziation von <i>CD14</i> <sup>-260</sup> mit Malaria tropica.....	36
3.4.2 Assoziation von <i>CD14</i> <sup>-481</sup> mit Malaria tropica.....	40
3.5.1 Assoziation von <i>CD14</i> <sup>-260</sup> mit Anämie .....	43
3.5.2 Assoziation von <i>CD14</i> <sup>-481</sup> mit Anämie .....	47
3.6 Assoziation der <i>CD14</i> -Genotypen mit Letalität .....	48
3.6.1 Assoziation von <i>CD14</i> <sup>-260</sup> mit Letalität.....	48
3.6.2 Assoziation von <i>CD14</i> <sup>-481</sup> mit Letalität.....	49
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>50</b>
4.1 Kritische Betrachtungen der Materialien und Methoden .....	50
4.1.1 Studienkonzept.....	50
4.1.2 Materialerfassung.....	51
4.1.3 Genotypisierung.....	53
4.2 Diskussion.....	53
4.2.1 Erfasste Polymorphismen.....	53
4.2.2 Einfluss der <i>CD14</i> -Genotypen auf P.-falciparum-Parasitämie .....	54
4.2.3 Einfluss der <i>CD14</i> -Genotypen auf unkomplizierte Malaria tropica.....	56
4.2.4 Einfluss der <i>CD14</i> -Genotypen auf schwere Malaria tropica .....	58

4.2.5 Einfluss der <i>CD14</i> -Genotypen auf Anämie.....	59
4.2.6 Einfluss der <i>CD14</i> -Genotypen auf Letalität .....	60
4.3 Schlussfolgerung und Blick in die Zukunft.....	61
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>62</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>7. Danksagung .....</b>	<b>68</b>
<b>8. Lebenslauf .....</b>	<b>69</b>
<b>9. Liste der verwendeten Abkürzungen.....</b>	<b>70</b>
<b>10. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>72</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Problemstellung

Im Jahr 2008 erkrankten weltweit etwa 247 Millionen Menschen an Malaria, 1 Million der Verläufe endete tödlich [42]. Die schwerwiegenden Komplikationen der Erkrankung sind meist auf *Plasmodium-falciparum*-Infektionen zurück zu führen [44]. Besonders betroffen in den Malaria-endemischen Gebieten sind Kinder bis zum Alter von fünf Jahren, da die Bewohner dieser Gebiete mit zunehmendem Alter eine Teilimmunität entwickeln und somit vor den schweren Krankheitsverläufen geschützt sind [44]. Bis dato ist es nicht gelungen, die Immunabwehrreaktion gegenüber den Parasiten vollständig zu verstehen. Jede Erkenntnis über einzelne immunmodulatorische Proteine ist wichtig, um das Gesamtbild der menschlichen Immunabwehr gegenüber *P. falciparum* zusammenfügen zu können. Das Verständnis der immunpathologischen Vorgänge ist für die Entwicklung von Impfstoffen oder anderen Heilmitteln von grosser Bedeutung.

Möglicherweise ist der CD14-Rezeptor bei der Immunreaktion gegenüber *P. falciparum* beteiligt. Der CD14-Rezeptor hat eine wichtige Schlüsselfunktion für die Immunabwehr von Gram-negativen Bakterien. Er bindet Bakterien-spezifische Toxine und präsentiert diese Monozyten, um eine Entzündungsreaktion hervorzurufen. Es wird vermutet, dass dieses Oberflächenprotein Toxine von *P. falciparum* in ähnlicher Weise bindet und die Abwehr sowie die Symptomatik der Malaria tropica beeinflusst [31]. Bei schwerer Malaria konnten spezifisch erhöhte Blutkonzentrationen vom löslichen sCD14 nachgewiesen werden [39], was auf den Einfluss des Proteins auf die Krankheitsverläufe schließen lässt.

Für einen einzelnen Nukleotidaustausch im Promotor des CD14-Gens,  $CD14^{260C>T}$ , wurde in verschiedenen Studien eine Assoziation mit dem Schweregrad des Krankheitsverlaufes bei bakteriellen Infektionserkrankungen festgestellt [13, 2]. Eine longitudinale Studie über die Assoziation der Punktmutation mit der Infektionsdynamik bei *P.-falciparum*-Infektionen wurde bis dato jedoch noch nicht durchgeführt.

In der hiesigen Arbeit wird der mögliche Einfluss von Einzelpunktmutationen des *CD14*-Promotors auf den Verlauf der Parasiteninfektionen bei ghanaischen Kleinkindern untersucht. Während des Projektes wurde außerdem eine weitere, bis

heute unbeschriebene Einzelpunktmutation in dem Promotor von *CD14* an der Position *CD14*<sup>-481</sup> entdeckt. Auch diese wurde auf denselben Einfluss untersucht.

Analysiert wurden Daten aus einer klinischen Studie, die das Bernhard-Nocht-Institut während der Jahre 2003-2005 in einem hochendemischen Gebiet für Malaria in Ghana durchgeführt hat.

## **1.2 Malaria tropica**

40% der Weltbevölkerung leben unter dem Risiko, an einer Malaria zu erkranken. Statistiken der WHO zeigen, dass alle 45 Sekunden ein Kind auf der Welt an den Folgen einer Malaria stirbt [42]. Sie ist in Ghana die Haupttodesursache von Kleinkindern [43].

Malaria tropica ist eine Infektionskrankheit, bei der der einzellige Parasit *Plasmodium falciparum* durch den Stich einer infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke übertragen wird. Die Parasiten befallen die Leberzellen des Menschen und vervielfältigen sich dort. Doch erst durch den späteren Befall der Erythrozyten kommt es zur systemischen Ausbreitung im Körper. Es kann hierbei zu Symptomen wie Fieber, Gliederschmerzen, Kopfschmerzen und allgemeiner Abgeschlagenheit kommen. Im asexuellen Stadium sind die Parasiten im Mikroskop für die Diagnostik einer Malaria erkennbar. Die Parasiten können sich im Verlauf zu sexuellen Gametozyten weiterentwickeln, die nach erneutem Blutsaugen durch eine weibliche *Anopheles*-Mücke den Entwicklungszyklus im Körper der Mücke fortsetzen. [35]

In dem Ausmaß des systemischen Befalls unterscheidet sich die Malaria tropica deutlich von den anderen drei Malariaformen. Diese sind: Malaria tertiana, hervorgerufen durch *P. ovale* und *P. vivax*, Malaria quartana, hervorgerufen durch *P. malariae* und Infektionen mit *P. knowlesi*. Im Gegensatz zu diesen kann nur die Malaria tropica in eine komplizierte schwere Malaria übergehen.

### **1.2.1 Schwere Malaria tropica**

Beinahe alle der tödlichen Verläufe der weltweiten Malariaerkrankungen sind laut der WHO-Statistiken auf die Infektion mit *P. falciparum* zurückzuführen [44]. Die im Jahre 2000 überarbeiteten Kriterien der WHO für die Diagnose von schwerer Malaria tropica sind v.a. für Kleinkinder entworfen worden, da diese in hochendemischen Regionen unter dem höchsten Risiko stehen. Die Rate der schweren Krankheitsver-

läufe geht im Laufe der ersten Lebensjahre zurück, bis das Risiko ab dem siebten Lebensjahr nur noch gering ist [36]. Die Sensitivität dieser Diagnosekriterien wurde 2000 bei der Überarbeitung der WHO-Kriterien deutlich auf Kosten der Spezifität erhöht. Die Kriterien für die Diagnosestellung der schweren Malaria bei Kleinkindern sind unspezifische Zeichen einer schweren Erkrankung. In holoendemischen Gebieten kommt es so häufig zu Fehldiagnosen, die schweren Malariafälle werden jedoch zum größten Teil erfasst. Dies ist aus Sicht der WHO vorrangig, da der weitere Verlauf einer komplizierten Malaria sehr stark von dem raschen Einsetzen einer adäquaten Therapie abhängig ist. Folgende Diagnosekriterien wurden von der WHO festgelegt:

Nachweis einer asexuellen *P.-falciparum*-Parasitämie mit zusätzlich mindestens einem der klinischen oder labortechnischen Anzeichen:

- Bewusstseinsstörung (Blantyre-Koma-Skala  $\leq 2$  (Siehe Tabelle 1.1)) bzw. das Kind ist unfähig, einen schmerzhaften Stimulus zu lokalisieren, mit/ohne Krampfanfall, bei erfolgtem Krampfanfall sollte das Koma mindestens über 30 Minuten nach dem Krampfanfall persistieren, um den Anfall von einem einfachen Fieberkrampf abgrenzen zu können);
- Extreme Schwäche/Erschöpfung (das Kind ist (nach vorher erlernter Fähigkeit) unfähig, ohne Unterstützung zu sitzen bzw. (bei noch nicht erlerntem selbstständigem Sitzen) zu trinken);
- Pathologische Atmung (Tachypnoe/vertiefte Atmung/Nasenflattern/Inverse Atmung);
- Ikterus (sichtbar oder Gesamtbilirubinwerte  $> 2,5$  mg/dl);
- Hyperpyrexie (Körpertemperatur  $> 40^{\circ}\text{C}$ );
- Hyperparasitämie (Parasitämie  $> 250000$  Parasiten/ $\mu\text{l}$  Blut (bei Nicht-Immunen))

Andere Ursachen für die Symptome einer zerebralen Malaria wie Trauma, Epilepsie, etc. mussten ausgeschlossen worden sein.

**Tabelle 1.1:** Blantyre-Koma-Skala [44]

Blantyre-Koma-Skala <sup>a</sup>	Skala <sup>b</sup>
<b>a) Beste motorische Antwort</b>	
Kind reagiert gezielt auf schmerzhaften Reiz	2
Kind entzieht sich ungezielt dem schmerzhaften Reiz	1
Ungezielte oder keine Reaktion auf den Schmerzreiz	0
<b>b) Verbale Antwort</b>	
Angemessenes Weinen	2
Jammern oder unangemessenes Weinen	1
Keine Reaktion	0
<b>c) Augenbewegung</b>	
Gezielt (folgt z.B. dem Gesicht der Mutter)	1
Ungezielt	0

<sup>a</sup> Diese Skala ist an die weitverbreitete Glasgow-Koma-Skala angelehnt und dient zur Komadiagnose bei Kleinkindern

<sup>b</sup> Die Skala kann Werte von 0-5 enthalten;  $\leq 2$  ist Zeichen einer Bewusstseinsstörung

### 1.2.2 Immunreaktion gegenüber einer *Plasmodium-falciparum*-Infektion

Die Infektion mit *P. falciparum* und das verursachte Krankheitsbild bieten der Grundlagenforschung noch heute unzählige Ansatzpunkte, die bislang unergründet geblieben sind. Es ist bis dato niemandem gelungen, einen einheitlichen Signalweg der immunologischen Vorgänge zu erstellen. In diesem Kapitel kann nicht auf alle Theorien eingegangen werden, da es den Rahmen der Arbeit sprengen würde. Es dient somit eher dem Überblick der wiederholt bewiesenen und allgemein akzeptierten immunologischen Grundlagen der Abwehrreaktionen des menschlichen Körpers gegenüber einer *P.-falciparum*-Parasitämie.

Gram-negative Bakterien beinhalten in ihrer Zellwand Antigene, auf die der menschliche Mechanismus abwehrend reagiert. Zelluläre Lipopolysaccharide (LPS) werden von den Rezeptoren der Monozyten gebunden und aktivieren eine intrazelluläre Signalkaskade. Diese bewirkt die vermehrte Transkription von proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1) und IL-6. Das ist der Beginn der frühen, angeborenen Immunantwort auf eine Infektion, die weitere Abwehrreaktionen nach sich ziehen kann [9]. Es wird vermutet, dass *P. falciparum* den LPS ähnliche Toxine im Körper freisetzt, auf die das Immunsystem pro-inflammatorisch reagiert. Parasitäres

Glycosylphosphatidylinositol (GPI), zum Beispiel, bringt durch Bindung an TLR2/TLR4-Rezeptoren (*Toll-like-receptors*) der Monozyten eine Signalwegkaskade in Gang und führt so zu der vermehrten Transduktion derselben Zytokine, die auch bei der Abwehr von bakteriellen Infektionen gebraucht werden [5, 31].

Der TNF spielt in der Entstehung des Krankheitsbildes einer Malariainfektion eine entscheidende Rolle. Die systemische Ausschüttung des Zytokins bewirkt nämlich typische Symptome der unkomplizierten Malaria wie Fieber, Gliederschmerzen, Antriebslosigkeit und Kopfschmerzen [15]. Die exzessive Produktion führt weiterhin zu septischen Verläufen bis hin zum multiplen Organversagen, das auch bei komplizierten Verläufen von schwerer *Malaria tropica* beobachtet wird [7]. Die systemische Reaktion auf Zytokine kann jedoch nicht alle Charakteristika der *Malaria tropica* erklären, da TNF von allen Plasmodium-Spezies induziert wird, während nur die *P.-falciparum*-Parasitämie zu dem schwerwiegenden Krankheitsbild der komplizierten *Malaria tropica* führen kann [7].

Zahlreiche Studien belegen, dass *P. falciparum*, im Gegensatz zu den anderen vier humanpathogenen Plasmodium-Spezies, die Fähigkeit besitzt, sich an die postkapillären Gefäßendothelien zu binden [7]. Mikroskopische Untersuchungen verschiedener infizierter Gewebe konnten diese Bindung nachweisen. *P.-falciparum*-spezifische Proteine (v.a. *Erythrocyte-membrane-protein-1*, EMP-1) besitzen die Fähigkeit, an Membranproteine von Endothelien und Trophoblasten zu binden [31]. Ein sehr wichtiger endothelialer Oberflächenrezeptor scheint das *Intercellular-adhesion-molecule-1* (ICAM-1) zu sein. Es wird auch an zerebralen Gefäßwänden exprimiert. Die Bindung der Parasiten führt zu Gefäßokklusionen, die wahrscheinlich bei der Entstehung der zerebralen *Malaria tropica* beteiligt sind. Auch die ICAM-1-Transkription wird durch TNF induziert [40].

Bewohner von holoendemischen Gebieten entwickeln eine Teilimmunität gegenüber den Parasiten. Die Menschen zeigen häufig eine geringe Parasitämie vor, erkranken aber nicht an Malaria [5]. Pombo *et al.* haben gezeigt, dass die wiederholte Präsenz von Parasitämien sehr geringer Dichte diese Toleranz bewirken kann [28]. Die Entwicklung von parasitenspezifischen T-Zellen spielt hierbei eine zentrale Rolle [31]. Doch ähnlich wie bei der TNF, haben die T-Zellen nicht nur eine parasitenabwehren-

de Wirkung. Auch die Präsenz spezifischer T-Zellen scheint mitverantwortlich für die Entstehung der klinischen Symptome der Malaria tropica [31].

### **1.3 CD14**

Der CD14-Rezeptor ist ein 50–55 kD schweres Protein, das auf der Oberfläche der Monozyten exprimiert wird. Es trägt deshalb die Bezeichnung „Monozyten-Differenzierungs-Antigen“. Jedoch ist es ebenfalls ein reguläres Oberflächenprotein bei Makrophagen und polymorphonukleären Leukozyten. Gong zeigte 2002, dass auch Hepatozyten im Verlauf einer Endotoxämie das CD14-Gen exprimieren können [14].

Im menschlichen Körper ist CD14 in zwei verschiedenen Proteinformen präsent. Das Glykoprotein wird auf der einen Seite mit einem GPI-Anker an der Membran der Monozyten befestigt. Diese Form wird Membran-CD14 genannt (mCD14). Auf der anderen Seite sezernieren Monozyten sowie Hepatozyten auch ein lösliches Serum-CD14 (sCD14).

#### **1.3.1 DNS-Lokalisation**

Das Gen des Moleküls liegt auf dem Chromosom 5, Locus q31.1. Dieser DNS-Abschnitt beinhaltet zahlreiche Gene, die wichtige Immunmodulatoren, Rezeptoren sowie Wachstumsfaktoren verschiedener Zellen der myeloiden Reihe kodieren. Dass auch das Gen des CD14-Proteins auf diesem Abschnitt liegt, lässt Rückschlüsse bezüglich der Funktion zu.

#### **1.3.2 Funktion**

Wright und seine Arbeitsgruppe beschrieben 1990 erstmals die Funktion von CD14 [46]. Hierbei wurde die zentrale Rolle des Proteins für die angeborene Immunantwort deutlich. Das Molekül ist Rezeptor für den Komplex aus bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) und körpereigenen Lipopolysaccharid-bindenden-Proteinen (LBP). LPS wird durch LBP monomerisiert und so zu seinem zellulären CD14/TLR4/MD2-Rezeptorkomplex transportiert. Über die intrazelluläre Domäne vom Toll-like-Rezeptor-4 (TLR4) kommt es zur Aktivierung einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade. Sie stimuliert Transkriptionsfaktoren wie die Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase (MAPK) und den nukleären Faktor Kappa-B (NF-kappa-B), die dar-

aufhin unter anderem die Synthese proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel des TNF bewirken.

Die systemische Verbreitung der Zytokine nach Aktivierung der Signaltransduktionskaskade bewirkt den Beginn der inflammatorischen Reaktion des Immunsystems auf die eingedrungenen Erreger. Erhöhte TNF-Konzentrationen bewirken außerdem eine vermehrte CD14-Expression an den Zelloberflächen. Es kommt zu einer positiven Rückkoppelung. Eine Überstimulation des CD14-Rezeptors mit Endotoxinen kann zu dem schwerwiegenden Toxischen-Schock-Syndrom führen.

Diejenigen Zellen, die kein CD14 an ihrer Oberfläche besitzen, werden durch die Stimulation durch das freie sCD14 nach Bindung an den LPS-LBP-Komplex sensibilisiert. Dies spielt besonders bei den Endothel-Zellen eine bedeutende Rolle [9].

CD14 muss des Weiteren zwei verschiedene Rezeptorregionen besitzen, da das Protein körperfremde von körpereigenen Zellbestandteilen unterscheiden kann. So induziert es die Phagozytose von körpereigenen apoptotischen Zellen, ohne die genannte Entzündungskaskade in Gang zu setzen [10]. Der genaue zelluläre Mechanismus hierbei ist bisher nicht aufgeklärt.

### **1.3.3 Der Polymorphismus $CD14^{260}$**

Baldini identifizierte 1999 einen Einzelnukleotidpolymorphismus (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) in der *CD14*-Promotorregion auf der vermuteten Position  $CD14^{159}$ . Es handelt sich hierbei um eine Transition von Cytosin (C) zu Thymin (T),  $CD14^{159C>T}$  [3]. Baldini beschrieb eine Assoziation zwischen dem homozygoten Genotyp  $CD14^{159TT}$  und einer erhöhten Konzentration an sCD14, sowie eines verringerten IgE-Spiegels im Blut der Träger. Im Jahr 2000 wurde die Lokalisation des SNP von Shimada auf  $CD14^{260}$  korrigiert [34]. Diese Lokalisation wurde in die Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) eingefügt (rs2569190, [17]). Später zeigte Le Van, dass das Allel  $CD14^{260T}$  des *CD14*-Promotors eine geringere Affinität zu dem inhibierenden Transkriptionsfaktor Sp3 besitzt [22]. Träger der besagten Punktmutation aktivieren verstärkt die Transkriptionsproteine Sp1 und Sp2, was eine um 32% vermehrte Expression des CD14-Moleküls bewirkt. Die erhöhte Aktivität wurde ebenso bei ruhenden Monozyten wie auch bei Zellen beobachtet, die durch LPS stimuliert wurden. Dieses Phänomen konnte Le Van jedoch nicht

bei Hepatozyten (HepG2-Zellen) nachweisen. Sie vertritt die Theorie, dass in diesen Zellen andere Bindungsstellen für das inhibierende Sp3-Protein existieren müssen.

$CD14^{260T}$  wurde seitdem mit verschiedenen Pathologien wie koronaren Herzerkrankungen, Asthma und Sepsis assoziiert.

So postulierte Unkelbach 1999, dass es sich bei der Mutation um einen Risikofaktor für Myokardinfarkte handelt [38]. Ebenso fand die Arbeitsgruppe von Giacconi 2006 eine Korrelation zwischen dem Polymorphismus  $CD14^{260C>T}$  und dem schlechteren Verlauf einer Artherosklerose [12].

Nachdem Baldini 1999 einen Einfluss der Mutation auf den IgE-Spiegel bewiesen hatte [3], stellte Jackola 2006 eine Assoziation zwischen  $CD14^{260TT}$  und dem Risiko, am familiärem Asthma zu erkranken fest [18]. Doch diese These wurde unter anderem von der Arbeitsgruppe von Kabesch widerlegt [19].

Da das CD14-Protein eine Schlüsselfunktion in der angeborenen Immunantwort wahrnimmt, wurden Veränderungen von Immunantworten durch die Mutation diskutiert. Der homozygote Genotyp  $CD14^{260TT}$  wurde mit einem negativen Verlauf einer Sepsis in Verbindung gebracht [13]. Baier zeigte, dass bei maschinell beatmeten Neugeborenen mit dem Genotyp  $CD14^{260TT}$  zwar kein erhöhtes Sepsis-Risiko bestand, es jedoch häufiger zu multiplen Infektionen kam [2]. D'Avila beschrieb wiederum das Gegenteil: die homozygoten Träger der Mutation seiner Studiengruppe hatten einen besseren Verlauf einer Sepsis [9].

