

Humane Endothelrezeptoren für den Malaria-  
Parasiten *Plasmodium falciparum* (Laveran, 1880)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
des Departments Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik  
und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kathrin Schuldt  
aus Brunsbüttel

Hamburg 2008

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. R. HORSTMANN  
Weitere Gutachterin der Dissertation:  
Frau Professor Dr. I. BRUCHHAUS  
Tag der Disputation: 19. September 2008

Hamburg, den 03. September 2008



*Jörg Ganzhorn*

Professor Dr. Jörg Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie



Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2004 bis Juli 2008 am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Horstmann durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Rolf Horstmann danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die zur Durchführung der Arbeit benötigten Mittel sowie die engagierte Betreuung dieser Arbeit. Er war Ansprechpartner und Ideengeber des Projekts und trug maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Bei Prof. Dr. Iris Bruchhaus bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Für die Einarbeitung in die Methodik der Zytoadhärenz-Versuche danke ich Srabasti Chakravorty und Prof. Alister Craig von der Liverpool School of Tropical Medicine.

Cosima Kretz und Prof. Dr. Peter Krammer vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg danke ich für die gute Zusammenarbeit hinsichtlich der funktionellen Studien zu CD95.

Ein großes Dankeschön für die hervorragende Zusammenarbeit geht an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für Tropenmedizinische Grundlagenforschung des Bernhard-Nocht-Instituts. Im Besonderen gilt mein Dank Dr. Claudia Esser, Birgit Förster, Dr. Daniela Kuhn und Sandra Nyenhuis für das große Engagement während der gesamten Arbeit.

Herzlicher Dank für die Unterstützung auch außerhalb des Instituts an Wibke Loag, Florian Herb und Michaela Petter.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mich während meiner gesamten Ausbildung in jeglicher Form unterstützt haben.

Für den großen Rückhalt danke ich herzlich Alice Grabbe.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>IV</b>
<b>Summary</b> .....	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie und Bedeutung der Malaria .....	1
1.2 Entwicklungszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	2
1.3 Klinik und Immunität der Malaria tropica.....	3
1.4 Sequestrierung von <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten .....	4
1.4.1 <i>P. falciparum</i> -Erythrocyte-Membrane-Protein-1 (PfEMP1) .....	5
1.4.2 Wirtsrezeptoren.....	6
1.5 Genetische Epidemiologie der <i>P. falciparum</i> -Malaria .....	7
1.6 Untersuchte Rezeptoren .....	8
1.6.1 P-Selektin .....	8
1.6.2 CD9 .....	8
1.6.3 CD95 .....	9
1.7 Zielsetzung .....	11
<b>2 Studiendesign und Studienpopulation</b> .....	<b>12</b>
2.1 Studiendesign .....	12
2.2 Studienpopulation .....	12
<b>3 Material</b> .....	<b>14</b>
3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	14
3.2 Laborausstattung .....	14
3.3 Puffer und weitere Lösungen .....	15
3.4 cDNA .....	16
3.5 Plasmide .....	16
3.6 Oligonukleotide .....	16
3.7 Antikörper .....	17
3.8 Peptide.....	17
3.9 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	18
3.9.1 Bakterienstämme .....	18
3.9.2 Medien.....	18
3.9.3 Antibiotika .....	18
3.10 Eukaryotische Zelllinien und Medien .....	18
3.11 Kultivierung von <i>P. falciparum</i> .....	19
3.11.1 <i>P. falciparum</i> -Isolate .....	19
3.11.2 Medium für die Kultivierung von <i>P. falciparum</i> .....	20
3.12 Molekularbiologische Kits.....	20
<b>4 Methoden</b> .....	<b>22</b>
4.1 Genetisch-epidemiologische Methoden.....	22
4.1.1 <i>In vitro</i> -Amplifikation von DNA-Fragmenten .....	22

4.1.2	Re-Sequenzierung genomischer DNA .....	22
4.1.3	Genotypisierung von genetischen Polymorphismen .....	24
4.1.4	Statistische Testverfahren .....	25
4.2	Zellbiologische Methoden .....	26
4.2.1	Kultivierung von <i>E.coli</i> -Bakterien .....	26
4.2.2	Transformation von <i>E.coli</i> .....	27
4.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	27
4.2.4	Reaktionen mit DNA-modifizierenden Enzymen .....	28
4.2.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA .....	28
4.2.6	Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien .....	29
4.2.7	Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zelllinien .....	30
4.2.8	Kultivierung von <i>P. falciparum</i> .....	31
4.3	Protein- und Immunchemische Methoden .....	32
4.3.1	Proteinexpression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i> .....	32
4.3.2	Immunoblot .....	33
4.3.3	Immunfluoreszenz-Färbungen .....	34
4.3.4	<i>P. falciparum</i> -Zytoadhäsionsversuche .....	35
4.3.5	Reportergen-Assay .....	36
4.3.6	Immunfluoreszenz-Färbung peripherer mononukleärer Zellen .....	38
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
5.1	P-Selektin .....	39
5.1.1	Genetische Varianten von P-Selektin .....	39
5.1.2	Assoziationsstudien der Varianten von <i>SELP</i> .....	40
5.1.3	Kopplungsungleichgewicht der Varianten von <i>SELP</i> .....	42
5.1.4	Rekonstruktion der Haplotypen .....	43
5.2	CD9 .....	44
5.2.1	CD9 als Rezeptor für <i>P. falciparum</i> -infizierte Erythrozyten .....	44
5.2.2	Genetische Varianten von <i>CD9</i> .....	48
5.2.3	Assoziationsstudien der Varianten von <i>CD9</i> .....	49
5.2.4	Kopplungsungleichgewicht der Varianten von <i>CD9</i> .....	50
5.2.5	Rekonstruktion der Haplotypen .....	51
5.3	CD95 .....	51
5.3.1	Charakterisierung einer Zelllinie, die CD95 exprimiert .....	51
5.3.2	Bindung von IE an CD95 .....	53
5.3.3	Genetische Varianten von <i>CD95</i> .....	54
5.3.4	Assoziationsstudien der Varianten von <i>CD95</i> .....	54
5.3.5	Kopplungsungleichgewicht der Varianten von <i>CD95</i> .....	57
5.3.6	Rekonstruktion der Haplotypen .....	58
5.3.7	Funktionelle Analyse von <i>CD95</i> -436C>A .....	58
5.3.8	Einfluss von -436C>A auf die Oberflächenexpression von CD95 auf peripheren mononukleären Zellen .....	60
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>63</b>
6.1	P-Selektin .....	63
6.1.1	Genetische Varianten von <i>SELP</i> .....	63
6.1.2	Assoziation von rs3917856 mit der Manifestation einer schweren Malaria ...	63
6.2	CD9 .....	66
6.2.1	CD9 als Wirtsrezeptor für IE .....	66
6.2.2	Fehlende Assoziation genetischer Varianten von <i>CD9</i> mit schwerer Malaria	67
6.2.3	Funktion von CD9 in der Pathogenese der Malaria tropica .....	67

---

6.3	CD95 .....	68
6.3.1	CD95 als Wirtsrezeptor für IE.....	68
6.3.2	Assoziation von <i>CD95</i> –436C>A mit einem Schutz vor <i>Malaria tropica</i> .....	69
6.3.3	Funktionelle Analyse von <i>CD95</i> –436C>A im Reporter-gen-Assay .....	70
6.3.4	Einfluss von –436C>A auf die Oberflächenexpression von CD95 auf peripheren mononukleären Zellen.....	71
6.3.5	Funktion von CD95 während einer Infektion mit <i>P. falciparum</i> .....	72
<b>Literaturverzeichnis.....</b>		<b>74</b>
<b>Anhang .....</b>		<b>82</b>

## Zusammenfassung

Die Sequestrierung *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten in mikrovaskulären Gefäßen des Gehirns und zahlreichen Organen ist ein Prozess, der bei Malaria tropica für die Entwicklung lebensbedrohlicher Komplikationen verantwortlich ist. Die pathophysiologischen Mechanismen und die Rolle involvierter Wirts- und Parasiten-Moleküle sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Oberflächenmoleküle P-Selektin, CD9 und CD95 auf den Verlauf einer Infektion mit *P. falciparum* untersucht.

Während P-Selektin als Interaktionspartner für parasitierte Erythrozyten bereits beschrieben ist, wurden in dieser Arbeit mittels eines zellbiologischen Ansatzes Hinweise gefunden, dass sowohl CD9 als auch CD95 an der Adäsion von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten beteiligt sein könnten. In Zytoadhäsions-Versuchen mit unterschiedlichen *P. falciparum*-Isolaten aus einem hyperendemischen Malariagebiet wurden die Bindungseigenschaften der beiden Oberflächenrezeptoren charakterisiert. Bei einer CD95-überexprimierenden Zelllinie ist eine Tendenz zur Bindung infizierter Erythrozyten zu beobachten, eine CD9-überexprimierende Zelllinie zeigt eine signifikante Erhöhung der Adhäsion. Genetische Varianten der drei Rezeptoren wurden innerhalb einer Fall-Kontroll-Studie, bestehend aus 2400 Patienten mit schwerer Malaria und 1900 gesunden Kindern aus Ghana, Westafrika, hinsichtlich einer Assoziation mit dem Auftreten einer schweren Malaria untersucht. Durch Re-Sequenzierung identifizierte Varianten wurden in der gesamten Studienkohorte genotypisiert und anhand der multivariaten logistischen Regression auf Assoziation mit der Erkrankung getestet. Für die untersuchten Varianten von *CD9* wurde kein Einfluss auf die Ausprägung einer schweren Malaria festgestellt. Im Gen von P-Selektin wurde ein protektiver Effekt der Variante 40800A>T in der 3'-UTR detektiert (OR 0,61; 95% KI: 0,44-0,85; p=0,003). Eine weitere schützende Variante ist 436 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart von *CD95* lokalisiert. Heterozygote Träger des Adenosins an dieser Position haben ein um 25% vermindertes Risiko, eine Malaria tropica zu entwickeln (OR 0,75; 95% KI: 0,64-0,88; p=9,0x10<sup>-5</sup>). Bei homozygoten Trägern beträgt der Schutz 52% (OR 0,48; 95% KI: 0,28-0,83; p=0,009). Anschließende Reporter-gen-Versuche und FACS-Analysen zur Oberflächenexpression von CD95 auf peripheren mononukleären Zellen lieferten keinen Aufschluss über die funktionelle Relevanz des Promotor-Polymorphismus – 436C>A.

Die Resultate dieser Arbeit liefern Anhaltspunkte für eine Rolle von P-Selektin, CD9 und CD95 in rezeptorvermittelten Prozessen, die bei einer Infektion mit *P. falciparum* pathophysiologische Relevanz haben könnten.



## Summary

Adherence of parasitized red blood cells to deep-organ vascular endothelium is essential for the pathogenesis of severe and life-threatening malaria complications. Despite the medical relevance of the adherence process, the knowledge of host and parasite molecules involved appears incomplete. Therefore, the focus of this work was to characterize P-Selektin, a known receptor for *P. falciparum*-infected red blood cells, as well as two new receptor candidates, CD9 and CD95.

Results of cytoadhesion assays using different *P. falciparum* field isolates collected from a malaria hyperendemic region point out, that CD9 and CD95 may function as receptors for sequestered parasites in the host. By investigating a cell line overexpressing CD95 a trend towards the adherence of parasitized red blood cells was observed. Compared to the reference cell line the binding of infected erythrocytes to cells overexpressing CD9 was significantly increased.