#### **1.3.4 Assoziation von CD14 mit Malaria**

Wenisch *et al.* verglichen die Blutkonzentrationen von TNF, IL-6 und sCD14 bei thailändischen Patienten mit schwerer Malaria mit solchen von gesunden Probanden und von Patienten mit einer endotoxininduzierten Sepsis [39]. Diese Studie belegte eine spezifisch erhöhte Konzentration von sCD14 bei schwerer Malaria tropica. Die Höhe der Konzentration konnte nicht in Relation mit dem Schweregrad der Erkrankung gebracht werden, aber die sCD14-Blutkonzentrationen der Malariaerkrankten überschritten diejenigen der Sepsis-Patienten. Nur zwei der 45 untersuchten Patienten wiesen eine zusätzliche Endotoxämie auf, so dass die sCD14-Konzentrationen keine Antwort auf Koinfektionen mit Gram-negativen Bakterien, sondern offensichtlich eine Reaktion des Immunsystems auf das *P. falciparum*, darstellten. Andererseits

wies Scragg *et al.* nach, dass die Zytokininduktion bei *P. falciparum*-Infektionen kein „klassischer“ Endotoxin-abhängiger Prozess ist [33]. Danach sind CD14<sup>+</sup>-Zellen zwar notwendig, aber allein nicht ausreichend für die Immuninduktion bei einer Plasmodieninfektion.

Bisher gibt es keine Publikationen, in denen eine mögliche Assoziation der oben beschriebenen Punktmutation *CD14*<sup>-260C>T</sup> mit Malaria untersucht wurde.

## **2. Material und Methoden**

Im folgenden Kapitel werden anfangs der Studienaufbau und die verwendeten Methoden in der Studie erläutert. Im Anschluss daran werden die angewandten Labormethoden zur Bestimmung der *CD14*-Genvarianten beschrieben.

### **2.1 Studiendesign**

#### **2.1.1 Studiengebiet**

Ghana liegt im tropischen Westafrika am Golf von Guinea. Die ehemals englische Kronkolonie hat eine Ausdehnung von 239.460 km<sup>2</sup>, grenzt im Osten an Togo, im Norden an Burkina Faso und im Westen an die Elfenbeinküste. Es gibt vier ethnische Hauptgruppen: die Akan, die Mole-Dagomba, die Ga und die Ewe. Die Akans bilden in dem Studiengebiet der vorliegenden Studie die Mehrheit.

Die Studie wurde im Afigya Sekyere District durchgeführt, der nördlich von Kumasi liegt und einer der 18 Distrikte der zentral gelegenen Ashanti-Region ist. Das Areal umfasst 714 km<sup>2</sup>, und die Bevölkerung wurde 2002 auf 117.653 Menschen geschätzt. Die neun Studiendörfer befinden sich im Regenwald der Region, wo Malaria hyper- bis holoendemisch auftritt. Die Inzidenz der Malaria steigt während der Regenzeiten von Mai bis September an, während sie ihren Tiefpunkt gegen Ende der Trockenzeit aufweist, die von November bis April vorherrscht [20]. Im Jahr 2002 starben in Ghana laut Angaben der WHO 23000 Menschen an Malaria [43]. Sie ist demzufolge nach HIV/AIDS die zweithäufigste Todesursache in der Region. Die WHO beschreibt des Weiteren, dass sie die Haupttodesursache bei Kindern unter dem fünften Lebensjahr (33% aller Todesursachen dieser Bevölkerungsgruppe) ist [43]. In 80-90% der diagnostizierten Infektionen handelt es sich um *P.-falciparum*-Parasitämien [24].

#### **2.1.2 Studienaufbau**

Die Studie ist Teil eines multizentrischen Forschungsprojektes, das nach Zustimmung der lokalen Ethikkommission im Oktober 2002 an drei verschiedenen Orten in Afrika begann. Kooperationspartner waren das Tropeninstitut Berlin und das Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen.

Bei dem Projekt handelte es sich um eine randomisierte kontrollierte Studie, die doppelblind verlief. Das Ziel war es, den Effekt der intermittierenden, präventiven Gabe

von Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP) als IPTi (*intermittent preventive anti-malarial treatment in infants*) im dritten, neunten und fünfzehnten Lebensmonat bei exponierten Kindern zu erforschen. Die Zeitpunkte der Medikamentengabe wurden dementsprechend gewählt, da sie so mit den Terminen der regulären Impfungen der WHO zusammenfallen konnten.

Das Interesse der Studie richtete sich auf den Einfluss auf die Malariainfektionen der Kleinkinder sowie auf die pharmakologische Verträglichkeit des Medikamentes.

Das zu untersuchende Medikament enthielt jeweils 250mg Sulfadoxin und 12,5mg Pyrimethamin. Das Placebopräparat bestand aus Laktose und Maisstärke. Beide Präparate wurden von der Schweizer Roche AG produziert.

Zwischen Januar 2003 und Januar 2004 wurden insgesamt 1070 drei Monate alte Kinder in die Studie aufgenommen, die ihren ständigen Wohnsitz in den Studiengengebieten hatten. Ein Team aus zwei Ärzten, einer Krankenschwester, einem Techniker und einem lokalen Mitarbeiter aus dem jeweiligen Studienort waren für die Aufnahme und die darauffolgenden monatlichen Untersuchungen verantwortlich.

Die zufällige Zuordnung der Gabe von SP beziehungsweise des Placebopräparates an die jeweiligen Kinder erfolgte elektronisch. Die Liste, in der die Zuordnung der Studienteilnehmer hinterlegt war, blieb bis zur Beendigung der Studie verschlossen.

Die erste Gabe des Präparates erfolgte im dritten Lebensmonat, die zweite im neunten und die dritte im jeweils 15. Lebensmonat der Kinder. Falls das Kind nach Medikamentengabe erbrach, erfolgte eine erneute Gabe 30 Minuten später.

Die Studienteilnahmedauer betrug für die einzelnen Teilnehmer jeweils 21 Monate. Die Kinder wurden einmal im Monat medizinisch untersucht. Während dieser Untersuchungen wurden die Körpertemperatur sowie die aktuelle Hämoglobinkonzentration gemessen und das Körpergewicht dokumentiert. Die Temperaturmessung erfolgte bis zum 12. Lebensmonat der Kinder rektal, danach wurde sie mit einem elektronischen Thermometer im Ohr erfasst (ThermoScan plus IRT 3520®, Braun). Die Hämoglobinkonzentration wurde photometrisch festgestellt (Hemocue). Einzelne Blutstropfen der Probanden wurden auf jeweils zwei Objektträgern asserviert und zu einem Ausstrich und dicken Tropfen präpariert. Die Färbung dieser erfolgte am selben Tag im Labor. Des Weiteren wurden die Mütter über den Verlauf des letzten Monats anamnestiziert. Die untersuchenden Ärzte dokumentierten Fieberschübe, Krankheits-

fälle sowie Krankenhausaufenthalte. Ebenso wurde nach möglichen Nebenwirkungen durch die SP-Gabe gefragt.

An den drei Terminen der IPTi-Gabe wurden den Studienteilnehmern zusätzlich 2,4 ml Blut entnommen, das in EDTA-Röhrchen gelagert wurde. Das Blut wurde am selben Tag in die verschiedenen Bestandteile aufgeteilt: Plasma, Lymphozyten, Granulozyten und mit Parasiten infizierte Erythrozyten.

Neben den monatlichen Untersuchungsterminen besuchten die lokal ansässigen Mitarbeiter die Familien in ihren Wohnsitzen, um deren aktuelle Lebenssituation zu betrachten, die Mütter zu weiteren Besuchen zu motivieren oder auch, um notwendige Medikamente zu bringen.

Eine Hämoglobinkonzentration  $<8$  g/dl, die während der klinischen Untersuchung festgestellt wurde, wurde mit Gabe von Eisensulfat und Folsäure behandelt. Bei der Gabe von Folsäure musste jedoch beachtet werden, dass diese erst sieben Tage nach IPTi-Gabe erfolgen durfte, um eine mögliche Hemmung der SP-Wirkung zu verhindern.

Bei akutem Fieber während der klinischen Untersuchung, beziehungsweise eines Fieberschubes innerhalb der letzten 48 Stunden in der Anamnese, wurde das asservierte Blut auf den Objektträgern der entsprechenden Probanden noch am selben Tag lichtmikroskopisch auf asexuelle Plasmodien untersucht. Im Falle einer nachgewiesenen Malariainfektion wurde am Folgetag die dreitägige medikamentöse Behandlung mit 4mg/kg Artesunat und 10mg/kg Amodiaquin pro Tag begonnen. Bei einer anhand der WHO-Leitlinien diagnostizierten schweren Malaria erfolgte die umgehende Einweisung in ein Krankenhaus.

Die Verlaufsdocumentationen der Ärzte wurden in eine dafür angelegte Datenbank (4th Dimension®) eingetragen.

Die Studie hat sich an die ethischen Grundprinzipien der Deklaration von Helsinki gehalten. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Kumasi hat die Studie untersucht und dieser zugestimmt. Die Einwilligung wurde von den Eltern der Probanden in Anwesenheit von unabhängigen Zeugen mit Fingerabdruck unterzeichnet.

### 2.1.3 Klinische Definitionen

#### *Malaria tropica*

Asexuelle *P.-falciparum*-Parasitämie (> 500 Parasiten/ $\mu$ l) mit

- Körpertemperatur  $\geq 38,0^{\circ}\text{C}$
- und/oder
- spontane Schilderung der Mutter bzw. des Erziehungsberechtigten über Fieber des Kindes in den letzten 48 Stunden.

Andere Ursachen für die Symptome wurden soweit wie möglich ausgeschlossen.

#### *Schwere Malaria*

Die Diagnose einer schweren Malaria wurde anhand der klinischen Symptome in Zusammenhang mit einer *P.-falciparum*-Parasitämie über 500 Parasiten/ $\mu$ l gestellt. Es galten die Kriterien der WHO von 2000 [44] (siehe Kapitel 1.1.1).

#### *Asymptomatische Parasitämie*

Nachgewiesene asexuelle *P.-falciparum*-Parasitämie im Blut des Kindes ohne auffallende Symptome und mit einer Körpertemperatur unter  $38^{\circ}\text{C}$ .

### 2.1.4 Laborarbeiten in Ghana

#### 2.1.4.1 Anfertigung der mikroskopischen Präparate

Der Ausstrich wurde mit der Methode nach Papenheim angefertigt.

1. Lufttrocknung des Blutausstrichs auf einem Objektträger
2. 2 Minuten Fixierung mit reinem Methanol
3. 20 Minuten Anfärbung mit Giemsa-Lösung
4. Abspülung mit Wasser und Lufttrocknung
5. Schutzglas mit *CV Mount* auf Ausstrich befestigen

**Protokoll 2.1:** Anfertigung eines Ausstriches nach Papenheim

Der „Dicke Tropfen“ wurde nach der Methode der Schnellfärbung präpariert.

1. Lufttrocknung des Blutropfens auf einem Objektträger
2. Ohne vorherige Fixierung 40 Minuten Anfärbung mit Giemsa Lösung
3. Abspülung mit Wasser und Lufttrocknung
4. Schutzglas mit *CV Mount* auf „Dickem Tropfen“ befestigen

**Protokoll 2.2:** Anfertigung eines „Dicken Tropfens“ nach der Methode der Schnellfärbung

#### **2.1.4.2 Mikroskopische Diagnostik**

Die mikroskopischen Präparate wurden nach WHO-Kriterien unter dem Lichtmikroskop untersucht [45]. Bei Auftreten von Parasiten wurde die Anzahl dieser auf bis zu 500 Leukozyten gezählt. Gametozyten wurden unabhängig vermerkt. Um den Plasmodiumstamm zu bestimmen, wurde aufgrund der erhöhten Spezifität der Ausstrich verwendet. Die Höhe der Parasitämie pro Mikroliter Blut wurde nach folgender Formel berechnet:

Gezählte Parasitenanzahl x 8000/500 (angenommene Leukozytenzahl 8000/ $\mu$ l).

Alle Blutproben wurden im Laufe der Studie unabhängig von einander von zwei lokalen Laborkräften untersucht. Bei widersprüchlichen Ergebnissen wurden die Ausstriche ein drittes Mal gezählt.

### **2.2. Laboranalysen des *CD14*-Promotors**

Die amplifizierte Promotorregion des *CD14*-Gens wurde vorerst mit Hilfe der Software SeqScape® von Applied Biosystem (ABI) sequenziert. Hierfür wurde das Blut von 23 Probanden ghanaischer Abstammung verwendet. Dieses Blut stammte aus den Probenbeständen des Bernhard-Nocht-Instituts. Mit der Untersuchungstechnik wurde der amplifizierte DNS-Abschnitt auf Einzelpunktmutationen (SNP, engl. *Single Nucleotid Polymorphism*) untersucht, um eventuell noch nicht bekannte SNP der ghanaischen Population zu identifizieren. Nach Erfassung der SNP wurde das Blut der 1070 Studienprobanden daraufhin untersucht.

#### **2.2.1 PCR-Amplifikation des *CD14*-Promotors**

Der zu untersuchende Genabschnitt wurde mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*) vervielfältigt. Hierbei werden nur die gewünschten Fragmente eines Gens durch spezifische Oligonukleotide (engl. *Primer*) in mehreren Zyklen amplifiziert. *Primer* sind synthetisch hergestellte DNS-Fragmente, die zu einem spezifischen DNS-Abschnitt passen und sich an jenen binden. Die zu amplifizierende Gensequenz wird durch zwei *Primer* (*Forward-Primer* und *Reverse-Primer*) eingerahmt.

In mehreren Schritten bauen hitzeresistente Transkriptions-Enzyme (*Taq-Polymerase*) an den spezifisch gebundenen *Primern* Basen an (die in dem dNTP-Mix enthalten sind) und replizieren das erwünschte Fragment. Durch wiederholtes Erhit-

zen und Herunterkühlen wird das Fragment in jedem Zyklus verdoppelt. So entsteht in kurzer Zeit eine sehr große Anzahl an erwünschten DNS-Fragmenten.

Die verwendeten *Primer* wurden von der Firma MWG Biotech hergestellt.

Die *Forward*- und *Reverse-Primer* für die Amplifikation der *CD14*-Promoterregion haben folgende Basensequenz:

*Forward Primer* : ggtgccaacagatgaggttcac

*Reverse Primer*: ggctcccagtggcacgc

2 µl DNS 0,5 µl <i>Forward-Primer</i> (10 pmol/µl; MWG Biotech) 0,5 µl <i>Reverse-Primer</i> (10 pmol/µl; MWG Biotech) 0,2 µl dTNP (10 mM von jeder Base; Roth) 0,05 µl Taq (Qiagen) 2 µl Q-Solution (5x, Qiagen) 1 µl Puffer (10x, Qiagen) 3,75 µl Wasser
---

**Protokoll 2.3:** Zusammenstellung für die Amplifikation der *CD14*-Promotorregion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion verlief in folgenden Schritten:

Initiale Denaturierung: 94°C über 4 Minuten
---

Zyklusablauf (35x):
---------------------

Denaturierung: 94°C über 30 Sekunden
--------------------------------------

<i>Annealing</i> : 64°C über 60 Sekunden
--

Extension: 72°C über 60 Sekunden
----------------------------------

Finale Extension: 72°C über 4 Minuten
---------------------------------------

**Protokoll 2.4:** Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für die Amplifikation der *CD14*-Promotorregion

Diese Amplifikationsprodukte wurden mit Hilfe von Sephadex<sup>TM</sup>-Platten (Amersham Biosciences) aufgereinigt.

Sephadex <sup>TM</sup> G-50-Pulver + 300 µl HPLC-Wasser 3 Stunden Aufquellung Abzentrifugierung von überschüssigem Wasser (5 Minuten bei 3000 Umdrehungen/min)
---

**Protokoll 2.5:** Erstellung von Sephadex<sup>TM</sup>-Platten

Die PCR-Produkte wurden daraufhin auf die Sephadex<sup>TM</sup>-Platte pipettiert, ohne die aufgequollene Sephadex<sup>TM</sup>-Masse zu durchstechen. Durch erneutes Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen/min über fünf Minuten wurden die Amplifikate durch die Platten hindurch in die darunterliegende Platte gepresst und somit gereinigt.

### 2.2.2. Zyklische Sequenzierung und Analyse der erfassten SNP durch SeqScape<sup>®</sup>

Die zyklische Sequenzierung erfolgt, indem die PCR-Amplifikate erneut mit demselben *Forward-Primer* gemischt werden. Es werden dNTP, Taq-Polymerase und fluoreszierende Stopp-Basen (ddNTP) hinzugefügt (Big Dye<sup>®</sup>, ABI). Bei wiederholter Ablesung wird die DNS-Replikation jeweils nach Einbau einer farbigen ddNTP abgebrochen.

So entstehen ungleich lange DNS-Produkte, die jeweils mit einer farblich unterschiedlich markierten Base enden, so dass die gesamte Abfolge von Basen des Abschnittes erfasst werden kann.

1 µl des aufgereinigten PCR-Produktes 3 µl Puffer (1x, ABI) 1 µl Big Dye <sup>®</sup> (ABI) 0,5 µl <i>Forward-Primer</i> (MWG) 4,5 µl HPLC-Wasser
---

**Protokoll 2.6:** Zusammenstellung für die Amplifikation von *CD14*<sup>-260</sup> und *CD14*<sup>-481</sup> mit Big Dye<sup>®</sup>

96°C über 5 Minuten Anschließend folgender Zyklus (24x) 96°C über 30 Sekunden 50°C über 15 Sekunden Finale Extension: 60°C über 4 Minuten
---

**Protokoll 2.7:** Amplifikation von *CD14*<sup>-260</sup> und *CD14*<sup>-481</sup> mit Big Dye<sup>®</sup>

Von diesen Produkten wurden jeweils 4 µl mit 12 µl HIDI-Formamid verdünnt und anschließend mit Hilfe des Sequenzierungsgerätes ABI PRISM<sup>TM</sup> 377 analysiert.

Dieses sortiert die Amplifikate durch elektrophoretische Auftrennung nach ihrer Fragmentlänge. Jede der fluoreszierenden Basen wird durch eine ganz spezifische Wellenlänge aktiviert und strahlt dann ein Signal aus, so dass das Gerät durch Laserstrahlung die verschiedenen Basen erkennen und nacheinander einlesen kann.

Durch die Software SeqScape® v2.1.1. wird die Sequenz des zu analysierenden Abschnittes visualisiert. Bei Eingabe einer Konsensussequenz kann die Software Abweichungen orten und als Mutation kennzeichnen.

### **2.2.3 Genotypisierung durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode (FRET)**

Nachdem bei der Sequenzierung in den Blutproben der 23 ghanaischen Probanden Punktmutationen in der *CD14*-Promotorregion nachgewiesen wurden, erfolgte die Genotypisierung der Studienteilnehmer mit Hilfe der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode (FRET).

Für die FRET-Methode wird ein fluoreszenzmarkierter Sensor synthetisch kreiert, der aufgrund der Basensequenz spezifisch zu einer bekannten Mutationssequenz passt. Gleichzeitig wird ein Anker gesucht, der auf eine Region in der Nähe des Sensors passt. Auch dieser ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. In dieser Arbeit wurden folgende Farbstoffe verwendet: Fluorescein, Cy5 und LC Red 640.

Im Laufe der Polymerase-Ketten-Reaktion werden demnach nicht nur die bestimmten Sequenzen amplifiziert, sondern an jedes Amplifikat ein Sensor und ein Anker gebunden.

Das automatische Genotypisierungsgerät (Light-Typer®, Roche) denaturiert bei gleichmäßig steigender Temperatur die einzelnen Stränge und regt gleichzeitig den Farbstoff des Ankers mit Laserlicht bestimmter Wellenlängen an, der daraufhin die Energie an den Farbstoff des Sensors weitergibt. Dieser emittiert wiederum Licht mit einer veränderten Wellenlänge. Die Strahlung lässt bei steigender Temperatur nach, da der Sensor von der Basensequenz gelöst wird. Diese Wellenemissionen werden von dem Light-Typer® aufgenommen und in Form von temperaturabhängigen Schmelzkurven dargestellt.

Für die Analyse wurde die DNS aus Granulozytenpräparaten extrahiert, die dem Blut der Studienteilnehmer entnommen wurden.

Die verwendeten *Forward*- und *Reverse-Primer* für die Amplifikation von *CD14*<sup>-260</sup> für die FRET-Reaktion haben folgende Basensequenz:

*Forward-Primer*: ggacactgccaggagac  
*Reverse-Primer*: tcttctccgagccgc

Die Basensequenz vom verwendeten Sensor und Anker für die Amplifikation von *CD14*<sup>-260</sup> für die FRET-Reaktion lautet:

Sensor für den Wildtyp: ggaggggggcccgtaacag-Fluorescein  
Anker : Light-Cycler 640-aaggattctgcagggcatctaggttct-Phosphat

Die Denaturierungstemperatur, die den Sensor von der *CD14*<sup>-260C</sup>-Sequenz lösen konnte, lag bei 65,4°C. Bei Vorliegen des Allels *CD14*<sup>-260T</sup> löste sich der Sensor bereits bei 58,7°C. Die Schmelztemperatur des Ankers betrug 70,9°C.

2 µl DNS (5 ng/µl)
1 µl Puffer BD, ohne MgCl <sub>2</sub> (10x; Pharmacia)
1 µl Solution S (Solis)
0,40 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1 µl <i>Forward-Primer</i> (10 pmol/µl; MWG)
0,2 µl <i>Reverse-Primer</i> (10 pmol/µl; MWG)
0,5 µl Sensor (4 pmol/µl; MWG)
0,5 µl Anker (4 pmol/µl; MWG)
0,2 µl dTNP (10 mM jede Base; Roth)
0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl; FirePol)

**Protokoll 2.8:** Zusammenstellung für die Amplifikation von *CD14*<sup>-260</sup> für die FRET-Reaktion

Denaturierung: 94°C über 3 Minuten
Zyklus (45x):
94°C über 20 Sekunden
55°C über 30 Sekunden
72°C über 30 Sekunden
Finale Extension: 72°C über 5 Minuten

**Protokoll 2.9:** PCR-Zyklen für die Amplifikation von *CD14*<sup>-260</sup> für die FRET-Reaktion

Es handelte sich hierbei um eine asymmetrische PCR. In diesem Verfahren entstehen bei erhöhter Zyklenzahl nur noch DNS-Stränge, die in Richtung von 5' zu 3' gelesen werden. Somit wird die Konkurrenz um die *Primer* verhindert und in großer Überzahl die gewünschte Sequenz amplifiziert, an die sich der Sensor und der Anker binden können.