The impact of genetic polymorphisms present in the three molecules on the development of the disease was evaluated in a candidate-gene association study. The study cohort consisted of 2400 severe malaria cases and 1900 healthy controls recruited in Ghana, West Africa. Variants identified by re-sequencing were genotyped and analyzed by multivariate logistic regression analysis. The characterized single nucleotide polymorphisms of *CD9* do not exert any influence on the clinical manifestation of severe falciparum malaria in this study group. A variant (40800A>T) localized in the 3'-UTR of the P-Selektin gene provides a 39% reduced risk of developing severe malaria (OR 0,61; 95% CI: 0,44-0,85;  $p=0,003$ ). A second protective variant was identified at position -436 relative to the transcription start of *CD95*. Heterozygous carriers of the Adenosin at this position are protected against severe disease by 25% (OR 0,75; 95% CI: 0,64-0,88;  $p=9,0 \times 10^{-5}$ ), whereas the homozygous state of this allele provides a 52% reduced risk (OR 0,48; 95% CI: 0,28-0,83;  $p=0,009$ ). Reporter gene assays as well as FACS analysis to determine the expression level of CD95 on the surface of peripheral mononuclear cells were conducted in order to investigate the functional consequences of this variant. None of these experiments revealed any clue about the potential protective role of the variant -436A>C of *CD95* during an infection with *P. falciparum*.

The obtained results provide evidence for the involvement of P-Selektin, CD9 and CD95 in receptor-mediated processes in severe malaria pathology.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AcGFP	Grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea coerulea</i>
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CI	„Confidence Interval“
ddH <sub>2</sub> O	Doppeltdestilliertes Wasser
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLU	Fluoreszein
g	Gravitationskonstante
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
gr.	groß
GST	Glutathion-S-Transferase
H	Stunde(n)
Hb	Hämoglobin
HAc	Essigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperanzin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC-H <sub>2</sub> O	durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie gereinigtes ddH <sub>2</sub> O
HRP	Meerrettichperoxidase
iFCS	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
kl.	klein

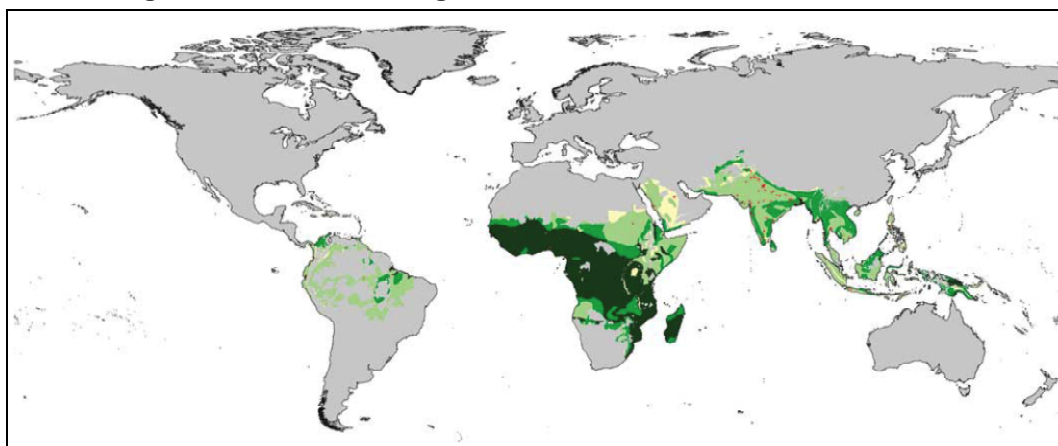
L	Liter
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
NaAc	Natriumacetat
N	Nukleotid
OD	Optische Dichte
OR(s)	Odds ratio(s)
PE	Phycoerythrin
pH	pH-Wert
PHO	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-Myristyl-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute („rotations per minute“)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SF	Standardfehler
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Triton X-100	Tertiärbutylphenylpolyoxyethylen
Tween-20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
U	Unit
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolette Strahlung
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation („World Health Organization“)
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Bedeutung der Malaria

Malaria ist heute, mehr als 100 Jahre nach Entdeckung der Plasmodien als Erreger durch Laveran (1880) und des parasitären Kreislaufs durch Ross im Jahre 1897 (Ross und Smyth, 1997), noch immer die bedeutendste parasitäre Infektionskrankheit des Menschen. Den schwersten Verlauf zeigt die Malaria tropica, hervorgerufen durch *Plasmodium falciparum*, ein einzelliger Parasit vom Stamm der Protozoen. Die Endemiegebiete der Malaria tropica erstrecken sich über weite Teile der Erde, überwiegend in tropischen und subtropischen Regionen (Abbildung 1-1).

Abbildung 1-1: Malaria-Endemiegebiete



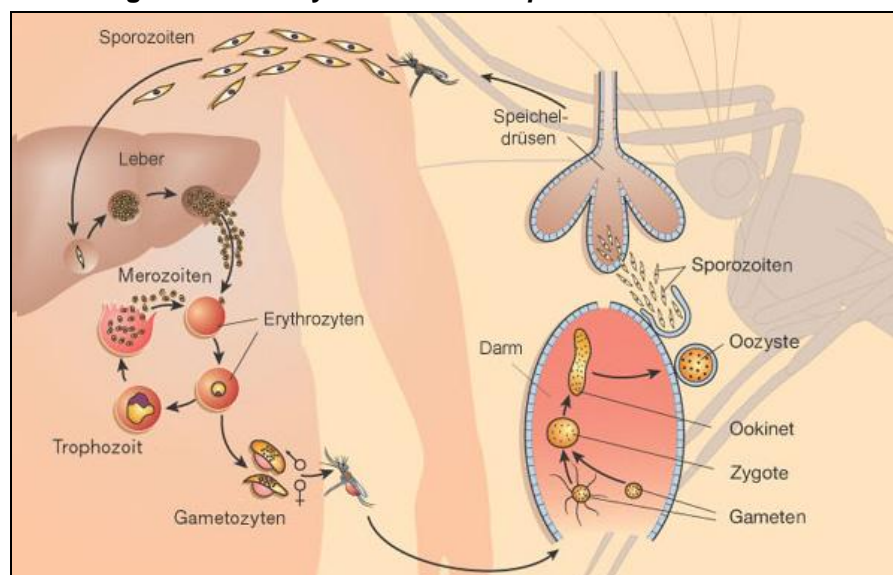
Einteilung der Endemiegebiete: hellgrün: hypoendemisch (Infektionsprävalenz bei Kindern <10%), grün: mesoendemisch (Infektionsprävalenz bei Kindern zwischen 11 und 50%); dunkelgrün: holo- und hyperendemisch (Infektionsprävalenz bei Kindern >50%); gelb: unklassifizierte Gebiete (Grafik nach Snow et al., 2005).

Weltweit lebten im Jahr 2007 etwa 2,4 Billionen Menschen in Risikogebieten für eine Infektion mit *P. falciparum* (Guerra et al., 2008). Die geschätzte Anzahl an Neuerkrankungen für das Jahr 2002 liegt bei 515 Millionen Menschen (Snow et al., 2005). Im Vergleich zu Gebieten in Südamerika und Asien ist die Übertragungsrate des Parasiten in Afrika am höchsten. Die Mehrheit aller Erkrankungen und tödlichen Verläufe betreffen schwangere Frauen und Kleinkinder in Gebieten südlich der Sahara (WHO, 2000). Nach Schätzungen sterben jährlich 1,5-2,5 Millionen Menschen an den Folgen einer Infektion mit *P. falciparum* (Vernick und Waters, 2004).

## 1.2 Entwicklungszyklus von *Plasmodium falciparum*

*P. falciparum* durchläuft einen komplexen Entwicklungszyklus, wobei eine sexuelle Vermehrung in der weiblichen Stechmücke der Gattung Anopheles (Sporogonie) und eine asexuelle Vermehrung im Menschen stattfindet (Schizogonie). Der Zyklus von *P. falciparum* ist schematisch in Abbildung 1-2 wiedergegeben.

Abbildung 1-2: Lebenszyklus von *P. falciparum*



Grafik verändert nach Wirth, 2002

Die Übertragung auf den Menschen findet während einer Blutmahlzeit der Anopheles-Mücke statt. Die Stechmücke induziert dabei mit der Speichelflüssigkeit Parasiten im Sporozoiten-Stadium in die Haut des Zwischenwirts. Die Sporozoiten sind in der Lage, in die Leber zu wandern, wo sie schließlich in einem Hepatozyten mit der Entwicklungsphase der asexuellen Schizogonie beginnen. Aus dem reifen Leber-Schizonten können bis zu 10 000 Merozoiten durch einen Abschnürungs-Prozess in die Blutbahn entlassen werden (Sturm et al., 2006). Diese ungeschlechtliche Vermehrung wird als exoerythrozytäre Phase im Lebenszyklus von *P. falciparum* bezeichnet.

Die freien Merozoiten sind in der Lage, Erythrozyten aktiv zu invadieren und sich über das Trophozoiten-Stadium in einen 8 bis 32-kernigen Schizonten zu differenzieren. Nach der Ruptur der Schizonten werden erneut Merozoiten frei, die weitere Erythrozyten befallen können. Die periodischen Fieberschübe, eine der typischen Krankheitserscheinungen der *Malaria tropica*, treten während dieser 48-stündigen erythrozytären Schizogonie auf. Nach mehreren Wochen entstehen die ersten Mikro- und Makrogameten, welche die infektiösen Stadien für den Endwirt, die Anopheles-Mücke, darstellen. Die sexuell

differenzierten Stadien können mit dem Blut durch einen Stich des Überträgers aufgenommen werden. Nach der Befruchtung des Makrogameten im Darm der Mücke beginnt die Gamogonie, und aus der Zygote differenziert sich der Ookinet. Dieser ist in der Lage, das Darmlumen zu verlassen und in das Mitteldarmepithel einzudringen. Hier findet die Entwicklung der Oozyste statt, die bis zu 10 000 Sporozoiten enthalten kann. Bricht die Oozyste auf, so gelangen die Sporozoiten in die Hämolymphe der Mücke. Sobald die Speicheldrüse ebenfalls von Sporozoiten befallen ist und diese in den Speichel-Ausführungsgang gelangt sind, ist die Mücke für den Menschen infektiös.

### 1.3 Klinik und Immunität der *Malaria tropica*

Morbidität und Mortalität einer Infektion mit *P. falciparum* sind abhängig von der Transmissionsrate, der Virulenz des Erregers, sowie vom Immunstatus und der genetischen Disposition des Betroffenen. In hochendemischen Gebieten Afrikas reicht die Symptomatik einer Infektion mit *P. falciparum* von einer asymptomatischen Parasitämie bis hin zu einer multifaktoriellen Erkrankung, die zum Tod führen kann (Mackintosh et al., 2004).

Die Manifestation einer *Malaria tropica* äußert sich in einer fieberhaften Erkrankung mit Schüttelfrost. Bei 1-2% der Fälle treten zusätzlich lebensbedrohliche Komplikationen auf. Neben Hypoglykämie, metabolischer Azidose sowie Lungen- und Nierenversagen stellen schwere Anämie und zerebrale Malaria die zwei häufigsten Manifestationen der komplizierten *Malaria tropica* dar (Newton et al., 1998).