Die verwendeten *Forward*- und *Reverse-Primer* für die Amplifikation von *CD14*<sup>-481</sup> für die FRET-Reaktion haben folgende Basensequenz:

*Forward-Primer:* aaggaaggggct  
*Reverse-Primer:* aactcttcggctgc

Die Basensequenz vom verwendeten Sensor und Anker für die Amplifikation von *CD14*<sup>481</sup> für die FRET-Reaktion lautet:

Sensor für die Mutation: Cy5-ccaggattgcataaactgt-Phosphat  
Anker: cacagaggaggaactgaatgaca-Fluorescein

Der Sensor hatte eine Schmelztemperatur bei 57,4°C. Der Sensor löste sich von dem Allel *CD14*<sup>481G</sup> bereits bei 50,6°C, während die Verbindung zwischen dem Anker und der DNS erst bei 66,1°C denaturierte.

2 µl DNS (5 ng/µl)
1 µl Puffer BD, ohne MgCl <sub>2</sub> (10x; Pharmacia)
1 µl Solution S (Solis)
0,40 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1 µl <i>Forward-Primer</i> (10 pmol/µl; MWG)
0,2 µl <i>Reverse-Primer</i> (10 pmol/µl; MWG)
0,5 µl Sensor (4 pmol/µl; MWG)
0,5 µl Anker (4 pmol/µl; MWG)
0,2 µl dTNP (10 mM jede Base; Roth)
0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl; FirePol)

**Protokoll 2.10:** Zusammenstellung für die Amplifikation von *CD14*<sup>481</sup> für die FRET-Reaktion

Für die Amplifikation der Sequenz um *CD14*<sup>481</sup> für die FRET-Reaktion wurden dieselben PCR-Zyklen verwendet wie für die vorher beschriebene Amplifizierung von *CD14*<sup>260</sup> (siehe Protokoll 2.9).

Nach der Analyse im Light-Typer<sup>®</sup> wurden die Schmelzkurven ausgewertet und jedem Studienprobanden der jeweilige Genotyp zugeordnet. Die Ergebnisse wurden anschließend in die Datenbank (4th Dimension<sup>®</sup>) eingegeben.

## 2.4 Statistische Auswertungen

Die Daten wurden in einer relationalen Datenbank (4th Dimension) organisiert, die einen Passwort-Schutz mit individuellem Zugang für verschiedenen Bereiche ermöglichte. Persönliche Daten der Studienteilnehmer waren anonymisiert. Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe der Statistiksoftware Stata<sup>®</sup> (Version 9.0; StataCorp).

Die Heterogenität der Verteilung der Genotypgruppen auf die Studienpopulation wurde mit dem  $\chi^2$ -Test bei diskreten Werten und dem Wilcoxon-Test bei kontinuierlichen Werten untersucht. Bei allen statistischen Analysen wurden *P*-Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

Das Risiko von Individuen mit bestimmten Genotypen für die untersuchten Malaria-Phänotypen wurde als Inzidenzdichte (Anzahl der Episoden pro Personenjahr unter Risiko) und kumulative Inzidenz (Anzahl der Personen mit mindestens einer Episode in dem Untersuchungszeitraum) berechnet. Das Relative Risiko wurde mittels Poisson'scher Regression geschätzt mit dem 95% Vertrauensintervall angegeben. Von dem jeweiligen Risikozeitraum wurden 21 Tage nach einer Malariaepisode oder nach Einnahme eines Antimalariamittels abgezogen. Der Effekt der Genotypen auf die Phänotypen wurde auf den Studienarm der klinischen Studie (IPTi mit Sulfadoxin-Pyrimethamin-Wirkung) korrigiert.

Die erfassten Genotypfrequenzen wurden mit den theoretisch erwarteten Frequenzen nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz statistisch verglichen.

### 3. Ergebnisse

In dem folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der statistischen Analysen im Einzelnen aufgeführt. Als Erstes erfolgt die Ausführung der Laborergebnisse der erfassten Polymorphismen. Danach werden die gefundenen Einflüsse dieser Mutationen auf die Infektionsdynamik von *P. falciparum* beschrieben.

#### 3.1 Polymorphismen der *CD14*-Promotorregion und Genotypfrequenzen

In der untersuchten Studiengruppe wurden im *CD14*-Promotor zwei Einzelnukleotidpolymorphismen auf den Loci *CD14*<sup>260</sup> und *CD14*<sup>481</sup> gefunden.

Auf *CD14*<sup>260</sup> wurde eine Transition von Cytosin (C) zu Thymin (T) nachgewiesen (*CD14*<sup>260C>T</sup>). In der NCBI-Datenbank ist dieser SNP bereits aufgelistet (rs2569190, [17]). In der Datenbank ist das Allel *CD14*<sup>260C</sup> als der „Wildtyp“ festgelegt. Die heterozygoten (*CD14*<sup>260CT</sup>) sowie die homozygoten Träger von Thymin (*CD14*<sup>260TT</sup>) wurden demnach als „mutierte“ Genotypen angesehen. In der Studiengruppe waren alle drei Genotypen nachweisbar. Bei 77 Probanden konnte trotz wiederholter PCR-Amplifikation kein Genotyp bestimmt werden.

Die untersuchte Mutation auf *CD14*<sup>481</sup> wurde bislang nicht in die NCBI-Datenbank aufgenommen und ist auch nicht in der Fachliteratur beschrieben. Es handelt sich um eine Transition von Adenin (A) zu Guanin (G) (*CD14*<sup>481A>G</sup>). Das Allel *CD14*<sup>481A</sup> wird aufgrund der höheren Frequenz als „Wildtyp“ bezeichnet. In der untersuchten Studiengruppe fanden sich 3,7% heterozygote Träger des Allels *CD14*<sup>481G</sup>. Homozygot mutante Träger wurden nicht gefunden. Aufgrund stark repetitiver DNS-Sequenzen war die Analyse dieser Mutation erschwert. Dies ist der Grund, weshalb 166 Blutproben nach wiederholten Versuchen nicht typisiert werden konnten.

In der folgenden Tabelle 3.1 ist die Frequenz der einzelnen Genotypen beschrieben. Diese Daten wurden mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht verglichen.

**Tabelle 3.1:** Genotypfrequenzen auf Position  $CD14^{260}$  im Vergleich mit den theoretischen Erwartungen nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz

Genotypen	Beobachtete Genotypfrequenz n <sup>a</sup> =993 (%)	Erwartete Genotypfrequenz <sup>b</sup> n <sup>a</sup> =993 (%)	P <sup>c</sup>
$CD14^{260CC}$	511 (47,8)	512 (51,6)	0,938
$CD14^{260CT}$	404 (37,8)	402 (40,5)	
$CD14^{260TT}$	78 (7,3)	79 (8,0)	

<sup>a</sup> Fallzahl, die in die Analyse aufgenommen wurde. Bei 77 Probanden konnte trotz wiederholter versuchter PCR-Amplifikationen kein Genotyp ermittelt werden

<sup>b</sup> Berechnet aus den beobachteten Allelfrequenzen entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gesetz

<sup>c</sup> p-Werte wurden mit dem  $\chi^2$ -Test errechnet und beziehen sich auf die Gesamtverteilung der Genotypen

**Tabelle 3.2:** Frequenzen des Allels  $CD14^{260}$

Allele	Allelfrequenz n <sup>a</sup> =1986 (%)
$CD14^{260C}$	1426 (71,8)
$CD14^{260T}$	560 (28,2)

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse mit aufgenommen wurde. Bei 77 Probanden konnte trotz wiederholter versuchter PCR-Amplifikationen kein Genotyp bestimmt werden

**Tabelle 3.3:** Genotypfrequenzen auf Position  $CD14^{481}$  im Vergleich mit den theoretischen Erwartungen nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz

Genotypen	Beobachtete Genotypfrequenz n <sup>a</sup> =904 (%)	Erwartete Genotypfrequenz <sup>b</sup> n <sup>a</sup> =904 (%)	P <sup>c</sup>
$CD14^{481AA}$	864 (95,6)	865 (95,7)	1,0
$CD14^{481AG}$	40 (4,4)	39 (4,4)	
$CD14^{481GG}$	0 (0,0)	0 (0,0)	

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse mit aufgenommen wurde. Bei 166 Probanden konnte trotz wiederholter versuchter PCR-Amplifikationen kein Genotyp ermittelt werden

<sup>b</sup> Berechnet aus den beobachteten Allelfrequenzen entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gesetz

<sup>c</sup> p-Werte wurden mit dem  $\chi^2$ -Test errechnet und beziehen sich auf die Gesamtverteilung der Genotypen

**Tabelle 3.4:** Allelfrequenzen auf Position *CD14*<sup>-481</sup>

Allele	Allelfrequenz n <sup>a</sup> =1808 (%)
<i>CD14</i> <sup>-481A</sup>	1772 (98)
<i>CD14</i> <sup>-481G</sup>	36 (2)

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse mit aufgenommen wurde. Bei 166 Probanden konnte trotz wiederholter versuchter PCR-Amplifikationen kein Genotyp bestimmt werden

Entsprechend dem *p*-Wert konnte die Nullhypothese, dass die Verteilung der gefundenen Genotypfrequenzen nicht nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz abweicht, nicht widerlegt werden.

### **3.2 Verteilung der *CD14*-Genotypen in der Untersuchungsgruppe**

Bevor der mögliche Einfluss der Mutationen des *CD14*-Gens auf das Risiko einer Malaria erfasst werden konnte, musste die Verteilung der Genotypen in der Studienpopulation untersucht werden. Es wurden hierbei verschiedene genetische, sozioökonomische, soziodemographische und veränderliche Faktoren berücksichtigt, die einen potentiellen Einfluss auf die Ergebnisse aller weiteren Untersuchungen hatten.

Es wurden Interaktionen sowie auch *Confounder*-Phänomene mit weiteren Mutationen untersucht, die im Zusammenhang mit dieser Studie von anderen Mitgliedern der Forschungsgruppe analysiert worden sind. Da keine Interaktionen festgestellt wurden, werden diese Untersuchungen im Zusammenhang mit den verschiedenen Mutationen hier nicht weiter erwähnt.

#### **3.2.1 Verteilung der *CD14*-Genotypen und Allelen in der SP- und Placebogruppe**

Laut Studienprotokoll haben die Hälfte der Probanden Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP) als IPTi erhalten, so dass zuerst eine zufällige ungleiche Verteilung der Genotypen in diesen beiden Gruppen ausgeschlossen werden musste.

**Tabelle 3.5:** Verteilung der Genotypen von  $CD14^{260}$  in der SP- und Placebo-Gruppe

	$CD14^{260CC}$ n <sup>a</sup> =511 (%)	$CD14^{260CT}$ n <sup>a</sup> =404 (%)	$CD14^{260TT}$ n <sup>a</sup> =78 (%)	P <sup>b</sup>
Placebo	255 (49,9)	200 (49,5)	43 (55,1)	0,653
Sulfadoxin-Pyrimethamin	256 (50,1)	204 (50,5)	35 (45,9)	

<sup>a</sup>Bei 77 Probanden konnte trotz wiederholter versuchter PCR-Amplifikationen kein Genotyp bestimmt werden

<sup>b</sup>p-Werte wurden mit dem  $\chi^2$ -Test errechnet

**Tabelle 3.6:** Verteilung der Genotypen von  $CD14^{481}$  in der SP- und Placebo-Gruppe

	$CD14^{481AA}$ n <sup>a</sup> =864 (%)	$CD14^{481AG}$ n <sup>a</sup> =40 (%)	P <sup>b</sup>
Placebo	431 (49,9)	22 (55,0)	0,527
Sulfadoxin-Pyrimethamin	433 (50,1)	18 (45,0)	

<sup>a</sup>Bei 166 Probanden konnte trotz wiederholter versuchter PCR-Amplifikationen kein Genotyp bestimmt werden

<sup>b</sup>p-Werte wurden mit dem  $\chi^2$ -Test errechnet

Da sich kein Hinweis auf eine ungleiche Verteilung der  $CD14$ -Mutationen in den Behandlungsarmen fand, wurden beide Arme im Folgenden zusammengefasst.

### 3.2.2 $CD14$ -Genotypen und verschiedene Charakteristika der Studienpopulation

Es wurden verschiedene individuelle Charakteristika der Untersuchungspopulation bezüglich ihrer Verteilung auf die  $CD14$ -Genotypgruppen untersucht, um mögliche *Confounding*-Faktoren zu erkennen. Keines der untersuchten Charakteristika war statistisch signifikant mit den  $CD14$ -Genotypen assoziiert, so dass nicht von einem relevanten *Confounding* ausgegangen wurde und keine entsprechenden Korrekturen bei den Analysen angewendet wurden.

**Tabelle 3.7:** Verteilung der Genotypen von  $CD14^{260}$  zum Zeitpunkt der Aufnahme der Probanden

	$CD14^{260CC}$ n <sup>a</sup> =511	$CD14^{260CT}$ n <sup>a</sup> =404	$CD14^{260TT}$ n <sup>a</sup> =78	P <sup>b</sup>
Geschlecht – Fallzahl (%)				
Männlich	256 (50,1)	209 (51,7)	37 (47,4)	
Weiblich	255 (49,9)	195 (48,3)	41 (52,6)	0,752
Alter in Wochen– Mittelwert (SA)				
Alter bei Studienbeginn	12,3 (±1,6)	12,4 (±1,6)	12,2 (±1,7)	0,578
z-Wert <sup>c</sup> - Mittelwert (SA)				
Geburtsgewicht	0,41 (±1,1)	0,31 (±1,2)	0,50 (±1,1)	0,267
Nutzung von Moskitoschutz <sup>d</sup> – Fallzahl (%)				
Ja	246 (48,1)	200 (49,5)	31 (39,7)	
Nein	217 (42,5)	175 (43,3)	31 (39,7)	
Fehlende Daten	48 (9,4)	29 (7,2)	16 (20,5)	0,414
Entfernung zur Studienklinik <sup>e</sup> – km (%)				
< 0,5 km	129 (25,2)	103 (25,5)	24 (30,8)	
0,5 – 1 km	215 (42,1)	162 (40,1)	28 (35,9)	
> 1 km	161 (31,5)	137 (33,9)	24 (30,7)	
Fehlende Daten	6 (1,2)	2 (0,5)	2 (2,6)	0,600
Hämoglobin (g/dL) - Mittelwert (SA), zum Zeitpunkt des Studienbeginns	10,3 (±1,3)	10,3 (±1,4)	10,5 (±1,4)	0,137

SA, Standardabweichung

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>p-Werte ermittelt mit dem Kruskal-Wallis-Test oder dem  $\chi^2$ -Test.

<sup>c</sup>Nach den standardisierten Gewichtstabellen des *Center for Disease Control* (CDC) [6].

<sup>d</sup>Die Information wurde durch Interviews mit den teilnehmenden Müttern erhalten. Als Moskitoschutz wurden die Verwendung unbehandelter Bettnetze, Pestizid-behandelter Bettnetze sowie Fenstergitter gewertet.

<sup>e</sup>Die Positionen wurden mit einem GPS-Gerät (*Global Position System*) gemessen.

**Tabelle 3.8:** Verteilung der Genotypen von  $CD14^{481}$  zum Zeitpunkt der Aufnahme der Probanden

	$CD14^{481AA}$ n <sup>a</sup> =864	$CD14^{481AG}$ n <sup>a</sup> =40	P <sup>b</sup>
Geschlecht – Fallzahl (%)			
Männlich	436 (50,5)	25 (62,5)	
Weiblich	428 (49,5)	15 (37,5)	0,137
Alter in Wochen – Mittelwert (SA)			
Alter bei Studienbeginn	12,4 (±1,6)	12,5 (±1,6)	0,644
z-Wert <sup>c</sup> - Mittelwert (SA)			
Geburtsgewicht	0,36 (±1,1)	034 (±1,2)	0,956
Nutzung von Moskitonetzen <sup>d</sup> – Fallzahl (%)			
Ja	421 (48,7)	19 (47,5)	
Nein	363 (42,0)	19 (47,5)	
Fehlende Daten	80 (9,3)	2 (5)	0,655
Entfernung zur Studienklinik <sup>e</sup> - Km (%)			
< 0.5 km	229 (26,5)	6 (15)	
0.5 – 1 km	346 (40,0)	20 (50)	
> 1 km	281 (32,6)	14 (35)	
Fehlende Daten	8 (0,9)	0	0,344
Hämoglobin [Hb (g/dL)] - Mittelwert (SA), zum Zeitpunkt des Studienbeginns			
	10,4 (±1,4)	10,3 (±1,2)	0,753

SA, Standardabweichung

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>p-Werte ermittelt mit dem Kruskal-Wallis-Test oder dem  $\chi^2$ -Test.

<sup>c</sup>Nach den standardisierten Gewichtstabellen des *Center for Disease Control* (CDC) [6].

<sup>d</sup>Die Information wurde durch Interviews mit den teilnehmenden Müttern erhalten. Als Moskitoschutz wurden die Verwendung unbehandelter Bettnetze, Pestizid-behandelter Bettnetze sowie Fenstergitter gewertet.

<sup>e</sup>Die Positionen wurden mit einem GPS-Gerät (*Global Position System*) gemessen.

### 3.3 Assoziation der $CD14$ -Genotypen mit *Plasmodium-falciparum*-Parasitämie

Um eine statistisch relevante Abweichung zwischen den Genotypen der beiden untersuchten Mutationen  $CD14^{260C>T}$  und  $CD14^{481A>G}$  bezüglich der Höhe und der Häufigkeit von *Plasmodium-falciparum*-Parasitämien erfassen zu können, wurden die Parasitämien nach Höhe der Parasitendichte sortiert und in aufsteigende Gruppen

unterteilt. Die Werte wurden um den Einflussfaktor der Sulfadoxin-Pyrimethamin-Einnahme korrigiert. Es wird in den folgenden Texten, Tabellen und Graphiken das jeweils adjustierte relative Risiko verwendet.

Zur Veranschaulichung der statistisch relevanten *p*-Werte wurden diese in den Graphiken angegeben. Auf eine weitere Erwähnung derer in den Tabellen wurde verzichtet. Statistisch nicht signifikante *p*-Werte wurden nicht abgebildet.

### 3.3.1 Assoziation von *CD14*<sup>-260</sup> mit *Plasmodium-falciparum*-Parasitämie

Zunächst wurden die Parasitämien der homozygoten sowie der heterozygoten Träger der Mutation *CD14*<sup>-260C>T</sup> jeweils mit den Fallzahlen des homozygoten Wildtyps verglichen. Im Verlauf erfolgten ebenso Vergleiche zwischen den Trägern des mutierten Allels *CD14*<sup>-260T</sup>.

**Tabelle 3.9:** Inzidenzdichte von *P.-falciparum*-Infektionen bei den Genotypen von *CD14*<sup>-260</sup>

Parasitämie (/µl)	n <sup>a</sup>	<i>CD14</i> <sup>-260CC</sup>			<i>CD14</i> <sup>-260CT</sup>			<i>CD14</i> <sup>-260TT</sup>		
		Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>
Insg.>0	19219	2170	653,4	3,32	1859	525,2	3,54	290	104,5	2,77
1-499	19324	691	681,4	1,01	546	550,5	0,99	96	108,6	0,88
500-4999	19345	847	688,0	1,23	728	551,9	1,32	101	109,2	1,32
5000-49999	19378	527	702,5	0,75	466	564,9	0,82	71	110,9	0,64
>50000	19414	130	708,5	0,18	146	570,2	0,26	27	112,2	0,24

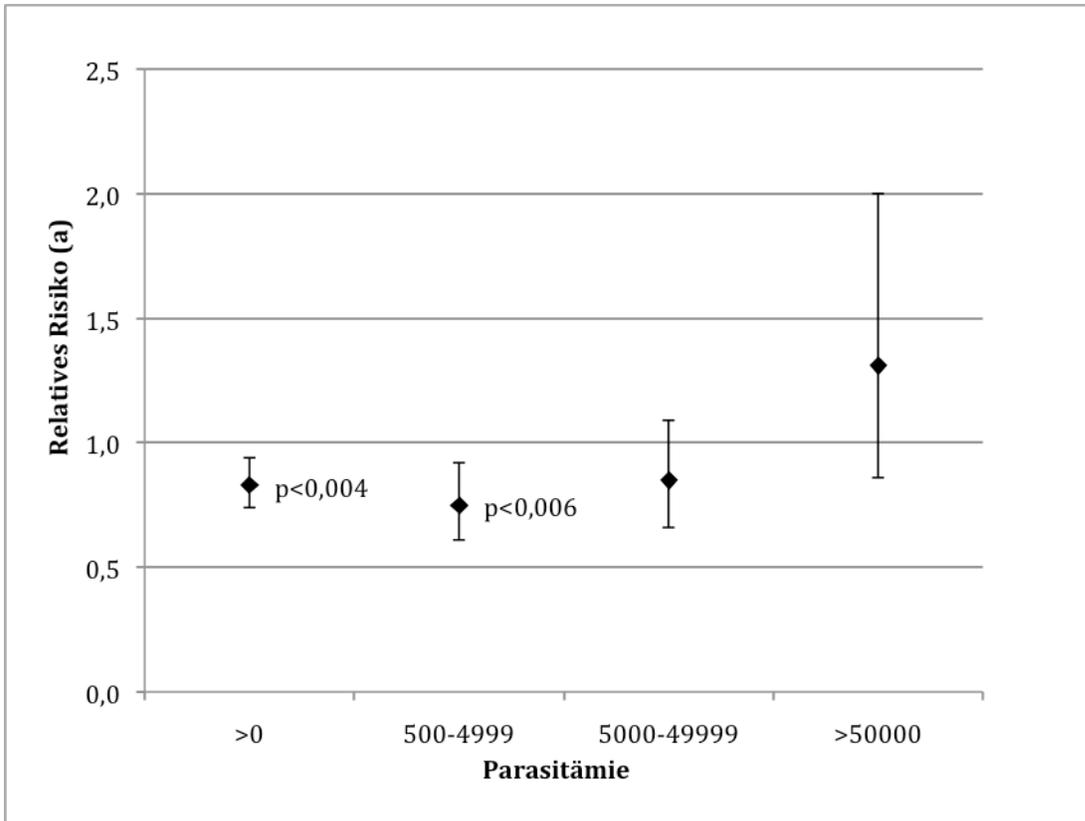
PYAR, *Persons Year at Risk*, Personenrisikojahre

Insg.>0, Alle erfassten *P.-falciparum*-Parasitämien insgesamt (>0 Parasiten/µl)

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>Fallzahl pro Person/Jahr

Die Träger des mutierten Genotyps *CD14*<sup>-260TT</sup> hatten im Vergleich mit den homozygoten Trägern des Wildtyps ein um 16% vermindertes Risiko einer *P.-falciparum*-Infektion. Dieser relative Schutz war jedoch bei erhöhten Parasitämien aufgehoben. Die homozygot mutierten Träger wiesen sogar ein um 31% erhöhtes Risiko für eine Parasitämie mit über 50000 Parasiten/µl Blut auf. Allerdings war die Fallzahl in dieser Gruppe niedrig (n=27). Eine deutliche Tendenz ist jedoch trotz großem Konfidenzintervall in der Abbildung 3.1 zu erkennen.



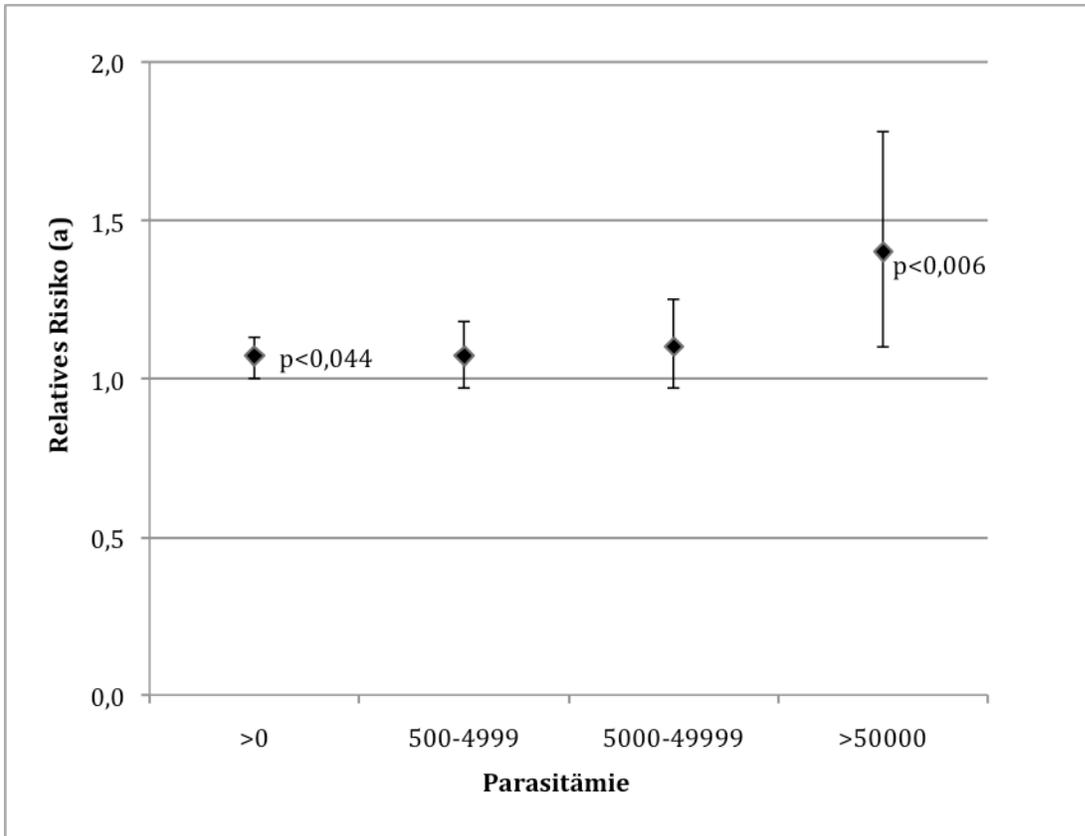
**Abbildung 3.1:** Häufigkeit und Dichte der *P.-falciparum*-Parasitämien der Träger des Genotyps *CD14*<sup>-260TT</sup> im Vergleich zu *CD14*<sup>-260CC</sup>. Zuerst wurde die Häufigkeit aller Parasitämien insgesamt untersucht und dann der Parasitendichte nach in aufsteigenden Gruppen.

Die Fehlerindikatoren stellen die Konfidenzintervalle dar.

>0, Alle erfassten *P.-falciparum*-Parasitämien insgesamt (>0 Parasiten/ $\mu$ l)

<sup>(a)</sup>Das relative Risiko wurde um den Einflussfaktor der Sulfadoxin-Pyrimethamin-Einnahme korrigiert.

Die heterozygoten Träger *CD14*<sup>-260CT</sup> trugen im Vergleich zu den homozygoten Trägern des Wildtyps ein um 7% erhöhtes Risiko für eine *P.-falciparum*-Infektion. Die Unterschiede der Risiken beider Genotypen wurden in der Anwesenheit von hohen Parasitendichten im Blut der Probanden deutlich. Diese Tendenz der Parasitämie-Höhe kann der Abbildung 3.2 entnommen werden. Die heterozygoten Träger hatten im Vergleich mit den homozygoten Trägern des Wildtyps ein um 40% erhöhtes Risiko, an einer Parasitämie über 50000 *P. falciparum*/ $\mu$ l zu erkranken ( $p$ -Wert < 0,006).



**Abbildung 3.2:** Häufigkeit und Dichte der *P.-falciparum*-Parasitämien der Träger des Genotyps *CD14*<sup>260CT</sup> im Vergleich zu *CD14*<sup>260CC</sup>. Zuerst wurde die Häufigkeit aller Parasitämien insgesamt untersucht und dann der Parasitendichte nach in aufsteigenden Gruppen.

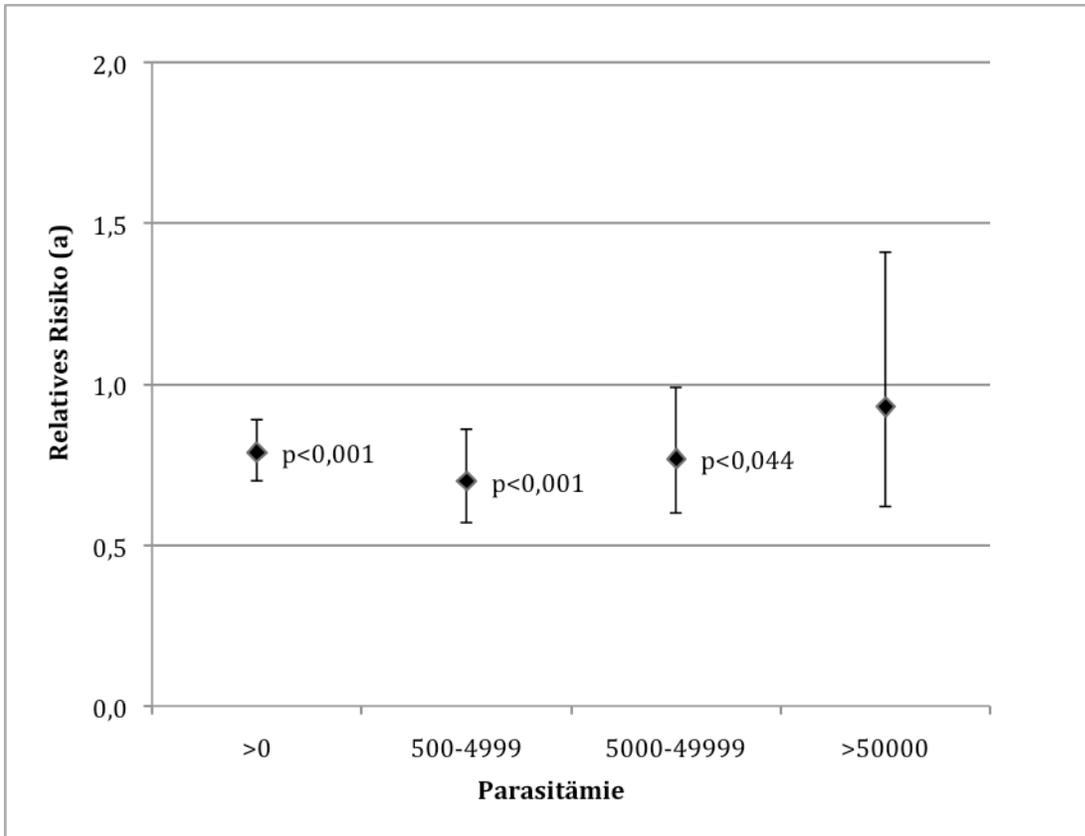
Die Fehlerindikatoren stellen die Konfidenzintervalle dar.

>0, Alle erfassten *P.-falciparum*-Parasitämien insgesamt (>0 Parasiten/μl)

<sup>(a)</sup>Das relative Risiko wurde um den Einflussfaktor der Sulfadoxin-Pyrimethamin-Einnahme korrigiert.

Um den Unterschied zwischen den heterozygoten Trägern des Allels *CD14*<sup>260T</sup> und den homozygoten Trägern hervorzuheben, wurden die beiden Gruppen unabhängig von der Gruppe des Wildtyps gegenübergestellt. In der Graphik wird hierbei die Gruppe der heterozygoten Träger als Basis genommen, mit der die Gruppe der homozygot mutierten Träger verglichen wird.

Es ergab sich eine statistisch signifikante Reduktion an Parasitämien bei der Gruppe des Genotyps *CD14*<sup>260TT</sup> (*p*-Wert<0,001). Diese Gruppe hatte ein um 24% vermindertes Risiko, eine Parasitämie im Blut zu tragen. Ebenso wie bei dem oben beschriebenen Vergleich zu dem Wildtyp bestand kein relativer Schutz bei Auftreten von hoher Parasitendichte.



**Abbildung 3.3:** Häufigkeit und Dichte der *P.-falciparum*-Parasitämien der Träger des Genotyps *CD14*<sup>260TT</sup> im Vergleich zu *CD14*<sup>260CT</sup>. Zuerst wurde die Häufigkeit aller Parasitämien insgesamt untersucht und dann der Parasitendichte nach in aufsteigenden Gruppen.

Die Fehlerindikatoren stellen die Konfidenzintervalle dar.

>0, Alle erfassten *P.-falciparum*-Parasitämien insgesamt (>0 Parasiten/ $\mu$ l)

<sup>(a)</sup>Das relative Risiko wurde um den Einflussfaktor der Sulfadoxin-Pyrimethamin-Einnahme korrigiert.

### 3.3.2 Assoziation von *CD14*<sup>481</sup> mit *Plasmodium-falciparum*-Parasitämie

Bei der statistischen Gegenüberstellung von Trägern des Wildtyps und Trägern des Allels *CD14*<sup>481G</sup> bezüglich der gemessenen Parasitendichte und der Häufigkeit von *P.-falciparum*-Infektionen waren die Werte ähnlich. Bei einer Parasitendichte über 50000 Plasmodien/ $\mu$ l konnte jedoch ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die heterozygoten Träger bewiesen ein um 60% vermindertes Risiko, eine solch ausgeprägte Parasitämie zu erleiden (*p*-Wert< 0,040).

**Tabelle 3.10:** Inzidenzdichte von *P.-falciparum*-Infektionen bei den Genotypen von *CD14*<sup>481</sup>

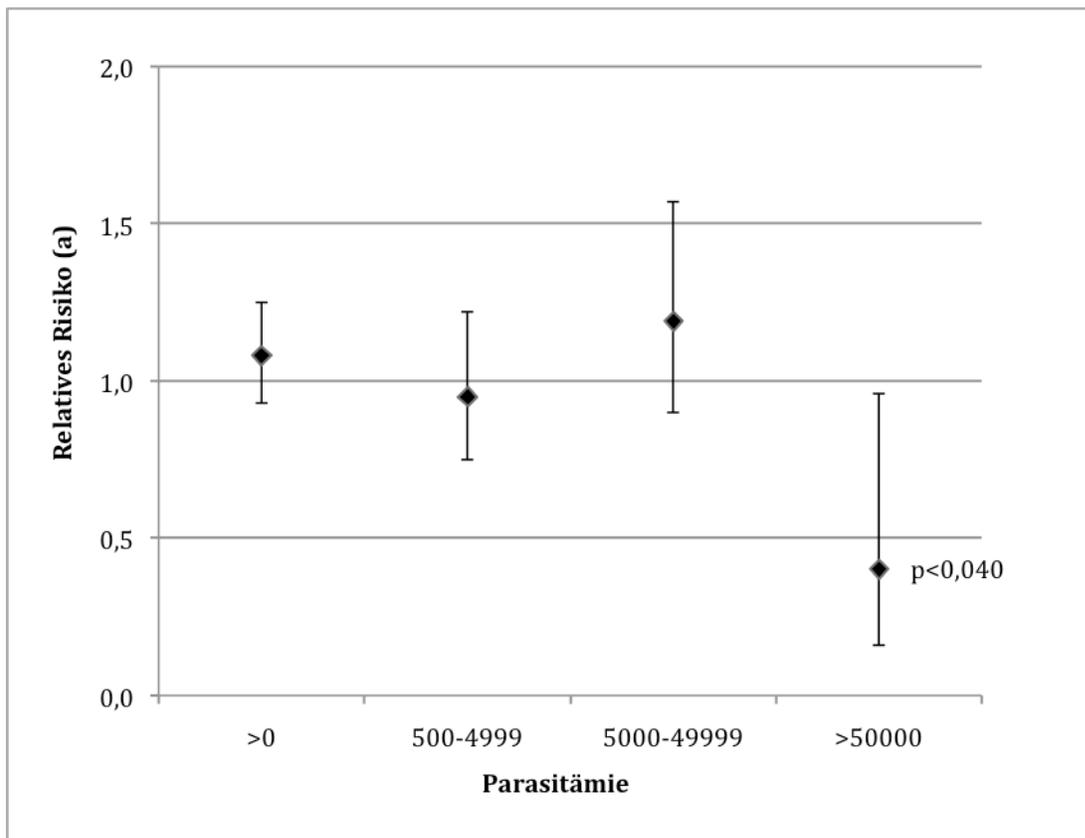
Parasitämie (/μl)	n <sup>a</sup>	<i>CD14</i> <sup>481AA</sup>			<i>CD14</i> <sup>481AG</sup>		
		Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>
Insg.>0	17355	3685	1117,3	3,30	186	52,0	3,58
1-499	17630	1132	1168,3	0,97	65	54,1	1,20
500-499	17652	1470	1173,3	1,30	67	55,8	1,20
5000-49999	17680	924	1200,0	0,80	52	56,6	0,90
>50000	17537	266	1210,9	0,22	5	57,2	0,08

PYAR, *Persons Year at Risk*, Personenrisikojahre

Insg.>0, Alle erfassten *P.-falciparum*-Parasitämien insgesamt (>0 Parasiten/μl)

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>Fallzahl pro Person/Jahr



**Abbildung 3.4:** Häufigkeit und Dichte der *P.-falciparum*-Parasitämien der Träger des Genotyps *CD14*<sup>481AG</sup> im Vergleich zu *CD14*<sup>481AA</sup>. Zuerst wurde die Häufigkeit aller Parasitämien insgesamt untersucht und dann der Parasitendichte nach in aufsteigenden Gruppen.

Die Fehlerindikatoren stellen die Konfidenzintervalle dar.

>0, Alle erfassten *P.-falciparum*-Parasitämien insgesamt (>0 Parasiten/μl)

<sup>(a)</sup>Das relative Risiko wurde um den Einflussfaktor der Sulfadoxin-Pyrimethamin-Einnahme korrigiert.

### 3.4 Assoziation der *CD14*-Genotypen mit *Malaria tropica*

In diese Untersuchung wurden nur die Krankheitsfälle einer klinisch und mikroskopisch nachgewiesenen *Malaria tropica* eingeschlossen. Fälle mit anderen Plasmodienspezies wurden ausgeschlossen. Neben des allgemeinen Nachweises einer *P. falciparum*-Infektion ( $>0 P. falciparum/\mu\text{l}$ ) wurden, wie bei der Voruntersuchung, die Krankheitsfälle nach Höhe der Parasitendichte sortiert und in aufsteigende Gruppen unterteilt. Zusätzlich wurden die Raten der asymptomatischen *P. falciparum*-Parasitämien den Genotypen gegenübergestellt.

#### 3.4.1 Assoziation von *CD14*<sup>-260</sup> mit *Malaria tropica*

**Tabelle 3.11:** Inzidenzdichte von asymptomatischen *P. falciparum*-Infektionen bei den Genotypen von *CD14*<sup>-260</sup>

n <sup>a</sup>	<i>CD14</i> <sup>-260CC</sup>			<i>CD14</i> <sup>-260CT</sup>			<i>CD14</i> <sup>-260TT</sup>		
	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>
19251	1117	661,8	1,69	921	532,4	1,73	142	106,1	1,73

PYAR, *Persons Year at Risk*, Personenrisikojahre

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>Fallzahl pro Person/Jahr

**Tabelle 3.12:** Inzidenzdichte von *Malaria tropica* bei den Genotypen von *CD14*<sup>-260</sup>, eingeteilt nach Höhe der nachgewiesenen Parasitämien im Verlauf der Erkrankung

	<i>CD14</i> <sup>-260CC</sup>			<i>CD14</i> <sup>-260CT</sup>			<i>CD14</i> <sup>-260TT</sup>			
	n <sup>a</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>
>0	19379	1097	700,4	1,57	979	563,5	1,74	156	110,6	1,41
1-499	19397	248	704,2	0,35	208	566,7	0,37	41	111,2	0,37
500-4999	19404	377	706,6	0,43	323	568,6	0,57	47	111,6	0,42
5000-49999	19408	360	707,8	0,51	325	570,0	0,57	43	112,0	0,38
>50000	19415	114	708,8	0,16	123	570,7	0,22	25	112,2	0,22

PYAR, *Persons Year at Risk*, Personenrisikojahre

>0, Alle erfassten Fälle an *Malaria tropica* mit >0 Parasiten/ $\mu\text{l}$

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>Fallzahl pro Person/Jahr

**Tabelle 3.13:** Inzidenzdichte von schwerer Malaria bei den Genotypen von  $CD14^{260}$ 

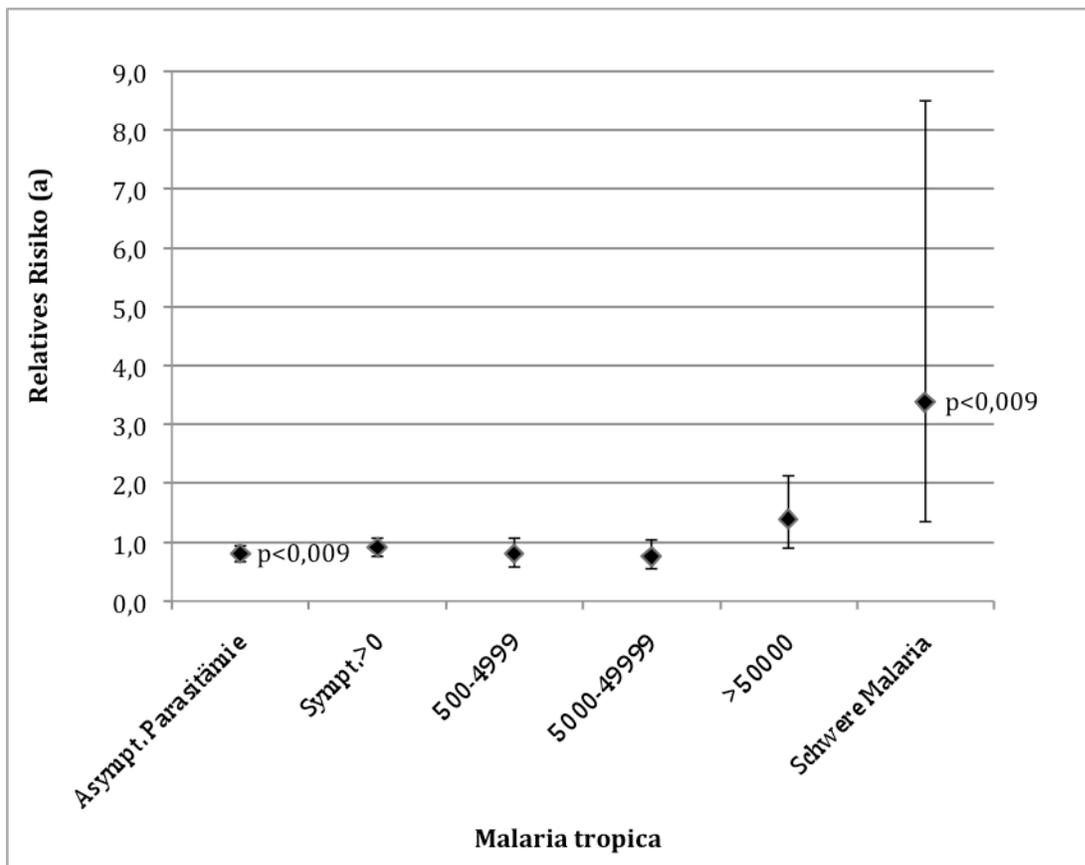
n <sup>a</sup>	$CD14^{260CC}$			$CD14^{260CT}$			$CD14^{260TT}$		
	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>
19414	13	708,9	0,02	24	570,8	0,04	7	112,1	0,06

PYAR, *Persons Year at Risk*, Personenrisikojahre

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>Fallzahl pro Person/Jahr

Die homozygoten Träger des Allels  $CD14^{260T}$  wiesen im Vergleich mit den homozygoten Trägern des Wildtyps seltener eine asymptomatische Parasitämie auf (um 21% vermindert). Die Gegenüberstellung der Anzahl von unkomplizierten Malariaerkrankungen in den beiden Genotypgruppen zeigte keine statistisch signifikanten Differenzen. Jedoch erkrankten in der Gruppe von  $CD14^{260TT}$  dreimal so viele Kinder an einer schweren Malaria tropica (Punktzahl: 3,41,  $p$ -Wert<0,009) wie in der Gruppe von  $CD14^{260CC}$ .