Wird während des Krankheitsverlaufs ein Hämoglobinwert von 5 g/dl oder niedriger festgestellt, liegt definitionsgemäß eine schwere Anämie vor. An ihrer Entstehung sind verschiedene pathophysiologische Prozesse beteiligt. Dazu gehören die Eliminierung von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten (IE), Verlust von nicht-infizierten Erythrozyten und eine ineffektive Erythropoese. Es kommt zu einer Sauerstoffunterversorgung aller Organe, die lebensbedrohlich werden kann. Die molekularen Mechanismen, die diese Prozesse während einer Infektion mit *P. falciparum* auslösen, sind weitestgehend ungeklärt (Ekvall, 2003).

Das Krankheitsbild der zerebralen Malaria ist geprägt von einem komatösen Zustand der Patienten. Begleitend können Krampfanfälle auftreten. Diese Symptome werden auf die Sequestrierung parasitierter Erythrozyten am Endothel der mikrovaskulären Gefäße im Gehirn zurückgeführt (Abschnitt 1.4). Dadurch kommt es zu einer Beeinträchtigung der Blutzirkulation, zu lokalen Ischämien und Ödemen im Gehirn (Van der Heyde et al., 2006). Charakteristische Merkmale der zerebralen Malaria sind die Störung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke und sequestrierende IE in den Kapillaren des Gehirns. In mehr als 10 % aller

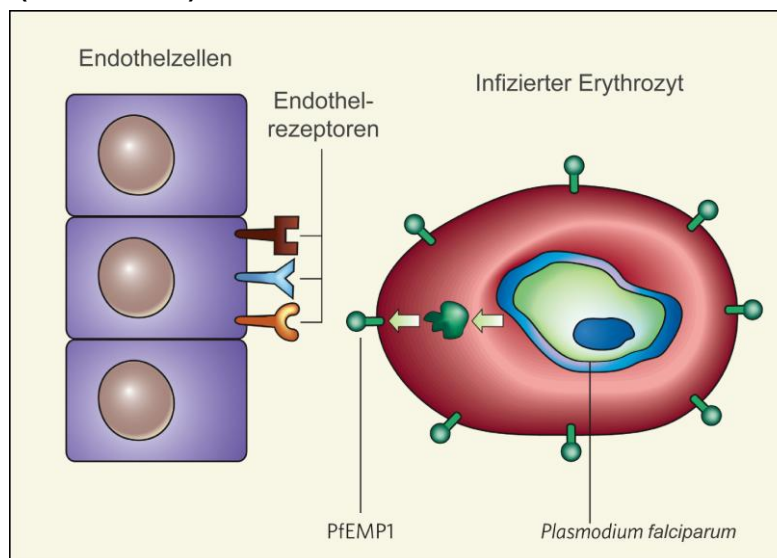
zerebralen Malaria-Fälle bei Kindern kommt es zu neurologischen Residuen (Newton et al., 1998).

In Hochendemiegebieten stellt die schwere Malaria bei Kindern bis zum 5. Lebensjahr die häufigste Todesursache dar. Säuglinge bis zum dritten Lebensmonat sind zunächst durch fötales Hämoglobin und maternale Antikörper gegen die Infektion geschützt. Im späteren Alter sind eine Erhöhung der Parasitendichte und ein vermehrtes Auftreten der klinischen Malaria festgestellt worden. In einem hyperendemischen Malariagebiet im Süden von Kenia wurden bei Kindern im Alter von 17 Monaten die höchste Inzidenz von Malariaepisoden beobachtet (Snow und Marsh, 1998). Mit zunehmendem Alter nehmen die Parasitendichten und die Inzidenz der Malariaepisoden bei gleichbleibender Prävalenz ab. Bis zum Erwachsenenalter entwickelt sich in den Endemiegebieten eine Semi-Immunität, die vor der Erkrankung, nicht jedoch vor der Infektion schützt (Petersen et al., 1991; Yazdani et al., 2006).

#### **1.4 Sequestrierung von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten**

In der erythrozytären Phase ist der Parasit in der Lage, an Endothelzellen kleiner Blutgefäße zu adhären. Die Zytadhäsion findet in postkapillaren Venolen im Gehirn und zahlreichen anderen Organen statt (Luse und Miller, 1971). Dieser Prozess der Sequestrierung dient zwei Überlebensstrategien des Erregers. Einerseits ist das mikroaerophile Milieu in den venösen Gefäßen vorteilhaft für die Reifung des Trophozoiten, andererseits ist der Erreger vor der Eliminierung der IE durch die Milz geschützt. Durch die Sequestrierung werden inflammatorische Reaktionen der Endothelzellen induziert, die Hypoxie, Azidose und schwere Organkomplikationen nach sich ziehen können. Die Entdeckung spezifischer Interaktionen zwischen Endothel und IE führte zur Schlussfolgerung, dass der Sequestrierung ein rezeptorvermittelter Prozess zugrunde liegen muss. Im Jahr 1995 konnte erstmals gezeigt werden, dass die Zytoadhäsion durch ein vom Erreger stammendes Molekül, dem *P. falciparum*-Erythrocyte-Membrane-Protein-1 (PfEMP1) vermittelt wird (Baruch et al., 1995). Die schematische Darstellung in Abbildung 1-3 verdeutlicht den Mechanismus der Zytoadhäsion von IE an Endothelzellen.

**Abbildung 1-3: Zytoadhäsion infizierter Erythrozyten (schematisch)**



Grafik verändert nach Borst und Genest, 2006

#### 1.4.1 *P. falciparum*-Erythrocyte-Membrane-Protein-1 (PfEMP1)

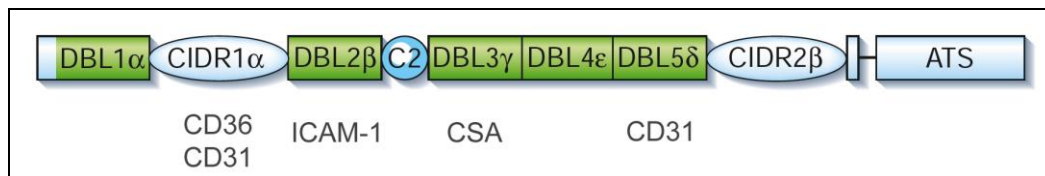
Im Verlauf einer Malariaepidemie spielt PfEMP1 als Virulenzfaktor eine entscheidende Rolle. Neben der Funktion der Zytoadhäsion ist PfEMP1 verantwortlich für die Antigenvariation des Erregers. PfEMP1 wird von Genen der *var*-Multigenfamilie codiert. Für das afrikanische *P. falciparum*-Isolat 3D7 wurden 61 *var*-Gene im haploiden Genom identifiziert (Gardner et al., 2002). Die *var*-Gene sind vorwiegend in den subtelomerischen Bereichen der 14 Chromosomen von *P. falciparum* lokalisiert. Die klonale Variation führt dazu, dass pro Zelle ausschließlich ein *var*-Gen transkribiert wird, infolgedessen wird nur ein PfEMP1 an der Oberfläche eines IE exponiert (Leech et al., 1984; Scherf et al., 1998). Der Parasit ist in der Lage, im nächsten Zyklus ein weiteres PfEMP1 aus dem Gen-Repertoire zu synthetisieren. Dieser Prozess – auch „Switching“ genannt – ist für den Parasiten ein wirksamer Mechanismus der Immunevasion. Es kommt zu einer hohen Variabilität der Antigene, die eine chronische Infektion mit *P. falciparum* ermöglicht (Horrocks et al., 2004; Kyes et al., 2007).

PfEMP1 hat ein Molekulargewicht von ca. 250 kDa (Abbildung 1-4). Exon 1 eines *var*-Gens codiert den Teil des Moleküls, der auf der Außenseite infizierter Erythrozyten lokalisiert ist. Die konservierte intrazelluläre Domäne wird von Exon 2 codiert. Die extrazelluläre Domäne ist gekennzeichnet durch extrem hohe Variabilität in der genomischen Sequenz als auch in ihrer Länge (Smith et al., 2000). Eine kurze N-terminale Sequenz ist ausreichend, um den Transport des Moleküls aus der parasitophoren Vakuole, in der sich der Parasit im



erythrozytären Stadium befindet, an die Oberfläche des infizierten Erythrozyten zu bewerkstelligen (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004).

**Abbildung 1-4: Schematische Darstellung von PfEMP1 mit Zytoadhärenzdomänen für Wirtsrezeptoren**



ATS: Acidic terminal segment; CIDR: Cystein-rich interdomain region; DBL: Duffy-binding-like; CSA: Chondroitin Sulfat A; ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1;  
Grafik verändert nach (Miller et al., 2002)

Neben den essentiellen Domänen, die für den Transport der Moleküle verantwortlich sind (Knuepfer et al., 2005), besteht der extrazelluläre Teil aus Duffy-binding-like (DBL-)Domänen und cystein-rich interdomain regions (CIDRs). Ein PfEMP1-Protein setzt sich aus 2-7 DBL-Domänen und 1-2 CIDRs zusammen, von denen einige als Domänen für die Adhärenz an Wirtsrezeptoren identifiziert wurden (Abbildung 1-4).

### 1.4.2 Wirtsrezeptoren

Bis heute sind 11 Rezeptoren bekannt, die eine Rolle bei der Interaktion von IE mit Endothelzellen spielen. In der Reihenfolge ihrer Entdeckung sind Thrombospondin (TSP), CD36, Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), Vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1), E-Selektin, Chondroitin Sulfat A (CSA), CD31, P-Selektin, Fraktalkine, Neural cell adhesion molecule (NCAM) und gC1q als Bindungspartner identifiziert worden (Newbold et al., 1999; Hatabu et al., 2003; Pouvelle et al., 2007; Biswas et al., 2007). Einen indirekten Hinweis gibt es für eine Wechselwirkung von  $\alpha_v\beta_3$  Integrin mit parasitierten Erythrozyten (Siano et al., 1998). TSP, CD36 und CD31 binden ca. 90% der untersuchten *P. falciparum*-Isolate aus Kenia (Heddini et al., 2001). Im Gegensatz dazu wurde CSA ausschließlich als Molekül für die Adhäsion mit Plazentaisolaten beschrieben (Fried und Duffy, 1996).

## 1.5 Genetische Epidemiologie der *P. falciparum*-Malaria

Genetische Faktoren spielen bei einer Infektion mit *P. falciparum* eine entscheidende Rolle. Die wichtigsten Beispiele schützender Varianten sind Polymorphismen im  $\beta$ -Globin-Gen und die Duffy-Blutgruppen-Antigene (May et al., 2007; Kwiatkowski, 2005).

Weitere prädisponierende Polymorphismen wurden in Genen gefunden, deren Produkte Einfluss auf die Eigenschaften von Erythrozyten nehmen, wie z.B die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und Bande 3 (von Kalckreuth et al., 2006; Guindo et al., 2007). Varianten von immunmodulierenden Komponenten, wie der induzierbaren Stickstoffoxid-Synthase (iNOS), des Tumornekrosefaktors (TNF) und Interleukin-4 (IL-4) scheinen ebenfalls die Manifestation einer schweren Malaria zu beeinflussen (McGuire et al., 1999; Cramer et al., 2004; Gyan et al., 2004).