**Abbildung 3.5:** Häufigkeit der Krankheitsfälle von unkomplizierter *Malaria tropica* der Träger des Genotyps  $CD14^{260TT}$  im Vergleich zu  $CD14^{260CC}$ , eingeteilt nach Höhe der nachgewiesenen Parasitämien. Diese unkomplizierten Malariaepisoden wurden weiterhin mit der Häufigkeit von asymptomatischen *P. falciparum*-Infektionen und schwerer Malaria verglichen.

Die Fehlerindikatoren stellen die Konfidenzintervalle dar.

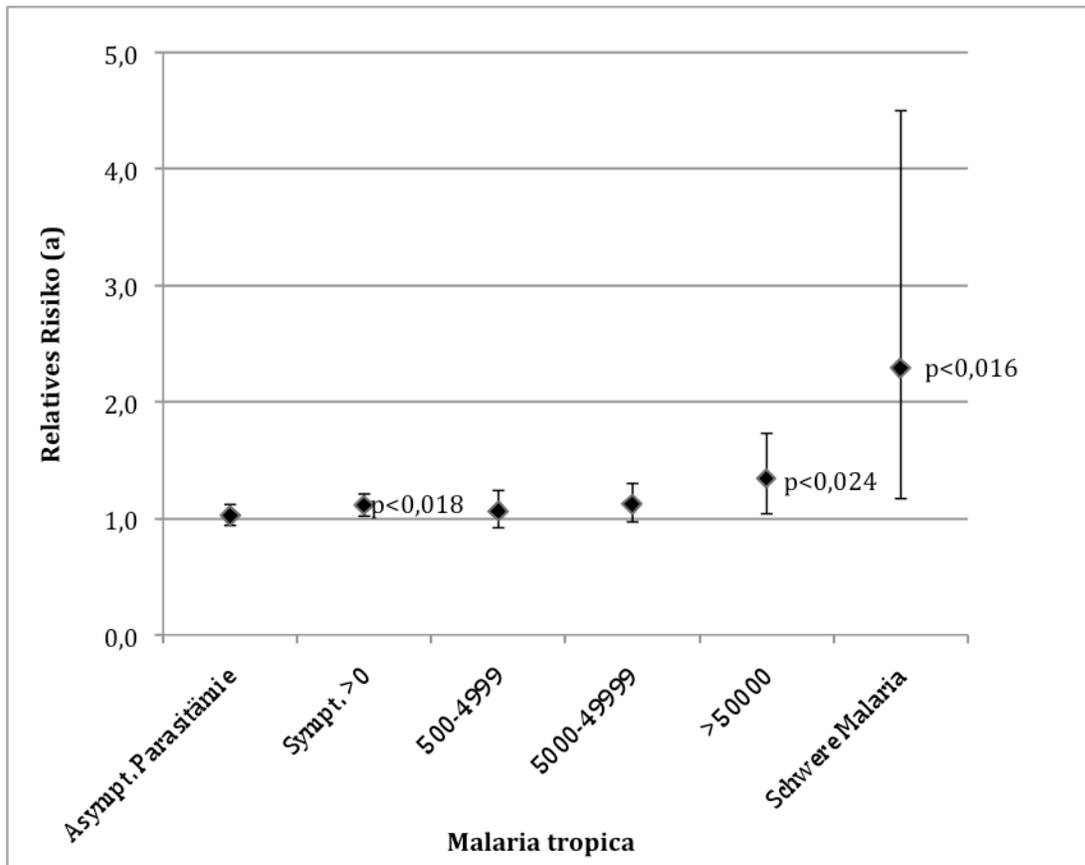
Asympt. Parasitämie, asymptomatische Parasitämie.

Sympt.>0, Symptomatische *Malaria tropica* mit nachgewiesener Parasitämie (>0 Plasmodien/ $\mu$ l).

<sup>(a)</sup>Das relative Risiko wurde um den Einflussfaktor der Sulfadoxin-Pyrimethamin-Einnahme korrigiert.

Die Träger des Genotyps  $CD14^{260CT}$  hatte im Vergleich zu Trägern des Genotyps  $CD14^{260CC}$  ein um 11% signifikant erhöhtes Risiko, an einer *Malaria tropica* zu erkranken. Ebenso wie bei den Vergleichen der Parasitämien stieg die Rate der Malariaerkrankungen mit hohen Parasitendichten bei  $CD14^{260CT}$  stärker als bei dem Wildtyp an. So besaßen die Träger des heterozygoten Genotyps ein um 34% erhöhtes Risiko, an einer *Malaria tropica* mit einer Parasitämie über 50000 *P. falciparum*/ $\mu$ l zu erkranken.

Die heterozygoten Träger von  $CD14^{260T}$  erkrankten außerdem doppelt so häufig an schwerer Malaria wie die homozygoten Träger des genetischen Wildtyps (Punktmasszahl: 2,29,  $p$ -Wert $<0,016$ ).



**Abbildung 3.6:** Häufigkeit der Krankheitsfälle von unkomplizierter Malaria tropica der Träger des Genotyps  $CD14^{260CT}$  im Vergleich zu  $CD14^{260CC}$ , eingeteilt nach Höhe der nachgewiesenen Parasitämien. Diese unkomplizierten Malariaepisoden wurden weiterhin mit der Häufigkeit von asymptomatischen *P.-falciparum*-Infektionen und schwerer Malaria verglichen.

Die Fehlerindikatoren stellen die Konfidenzintervalle dar.

Asympt. Parasitämie, asymptomatische Parasitämie.

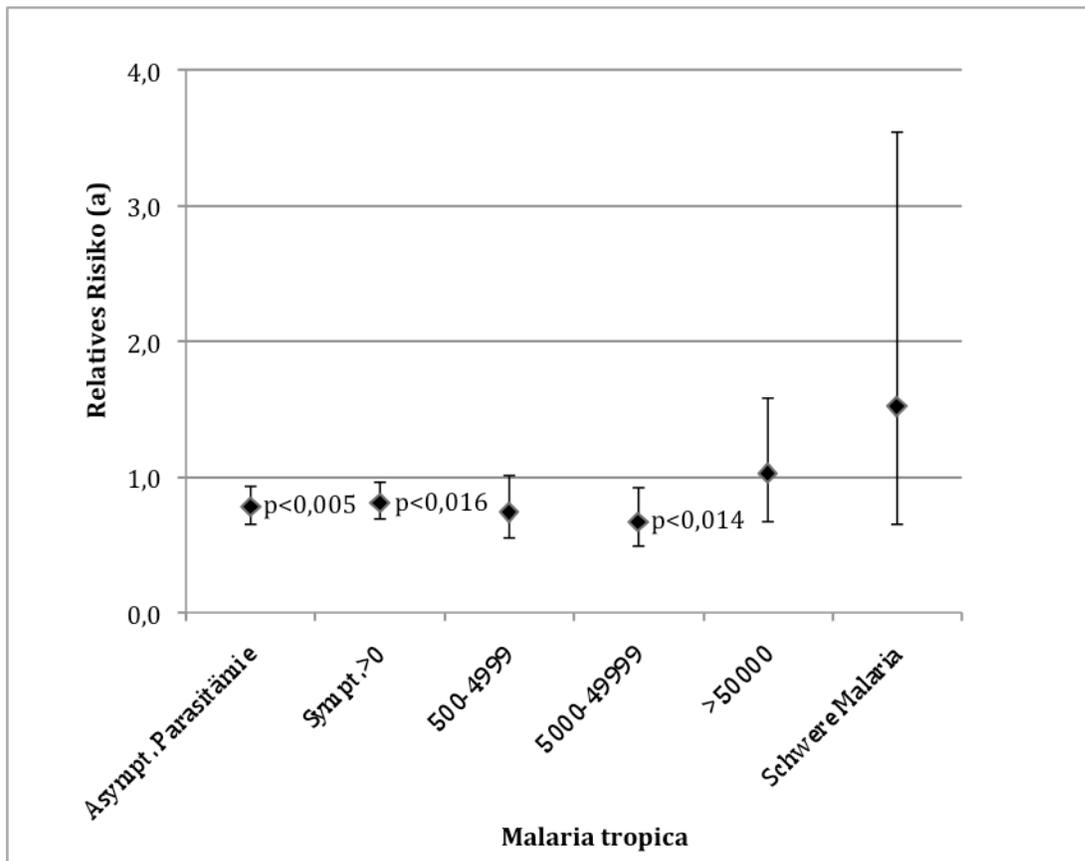
Sympt.>0, Symptomatische Malaria tropica mit nachgewiesener Parasitämie (>0 Plasmodien/ $\mu$ l).

<sup>(a)</sup> Das relative Risiko wurde um den Einflussfaktor der Sulfadoxin-Pyrimethamin-Einnahme korrigiert.

Zum Abschluss dieser Analyse wurde das Risiko für Malariaerkrankungen von der Gruppe der homozygoten Mutationsträger ( $CD14^{260TT}$ ) mit derjenigen der heterozygoten Träger verglichen. Es zeigte sich ein um 19% vermindertes Risiko für die Entwicklung einer Malaria tropica bei den homozygot mutanten Träger gegenüber der

heterozygoten Gruppe. Weiterhin hatte die Gruppe der homozygot mutierten Träger ein um 22% vermindertes Risiko einer asymptomatischen Parasitämie.

Lediglich bei der einfachen Malaria tropica mit sehr hoher Parasitendichte sowie bei der schweren Malaria war kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar.



**Abbildung 3.7:** Häufigkeit der Krankheitsfälle von unkomplizierter Malaria tropica der Träger des Genotyps  $CD14^{-260TT}$  im Vergleich zu  $CD14^{-260CT}$ , eingeteilt nach Höhe der nachgewiesenen Parasitämien. Diese unkomplizierten Malariaparasitämien wurden weiterhin mit der Häufigkeit von asymptomatischen *P.falciparum*-Infektionen und schwerer Malaria verglichen.

Die Fehlerindikatoren stellen die Konfidenzintervalle dar.

Asympt. Parasitämie, asymptomatische Parasitämie.

Sympt.>0, Symptomatische Malaria tropica mit nachgewiesener Parasitämie (>0 Plasmodien/ $\mu$ l).

<sup>(a)</sup>Das relative Risiko wurde um den Einflussfaktor der Sulfadoxin-Pyrimethamin-Einnahme korrigiert.

### 3.4.2 Assoziation von $CD14^{-481}$ mit Malaria tropica

Die Analyse der Krankheitsverläufe in den beiden Genotypgruppen von  $CD14^{-481}$  zeigte genau wie bei den oben beschriebenen Untersuchungen keine eindeutigen Unterschiede.

**Tabelle 3.14:** Inzidenzdichte von *P. falciparum*-Infektionen bei den Genotypen von *CD14*<sup>481</sup>

n <sup>a</sup>	<i>CD14</i> <sup>481AA</sup>			<i>CD14</i> <sup>481AG</sup>		
	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>
17532	3740	1132,0	3,35	186	51,95	3,58

PYAR, *Persons Year at Risk*, Personenrisikojahre

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>Fallzahl pro Person/Jahr

**Tabelle 3.15:** Inzidenzdichte von Malaria tropica bei den Genotypen von *CD14*<sup>481</sup>, eingeteilt nach Höhe der nachgewiesenen Parasitämien im Verlaufe der Erkrankung

	<i>CD14</i> <sup>481AA</sup>				<i>CD14</i> <sup>481AG</sup>			
	n <sup>a</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	
>0	17561	1914	1196,9	1,60	93	56,3	1,65	
1-499	17698	427	1203,6	0,35	17	56,8	0,30	
500-499	17706	640	1207,5	0,53	36	57,0	0,63	
5000-49999	17709	627	1210,0	0,52	36	57,0	0,63	
>50000	17570	234	1211,6	0,17	4	57,2	0,02	

PYAR, *Persons Year at Risk*, Personenrisikojahre

>0, Alle erfassten Fälle an Malaria tropica mit >0 Parasiten/μl

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>Fallzahl pro Person/Jahr

**Tabelle 3.16:** Inzidenzdichte von schwerer Malaria bei den Genotypen von *CD14*<sup>481</sup>

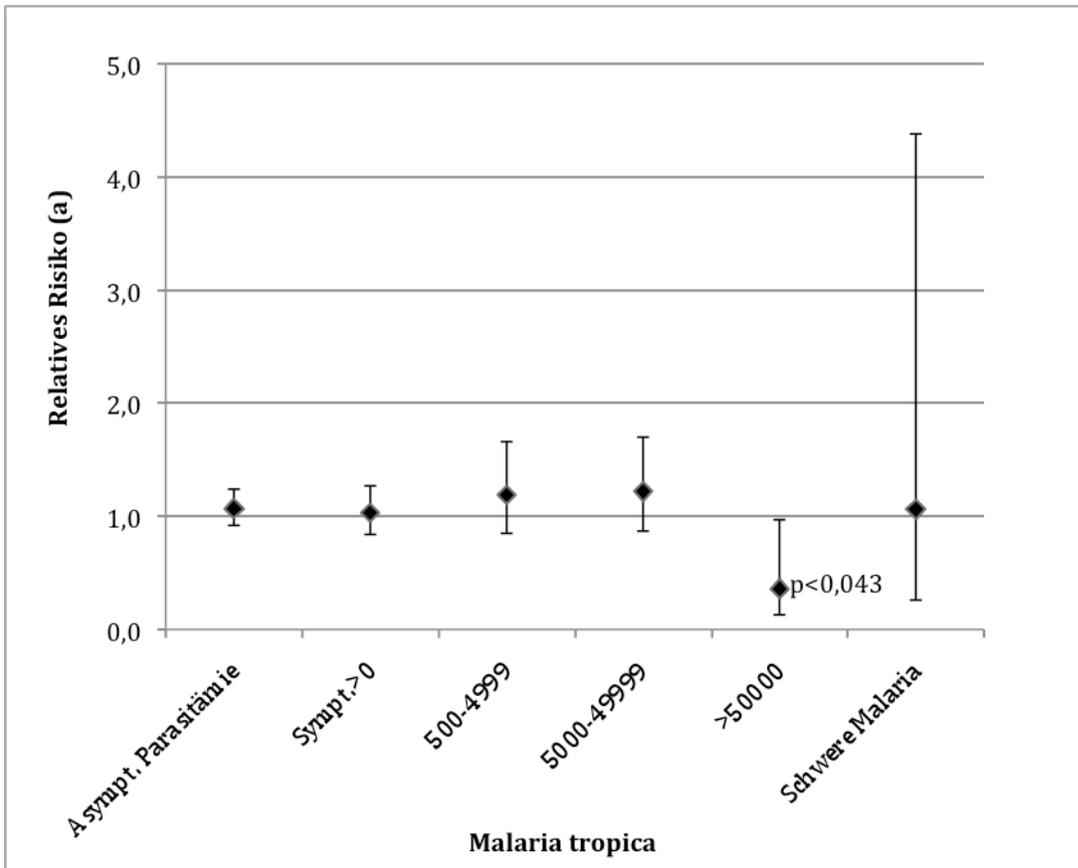
n <sup>a</sup>	<i>CD14</i> <sup>481AA</sup>			<i>CD14</i> <sup>481AG</sup>		
	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>
17520	40	1211,7	0,03	2	57,2	0,03

PYAR, *Persons Year at Risk*, Personenrisikojahre

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>Fallzahl pro Person/Jahr

Erneut zeigte sich jedoch ein vermindertes Risiko für die Gruppe der heterozygoten Träger des Allels *CD14*<sup>481G</sup>, an einer einfachen Malaria tropica mit einer Parasitämie über 50000 *P. falciparum*/μl zu erkranken (um 64% vermindert).



**Abbildung 3.8:** Häufigkeit der Krankheitsfälle von unkomplizierter *Malaria tropica* der Träger des Genotyps *CD14*<sup>481AG</sup> im Vergleich zu *CD14*<sup>481AA</sup>, eingeteilt nach Höhe der nachgewiesenen Parasitämien. Diese unkomplizierten Malariaepisoden wurden weiterhin mit der Häufigkeit von asymptomatischen *P.-falciparum*-Infektionen und schwerer Malaria verglichen.

Die Fehlerindikatoren stellen die Konfidenzintervalle dar.

Asympt. Parasitämie, asymptomatische Parasitämie.

Sympt.>0, Symptomatische *Malaria tropica* mit nachgewiesener Parasitämie (>0 Plasmodien/ $\mu$ l).

<sup>(a)</sup>Das relative Risiko wurde um den Einflussfaktor der Sulfadoxin-Pyrimethamin-Einnahme korrigiert.

### 3.5 Assoziation der *CD14*-Genotypen mit Anämie

Die Schweregrade einer Anämie wurden in diesen Analysen in zwei Gruppen unterteilt: gemessene Hämoglobinwerte unter 9,0 g/dl wurden als „leichte Anämie“ gewertet und solche unter 7,5 g/dl als „schwere Anämie“. Die dritte Gruppe umfasste alle weiteren Hämoglobinkonzentrationen über 9,0 g/dl. Für Patienten in Deutschland gilt bereits ein Hämoglobinwert über 9,0 g/dl als vermindert. Die deutschen Richtlinien wurden in dieser Arbeit jedoch nicht verwendet, da viele ghanaische Kinder chronische Anämien aufweisen, eine weitere Verminderung des Hb-Spiegels jedoch gut

kompensieren können und deshalb auch bei niedrigen Hb-Werten häufig asymptomatisch sind.

### 3.5.1 Assoziation von $CD14^{-260}$ mit Anämie

**Tabelle 3.17:** Inzidenzdichte von Anämieepisoden bei Trägern verschiedener Genotypen von  $CD14^{-260}$

Hb-konz. (g/dl)	n <sup>a</sup>	$CD14^{-260CC}$			$CD14^{-260CT}$			$CD14^{-260TT}$		
		Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>
>9,0	19060	4914	522,1	9,41	3807	425,1	9,00	739	81,1	9,11
7,5-9,0	19556	1502	727,0	2,07	1229	582,5	2,11	204	113,6	1,80
<7,5	19806	484	780,9	0,62	458	624,8	0,73	75	120,3	0,62

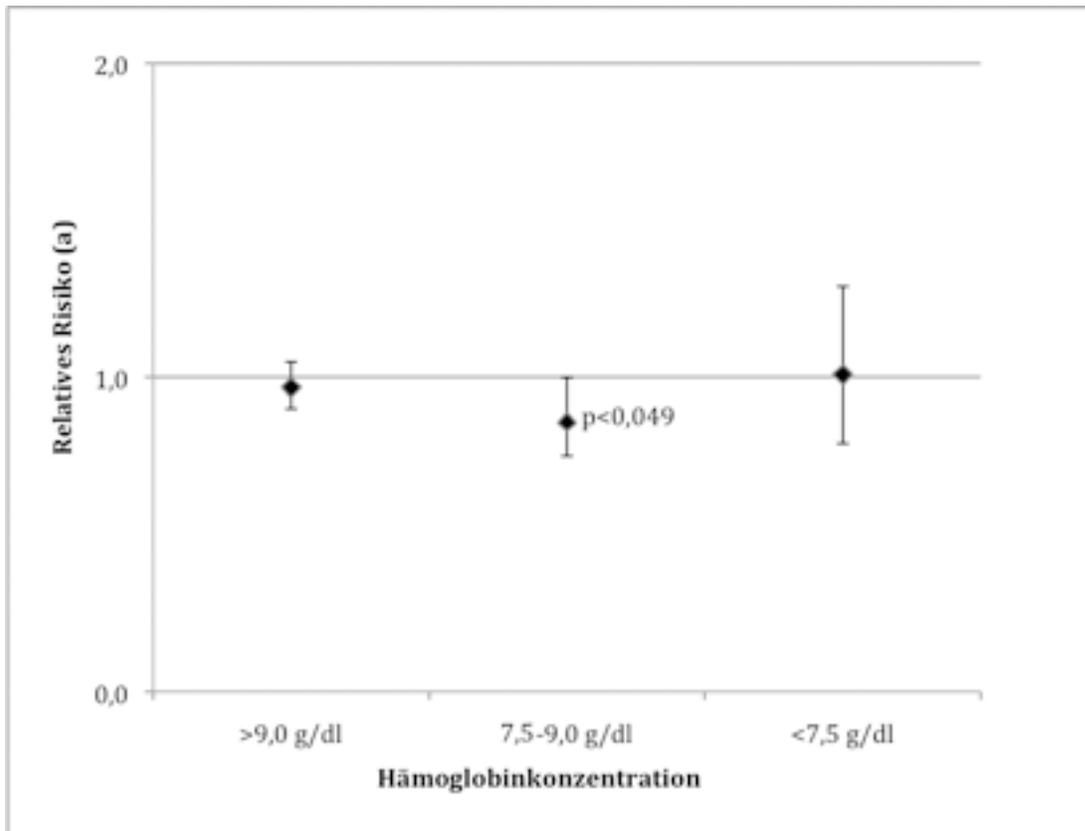
Hb-konz., Hämoglobinkonzentration

PYAR, *Persons Year at Risk*, Personenrisikojahre

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>Fallzahl pro Person/Jahr

Die homozygot mutanten  $CD14^{-260T}$ -Träger erkrankten um 14% seltener an leichter Anämie als die homozygoten Träger des Wildtyps.

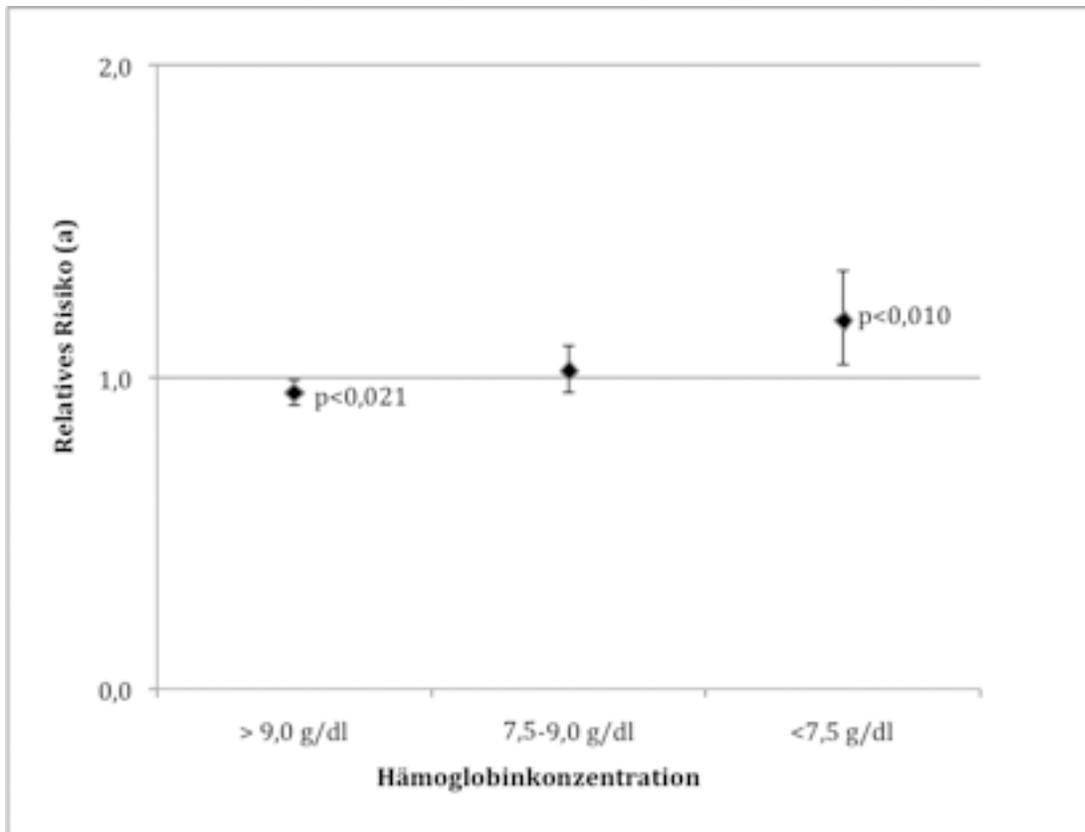


**Abbildung 3.9:** Häufigkeit der Krankheitsfälle von Anämie der Träger des Genotyps  $CD14^{-260TT}$  im Vergleich zu  $CD14^{-260CC}$ , eingeteilt nach Höhe der gemessenen Hb-Konzentrationen.

Die Fehlerindikatoren stellen die Konfidenzintervalle dar.

<sup>(a)</sup>Das relative Risiko wurde um den Einflussfaktor der Sulfadoxin-Pyrimethamin-Einnahme korrigiert

Die heterozygoten Träger der Allele auf Position  $CD14^{-260}$  besaßen ein leicht erhöhtes Risiko für eine Anämie (5% verminderte Rate an Hämoglobinwerten über 9,0 g/dl) und ein um 18% erhöhtes Risiko einer schweren Anämie ( $p < 0,010$ ).

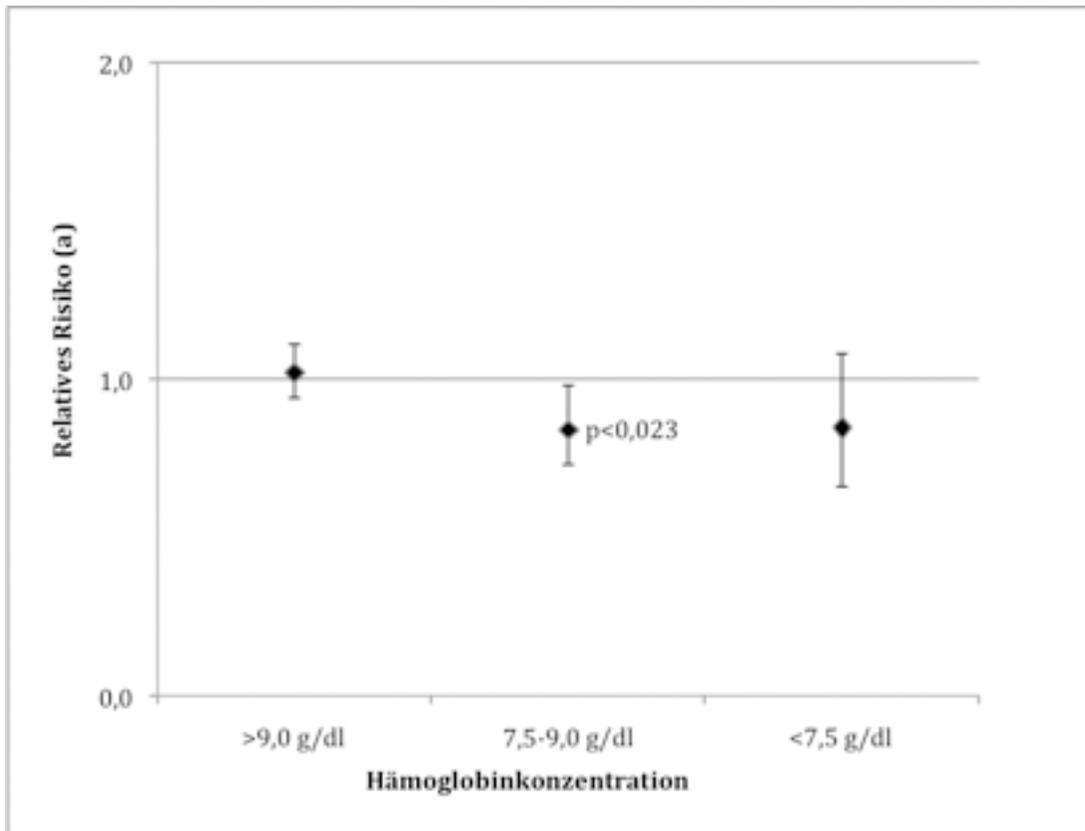


**Abbildung 3.10:** Häufigkeit der Krankheitsfälle von Anämie der Trägern des Genotyps  $CD14^{260CT}$  im Vergleich zu  $CD14^{260CC}$ , eingeteilt nach Höhe der gemessenen Hämoglobinkonzentrationen.

Die Fehlerindikatoren stellen die Konfidenzintervalle dar.

<sup>(a)</sup>Das relative Risiko wurde um den Einflussfaktor der Sulfadoxin-Pyrimethamin-Einnahme korrigiert

Homozygote Träger des Genotyps  $CD14^{260TT}$  hatten ein um 16% vermindertes Risiko, an einer Anämie mit Hämoglobin-Werten unter 9,0 g/dl zu erkranken. Dieser Schutz galt jedoch nicht für schwere Anämien. Bei einem Hb unter 7,5 g/dl gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypgruppen.



**Abbildung 3.11:** Häufigkeit der Krankheitsfälle von Anämie der Träger des Genotyps  $CD14^{-260TT}$  im Vergleich zu  $CD14^{-260CT}$ , eingeteilt nach Höhe der gemessenen Hämoglobinkonzentrationen.

Die Fehlerindikatoren stellen die Konfidenzintervalle dar.

<sup>(a)</sup> Das relative Risiko wurde um den Einflussfaktor der Sulfadoxin-Pyrimethamin-Einnahme korrigiert.

### 3.5.2 Assoziation von $CD14^{481}$ mit Anämie

**Tabelle 3.18:** Inzidenzdichte von Anämie bei den Genotypen von  $CD14^{481}$

Hb-konz. (g/dl)	n <sup>a</sup>	$CD14^{481AA}$			$CD14^{481AG}$		
		Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>
>9,0	17386	8146	900,5	9,05	406	41,4	9,81
7,5-9,0	17941	2529	1243,5	2,03	130	57,1	2,28
< 7,5	18084	870	1330,6	0,70	46	61,8	0,60

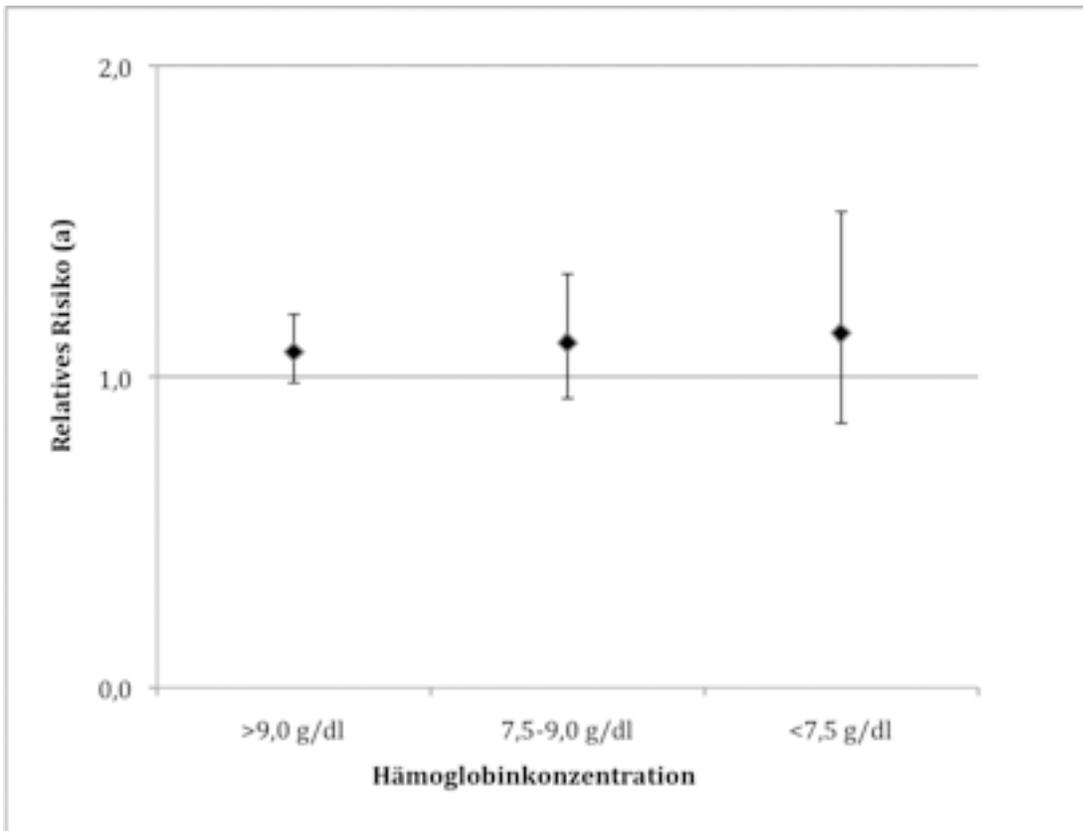
Hb-konz., Hämoglobinkonzentration

PYAR, *Persons Year at Risk*, Personenrisikojahre

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>Fallzahl pro Person/Jahr

Die Analysen ergaben keinen Unterschied zwischen Trägern des Genotyps  $CD14^{481AG}$  und Homozygoten des Wildtyps.



**Abbildung 3.12:** Häufigkeit der Krankheitsfälle von Anämie der Träger des Genotyps  $CD14^{481AG}$  im Vergleich zu  $CD14^{481AA}$ , eingeteilt nach Höhe der gemessenen Hämoglobinkonzentrationen.

Die Fehlerindikatoren stellen die Konfidenzintervalle dar.

<sup>(a)</sup>Das relative Risiko wurde um den Einflussfaktor der Sulfadoxin-Pyrimethamin-Einnahme korrigiert

### 3.6 Assoziation der $CD14$ -Genotypen mit Letalität

#### 3.6.1 Assoziation von $CD14^{260}$ mit Letalität

Während der Studienzeit verstarben 19 Kinder. 12 von ihnen wurden in der  $CD14^{260}$ -Analyse erfasst. Es wurde keine Abhängigkeit der Mortalität von den Genotypen festgestellt. Auch in Bezug auf die Todesursachen konnten keine Abweichungen innerhalb der Gruppen erfasst werden.

**Tabelle 3.19:** Inzidenzdichte der erfassten Todesfälle während der Studie bei den Genotypen von  $CD14^{260}$

n <sup>a</sup>	$CD14^{260CC}$			$CD14^{260CT}$			$CD14^{260TT}$		
	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>
20234	5	718,3	0,007	6	581,3	0,01	1	110,9	0,009

PYAR, *Persons Year at Risk*, Personenrisikojahre

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>Fallzahl pro Person/Jahr

### 3.6.2 Assoziation von $CD14^{481}$ mit Letalität

Von den 19 Todesfällen wurden 8 in den Analysen der Gruppen des Genotyps  $CD14^{481}$  erfasst, alle in der Gruppe des Wildtyps ( $CD14^{481AA}$ ). Aufgrund der geringen Fallzahl war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

**Tabelle 3.20:** Inzidenzdichte der erfassten Todesfälle während der Studie bei den Genotypen von  $CD14^{481}$

n <sup>a</sup>	$CD14^{481AA}$			$CD14^{481AG}$		
	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>	Ereignis	PYAR	Rate <sup>b</sup>
16047	8	5756,9	0,007	0	122,9	0

PYAR, *Persons Year at Risk*, Personenrisikojahre

<sup>a</sup>Fallzahl, die in die Analyse eingebracht wurde

<sup>b</sup>Fallzahl pro Person/Jahr

## 4. Diskussion

### 4.1 Kritische Betrachtungen der Materialien und Methoden

Das vierte Kapitel soll damit beginnen, dass mögliche Schwachpunkte dieser Arbeit kritisch betrachtet werden, um daraufhin die Ergebnisse zu diskutieren.

#### 4.1.1 Studienkonzept

Die ausgewerteten Daten der vorliegenden Arbeit basieren auf einer randomisierten kontrollierten Studie mit prospektivem longitudinalem Design. Die selektierten Probanden wurden im Alter von drei Monaten in die Studie aufgenommen und bis zum zweiten Lebensjahr monatlich untersucht. Die Studie bietet somit einen relativ repräsentativen Eindruck von der genannten Altersgruppe der ghanaische Population des Afigya Sekyere Distriktes. Durch die zufällige Auswahl der Probanden und der großen Anzahl an Teilnehmern können Störgrößen wie Geschlecht, sozialer Schichtzugehörigkeit oder bei Studienaufnahme nicht bekannte Vorerkrankungen weitestgehend ausgeglichen werden. Jedoch besteht trotzdem ein gewisser Selektionsbias, da nur die Kinder derjenigen Mütter aufgenommen wurden, die regelmäßig zu den Gesundheitsposten in den Orten kamen. Es ist anzunehmen, dass Familien mit einem schlechteren Bildungsniveau oder geringerem Einkommen, die aufgrund dessen weit außerhalb der Orte wohnen, deutlich seltener die ärztliche Hilfe in Anspruch nehmen. Bei Selektion einer besser aufgeklärten oder besser verdienenden Populationsgruppe kann sich wiederum bei vermehrter Nutzung von Präventionsmaßnahmen wie zum Beispiel Mosquitonetze die Infektionsdynamik im Vergleich zu sozial schwächeren unterscheiden. Im Rahmen der Studienpopulation wurden Faktoren wie Nutzung eines Bettnetzes oder Entfernung von der Klinik auf Verzerrungsphänomene untersucht. Innerhalb der Gruppe wurden keine *Confounding*-Phänomene erkannt.

Während das randomisierte Design es ermöglicht, trotz des oben geschilderten Risikos eines Selektionsbias eine relativ repräsentative Gruppe aufzunehmen, kann im Verlauf der fünfzehnmonatigen Teilnahme an der Studie eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die regelmäßigen monatlichen ärztlichen Untersuchungen der Studienteilnehmer entstehen. Die Probanden erhielten bei nachgewiesener Malariaerkrankungen, anderen Krankheitssymptomen oder Zeichen einer Anämie zeitnah eine ad-

äquante medikamentöse Behandlung. Hierbei handelte es sich jedoch um eine deutlich intensivere ärztliche Betreuung als die, die gleichaltrige Kinder des Distriktes erhielten, die nicht an der Studie teilnahmen. Dieser Kohorteneffekt im Vergleich zur nicht untersuchten Bevölkerung konnte jedoch aufgrund ethischer Grundsätze nicht vermieden werden und sollte eher zu einer Unterschätzung der Effekte geführt haben.

Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die Studie aufgrund der Größe und repräsentativen Populationsgruppe sehr geeignet dafür ist, die genetischen Einflüsse auf die Infektionsdynamik von *P. falciparum* zu betrachten. Diese Arbeit ist jedoch nur ein Teilaspekt einer Studie, die ursprünglich nicht darauf ausgelegt war, den Einfluss von *CD14*-Varianten zu erforschen. Deshalb wurden einige Parameter nicht erfasst, die für die Erklärung der Ergebnisse ausschlaggebend sein könnten. So wurden kaum Laborparameter bestimmt wie zum Beispiel Serumspiegel der Interleukine oder die TNF-Blutkonzentration bei akuten *P.-falciparum*-Infektionen. Diese Parameter hätten den immunmodulatorischen Effekt des untersuchten Proteins eventuell deutlicher hervorheben können.

#### **4.1.2 Materialerfassung**

*P.-falciparum*-Parasitämien wurden in dieser Studie nach allgemeinen WHO-Leitlinien [45] am Lichtmikroskop diagnostiziert. Die Erstellung des Dicken Tropfens gilt als „Goldstandard“ zur Erfassung von Plasmodium-Infektionen. Die Untersuchung bietet eine hohe Spezifität, während die Sensitivität stark variiert [27]. Die Hauptursache hierfür ist, dass die Sensitivität sehr von der Erfahrung des Mikroskopikers abhängig ist. Eine Erfassungsquote von  $\geq 500$  Parasiten/ $\mu$ l ist der Mindeststandard bei erfahrenen Mitarbeitern [26]. In der Studie wurden alle Objektträger mindestens zweimal von unterschiedlichen, routinierten Laboranten untersucht, um die Fehlerquote gering zu halten. Trotzdem kann nicht garantiert werden, dass als Parasiten-negativ eingestufte Probanden nicht doch eine sehr geringe Parasitämie hatten. Auf eine molekular-biologische Detektion der Plasmodien-Spezies in allen Blutproben wurde jedoch im Hinblick auf die Kosten verzichtet.

Eine sinnvolle Definition einer Malariasymptomatik in epidemiologischen Studien in hochendemischen Regionen ist grundsätzlich schwierig. Die WHO-Leitlinien von 2000 zur Diagnose einer Malaria sind zwar hoch sensitiv, dies jedoch auf Kosten der

Spezifität. Im klinischen Gebrauch erweisen sie sich als sinnvoll, da gerade in Regionen mit einer unterentwickelten Infrastruktur eine ausgiebige Diagnostik bei akuter Fieberkrankung nicht möglich und ein rasches Handeln für die erfolgreiche Therapie einer Malariasymptomatik ausschlaggebend ist [11]. Die geringe Spezifität der Diagnostik ist jedoch ein Nachteil bei klinischen Studien. So wird nach der genannten WHO-Definition jedes febrile Krankheitsbild mit nachgewiesener asexueller *P. falciparum*-Parasitämie als diagnostizierte Malaria tropica eingestuft. Da jedoch die Infektionsrate der Studienkinder sehr hoch ist, werden auch fieberhafte Infektionen anderer Genese mit begleitender Parasitämie als Malaria eingestuft. Kobbe *et al.* wiesen nach, dass 18,2% aller Kinder im Alter von drei Monaten bei Aufnahme in die Studie eine *P. falciparum*-Infektion hatten [20]. Bei einer so hohen Infektionsrate in einem holoendemischen Areal wie dem Studiengebiet ist davon auszugehen, dass eine nachgewiesene Parasitämie nicht zwangsläufig mit dem klinischen Krankheitsbild in Verbindung zu bringen ist. So können bei asymptomatischen Parasitämien Koinfektionen vorliegen und übersehen werden [11, 4, 26].