Hinsichtlich der Wirtsrezeptoren wurde der Einfluss genetischer Varianten für CD36, ICAM-1 und CD31 entdeckt (Fernandez-Reyes et al., 1997; Aitman et al., 2000; Kikuchi et al., 2001). Die funktionelle Relevanz der strukturellen Variante K29M von ICAM-1 konnte in Hinblick auf das Auftreten der zerebralen Malaria aufgeklärt werden (Craig et al., 2000). Im Vergleich zum Wildtyp zeigen infizierte Erythrozyten eine verringerte Zytoadhäsion an ICAM-1 mit einem Methionin-Rest anstelle eines Lysins an Position 29. Andere Assoziationsstudien bezüglich dieser Variante lieferten teilweise abweichende Resultate in unterschiedlichen Studienpopulationen (Bellamy et al., 1998; Kun et al., 1999; Fry et al., 2008).

Für andere Wirtsrezeptoren wurden bisher keine Untersuchungen zum Einfluss genetischer Varianten auf die Manifestation einer schweren Malaria veröffentlicht. Durch Sequenzanalysen von 100 *P. falciparum*-Isolaten aus unterschiedlichen Teilen der Welt konnte festgestellt werden, dass schon vor ca. 10 000 Jahren eine Expansion der Parasitenpopulation stattgefunden haben muss (Joy et al., 2003). Aufgrund des hohen selektiven Drucks einer *P. falciparum*-Infektion ist anzunehmen, dass sich seit der Ausbreitung der Malaria weitere schützende genetische Polymorphismen herausgebildet haben (Miller, 1996).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Endothelrezeptoren, P-Selektin, CD9 und CD95 untersucht, um einen möglichen Einfluss auf eine Infektion mit *P. falciparum* festzustellen. Die Zytoadhärenz-Eigenschaften von CD9 und CD95 an *P. falciparum*-Isolate wurden *in vitro* charakterisiert. Des Weiteren wurden genetische Varianten aller drei Rezeptoren im Hinblick auf die Manifestation einer Malariaepisode analysiert.

## 1.6 Untersuchte Rezeptoren

### 1.6.1 P-Selektin

P-Selektin gehört zu einer Familie adhäsiver Rezeptoren, die fukosylierte und sialylierte Proteine erkennen und binden (Kansas, 1996). Der Rezeptor wird überwiegend auf aktivierten Zellen exprimiert und ist in die Interaktion von Endothelzellen mit Leukozyten und Thrombozyten involviert. Während einer lokalen Entzündungsreaktion ist P-Selektin an der Zelloberfläche von Endothelzellen an der Rekrutierung von Leukozyten beteiligt.

Im Jahr 1998 wurde zum ersten Mal gezeigt, dass P-Selektin als Wirtsrezeptor für IE dient (Ho et al., 1998). Die Interaktion findet zwischen der Lektin-Domäne des Rezeptors und einem Sialinsäure-Rest der IE statt. Drei Jahre später wurde dieses Resultat bestätigt, indem PfEMP1 als Ligand für P-Selektin identifiziert wurde (Senczuk et al., 2001). Die Defizienz von P-Selektin auf Endothelien schützt infizierte Mäuse in einem Tiermodell mit *Plasmodium berghei* vor der Entwicklung von Symptomen, die charakteristisch für die zerebrale Malaria sind (Combes et al., 2004).

Das Gen für P-Selektin (*SELP*) besteht aus 17 Exons und umfaßt ca. 50 kb in der Region q23-25 von Chromosom 1. In einer Assoziationsstudie mit 13 Polymorphismen von *SELP* und dem Risiko, einen Herzinfarkt zu erleiden, wurde die Variante T715P als prädisponierender Faktor identifiziert (Herrmann et al., 1998). Das Vorkommen der Strukturvariante V640L steht im Zusammenhang mit dem Risiko für Schlaganfall (Zee et al., 2004). Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses genetischer Polymorphismen von P-Selektin auf die Empfänglichkeit für bzw. den Schutz vor einer Malaria tropica sind bisher nicht veröffentlicht.

### 1.6.2 CD9

Erstmals wurde CD9 als Oberflächenmolekül im Jahr 1981 beschrieben (Andrews et al., 1981). Inzwischen wird CD9 der Klasse der Tetraspanine zugeordnet. Tetraspanine sind durch ihre konservierte Molekülstruktur charakterisiert, welche aus 4 Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Domänen besteht.

CD9 wird auf einer Reihe von Zelltypen exprimiert. Unter anderem wurde es auf Thrombozyten nachgewiesen und ist an ihrer Aktivierung und Aggregation beteiligt (Boucheix et al., 1991). Über die Funktion von CD9 im Speziellen ist bisher wenig bekannt. Eine Rolle von Tetraspaninen bei der Zellmigration und Zelladhäsion wurde postuliert (Boucheix und Rubinstein, 2001). Für CD9 wurde die Interaktion mit Integrinen und anderen membranständigen Proteinen wie z.B. CD36 beschrieben (Miao et al., 2001). Aufgrund

hoher Variabilität in der Sequenz der großen extrazellulären Domänen der Tetraspanine wird diesem Bereich die Funktion von Protein-Protein-Interaktionen zugesprochen. Der konservierte Teil ist vermutlich für die Homodimerisation des Rezeptors verantwortlich und an der Formation sogenannter Tetraspanin-Netze oder Mikrodomänen in Zellmembranen beteiligt (Stipp et al., 2003).

Die Arbeitsgruppe von F. Sanchez-Madrid stellte fest, dass aus Tetraspaninen zusammengesetzte Mikrodomänen die Leukozyten-Adhäsion an Endothelzellen regulieren. (Barreiro et al., 2005). Durch die Assoziation von CD9 mit VCAM-1 und ICAM-1 in der Membran wird der Transmigrations-Prozess der Leukozyten durch die Endothelzellen gesteuert. Dieser Vorgang ist bei dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und der Bildung von Ödemen bei Patienten mit zerebraler Malaria beobachtet worden. Somit könnte CD9 bei der Ausprägung einer zerebralen Malaria beteiligt sein.

### 1.6.3 CD95

CD95 (APO-1, Fas Rezeptor) ist ein Transmembran-Molekül und spielt eine entscheidende Rolle bei der Apoptose sowie bei der Regulation der Immunantwort. Der Rezeptor ist das am besten charakterisierte Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie. CD95 findet sich auf nahezu allen Zelltypen im menschlichen Körper, wird jedoch erst nach der Aktivierung einer Zelle aus dem Zytoplasma an die Zelloberfläche transportiert. Die extrazelluläre Domäne von CD95 besteht aus 3 Cystein-reichen Domänen, die für eine homologe Trimerisation des Rezeptors essentiell sind (Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000). Nach der Bindung des Liganden FasL an den Rezeptor-Komplex wird die Apoptose induziert. Für die Signaltransduktion im Zellinneren ist die intrazelluläre Todes-Domäne verantwortlich.

CD95 wird unter anderem von aktivierten T- und B-Zellen exprimiert. Im Verlauf einer Infektion bewirkt CD95 die Abschaltung der Immunreaktion durch aktivierungs-induzierten Zelltod dieser Zellen (Krammer, 2000). Treten Mutationen im Gen von CD95 oder FasL auf, kann es zur Ausprägung des Autoimmunen Lymphoproliferativen Syndroms (ALPS) kommen. Bei Patienten mit ALPS wurden Lymphadenopathien und eine vergrößerte T-Zell-Population festgestellt (Fisher et al., 1995). In Assoziation mit dem ALPS wurden mehrere genetische Varianten mit funktioneller Relevanz beschrieben (Vaishnav et al., 1999).

Polymorphismen im Gen von CD95 könnten auch im Verlauf einer Malariaepisode eine Rolle spielen, da die Pathogenese bei einer chronischen Infektion mit *P. falciparum* auch auf eine andauernden Aktivierung des Immunsystems zurückzuführen ist (Artavanis-Tsakonas et al., 2003).

Im Zusammenhang mit Malaria wurde für CD95 eine Rolle bei der Induktion der Apoptose von Endothelzellen postuliert (Pino et al., 2003). Durch direkten Kontakt von IE mit

Endothelzellen konnte in einem *in vitro*-Modell der Apoptose-Prozess eingeleitet werden. Nach der Adhäsion von IE an Endothelzellen wurde eine erhöhte Expression von CD95 und anderen Apoptose-Rezeptoren beobachtet (Pino et al., 2003). Zwei Arbeitsgruppen zeigten im Tiermodell, dass CD95 eine Funktion bei der Entwicklung der zerebralen Malaria übernehmen könnte (Ohno et al., 2005; Potter et al., 2006).

Aufgrund dieser Hinweise ist CD95 als potentieller Wirtsrezeptor für die Adhäsion von IE zu betrachten. Genetische Varianten im CD95-Gen könnten einerseits das Bindungsverhalten von IE beeinflussen, andererseits durch die immunmodulatorische Rolle von CD95 einen Einfluss auf die Immunantwort während einer Infektion ausüben.

## 1.7 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Hinweise auf pathophysiologische Prozesse gefunden werden, die Auswirkungen auf den Verlauf einer Malaria tropica haben. Mit Hilfe zweier Ansätze sollten Endothelrezeptoren hinsichtlich ihrer Relevanz bei einer Infektion mit *P. falciparum* charakterisiert werden.

### 1) Zellbiologischer Ansatz

In einem Zytoadhärenz-Assay sollten potentielle Endothelrezeptoren für die Sequestrierung von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten *in vitro* untersucht werden. Um eine Variabilität von *P. falciparum*-Stämmen zu erreichen, sollten sowohl ein laboradaptiertes Isolat als auch Feldisolate aus einem hyperendemischen Malariagebiet in Ghana auf ihre Interaktion mit zwei potentiellen Rezeptoren, CD9 und CD95, getestet werden.

### 2) Genetisch-epidemiologischer Ansatz

Mit Hilfe von Assoziationsstudien sollte der Einfluss genetischer Polymorphismen von Endothelrezeptoren auf die Manifestation einer schweren Malaria getestet werden. Dahingehend sollten genetische Polymorphismen der potentiellen Rezeptoren CD9 und CD95 untersucht werden, sowie Varianten von P-Selektin, einem Rezeptor dessen Interaktion mit *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten bekannt ist.

Zunächst sollten Varianten der Wirtsrezeptoren durch Re-Sequenzierung genomischer DNA von 46 Individuen einer Studienkohorte aus einem malaria-hyperendemischen Gebiet in Ghana identifiziert werden. Innerhalb dieser Studienpopulation - bestehend aus 2400 Kindern mit schwerer Malaria und einer Kontrollgruppe von 1900 gesunden Kindern – sollten relevante Polymorphismen genotypisiert werden und anschließend mit Hilfe eines Fall-Kontroll-Studiendesigns auf Assoziation mit der Erkrankung getestet werden. Aufgrund der Tatsache, dass unterschiedliche pathophysiologische Prozesse bei der Entwicklung schwerster Komplikationen im Verlauf einer Malariaepisode eine Rolle spielen, sollte das Augenmerk dabei nicht nur auf den Krankheitsstatus gelegt werden, sondern auch auf die zwei dominierenden klinischen Manifestationen der Infektion, schwere Anämie und zerebrale Malaria. Nach der Identifizierung eines assoziierten Polymorphismus sollte seine funktionelle Relevanz untersucht werden. Dadurch sollten Hinweise auf molekulare Prozesse erlangt werden, die zur Pathogenese dieser komplexen Erkrankung beitragen.