In der Studie wurde zwar darauf geachtet, dass Fieberschübe mit nachgewiesener Parasitämie nur dann als Malariaepisode gewertet wurden, wenn andere offensichtliche Ursachen ausgeschlossen waren. Es wurde aber hierbei nur klinisch und anamnestisch vorgegangen, ohne dass Blutkulturuntersuchungen oder serologische Untersuchungen als Ausschluss anderer Ursachen febriler Temperaturen gemacht wurden. Mögliche Koinfektionen können aber besonders bei Untersuchungen des Einflusses der Mutation  $CDI4^{260C>T}$  auf die Infektionsdynamik der Probanden wichtig sein. Baier *et al.* untersuchte 2006 den Einfluss der Mutation auf die Entwicklung von septischen Krankheitsverläufen bei beatmeten Frühgeborenen. Seine Arbeitsgruppe beschrieb eine erhöhte Anfälligkeit der Träger von  $CDI4^{260TT}$  für multiple Koinfektionen [2].

Bei der Diskussion der folgenden Ergebnisse muss dies beachtet werden, da Koinfektionen als Ursache für die klinischen Krankheitsverläufe in dieser Studie nicht ausgeschlossen werden konnten. So wäre es möglich, dass die homozygoten Träger der Mutation von  $CDI4^{260}$  eine geringere Fallzahl von asymptomatischen Parasitämien aufwiesen, da sie häufiger Koinfektionen hatten, die klinische Symptome hervorrie-

fen, die wiederum auf die bakterielle und nicht etwa die parasitäre Infektion zurückzuführen waren.

Den Kindern wurde während der Studie an drei verschiedenen Zeitpunkten venöses Blut entnommen. Diesem Blut wurden keine Laborparameter entnommen, die mögliche Auswirkungen der Punktmutationen auf Zytokine und andere immunmodulatorische Stoffe zeigen könnten. Dies erschwert die Postulation der anschließend aufgeführten Theorien bezüglich der immunmodulatorischen Auswirkungen der SNP des *CD14*-Promotors. Diese können erst durch Erfassung der Zytokinblutkonzentrationen in weiteren Studien bewiesen, beziehungsweise widerlegt werden.

#### **4.1.3 Genotypisierung**

Die Erfassung der Punktmutation *CD14*<sup>481A>G</sup> erwies sich als äußerst schwierig, da die Mutation inmitten stark repetitiver Sequenzen liegt und somit die Auswahl der *Primer* kompliziert war. Es musste auf relativ lange Primersequenzen zurückgegriffen werden, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass einzig und allein die erwünschte Region amplifiziert wird. Dieses wiederum hat einen negativen Einfluss auf die Schmelztemperatur, die durch die Länge höher ausfällt und die Polymerasereaktion somit gefährdet. Homozygote Träger des mutierten Allels *CD14*<sup>481G</sup> wurden gar nicht erfasst. Es ist nicht auszuschließen, dass eine geringe Anzahl dieses Genotyps unter den Probanden vertreten war, jedoch ergaben die Ergebnisse nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz ähnliche Relationen mit einer Erwartung von 0,5 Trägern des homozygoten Genotyps *CD14*<sup>481GG</sup>.

## **4.2 Diskussion**

### **4.2.1 Erfasste Polymorphismen**

Die Frequenzen der beiden Allele und drei Genotypen von *CD14*<sup>260</sup> entsprechen denen der aktuellen NCBI-Daten. Sie weichen nicht signifikant von den Frequenzen ab, die nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht entsprechend der Häufigkeiten der Genotypen zu erwarten waren. Die Frequenz der homozygoten Träger des Allels *CD14*<sup>260T</sup> beträgt 7,3% und der homozygoten Träger des Wildtyps 47,8%. Diese Allelfrequenzen entsprechen denen der von NCBI gelisteten Gruppe von Afro-Amerikanern [17].

Auch die Frequenz der zwei Genotypen von  $CD14^{481}$  weichen nicht von den erwarteten Werten nach Hardy-Weinberg ab. Da die Mutation nicht in der NCBI-Datenbank aufgeführt wird, ist hierfür kein Vergleich mit unterschiedlichen Populationen möglich.

#### **4.2.2 Einfluss der $CD14$ -Genotypen auf $P.$ -*falciparum*-Parasitämie**

Das Gen, das für das CD14-Protein kodiert, liegt auf der Chromosomenregion 5q31.1. innerhalb des Bereiches 5q31-33, in dem signifikante *Lod-Scores* für hohe Parasitämie und eine gehäufte Anzahl von Reinfektionen mit *P. falciparum* beschrieben wurden [29]. Diese Beobachtung bildete die Grundlage für die Assoziationsuntersuchung verschiedener Kandidatengene aus dieser Region.

Eine erhöhte Transkriptionsaktivität von Monozyten, die in dem  $CD14$ -Promotor das mutierte Allel  $CD14^{260T}$  tragen, wurde beschrieben [22]. Träger der Mutation könnten bei Infektionen eine erhöhte Menge an sCD14 bilden und effizienter auf Krankheitserreger reagieren. Homozygote Träger des Genotyps  $CD14^{260TT}$  könnten so bei Infektionen relativ geschützt sein wie in der vorliegenden Studie beobachtet. Die Träger des Genotyps  $CD14^{260TT}$  hatten im Vergleich mit denen des Wildtyps einen 16%igen Schutz gegenüber einer *P.-falciparum*-Parasitämie. Dieser Schutz konnte jedoch nicht mehr bei sehr hohen Parasitämien (> 50000 Parasiten/ $\mu$ l) beobachtet werden. Hier erschienen die homozygoten Träger des Genotyps  $CD14^{260TT}$  im Vergleich zu den Trägern des homozygoten Wildtyps häufiger betroffen zu sein.

Die Tendenz eines erhöhten Risikos könnte mit einer veränderten Ausschüttung von Zytokinen wie TNF zusammenhängen. TNF ist ein proinflammatorisches Zytokin, das in der Frühphase von Infektionen von aktivierten Monozyten freigegeben wird. Die Aktivierung der Monozyten und somit auch die Ausschüttung von TNF werden durch die Verbindung des CD14-Rezeptors mit dem LPS/LBP-Komplex initiiert [32]. Es wird vermutet, dass Antigene von *P. falciparum* über Bindung an den CD14-TLR-Rezeptorkomplex ebenfalls die Fähigkeit besitzen, die Zytokininduktion der Monozyten zu stimulieren. Parasitäres GPI ist seit einiger Zeit als ein solcher TNF-induzierender Faktor bekannt [31]. Geringe Konzentrationen von TNF reduzieren *P.-falciparum*-Infektionen, eine überschießende Ausschüttung scheint aber

mitverantwortlich für die Entwicklung von Malariakomplikationen [16, 1]. Eine erhöhte Sekretion von TNF durch eine Aktivierung von CD14 aufgrund der Promotormutation wäre eine Erklärung dafür, dass das Risiko für eine geringe Parasitendichte durch den Genotyp  $CD14^{260TT}$  verringert ist, das Risiko für eine hohe Parasitendichte aber eher begünstigt wird. Dies ist jedoch ohne die Messung der Blutkonzentrationen von Zytokinen nicht weiter zu untersuchen.

Weiterhin ist es denkbar, dass bereits die infizierten Hepatozyten das Immunsystem aktivieren, da auch sie die Fähigkeit besitzen, CD14-Rezeptoren zu exprimieren [14]. In diesen Zellen überwiegt jedoch der Anteil des inhibierenden Transkriptionsfaktors Sp3 [22]. Ein Einfluss des Allels  $CD14^{260T}$  auf eine verstärkte Abwehr der Leberzellen gegenüber den Parasiten ist bisher nicht gezeigt worden.

Schwer zu interpretieren sind die Assoziationen mit dem heterozygoten Genotyp  $CD14^{260CT}$ , da dieser im Vergleich zu den homozygoten Trägern des Wildtyps ebenso wie zu den Trägern des homozygoten Mutanten einen Risikofaktor darstellt. Die Ergebnisse zeigten, dass Heterozygote im Vergleich zu Trägern des Wildtyps ein tendenziell erhöhtes Risiko für eine Infektion hatten. Das Risiko, an einer Parasitämie mit über 50000 Plasmodien pro  $\mu$ l Blut zu erkranken, lag bei den heterozygoten Trägern um 40% höher als bei den homozygoten Trägern des Wildtyps. Möglicherweise besteht ein nicht erfasstes Kopplungsungleichgewicht zwischen dem  $CD14^{260}$ -Locus und einem anderen, kausalen, Locus, das die Assoziation der Heterozygoten erklären könnte. Tatsächlich liegt das Gen des CD14-Rezeptors in unmittelbarer Nachbarschaft zu weiteren Genloci, deren Proteine sehr wichtige Schlüsselfunktionen in der Abwehr einer Malariaerkrankung beinhalten [29].

Der heterozygote Genotyp  $CD14^{260CT}$  scheint auch im Vergleich mit dem homozygot mutierten Genotyp  $CD14^{260TT}$  einen Risikofaktor für eine Parasitämie darzustellen. Die homozygoten Träger weisen ein um 21% vermindertes Risiko auf, wiederum nicht jedoch bei hoher Parasitendichte.

Bei der Analyse der möglichen Assoziationen der Genotypen von  $CD14^{481}$  mit einer *P.-falciparum*-Parasitämie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Trägern der zwei Genotypen festgestellt werden. Es ist zwar auffällig, dass die Kinder mit dem Genotyp  $CD14^{481AG}$  im Vergleich zu denen mit dem homozygoten Wildtyp ein vermindertes Risiko für Parasitämien mit über 50000 pro  $\mu$ l hatten, das Kon-

fidenzintervall zeigt aber eine breite Streuung der Werte. Aufgrund der mangelnden Daten über die Mutation  $CD14^{482A>G}$  ist keine vergleichende Diskussion möglich.

#### **4.2.3 Einfluss der $CD14$ -Genotypen auf unkomplizierte *Malaria tropica***

Mehrere Fall-Kontroll-Studien haben bei septischen Patienten ein überzufällig häufiges Vorkommen des mutierten Genotyps  $CD14^{260TT}$  festgestellt [13, 47] und daraus geschlossen, dass dieser Genotyp zu einem septischen Krankheitsverlauf prädisponiert. So genotypisierte die Arbeitsgruppe von Gibot 90 Patienten, die aufgrund einer Sepsis intensivmedizinisch versorgt werden mussten. Als Kontrollgruppe wurden 122 gesunde Franzosen zufällig nach Alter und Geschlecht zugeordnet. Auch diese wurden bezüglich der  $CD14$ -Promotorregion genotypisiert. Die Studienergebnisse zeigten, dass in der Gruppe der Erkrankten eine statistisch signifikante Häufung der homozygoten Träger von  $CD14^{260T}$  zu finden war. Innerhalb der Fallgruppe wurde zusätzlich deutlich, dass die Träger des homozygot mutierten Genotyps ein erhöhtes Risiko eines schweren Verlaufes der Sepsis hatten und im Vergleich mit den homozygoten Trägern des Wildtyps häufiger an den Folgen der Sepsis verstarben [13]. Bei dieser Art von retrospektivem Studiendesign kann jedoch nicht nachvollzogen werden, ob es sich hierbei um ein erhöhtes Allgemeinrisiko handelt, an einer Infektion zu erkranken oder ob der klinische Verlauf einer Infektion bei diesem Patientengut schwerwiegender ist.

Die Probanden der vorliegenden longitudinalen Studie bieten hierfür bessere Voraussetzungen.

Es handelt sich um eine grosse Anzahl von Kindern, die über einen längeren Zeitraum intensiv beobachtet wurden und noch dazu ähnliche Lebensumstände teilten. Das Infektionsrisiko für *P. falciparum* ist bei den Probanden zwar selbst in denselben Dörfern nicht überall gleich [21], aber trotz allem sind die Grundvoraussetzungen der untersuchten Population vergleichbar. Bei dieser longitudinalen Untersuchung kann auf der einen Seite die Häufigkeit der Infektionen in den verschiedenen Genotypgruppen verglichen werden, auf der anderen Seite werden ebenso die Daten des klinischen Verlaufes der Erkrankung analysiert und verglichen. So ist eine Unterscheidung zwischen der möglichen Prädisposition einer Infektion und der eines klinisch schlechteren Verlaufes möglich.

Die Träger des Genotyps  $CD14^{260TT}$  wiesen im Vergleich zu Trägern von  $CD14^{260CC}$  keine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Malaria auf. Interessanterweise hatten Probanden mit dem homozygot mutierten Genotyp  $CD14^{260TT}$  ein um 21% vermindertes Risiko für eine asymptomatische Parasitämie. Dies deutet darauf hin, dass diese Probanden bei einer Infektion mit *P. falciparum* zeitnah auch die Symptome einer Malaria aufweisen, während homozygote Wildtypträger bei einer Infektion seltener klinisch erkranken.

Eine mögliche Hypothese wäre, wie oben erläutert, dass die vermehrte CD14-Expression bei dem homozygot mutierten Genotyp eine Infektion frühzeitig abwehren kann. Die Infektion zieht jedoch bei systemischer Ausbreitung eine verstärkte Stimulation von CD14 nach sich und somit auch eine verstärkte Aktivierung von TNF und ähnlichen proinflammatorischen Zytokinen. Diese systemische Antwort könnte demnach zum raschen Aufkommen von Symptomen führen.

Das mutierte Allel  $CD14^{260T}$  zeigte in wiederholten Studien eine deutliche Korrelation mit erhöhten sCD14-Konzentrationen im Blut [3, 22]. Serum-CD14 sensibilisiert bei Vorliegen von Endotoxinen unter anderem Endothelien, die eigenständig kein CD14 exprimieren [14]. Die Zellen beginnen daraufhin die Expression ihrer spezifischen entzündlichen Abwehrmechanismen. Diese Kaskade wird jedoch nicht nur durch Endotoxine oder andere Wandbestandteile Gram-negativer Bakterien aktiviert. Die Präsenz von *P. falciparum* bewirkt durch die Aktivierung von sCD14 ähnliche proinflammatorische Reaktionen.

Es wurde die Aktivierung von dendritischen Zellen, als Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem zellulären Immunsystem, intensiv beobachtet. So wurde bei Vorliegen einer *P. falciparum*-Parasitämie der gleiche Reaktionsmechanismus wie bei einer Endotoxämie nachgewiesen [41], so dass davon ausgegangen werden kann, dass sCD14 bei Anwesenheit von *P. falciparum* eine vaskuläre Entzündungsreaktion hervorruft [39]. Die möglicherweise erhöhten sCD14-Blutkonzentrationen bei den Trägern von  $CD14^{260TT}$  könnten ein entscheidender Faktor sein, weshalb diese Gruppe bei einer bestehenden Parasitämie deutlich häufiger Symptome aufweist als die Gruppe des homozygoten Wildtyps. Eine erhöhte sCD14-Expression könnte die Entwicklung einer verstärkten systemischen Entzündung bewirken, die sich auf mikrovaskulärer Ebene im gesamten Körper ausbreitet. Auf der einen Seite weisen

die homozygot mutierten Träger so seltener Parasiten vor, da diese frühzeitig systemisch abgewehrt werden. Auf der anderen Seite verlaufen die Infektionen bei systemischer Ausbreitung mit stärkeren Symptomen als bei den Trägern von  $CD14^{260CC}$ , da mit Hilfe der erhöhten sCD14-Konzentration rasch das angeborene und das zelluläre Immunsystem aktiviert werden.

Wenisch *et al.* demonstrierten eine deutliche Korrelation zwischen erhöhten Konzentrationen von sCD14 und gestiegenen TNF-Werten [39], so dass es wahrscheinlich ist, dass zusätzlich erhöhte TNF-Werte die Prädisposition von  $CD14^{260TT}$  für symptomatische Malariaerkrankungen ausmachen [1].

Auch in der Untersuchung des Phänotypen „unkomplizierte Malaria tropica“ in den Gruppen der drei möglichen Genotypen von  $CD14^{260}$  war der heterozygote Genotyp  $CD14^{260CT}$  anscheinend ein Risikofaktor für die Malaria. Diese Gruppe hatte im Vergleich mit den homozygoten Wildtyp-Trägern ein um 11% erhöhtes Risiko, an einer Malaria tropica zu erkranken. Die Anfälligkeit stieg bei erhöhter Parasitendichte deutlich an. Auch hier gelten ähnliche Thesen wie bereits oben beschrieben. Es ist möglich, dass es sich um ein noch unbekanntes Kopplungsungleichgewicht handelt oder dass die Heterogenität des Proteins einen anderen noch nicht erforschten Einfluss auf die Expression des CD14-Moleküls birgt.

Die Untersuchungen möglicher Assoziationen der  $CD14^{481}$ -Genotypen und unkomplizierter Malaria tropica erbrachten keine weiteren Erkenntnisse. Die Träger des Allels  $CD14^{481G}$  besitzen möglicherweise einen Schutzfaktor gegenüber Malaria mit erhöhten *P.falciparum*-Parasitämien. Dies lässt sich jedoch bei der geringen Fallzahl und der breiten Streuung des Konfidenzintervalles nicht belegen.

#### **4.2.4 Einfluss der CD14-Genotypen auf schwere Malaria tropica**

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass vor allem die schwere Manifestation der Malaria vom Genotyp  $CD14^{260TT}$  beeinflusst werden. Dies wird vor allem durch die Analyse der Fallbeispiele von schwerer Malaria deutlich. Insgesamt kam es innerhalb der untersuchten Studienzeit in 60 Fällen zu dem Krankheitsbild einer schweren Malaria in den drei Gruppen des Genotyps  $CD14^{260}$ . Die Gruppe von  $CD14^{260CT}$  bewies ein doppelt so hohes Risiko wie die des Wildtyps. In der Gruppe der homozygoten Träger der Mutation kam es sogar dreimal so häufig zu schwerer

Malaria. Dies weist darauf hin, dass das Allel  $CD14^{260T}$  ein Risikofaktor für die Entwicklung einer schweren Malaria tropica ist. Es lässt sich womöglich mit der erhöhten Transkriptionsaktivität des mutierten  $CD14$ -Promotors und den damit erhöhten Zytokinkonzentrationen in Verbindung bringen.

Es ist gezeigt worden, dass erhöhte Werte von TNF eine bedeutende Rolle in dem klinischen Verlauf der schweren Malaria spielen. Erhöhte TNF-Konzentrationen werden sowohl mit Hyperpyrexie und schwerer Malaria-assoziiertes Anämie als auch mit zerebraler Malaria in Verbindung gebracht [1, 25, 30]. Verschiedene Studien belegen, dass TNF eine bedeutende Rolle in der Induktionskaskade von *Intercellular-adhesion-molecule-1* (ICAM-1) spielt [37, 40]. ICAM-1 ist ein Oberflächenprotein der Endothelien, das auch an den zerebralen Endothelien exprimiert wird. Es wird vermutet, dass dieses Molekül sehr wichtig für die Adhäsion von *P.-falciparum*-infizierten Erythrozyten an den mikrovaskulären Gefäßwänden des Gehirns ist [23]. Die Adhäsion obstruiert die Blutgefäße, was eine Ischämie oder Hämorrhagie zur Folge hat und zur schweren Komplikation der zerebralen Malaria führt. Erhöhte TNF-Blutwerte können demnach bei einer *P.-falciparum*-Parasitämie eine schwere Malaria auslösen. Wie bereits erwähnt, wurden bei erhöhten sCD14-Konzentrationen erhöhte TNF-Werte beobachtet [39]. Studien, die sCD14-Konzentrationen im Blut von Malariapatienten bestimmen und deren Assoziation mit dem klinischen Krankheitsverlauf untersuchen, sollten demnach folgen.

Die schwere Malaria war der einzige Phänotyp in dieser Studie, bei dem kein Unterschied zwischen dem Genotyp  $CD14^{260CT}$  und  $CD14^{260TT}$  festgestellt wurde. Dies unterstreicht die Bedeutung, die das Allel  $CD14^{260T}$  als Risikofaktor für eine schwere Malaria hat.

Da bei Trägern von  $CD14^{260T}$  eine Prädisposition für multiple Infektionen nachgewiesen wurde [2], sollten Koinfektionen in folgenden Untersuchungen mit untersucht werden.

#### **4.2.5 Einfluss der $CD14$ -Genotypen auf Anämie**

Blutarmut ist eine häufig beobachtete Folge der Malaria. Die schwere Anämie mit Hämoglobinwerten unter 5,0 g/dl ist sogar ein entscheidendes Kriterium für die Dia-

gnose einer schweren Malaria [44]. Deshalb wurden die Träger der beiden Punktmutationen auf diesen Phänotyp hin untersucht.

Die homozygoten Träger des Allels  $CD14^{260T}$  zeigten im Vergleich mit den homozygoten Trägern des Wildtyps einen geringen Schutz gegenüber leichten Anämien. Dieser Unterschied bestand ebenso im Vergleich mit der Gruppe der heterozygoten Träger (16% vermindertes Risiko). Dies ist schwer mit den vorhergehenden Überlegungen zu vereinbaren. In den vorangegangenen Untersuchungen wurden in dieser Arbeit die Ergebnisse des Genotyps  $CD14^{260TT}$  mit erhöhten TNF-Werten in Verbindung gebracht. Jedoch soll TNF durch Knochenmarksuppression eine Anämie verstärken [7], so dass ein Schutz vor Anämie bei dem Genotyp  $CD14^{260TT}$  nicht zu erwarten ist. Eine mögliche Ursache könnte jedoch der Schutz des homozygot mutierten Genotyps vor einer Parasitämie sein. Einer der meist diskutierten Pathomechanismen der Malaria-assoziierten Anämie ist nämlich die Zerstörung der Erythrozyten bei Befall durch die Malaria-Parasiten [31]. Bei geringerem Parasitenbefall dieser Genotypgruppe könnte sie dies auch vor der Malaria-assoziierten Anämie schützen.

Die parasitäre Zerstörung infizierter Erythrozyten könnte die Ursache dafür sein, dass die heterozygoten Träger im Vergleich mit den Trägern des homozygoten Wildtyps aufgrund ihres erhöhten Malariarisikos ein um 18% erhöhtes Risiko für schwere Anämie vorweisen. Es bliebe jedoch zu untersuchen, weshalb die homozygot mutierten Träger keine erhöhte Anämierate aufweisen, obwohl sie dreimal so häufig wie die Gruppe des Wildtyps an schwerer Malaria erkranken.