## 2 Studiendesign und Studienpopulation

### 2.1 Studiendesign

Mit dem Ziel, prädisponierende genetische Faktoren für die komplizierte schwere Malaria zu identifizieren, wurde ein Fall-Kontroll-Studiendesign verwendet. In Fall-Kontroll-Studien werden neuerkrankte Personen (inzidente Fälle) mit nicht erkrankten Personen (Kontrollen) bezüglich verschiedener Risikofaktoren (Exposition) verglichen. Während die Fälle im Komfo Anokye Teaching Hospital in Kumasi, Ghana, aufgenommen wurden, stellen die Kontrollen eine Zufallsstichprobe der Bevölkerung aus dem Einzugsgebiet des Krankenhauses dar. Um Selektionsfehler zu vermeiden und sogenannte „Confounding factors“ ausschließen zu können, wurden Fall- und Kontrollgruppe in ihrer Geschlechts- und Altersverteilung sowie ihrer Ethnizität angepasst.

### 2.2 Studienpopulation

Das Studiengebiet der Ashanti-Region in Ghana gehört zu den hyperendemischen Malariagebieten, in denen Malaria ganzjährig übertragen wird und hohe Infektionsprävalenzen der Plasmodienspezies *P. falciparum*, *P. ovale* und *P. malariae* vorliegen (Binka et al., 1994; Kobbe et al., 2006).

Die Rekrutierung der Kinder mit komplizierter Malaria fand zwischen 2001 und 2005 im Komfo Anokye Teaching Hospital statt. Insgesamt wurden 2400 Kinder mit komplizierter Malaria im Alter von 6 Monaten bis zu 10 Jahren in die Studiengruppe aufgenommen.

Die Einschlusskriterien entsprachen den WHO-Kriterien für eine komplizierte Malaria (WHO, 2000), d.h. das Vorliegen einer asexuellen *P. falciparum*-Parasitämie mit mindestens einem der folgenden Symptome:

- Schwere Anämie (Hb < 5 g/dl)
- Nicht erweckbares Koma (Blantyre Coma Score < 3)
- Laktatazidose (Laktat-Wert > 5 mmol/l)

Traten während des Krankheitsverlaufs der schweren Malaria zusätzliche Symptome auf, wie z.B. Prostration und respiratorische Insuffizienz, wurden diese dokumentiert und in die Analyse einbezogen. Mit EDTA versetzte Blutproben von 0,5 bis 2 ml wurden aus Resten gewonnen, die den Patienten im Rahmen von Routineuntersuchungen entnommen worden

waren. Kindern der Kontrollgruppe wurden Blutproben entsprechend entnommen. Die Kontrollgruppe besteht aus 1900 Proben von Kindern aus der Region. Die Selektion der Kontroll-Probanden wurde mit dem Ziel durchgeführt, sie hinsichtlich der Alters-, Geschlechterverteilung und der Ethnizität der Patientengruppe anzupassen. Die Zusammensetzung der Studiengruppe ist in Tabelle 2-1 zusammengestellt. Zusätzlich sind die Merkmale der klinischen Subgruppen aufgeführt. Durch das gleichzeitige Auftreten der zwei Hauptmerkmale, schwere Anämie und zerebrale Malaria, entstehen Überlappungen bei 142 Fällen. In der Gruppe der Anderen sind Patienten mit schwerer Malaria zusammengefasst, bei denen weder eine schwere Anämie noch eine zerebrale Malaria diagnostiziert wurde. Bei diesen Kindern diagnostizierte Komplikationen sind z.B. Laktatazidose, Prostration oder Hyperparasitämie.

**Tabelle 2-1: Demographische Merkmale der Studiengruppe**

	Alter (Monate)	Geschlecht (männl:weibl)	Ethnizität (%)			n
			Akan	Northerner	Ewe	
Schwere Malaria	20 (7-117)	54:46	67,3	29,8	2,9	2400
Kontrollgruppe	30 (7-117)	53:47	69,2	29,3	1,5	1900
<b>Stratifizierung der Fallgruppe in klinische Subgruppen</b>						
Schwere Anämie	16 (7-108)	54:46	69,2	27,8	3,0	1525
Zerebrale Malaria	25 (7-109)	54:46	63,7	34,0	2,3	536
Anderere	27 (7-117)	56:44	65,0	31,4	3,6	481

Dargestellt ist der Median der Altersverteilung mit Verteilung in Klammern; Andere: Schwere Malaria-Fälle mit anderen Komplikationen als schwere Anämie und zerebrale Malaria

Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der School of Medical Sciences, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana, genehmigt. Alle Einverständniserklärungen von Eltern oder Erziehungsberechtigten der teilnehmenden Kinder liegen vor.



### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Allgemein verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Merck (E. Merck Darmstadt), Roth (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und Sigma (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) bezogen. Verbrauchsmaterial und sterile Plastikmaterialien waren von Greiner (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich), Eppendorf AG, Hamburg, Nunc (Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden) und SARSTEDT (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht). Die Sterilfiltration von Lösungen erfolgte unter Verwendung von Filtern mit einer Ausschlussgröße von 0,22 µm von Schleicher&Schuell, Dassel. Hersteller von speziellen Materialien werden in den einzelnen Abschnitten genannt.

#### 3.2 Laborausstattung

Biophotometer 6131	Eppendorf AG, Hamburg
Sequenzierungs-Apparatur	
ABI PRISM® 3100	BD Biosciences, Heidelberg
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder Labortechnik, Hebertshausen
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Lesegerät GENios	Tecan, Mainz
Fluoreszenzmikroskop Axiovert	Carl Zeiss, Jena
Lichtmikroskop Axiovert	Carl Zeiss, Jena
LightTyper	Roche Diagnostics, Mannheim
Sicherheitswerkbank HERAsafe	
HS15	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Thermocycler Primus 96 advanced	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg

### 3.3 Puffer und weitere Lösungen

Acrylamid-Stammlösung 30% (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
Agarose-Gel-Auftragspuffer (10x)	0,1% (w/v) Bromphenolblau 0,1% (w/v) Xylencyanol 0,1 M EDTA pH 8,0 0,5xTBE 50% (v/v) Glycerin
Bindungsmedium (1L)	16,4 g RPMI Pulver Medium (ohne NaHCO <sub>3</sub> ) 2% (w/v) Glucose add 1000 ml ddH <sub>2</sub> O pH 7,2, sterilfiltriert
Blockierungslösung (Immunoblot)	PBS 5% Magermilchpulver 20 mM Tris-HCl pH 7,5 0,2% (v/v) Tween-20
Coomassie-Färbelösung	0,1% Coomassie Serva Blue R 40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	30% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in ddH <sub>2</sub> O
Geltrocknungslösung	20% (v/v) EtOH 10% (v/v) Glycerin
HT-PBS (10x)	1,37 M NaCl 160 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,2
iFCS	FCS 45 min bei 56°C inaktiviert
IPTG	1M IPTG in ddH <sub>2</sub> O
PBS (10x)	1,37 M NaCl 27 mM KCl 101 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,2
SDS-PAGE-Auftragspuffer (5x)	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 20% (v/v) Glycerin 2% (w/v) SDS 0,001% (w/v) Bromphenolblau 50 mM DTT

SDS-PAGE-Elektrophorese-Puffer (10x)	0,25 M Tris-HCl 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS; pH 8,3
SDS-PAGE-Sammelgel-Puffer (4x)	0,5 M Tris-HCl 0,4% (w/v) SDS; pH 6,8
SDS-PAGE-Trenngel-Puffer (4x)	1,5 M Tris-HCl 0,4% (w/v) SDS; pH 8,8
TBE (5x)	0,45 M Tris-Base 0,45 M Borsäure 10 mM EDTA pH 8,0 filtriert und autoklaviert
T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub>	10 mM Tris-HCl pH 8,0 0,1 mM EDTA pH 8,0
Transferpuffer (Fastblot)	25 mM Tris pH 8,3 150 mM Glycin 10% (v/v) Methanol

### 3.4 cDNA

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung der cDNA von CD95 diente der Klon IRATp970B0639D einer cDNA-Bank von imaGenes (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin).

### 3.5 Plasmide

**Tabelle 3-1: Plasmide und Bezugsquellen**

Plasmid	Quelle
pAcGFP-N1	BD Biosciences, Heidelberg
pGEX-CD9	P. Monk, Sheffield
pGEX-2KG	P. Monk, Sheffield
pGL3-Basic	Promega, Mannheim
pGL3-Control	Promega, Mannheim
pRL-TK	Promega, Mannheim

### 3.6 Oligonukleotide

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide wurden von der MWG-BIOTECH AG (Ebersberg) bezogen. Eine Liste der Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

### 3.7 Antikörper

**Tabelle 3-2: Antikörper mit Anwendung und Bezugsquellen**

Antikörper	Epitop	Anwendung	Quelle
VJ1/10	CD9	10 µg/ml	Sanchez-Madrid, Madrid
VJ1/20	CD9	10 µg/ml	Sanchez-Madrid, Madrid
Fas 2R2	CD95	20 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg
αCD95- IgG1-Biotin	CD95	1:100	P. Krammer, Heidelberg
αFA6-158	CD36	10 µg/ml	Roche Diagnostics, Mannheim
Maus IgG1-Isotyp		1:250	BD Biosciences, Heidelberg
αAcGFP JL-8	AcGFP	1:4000	BD Biosciences, Heidelberg
αCD4-FITC	CD4	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
αCD8-FITC	CD8	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
αCD19-FITC	CD19	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
αCD69-APC	CD69	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
αGST	GST	1:100	Dianova, Hamburg
Ziege-HRP	Maus IgG	1:5000	Dianova, Hamburg
Ziege-Alexa®-594	Maus IgG	1:1000	Molecular Probes, Karlsruhe

### 3.8 Peptide

Peptide wurden von Eurogentec Deutschland GmbH, Köln, bezogen.

**Tabelle 3-3: Peptide aus extrazellulären Domänen von CD9**

Name	Peptid-Sequenz	Domäne
CD9 I	RFDSQTKSIFEQET	AS 36-49 (kl. extrazelluläre Domäne)
CD9 II	KDEPQRETLKAIHYALNC	AS 135-152 (gr. extrazelluläre Domäne)
CD9 III	CPKKDVLETF	AS 167-176 (gr. extrazelluläre Domäne)
CD9 IV	CPDAIKEVFDNK	AS 181-192 (gr. extrazelluläre Domäne)

### 3.9 Kultivierung von *Escherichia coli*

#### 3.9.1 Bakterienstämme

*E. coli* chemisch kompetente Bakterienstämme wurden von Invitrogen GmbH, Karlsruhe, bezogen.

XL1-Blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)]

BL21-CodonPlus®(DE-3)-Ril *B F<sup>-</sup> ompT hsdS(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tetr gal Δ(DE3)endA Hte* [*argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>*]

#### 3.9.2 Medien

Die Medien wurden mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und 25 min bei 120°C und einem Druck von 1 bar autoklaviert. Nach Abkühlung des Mediums auf ca. 50°C wurden die Antibiotika zugegeben.

LB-Medium (Luria Broth) 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl  
Kultur-Platten: zusätzlich 15 g Bacto-Agar pro Liter

SOC-Medium 20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 0,5 g/l NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 7,0, 20 mM Glucose, sterilfiltriert

#### 3.9.3 Antibiotika

Alle Antibiotika wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen und in folgenden Stammlösungen verwendet.

Ampicillin	25 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	35 mg/ml in EtOH
Kanamycin	50 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O

### 3.10 Eukaryotische Zelllinien und Medien

Die verwendeten Zelllinien und ihre Bezugsquellen sind mit entsprechenden Kulturmedien in Tabelle 3-4 zusammengefasst. Medien, FCS und 100x Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) wurden von PAA Laboratories (Cölbe) bezogen. Gentamycin stammt von der Biochrom AG (Berlin). Alle Medien wurden mit 10% iFCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin versetzt. Für die Herstellung von Stabilaten wurde

Einfriermedium verwendet, welches aus dem entsprechenden Medium mit 18% (v/v) iFCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin und 10% (v/v) DMSO bestand.

**Tabelle 3-4: Zelllinien, Kulturmedien und Bezugsquellen**

Zelllinie	Medium	Zusatz	Quelle
CHO $\Delta$ 745	Ham's F12		M. Klinkert, Hamburg
CHO $\Delta$ 745-CD9-GFP	Ham's F12	Gentamycin (700 $\mu$ g/ml)	D. Kuhn, Hamburg
CHO $\Delta$ 745-CD95-AcGFP	Ham's F12	Gentamycin (700 $\mu$ g/ml)	
Jurkat	RPMI 1640		T. Jacobs, Hamburg

Bei der Chinese Hamster Ovary (CHO)- $\Delta$ 745-Zelllinie handelt es sich um eine Modifikation der CHO-K1 Zelllinie. Durch die Deletion des Gens *xylt1*, welches für die Xylosyltransferase codiert, wurde eine Zelllinie generiert, die nicht in der Lage ist, Glykosaminoglykane zu synthetisieren. Das Enzym katalysiert die Verknüpfung von UDP-Xylulose an Serin-Reste der Zielproteine. Durch die Defizienz der Xylosyltransferase wird die Synthese von CSA unterbunden, welches als Rezeptor für IE bekannt ist (Rogerson et al., 1995).

### 3.11 Kultivierung von *P. falciparum*

#### 3.11.1 *P. falciparum*-Isolate

Für die Adhäsionsversuche wurden *P. falciparum*-Isolate unterschiedlichen Bindungs-Phänotyps verwendet (Tabelle 3-5).

**Tabelle 3-5: *P. falciparum*-Isolate und Bezugsquellen**

Stamm	Literatur	Quelle
C24	(Jenkins et al., 2007)	A. Craig, Liverpool
Ghana-Feldisolat-Gemisch		
Patienten-Isolat-Gemisch		

Das Ghana-Feldisolat-Gemisch wurde aus 3 Isolaten von Malariapatienten aus Ghana hergestellt, die im gefrorenen Zustand nach Hamburg überführt worden waren. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen 1 und 6 Jahre alt und von schwerer

Anämie und Prostration betroffen. Für die Adhäsionsversuche wurden die Isolate vermischt und gemeinsam kultiviert, um eine möglichst große Vielfalt an *P. falciparum*-Isolaten im Kulturgemisch zu erhalten. Die Typisierung der Allele des Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) des Isolat-Gemisches ergab, dass die Anzahl der vorhandenen *P.falciparum*-Stämme im Gemisch zwischen 2 und 4 betrug (Smythe et al., 1990). Das Patienten-Isolat-Gemisch bestand aus *P. falciparum*-Isolaten, die in Hamburg von 3 Malaria-Patienten isoliert und anschließend zusammen für ca. 3 Wochen kultiviert wurden.

### 3.11.2 Medium für die Kultivierung von *P. falciparum*

*P. falciparum*-Isolate wurden in RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen Kat.Nr. 13018-031, Karlsruhe) unter Zugabe von Erythrocyten der Blutgruppe 0+ (Blutbank Eppendorf, Hamburg) mit einem Hämatokrit von 3,5% kultiviert. Weitere Mediumzusätze sind in Tabelle 3-6 zusammengestellt. Vor der Sterilfiltration wurde der pH-Wert auf 7,4 adjustiert.

**Tabelle 3-6: Mediumzusätze für die Kultivierung von *P. falciparum*-Isolaten**

Zusatz	Konzentration	Quelle
Albumax II	0,5% (w/v)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Hypoxanthin	27,2 mg/l	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Natrium Bicarbonat	1 g/l	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
D(+)-Glucose Monohydrat	2 g/l	Merck, Darmstadt
Gentamycin	2,5 mg/l	Bären Apotheke, Hamburg

### 3.12 Molekularbiologische Kits

BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Perbio Science, Bonn
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	PE Biosystems, Darmstadt
Dual-Luciferase® Reporter Assay	Promega, Mannheim
ECL Western Blotting Detection	Amersham Pharmacia, Freiburg
Nukleobond® Gel Extraktion Kit	Macherey-Nagel GmbH, Düren
NukleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden

T4 DNA Ligase

Roche Diagnostics, Mannheim



## 4 Methoden

### 4.1 Genetisch-epidemiologische Methoden

#### 4.1.1 *In vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt es, beliebige DNA-Abschnitte ohne Verwendung von Wirtszellen zu amplifizieren. Als DNA-Template wurden in dieser Arbeit sowohl genomische DNA als auch Plasmid-DNA verwendet und die Reaktionen mit unterschiedlichen DNA-Polymerasen durchgeführt. Für die Re-Sequenzierung der genomischen Sequenzen wurde die Taq-Polymerase FIREPol® (Solis BioDyne, Estland) mit zugehörigen Puffern eingesetzt. Die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/M.) wurde für die Amplifikation von cDNA und für die zielgerichtete Mutagenese verwendet.

#### 4.1.2 Re-Sequenzierung genomischer DNA

Die genomische DNA aus Blutproben der Studienpopulation lag zu Beginn dieser Arbeit bereits isoliert vor. Um in der Studienpopulation auftretende Varianten zu charakterisieren, wurden zunächst Genabschnitte in 23 DNA-Proben von Individuen der Patienten-Kohorte und 23 DNA-Proben des Kontrollkollektivs re-sequenziert. Die 23 DNA-Proben der Patienten-Kohorte wurden so ausgewählt, dass 8 DNA-Proben von Patienten mit zerebraler Malaria stammten, 8 Proben von Patienten mit der Diagnose der schweren Anämie und 7 Proben von Patienten mit schwerer Malaria und anderen Komplikationen. Dadurch wurde gewährleistet, dass Varianten, die möglicherweise nur bei bestimmten klinischen Subgruppen der schweren Malaria eine Rolle spielen, identifiziert werden konnten. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass ca. 1000 bp der Promotor-Region sowie alle codierenden Bereiche, Intron/Exon-Grenzen und ca. 600 bp des 3'-untranslatierten Bereichs (3'-UTR) eines Gens amplifiziert und re-sequenziert werden konnten. Die Sequenzen der Oligonukleotide finden sich im Anhang (Tabelle 0-5). Unter Verwendung der FIREPol® DNA-Polymerase wurde die Amplifikation unter den jeweils optimalen Bedingungen in THERMO-FAST® 96-well-Mikrotiterplatten (ABgene Germany, Hamburg) durchgeführt (Tabelle 0-2 im Anhang). Es wurden 10 ng der DNA-Proben in die PCR eingesetzt.

PCR-Ansatz:	PCR-Programm:
2,0 µl DNA-Template (5 ng/µl)	94°C 3 min
1,0 µl forward-Primer (10 pmol/µl)	95°C 1 min
1,0 µl reverse-Primer (10 pmol/µl)	X°C 1 min
2,0 µl 10x Polymerase-Puffer BD/B	<u>72°C 1 min</u> 40 Zyklen
0,4 µl dNTPs (je 10 mM)	72°C 10 min
1,2-2,4 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4°C
0,4 µl FIREPol® Polymerase (5 U/µl)	
0-1,0 µl Solution S	
ad 20,0 µl ddH <sub>2</sub> O	

Die Reinigung der PCR-Amplifikate erfolgte mit 96-Loch-Filter-Platten nach Angaben des Herstellers mit Sephadex G-50 (Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.). Nach der Amplifikation wurde 1 µl des gereinigten PCR-Produkts in die BigDye-Reaktion eingesetzt. Für die anschließende Sequenzierung sowie für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde das BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet.

PCR-Ansatz:	PCR-Programm:
1,0 µl DNA-Template	96°C 5 min
0,5µl Forward/reverse Primer (10 pmol/µl)	96°C 30 sec
1,0 µl BigDye Reaktionsmix	50°C 15 sec
3,0 µl PCR-Puffer	<u>60°C 4 min</u> 25 Zyklen
ad 10,0 µl ddH <sub>2</sub> O	4°C

Unter Verwendung von Sephadex G-50 wurde das PCR-Produkt aus dem Ansatz getrennt und bis zur Analyse im Sequenzer in HiDi-Formamid (Applied Biosystems) gelagert.

Der Sequenzvergleich von insgesamt 46 DNA-Proben erfolgte mit SeqScape® Software Version 2.5 (Applied Biosystems). Die Allelfrequenzen (AF) der detektierten Varianten, Deletionen und Insertionen wurden bestimmt und ihre Relevanz hinsichtlich der Genregulation bzw. der Funktion des Proteins in der Literatur recherchiert. Die AF bezeichnet die relative Häufigkeit eines Allels in einer Population. Sie errechnet sich durch die Anzahl der vorhandenen Kopien eines Allels in einer Population dividiert durch die Gesamtzahl der Allele. Üblicherweise wird die Frequenz des seltenen Allels angegeben. Für die Genotypisierung der Varianten im Gesamt-Kollektiv wurden Polymorphismen mit einer AF von mindestens 5% in einer der beiden Untergruppen ausgewählt, wenn zusätzlich eines der nachstehenden Kriterien zutreffend war:

- Variante generiert einen nicht-synonymen Aminosäure-Austausch
- Variante befindet sich in einer putativen Transkriptionsfaktor-Bindestelle
- Variante befindet sich in einer putativen Splice-Region
- Variante kennzeichnet einen auftretenden Haplotyp („tagging-SNP“)
- Variante steht im Zusammenhang mit einem Hinweis auf eine Assoziation mit der Manifestation der schweren Malaria

### 4.1.3 Genotypisierung von genetischen Polymorphismen

Um die Genotypen der selektierten Varianten in der gesamten Studienpopulation zu ermitteln, wurde eine Methodik angewandt, die das Prinzip des „Fluorescence Resonance Energie Transfer“ (FRET) zugrunde liegt. Hierbei handelt es sich um eine Methode, die auf der Interaktion zweier unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe beruht. Vor der eigentlichen Analyse der Variante wird die Zielsequenz in einem Thermocycler mittels PCR amplifiziert. Die PCR wird in Gegenwart von zwei Hybridisierungssonden durchgeführt, welche auf der zu amplifizierenden Nukleinsäure benachbart hybridisieren. Die Hybridisierungssonden sind jeweils mit einem Fluorophor markiert. Die Fluorophore kommen im Falle der Hybridisierung beider Sonden so in Nachbarschaft zueinander, dass ein FRET stattfinden kann und eine Fluoreszenzstrahlung messbar wird. Eine der zwei Sonden (Sensor) wird so gewählt, dass sie mit der Region um die zu untersuchende Variante hybridisiert. Liegt nun eine Mutation vor, ist die Affinität des Sensors zur Zielsequenz geringer als bei einer vollständig komplementären Sequenz. Dadurch ist die Hybridisierungstemperatur im Fall eines mutierten Alles erniedrigt. Durch den Verlust der räumlichen Nähe zur zweiten Hybridisierungssonde (Anchor) ist dieses Ereignis durch einen Abfall in der Fluoreszenzintensität messbar. Durch kontinuierliche Erhöhung der Temperatur im LightTyper (Roche Diagnostics, Mannheim) wird eine Schmelzkurvenanalyse für jede Probe durchgeführt. Unter Verwendung der LightTyper Software werden auf diese Weise die jeweiligen Genotypen ermittelt.