Die Untersuchungen der Mutation von  $CD14^{481}$  ergaben auch in dieser Analyse keine relevanten Ergebnisse, so dass zusammenfassend die Vermutung nahe liegt, dass die Transition  $CD14^{481A>G}$  keinen bedeutenden Einfluss auf die Infektionsdynamik von *P. falciparum* bei den untersuchten Kindern hat.

#### **4.2.6 Einfluss der *CD14*-Genotypen auf Letalität**

In der Studienpopulation kam es im Laufe der untersuchten drei Jahre zu 19 Todesfällen. 12 von denen sind in der Gruppe des Genotyps  $CD14^{260}$  erfasst worden. Diese Fallzahl ist zu gering, um das Risiko des letalen Ausgangs einer *P.-falciparum*-Infektion der drei Gruppen zu vergleichen. Jedoch ergaben bereits die Ergebnisse der

jeweiligen Allelfrequenzen keinen Anlass dafür, anzunehmen, dass das Allel *CD14*<sup>260C</sup> einen Selektionsvorteil gegenüber *CD14*<sup>260T</sup> beinhaltet.

Da nur 8 der 19 Todesfälle unter den erfassten Probanden der Gruppen des Genotyps *CD14*<sup>481</sup> geschahen, können auch hier keine Theorien bezüglich der Risiken der beiden Genotypgruppen aufgestellt werden.

### **4.3 Schlussfolgerung und Blick in die Zukunft**

Diese Arbeit liefert Hinweise dafür, dass der homozygot mutierte Genotyp *CD14*<sup>260TT</sup> einen deutlichen Einfluss auf die *P.-falciparum*-Infektionsdynamik hat. Während bei Trägern dieses Genotyps eine geringe Parasitämie deutlich seltener vorkam, wurde ein erhöhtes Risiko für symptomatische Malariaverläufe beobachtet.

Die Ergebnisse über die Divergenz zwischen dem homozygoten Genotyp *CD14*<sup>260TT</sup> und dem heterozygoten machen deutlich, wie unklar der Pathomechanismus von CD14 und der Zytokininduktion bei *P.-falciparum*-Parasitämien ist. Es könnten Studien folgen, in denen mögliche Assoziationen der *CD14*-Genotypen und der TNF- sowie sCD14-Spiegel bei Vorliegen einer *P.-falciparum*-Infektion untersucht werden. Interessant ist weiterhin die Frage, ob die jeweiligen Genotypen die Teilimmunität der Probanden im Verlauf beeinflussen können. Hierfür sollten ältere Probanden über einen längeren Zeitraum untersucht werden. In diesem Zusammenhang könnte außerdem untersucht werden, ob die Rate der asymptomatischen Parasitämien bei den Trägern von *CD14*<sup>260TT</sup> im Alter zunimmt und somit eine zunehmende Toleranz gegenüber den Parasiten entsteht oder ob eine verstärkte TNF-Induktion durch die Mutation dieses eventuell verhindert.

Die Erfassung von möglichen Kopplungsungleichgewichten zwischen den *CD14*-Mutationen und anderen immunrelevanten DNS-Sequenzen könnte nachweisen, ob andere haplotypische Genvarianten für die Assoziationen verantwortlich sind.

## 5. Zusammenfassung

Der CD14-Rezeptor nimmt eine Schlüsselfunktion der Abwehrreaktion des angeborenen Immunsystems ein. Die verstärkte Transkriptionsrate von CD14 bei Vorliegen der Promotorpunktmutation  $CD14^{260C>T}$  beeinflusst den Krankheitsverlauf bei Infektionen.

In dieser Arbeit wurden 1070 Kleinkinder mit verschiedenen Varianten von  $CD14^{260}$  und  $CD14^{481}$  über einen Zeitraum von anderthalb Jahren bezüglich des Auftretens von Malaria-Phänotypen beobachtet. Die Analysen zeigten einen Einfluss auf die Infektionsdynamik von *P. falciparum* durch den Genotyp  $CD14^{260TT}$ . Dieser homozygote Genotyp war mit einem deutlichen Schutz vor einer *P.-falciparum*-Parasitämie assoziiert (17% seltener nachgewiesene Parasitämien im Vergleich zu dem homozygoten Wildtyp  $CD14^{260CC}$ ,  $p<0,004$ ). Die Träger wiesen jedoch im Vergleich mit dem Wildtyp auch eine verminderte Rate an asymptomatischen Parasitämien auf (Punktmaßzahl: 0,79,  $p<0,009$ ), so dass  $CD14^{260TT}$  keinen statistisch relevanten Schutzfaktor bei Malariaepisoden bedeutet. Anhand der Ergebnisse wurde in dieser Arbeit die These postuliert, dass der mutierte Genotyp  $CD14^{260TT}$  insgesamt eine stärkere Immunantwort auf die Parasitämie bewirken könnte.

Kinder mit dem heterozygoten Genotyp  $CD14^{260CT}$  hatten im Gegensatz zu den homozygoten  $CD14^{260}$ -Genotypen häufiger Parasitämien und Malariaepisoden (7% häufiger Parasitämien als der Wildtyp,  $p<0,044$ , 11% häufiger Malariaepisoden,  $p<0,018$ ). Die heterozygoten Träger hatten außerdem ein erhöhtes Risiko für schwere Anämie (Punktmaßzahl: 1,18,  $p<0,010$ ). Für diese Beobachtung konnte auch im Hinblick auf vorangegangene Studien keine Erklärung gefunden werden.

Beide Genotypen,  $CD14^{260CT}$  und  $CD14^{260TT}$ , zeigten ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung von schwerer Malaria im Vergleich zum Wildtyp ( $CD14^{260CT}$ : Punktmaßzahl: 2,29,  $p<0,044$ .  $CD14^{260TT}$ : Punktmaßzahl: 3,38,  $p<0,009$ ).

Bei Kindern mit der Transition  $CD14^{481A>G}$  konnte kein Einfluss auf Infektionsdynamik der *P.-falciparum*-Parasitämien nachgewiesen werden.

Zusammengefasst zeigt sich ein deutlicher Einfluss der Punktmutation  $CD14^{260C>T}$  auf die Infektionsrate und die Krankheitsverläufe bei *P.-falciparum*-Parasitämien.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Allan, R.; Rowe, A.; Kwiatkowski, D. (1993) *Plasmodium falciparum* varies in its ability to induce Tumor necrosis factor. *Infection and Immunity* 61(11): 4772-4776.
2. Baier, R. J.; Loggins, J.; Yanamandra, K. (2006) IL-10, IL-6 and CD14 polymorphisms and sepsis outcome in ventilated very low birth weight infants. *BMC Medicine* 4:10.
3. Baldini, M.; Lohman, C.; Halonen, M.; Erickson, R.; Holt, P.; Martinez, F. (1999) A Polymorphism in the 5' Flanking Region of the CD14 Gene is Associated with Circulating Soluble CD14 Levels and with Total Serum Immunglobulin E. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 20: 976-983.
4. Bejon, P.; Berkley, J.A.; Mwangi, T.; Ogada, E.; Mwangi, I.; Maitland, K.; Williams, T.; Scott, J.A.G.; English, M.; Lowe, B.S.; Peshu, N. (2007) Defining childhood severe falciparum malaria for intervention studies. *Public Library of Science, England* 4(8): e251.
5. Boutlis, C.S.; Yeo, T.W.; Anstey, N.M. (2006) Malaria tolerance – for whom the cell tolls? *Trends in Parasitology* 22(8): 371-377.
6. *Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics of the United States of America* (2002) 2000 CDC Growth Charts for the United States: Methods and Development, Data From the National Health Examination Surveys and the National Health and Nutrition Examination Surveys. *Vital and Health Statistics, Series 11, Number 246, DHHS Publication No. (PHS) 2002-1696.*
7. Clark, I.A.; Budd, A.C.; Alleva, L.M.; Cowden, W.B. (2006) Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine. *Malaria Journal* 5:85.
8. D'Avila, LC.; Albarus MH.; Franco, CR.; Aguiar, BB.; Oliveira, JR.; Dias, FS.; Alho, CS (2006) Effect of CD14<sup>-260C>T</sup> polymorphism on the mortality of critically ill patients. *Immunology and Cell Biology* 84(4): 342-348.
9. Dauphinee S.M.; Karsan, A. (2006) Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Laboratory Investigation* 86: 9-22.

10. Devitt, A.; Moffatt, O.; Raykundalia, C; Capra, J.D; Simmons, D. L.; Gregory, C. D.: Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392: 505-509.
11. Evans, J.A.; Adusei, A.; Timmann, C.; May, J.; Mack, D.; Agbenyega, T.; Horstmann, R.D.; Frimpong, E. (2004) High mortality of infant bacteraemia clinically indistinguishable from severe malaria. *Quarterly Journal of Medicine* 97: 591-597.
12. Giacconi, R.; Caruso, C.; Lio, D.; Muti, E.; Cipriano, C.; Costarelli, L.; Saba, V.; Gasparini, N.; Malavolta, M.; Mocchegiani, E. (2007) CD14 C (-260) T polymorphism, atherosclerosis, elderly: Role of cytokines and metallothioneins. *International Journal of Cardiology* 120: 45-51.
13. Gibot, S.; Cariou, A.; Drouet, L.; Rossignol, M.; Ripoll, L. (2002) Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Official Journal of the Society of Critical Care Medicine* 30(5): 969-973.
14. Gong, J.P.; Dai, L.; Liu, C.; Wu, C.; Shi, Y.; Li, S.; Li, X. (2002) Expression of CD14 protein and its gene in liver sinusoidal endothelial cells during entoxemia. *World Journal of Gastroenterology* 8(3): 551-554.
15. Hehlhans, T.; Pfeffer, K. (2005) The intriguing biology of the tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115: 1-20.
16. Hensmann, M.; Kwiatkowski, D. (2001) Cellular basis of early cytokine response to *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, 69(4): 2364-2371
17. *Innate Immunity*(2008).  
<http://innateimmunity.net/IIPGA/IIPGA2/PGAs/InnateImmunity/CD14>
18. Jackola, D.R.; Basu, S.; Liebler, C.L.; Willaert, R.; Luah, S.S.; Oetting, W.; King, R.A.; Blumenthal, M.N. (2006) CD14 promoter polymorphisms in atopic families: Implications for modulated allergen-specific Immunglobulin E and G1 response. *International Archives of Allergy and Immunology* 139(3): 217-224.
19. Kabesch, M.; Hasemann, K.; Schickinger, V.; Tzotcheva, I.; Bohnert, A.; Carr, D.; Baldini, M.; Hackstein, H.; Leupold, W.; Weiland, S.K.; Martinez, F. D.; von Mutius, E.; Bein, G. (2004) A promoter polymorphism in the CD14 gene is asso-

ciated with elevated levels of soluble CD14 but not with IgE or atopic disease. *Allergy* 59: 520-525.

20. Kobbe, R.; Neuhoff, R.; Marks, F.; Adjei, S.; Langefeld, I.; von Reden, C.; Adjei, O.; Meyer, C.; May, J. (2006) Seasonal variation and high multiplicity of first *Plasmodium falciparum* infections in children from a holoendemic area in Ghana, West Africa. *Tropical Medicine and International Health* 11(5): 613-619.

21. Kreuels, B.; Kobbe, R.; Adjei, S.; Kreuzberg, C.; von Reden, C.; Bäter, K.; Klug, S.; Busch, W.; Adjei, O.; May, J. (2008) Spatial variation of malaria incidence in young children from a geographically homogenous area with high endemicity. *Journal of Infectious diseases* 197(1): 85-93.

22. Le Van, T.; Bloom, J.; Bailey, T.; Karp, C.; Halonen, M.; Martinez, F.; Vercelli, D. (2001) A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of the Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *Journal of Immunology* 167: 5838-5844.

23. Lou, J.; Lucas, R.; Grau, G.E. (2001) Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clinical Microbiology* 14(4): 810-820.

24. May, J.; Adjei, S.; Busch, W.; Gabor, J.; Issifou, S.; Kobbe, R.; Kreuels, B.; Lell, B.; Schwarz, N.; Adjei, O.; Kremsner, P.; Grobusch, M. (2008) Therapeutic and prophylactic effect of intermittent preventive anti-malarial treatment in infants (IPTi) from Ghana and Gabon. *Malaria Journal* 7:198.

25. McGuire, W.; Knight, J.C.; Hill, A.V.S.; Allsopp, C.E.M.; Greenwood, B.M.; Kwiatkowski, D. (1999) Severe malaria anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *Journal of Infectious Diseases* 179: 287-290.

26. Moody, A. (2002) Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clinical Microbiology Reviews* 15(1): 66-78.

27. O'Meara, W.P.; Hall, B.F.; McKenzie, F.E. (2007) Malaria vaccine efficacy: the difficulty of detecting and diagnosing malaria. *Malaria Journal*, 6:36.

28. Pombo, D.J.; Lawrence, G.; Hirunpetcharat, C.; Rzepczyk, C.; Bryden, M.; Cloonan, N.; Anderson, K.; Mahakunkijcharoen, Y.; Martin, L.B.; Wilson, D.; Elliott, S.; Elliott, S.; Eisen, D.P.; Weinberg, J.B.; Saul, A.; Good, M.F. (2002) Immunity to

malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. The Lancet 360: 610-617.

29. Rihet, P.; Traoré, Y.; Abel, L.; Aucan, C.; Traoré-Leroux, T.; Fumoux, F. (1998) Malaria in Humans: *Plasmodium falciparum* blood infection levels are linked to chromosome 5q31-q33. American Journal of human Genetics, 63: 498-505.
30. Rudin, W.; Eugster, H.P.; Bordmann, G.; Bonato, J.; Müller, M.; Yamage, M.; Ryffel, B. (1997) Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor alpha-/beta-deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and T helper type 1 response. American Journal of Pathology 150(1): 257-266.
31. Schofield, L.; Grau, G.E. (2005) Immunological processes in malaria pathogenesis. Nature Reviews Immunology 5:722-735.
32. Schumann, R. (1992) Function of lipopolysaccharide (LSP)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. Research in Immunology 143: 11-15.
33. Scragg, I. G.; Hensmann, M.; Bate, C. A. W.; Kwiatkowski, D. (1999) Early cytokine induction by *Plasmodium falciparum* is not a classical endotoxine-like process. European Journal of Immunology 29: 2636-2644.
34. Shimada, K.; Watanabe, Y.; Mokuno, H.; Iwama, Y.; Daida, H.; Yamaguchi, H. (2000) Common polymorphism in the promoter of CD14 monocyte receptor gene is associated with acute myocardial infarction in Japanese men. American Journal of Cardiology 86: 682-684.
35. Sinden, R.E.; Gilles, H.M. (2002) The malaria parasites. In: Warrell, D.A.; Gilles, H.M. (Hrsg.) Essential malariology. Arnold, London, New York, New Delhi (4. Auflage, Seiten 8-34).
36. Snow, R.W.; Gilles, H.M. (1999) The epidemiology of malaria. In: Warrell, D.A.; Gilles, H.M. (Hrsg.) Essential malariology. Arnold, London, New York, New Delhi (4. Auflage, Seiten 8-34)
37. Turner, G.; Chuong, L.V.; Mai, N.T.H.; Chau, T.T.H.; Phu, N.H.; Bethell, D.; Wyllie, S.; Louwrier, K.; Fox, S.B.; Gatter, K.C.; Day, N.P.; Hien, T.T.; White, N.J.; Berendt, A.R. (1998) Systemic endothelial activation occurs in both mild and severe malaria. American Journal of Pathology 152(6): 1477-1487.

38. Unkelbach, K.; Gardemann, A.; Kostrzewa, M.; Philipp, M.; Tillmanns, H.; Haberbosch, W. (1999) A new promoter polymorphism in the gene of Lipopolysaccharide Receptor, CD14 is associated with expired myocardial infarction in patients with low arteriosclerotic risk profile. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 19: 932-938.
39. Wenisch, C.; Wenisch, H.; Parschalk, S.; Vanijanonta, S.; Burgmann, H.; Exner, M.; Zedwitz-Liebenstein, K.; Talhammer, F.; Georgopoulos, A.; Graninger, W.; Looareesuwan, S. (1996) Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical and Experimental Immunology* 105: 74-78.
40. Wong, D.; Dorovini-Zis, K. (1992) Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmunology* 39: 11-22.
41. Wong, K.; Rodriguez, A. (2008) *Plasmodium* infection and endotoxic shock induce the expansion of regulatory dendritic cells. *Journal of Immunology* 180: 716-726.
42. *World Health Organisation* (2007) Fact sheet nr. 94:  
[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/print.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/print.html)
43. *World Health Organisation* (2006) Country health fact sheet 2006 Ghana:  
[www.afro.who.int/home/countries/fact\\_sheets/ghana.pdf](http://www.afro.who.int/home/countries/fact_sheets/ghana.pdf)
44. *World Health Organisation* (2000) Severe falciparum malaria. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94: Supplement 1.
45. *World Health Organisation* (1999) Bench Aids for the Diagnosis of Malaria Infections, 2. Ausgabe.
46. Wright, S.; Ramos, R.; Tobias, P.; Ulevitch, R.; Mathison, J. (1990) CD14. A receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249(4975): 1431-1433.
47. Yu, B.J.; Li, J.S.; Zhang, D.L.; Tang, X.M. (2003) The association of the single nucleotide polymorphisms on TNF and CD14 promoters with the mortality of infection, systematic inflammatory response syndrome and sepsis in surgical patients. (Publikation auf Chinesisch) *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 83(24): 2132-2136.

## 7. Danksagung

Ich möchte insbesondere Herrn Prof. Dr. Jürgen May dafür danken, dass er mir diese Dissertation und die dazugehörigen Erlebnisse in Ghana ermöglicht hat. Großen Dank für die Betreuung und vor allem für die Zeit, die trotz aller Zeitknappheit doch stets gefunden wurde.

Herrn Jürgen Sieverts, Frau Christa Ehmens und allen anderen Mitarbeitern des Labors des Bernhard-Nocht-Institutes möchte ich herzlich dafür danken, dass sie mir während meiner Laborarbeit mit unglaublicher Geduld so viel geholfen haben. Ebenso viel Dank möchte ich Frau Wibke Busch entgegen bringen, da sie mir wiederholte Male half, Stata® ein klein wenig besser zu verstehen. Mein ganz besonderer Dank hierfür gilt Herrn Dr. Benno Kreuels, ohne den ich die Statistik nie verstanden hätte.

Herrn Dr. Benno Kreuels möchte ich weiterhin zusammen mit Frau Dr. Christina Kreuzberg für die großartige Zeit und Erfahrungen in Kumasi danken. Mein Dank gilt hierbei ebenso der gesamten Arbeitsgruppe des KCCR-Institutes. Und selbstverständlich danke ich all den ghanaischen Familien, die an der Studie teilgenommen haben.

Ich danke meinem Vater, der mich die Faszination des Lebens lehrte und mir die Abenteuerlust schenkte. Meiner Mutter danke ich für die Geduld, die sie mir beibrachte und vor allem entgegenbrachte. Sie gab mir das Vertrauen, an mich selbst zu glauben.

All meinen Geschwistern danke ich für ihre unendliche Unterstützung, die sie mir im Leben bedeuten.

Meinen Freunden möchte ich dafür danken, dass sie mich in dieser Zeit der Arbeit, die manche Male unendlich erschien, trugen und ertrugen.

Aber ganz besonders möchte ich meinem geliebten Benjamin danken. Danke, dass Du da bist.

## **8. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Geburtsdatum: 24.03.1981

Geburtsort: Gifhorn

### **Aktuelle Arbeitsstelle**

Seit 03/2008 Assistenzärztin in der Weiterbildung zum Facharzt der Psychiatrie und Psychotherapie im Bethesda Krankenhaus Bergedorf

### **Studium**

04/2000 - 12/2007 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

08/2004 – 04/2005 Datensammlung und andere klinische Tätigkeiten in Kumasi (Ghana) zum Zwecke der Promotion

08/2002 – 07/2003 Zwei Auslandssemester an der Università di Palermo (Italien)

### **Schulausbildung**

01/1992 – 05/1999 Gymnasium der Deutschen Schule von Teneriffa (Spanien)

08/1991 – 12/1991 Otto-Hahn-Gymnasium (Geesthacht, Schleswig-Holstein)

## 9. Liste der verwendeten Abkürzungen

µl	Mikroliter
A	Adenin
Bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
CD14	<i>Cluster of differentiation-14</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EMP-1	<i>Erythrocyte-membrane-protein-1</i>
Hb	Hämoglobin
G	Guanin
g/dl:	Gramm pro Deziliter
GPI	Glycolsylphosphatidylinositol
ICAM-1	<i>Intercellular-adhesion-molecule-1</i>
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
Insg.	Insgesamt
IPTi	<i>Intermittent preventive anti-malarial treatment in infants</i>
IRR	<i>Incidence rate ratio</i>
KCCR-Institut	Kumasi Centre of Collaborative Research, Ghana
KI	Konfidenzintervall
LBP	Lipopolysaccharide bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-aktiviertes-Protein-Kinase
mCD14	Membranständiges CD14
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information, United States</i>
NF-kappa-B	Nukleärer Faktor-kappa-B
NTP	Nukleosidtriphosphat
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PYAR	<i>Persons year at risk, Personenrisikojahre</i>

RR	Relatives Risiko
SA	Standardabweichung
sCD14	Serumlösliches CD14
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
SP	Sulfadoxin-Pyrimethamin
T	Thymin
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
V.a.	Vor allem
WHO	<i>World Health Organisation</i>

## **10.Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe erfasst, 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.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....