Für die Genotypisierung der Marker wurden 2 µl einer 1:200 Verdünnung der DNA-Proben verwendet, die zuvor unter Verwendung des GenomiPhi HY DNA Amplification Kit (GE Healthcare, Braunschweig) genomweit amplifiziert worden waren. Individuelle Bedingungen der PCR-Ansätze sind in Tabelle 0-3 im Anhang wiedergegeben. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für die Genotypisierung mit dem üblichen PCR-Programm ist im Folgenden aufgeführt:

PCR-Ansatz:	PCR-Programm:
2,0 µl DNA-Template (5 ng/µl)	95°C 3 min
0,2-1,0 µl forward-Primer (10 pmol/µl)	95°C 1 min
0,2-1,0 µl reverse-Primer (10 pmol/µl)	X°C 1 min
0,4 µl Anchor (5 pmol/µl)	<u>72°C 1 min</u> 45 Zyklen
0,4 µl Sensor (5 pmol/µl)	72°C 10 min
1,0 µl 10x Polymerase-Puffer BD/B	4°C
0,2 µl dNTPs (je 10 mM)	
0,4-1,2 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	
0,2 µl FIREPol® Polymerase (5 U/µl)	
0-0,5 µl DMSO	
0-1,0 µl Solution S	
ad 10,0 µl ddH <sub>2</sub> O	

#### 4.1.4 Statistische Testverfahren

Die statistischen Berechnungen wurden mit den Programmen Stata 9.2 (Stata Corporation, USA), Haploview (Barrett et al., 2005) und Prism 4.0a (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt.

Zur Analyse von Assoziationen zwischen Genotypen und Phänotypen bzw. Genotypen und quantitativen Merkmalen wurden verschiedene statistische Verfahren zur Überprüfung von signifikanten Unterschieden verwendet. Die Nullhypothese wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  unter der Annahme  $\alpha = 5\%$  (Fehler 1. Art) formuliert.

Die Abweichung der Genotyp-Verteilung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) wurde mit einem in der Software Haploview implementierten Modul überprüft (Wigginton et al., 2005). Einerseits lassen sich anhand dieses Tests Genotypisierungsfehler feststellen. Das könnte der Fall sein, wenn das HWE in der gesamten Studiengruppe nicht erfüllt ist. Andererseits kann eine Abweichung vom HWE in der Fallgruppe einen Hinweis auf eine mögliche Assoziation mit der Ausprägung der Krankheit geben. In diesem Fall besteht die Fallgruppe aus selektierten Individuen, in der möglicherweise eine Unterrepräsentation bestimmter Genotypen durch natürliche Selektion zu beobachten ist. Solche Varianten, deren Allelfrequenzen mit 95% Sicherheit im HWE liegen, wurden auf Assoziation mit dem Krankheitsbild der Malaria getestet.

Als multivariates Verfahren wurde die logistische Regression angewendet, um den Einfluss mehrerer Faktoren (Kovariablen) auf die Manifestation einer Malaria zu untersuchen und Verzerrungen durch Störfaktoren und Interaktionen zu berücksichtigen.

Um die Verlässlichkeit dieses Tests zu beurteilen, wurde die statistische Power mit Hilfe des Programms CaTS berechnet (Skol et al., 2006).

Liegen Varianten auf einem Chromosom eng beieinander, können sie abhängig voneinander vererbt werden. Wenn eine nicht zufällige Vererbung zweier Mutationen auftritt, spricht man von einem Kopplungsungleichgewicht.  $D'$  und  $r^2$  sind Maße für das Kopplungsungleichgewicht. Ein  $D'$  von 1 repräsentiert ein komplettes Kopplungsungleichgewicht. Ist  $D'=0$ , werden zwei Varianten unabhängig vererbt. Der quadrierte Korrelationskoeffizient ( $r^2$ ) steht für den linearen Zusammenhang zweier Varianten und liefert bei niedrigen Allelfrequenzen eines Markers eine zuverlässigere Aussage über das Kopplungsungleichgewicht. Wenn  $r^2$  den Wert 0 aufweist, treten die Varianten unabhängig voneinander auf. Ist  $r^2=1$ , besteht zwischen zwei Varianten eine vollständige Korrelation.  $D'$  und  $r^2$  für die genotypisierten Varianten wurden unter Verwendung des Programms Haploview errechnet und dargestellt.

Um zu testen, ob Kombinationen aus den genotypisierten Varianten die Pathogenese der schweren Malaria beeinflussen, wurden Haplotypen rekonstruiert. Diese Analyse und der Vergleich der Haplotyp-Häufigkeiten zwischen Fall- und Kontrollgruppe anhand des  $\chi^2$ -Test wurde mit Haploview durchgeführt. Haplotypen sind Kombinationen von Allelen innerhalb bestimmter Abschnitte eines Chromosomenstrangs. Die Betrachtung von Haplotypen in genetischen Assoziationsstudien ist oft effizienter als die Betrachtung der einzelnen Polymorphismen. Ein statistisches Problem ist hierbei die Rekonstruktion der Phaseninformation: Bei der Genotypisierung werden nur die Allele eines Individuums der Loci bestimmt, jedoch nicht, welche Base auf welchem Chromosomenstrang angesiedelt ist

Der Rank-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon wurde angewendet, um zwei nicht normalverteilte, unabhängige Stichproben miteinander zu vergleichen. Für den Vergleich von mehr als zwei nicht normal verteilten, unabhängigen Stichproben erfolgte die Analyse mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik, Universitätsklinikum Lübeck, Medizinische Universität zu Lübeck.

## **4.2 Zellbiologische Methoden**

### **4.2.1 Kultivierung von *E.coli*-Bakterien**

#### **Glycerinkulturen zur Langzeitlagerung**

Glycerinkulturen von *E.coli* können ohne Verlust der Lebensfähigkeit bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert und bei Bedarf ein geringer Teil auf einer entsprechenden Kulturplatte ausgestrichen werden. Dafür wurde 1 ml einer dicht gewachsenen ÜN-Kultur einer einzelnen *E.coli*-Kolonie mit 1 ml

Glycerin (autoklaviert) versetzt, vermischt und vor der Lagerung bei -70°C 10 min auf Eis inkubiert. Für die Glycerinkulturen wurden sterile Kryoröhrchen verwendet.

#### **Kultur auf Mediumplatten**

Für die Kultivierung von *E.coli* auf Mediumplatten wurden 50-200 µl einer Bakteriensuspension auf entsprechenden Platten ausgestrichen und in der Regel bei 37°C ÜN bebrütet. Sobald Einzelkolonien sichtbar waren, wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4°C bis zu 3 Monate gelagert. Das verwendete Medium war LB-Medium, gegebenenfalls mit der erforderlichen Antibiotika-Konzentration für Bakterien mit einem plasmidkodierten Resistenzgen.

#### **Flüssigkulturen**

Zum Anziehen einer Flüssigkultur wurde eine einzeln liegende Kolonie mit Hilfe einer Impföse in die entsprechende Menge Medium (3 oder 50 ml) gegeben. Die Kultur wurde ÜN unter Schütteln mit 225 rpm bei 37°C inkubiert. Hierfür wurde LB-Medium mit dem Zusatz von entsprechendem Antibiotikum verwendet.

### **4.2.2 Transformation von *E.coli***

Für die Transformation von chemisch kompetenten *E.coli* Zellen wurden 200 µl Aliquots auf Eis aufgetaut und dann Plasmid-DNA je nach Konzentration in einem Volumen von 1-8 µl zugegeben. Nach kurzem Vermischen wurden die Zellen 15 min auf Eis gehalten, einem Hitzeschock für 90 sec bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 800 µl SOC-Medium (RT) wurden die Zellen bei 37°C unter Schütteln mit 225 rpm inkubiert. Von dem Transformationsansatz wurden 50 und 200 µl auf zwei Kulturplatten ausgestrichen.

### **4.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli***

#### **Plasmid-DNA-Mini-Präparation nach Qiagen**

Aus einer 3 ml ÜN-Kultur wurden 1,5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation (10 000xg, 15 sec, RT) wurde der Überstand bis auf 50-100 µl verworfen. Anschließend wurde die Plasmid-Isolierung nach Angaben des Herstellers durchgeführt (QIAGEN® Plasmid Purification Handbook; <http://www.qiagen.com/>). Die Konzentration der Plasmid-DNA im Eluat wurde im BioPhotometer durch die Messung der Extinktion der DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm bestimmt.

### **Plasmid-DNA-Midi-Präparation nach Qiagen**

Eine 50 ml ÜN-Kultur wurde in Zentrifugations-Röhrchen überführt und 15 min lang bei 4000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zelleniederschlag nach Herstellerprotokoll aufbereitet (QIAGEN® Plasmid Purification; www.qiagen.com).

Diese Isolierungsmethode diente hauptsächlich dazu, große Mengen eines Plasmids zu erhalten, um diese für weitere Klonierungen bzw. für die Transfektion von Zelllinien zu verwenden. Sollte das isolierte Plasmid zur Transfektion von Zellen verwendet werden, wurde das EtOH des letzten Waschens unter der Sterilbank abgenommen und die DNA nach dem Trocknen in sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### **4.2.4 Reaktionen mit DNA-modifizierenden Enzymen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II von New England Biolabs verwendet. Für die Analyse von Plasmiden wurden 0,2-1,0 µg Plasmid-DNA mit 5-10 U<sup>1</sup> in dem für die jeweilige Nuklease entsprechenden Puffer eingesetzt. Für präparative Restriktionsspaltungen wurden Ansätze mit 20 µg Plasmid-DNA gemacht, in denen 20-40 U eines Enzyms eingesetzt wurden. Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4 DNA-Ligase nach Herstellerangaben (Roche Diagnostics, Mannheim).

### **4.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA**

Für die Trennung von DNA-Fragmenten und die Analyse von Plasmid-DNA wurden 0,7-1,5% Agarosegele verwendet. Die Gele wurden aus NEEO Ultra Agarose in TBE-Puffer hergestellt. Es wurde Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 250 ng/ml zugegeben. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE-Puffer verwendet. Der Gellauf wurde bei 120 V für etwa 30 min durchgeführt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels eines Geldokumentationssystems fotografiert. Als Größenstandard dienten die peqGOLD 100 bp DNA-Leiter und peqGOLD DNA-Sizer VI (PEQLAB Biotechnologie GMBH).

### **Isolierung von DNA-Amplifikaten**

DNA-Amplifikate wurden direkt nach der PCR unter Verwendung des QIAquick® PCR Purification Kit aus dem PCR-Ansatz gereinigt. Sollten DNA-Amplifikate von anderen isoliert werden, wurde zunächst eine Trennung der DNA-Fragmente durch Gel-Elektrophorese durchgeführt. Anschließend wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des NukleoSpin® Extract II Kit von der Agarose getrennt.

---

<sup>1</sup> 1 U (Unit) ist nach Definition die Enzymmenge, die 1 µg λ-Phagen-DNA in 1 h vollständig schneidet.

## 4.2.6 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

### Adhärente Kultur

Für die adhärente Kultur von CHO $\Delta$ 745-Zellen wurden Zellkulturflaschen mit Filterkappenverschluss und 25 oder 75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche verwendet. In einem Kulturmedium von 5 bzw. 15 ml wurden die Zellen mit einer Dichte von 4000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät (entspricht einer Konfluenz von ca. 10%) und bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und erhöhter Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension erfolgte dabei mit der Neubauer-Zählkammer. Bei Erreichen von nahezu 100% Konfluenz wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:20 passagiert. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10 min mit 1x Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnten CHO $\Delta$ 745-Zellen bis zu 30-mal passagiert werden, ohne dass sie ihre Teilungsfähigkeit verloren.

### Suspensions-Kultur

Suspensions-Kulturen von Jurkat-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit Filterkappenverschluss in einem Volumen von 5 bis 250 ml gehalten. Mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  -  $2,0 \times 10^6$  Zellen/ml wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gehalten. Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen, wurde die Zelldichte über drei Tage vor der Elektroporation auf ca.  $3,0 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt.

### Stabilate von Zellen

Eukaryotische Zellen lassen sich in flüssigem Stickstoff für lange Zeit aufbewahren, ohne dass sie ihre Lebensfähigkeit verlieren. Die Zellen wurden bis zur gewünschten Menge in adhärenter bzw. Suspensions-Kultur angezogen und zentrifugiert (500xg, 10 min, RT). Der Zelleniederschlag wurde in eiskaltem Einfriermedium mit einer Zelldichte von  $1,0 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen. 1 ml Aliquots der Zellsuspension wurden in Kryoröhrchen überführt und auf Eis inkubiert, bevor sie in einem mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainer („Mr. Frosty“, Cryo 1°C Freezing Container, Nunc) bei -70°C eingefroren wurden. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### Auftauen von Zellen

Stabilate von Zellen wurden in Kultur genommen, indem die Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstoff in ein Wasserbad mit 37°C überführt wurden. Sobald die Suspension aufgetaut war, wurden die Zellen in 10 ml Medium überführt und 10 min bei RT und 500xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 5 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und wie beschrieben kultiviert. Nach etwa 2-3



Tagen war ein normaler Wachstumszyklus zu beobachten, so dass die Zellen für Transfektionen und Zytoadhäsionsversuche verwendet werden konnten.

## 4.2.7 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zelllinien

### Liposomen-basierte Transfektion

CHO $\Delta$ 745 Zellen wurden mit Plasmid-DNA transfiziert, um eine Zelllinie herzustellen, die den potentiellen Adhäsions-Rezeptor CD95 auf der Zelloberfläche kontinuierlich exprimiert. Das Plasmid ist so konstruiert, dass der zu untersuchende Rezeptor als Fusionsprotein mit einem intrazellulären, C-terminalen AcGFP exprimiert wird. Als Vektor diente pAcGFP-N1, in welches die cDNA von CD95 eingefügt wurde. Für die Transfektion wurde das Zelltransfektionsreagenz Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen) eingesetzt. Die Transfektionstechnik nutzt die Eigenschaft der positiv geladenen Kopfgruppen kationischer Lipidkomplexe (Liposomen), die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats interagieren und DNA-Lipidkomplexe bilden. Diese verschmelzen mit der Zellmembran, wodurch die DNA in die Zelle eingeschleust wird.

CHO $\Delta$ 745 Zellen wurden im 24-well-Format mit einer Dichte von  $2,0 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. 24 h später wurde die Transfektion nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Verhältnis von Lipofectamine Reagenz ( $\mu$ l) und eingesetzter DNA-Menge ( $\mu$ g) betrug 2:1. 48 h nach der Transfektion wurde das Selektionsreagenz G418 mit  $700 \mu$ g/ml zum Medium zugegeben. Das verwendete Plasmid enthält das Gen *neo* für die Aminoglykosid-Phosphotransferase, welche dem Organismus die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418 verleiht. Dadurch wird erreicht, dass nur erfolgreich transfizierte Zellen proliferieren können. Sobald nach einer Transfektion mindestens  $1,0 \times 10^6$  Zellen vorhanden waren, wurden die GFP-exprimierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie isoliert. Ca. 200 AcGFP-exprimierende Zellen wurden in zwei 96-Loch Mikrotiterplatten vereinzelt, um homogene Einzelzellpopulationen zu erhalten. Die hergestellte Zelllinie wurde anschließend auf ihre Expression von CD95 durch Immunoblot und Immunfluoreszenzfärbung überprüft, bevor sie in Zytoadhäsions-Versuche eingesetzt wurde.

### Transfektion mittels Elektroporation

Für Reporteragen-Assays wurden Jurkat-Zellen mittels Elektroporation transfiziert.  $1,0 \times 10^7$  Zellen wurden in  $500 \mu$ l Medium aufgenommen und in Elektroporationsküvetten (Bio-Rad, Göttingen) auf Eis überführt. Die entsprechende Menge jedes Konstruktes wurde in die Küvetten gegeben und die Elektroporation mit  $960 \mu$ F bei einer Stromstärke von 200 V durchgeführt. Bis zur Überführung der Zellen in vorgewärmtes Medium wurden die Zellen auf Eis gehalten.

## 4.2.8 Kultivierung von *P. falciparum*

### Kontinuierliche Kultur von *P. falciparum*-Isolaten

Die *P. falciparum*-Isolate wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 5 ml Medium bzw. in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 20-30 ml Medium mit einem Hämatokrit von 3,5% gehalten. Die Kultivierung erfolgte unter einer reduzierten Sauerstoff-Atmosphäre in einem Gasgemisch mit folgender Zusammensetzung: 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 94% N<sub>2</sub>. Durch einen Ausstrich der Erythrozyten auf einem Objektträger, Fixierung in MeOH und anschließender Giemsa-Färbung konnte die Parasitämie ermittelt werden. Die Parasitendichte der einzelnen Isolate wurde zwischen 0,25 und 8% gehalten. Je nach Proliferation der einzelnen Isolate wurde die Parasitämie alle 2-3 Tage überprüft und die Kultur entsprechend verdünnt.

### Synchronisation einer *P. falciparum*-Kultur

Aufgrund asynchronen Wachstums beinhaltet eine kontinuierliche *P. falciparum*-Kultur nach mehreren Zyklen Parasiten im Ring- und im Trophozoiten-Stadium. Um die Parasiten für Zytoadhäsionsversuche in ein synchrones Stadium zu bringen, wurde die Eliminierung der Trophozoiten-Stadien 24h vor einem Versuch mit Hilfe der Sorbitol-Methode durchgeführt (Lambros und Vanderberg, 1979). Die Erythrozyten einer asynchronen Kultur wurden durch Zentrifugation vom Medium getrennt (800xg, 5 min, RT) und in einem 10x Volumen einer sterilen 5%igen Sorbitol-Lösung (37°C) aufgenommen. Nach einer Inkubation bei 37°C für 5 min wurde die Suspension erneut zentrifugiert und die Sorbitol-Lösung abgenommen. Die Erythrozyten wurden in der entsprechenden Menge vorgewärmten Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Das Sorbitol dringt in die Erythrozyten durch das tubulär-vesikuläre System ein und bringt die Zelle durch osmotischen Druck zum platzen, sobald die Erythrozyten wieder in Kulturmedium aufgenommen werden. Parasiten im Ring-Stadium haben diese tubulären Strukturen noch nicht vollständig ausgebildet und sind deshalb gegenüber dieser Methode resistent.

### Stabilate von *P. falciparum*-Kulturen

Für die Langzeitlagerung von *P. falciparum*-Isolaten wurde die Parasitämie der Kultur zunächst auf 2% Parasiten im Ring-Stadium eingestellt. Die Erythrozyten wurden durch Zentrifugation (800xg, 5 min, RT) vom Medium getrennt und mit dem 2-fachen Volumen einer 30%igen Glycerol-Lösung in HT-Puffer vermischt. Zum Einfrieren wurden Kryoröhrchen verwendet. Diese wurden auf Eis gehalten, bevor sie in einem mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainer („Mr. Frosty“) auf -70°C gekühlt wurden. Nach 24 h konnten die Stabilate in flüssigen Stickstoff überführt werden.

### **Auftauen von *P. falciparum*-Stabilaten**

Um kryokonservierte *P. falciparum*-Isolaten zu kultivieren, wurde das Stabilat im Wasserbad (37°C) aufgetaut und die Erythrozyten in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt. Anschließend wurden 0,2 ml einer auf 37°C vorgewärmten 12% NaCl-Lösung tröpfchenweise zugegeben. Die Suspension wurde durch Schütteln gut vermengt. Nach langsamer Zugabe von 1,8 ml einer 1,6% NaCl-Lösung, die ebenfalls auf 37°C angewärmt wurde, wurde die Suspension zentrifugiert (800xg, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Erythrozyten wurden entsprechend ihrem Volumen in Kulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Am folgenden Tag wurde die Parasitämie bestimmt und die Kultur wie oben beschrieben geführt.

## **4.3 Protein- und Immunchemische Methoden**

### **4.3.1 Proteinexpression rekombinanter Proteine in *E.coli***

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl die große extrazelluläre Domäne des membranständigen Tetraspanins CD9 als Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusions-Protein als auch GST rekombinant in *E.coli* exprimiert. Zu diesem Zweck wurde der *E.coli*-Stamm BL21 Ril verwendet, welcher das jeweilige Expressionskonstrukt enthielt (pGEX-CD9 bzw. pGEX-2KG). Aus den Glycerinkulturen wurde eine 100 ml Kultur (37°C) ÜN angezogen und 10 ml dieser Kultur am folgenden Tag in 1 L LB-Medium überführt (37°C). Sobald eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht war, wurde IPTG zur Induktion der Expression der rekombinanten Proteine in einer Konzentration von 0,1 µM zugegeben. Vier Stunden nach Induktion wurde die Kultur zentrifugiert (1000xg, 4°C, 15 min). Die Zelniederschläge wurden in 30 ml PBS (4°C) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (1000xg, 4°C, 10 min) wurde der Überstand verworfen und die Zellen zur Isolierung der überexprimierten Proteine aufgeschlossen bzw. bis zur Verarbeitung bei -70°C gelagert.

### **Reinigung rekombinant exprimierter Proteine**

Die Proteinreinigung von GST-Fusionsproteinen wurde unter nativen Bedingungen unter Verwendung des BugBuster® GST•Bind™ Purification Kit (VWR International GmbH, Darmstadt) durchgeführt. Die Proteinisolierung erfolgte wie im Protokoll Nr. TB245 beschrieben ([www.merckbiosciences.co.uk/html/NVG/includes-user-protocols.html](http://www.merckbiosciences.co.uk/html/NVG/includes-user-protocols.html)). Zur Entfernung des Elutionspuffers wurde anschließend gegen PBS in Slide-A-Lyzer-Dialysekassetten (Pierce, Perbio Science, Bonn) mit 0,5-3,0 ml Probevolumen (4°C, ÜN) dialysiert. Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte unter Verwendung des BCA™

Protein Assay Kits nach Herstellerangaben (Pierce). Anschließend wurden die Proteinlösungen aliquotiert und bis zur Verwendung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen gemäß ihrem Molekulargewicht erfolgte mit einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). In diesem Fall wurde das Mini-Gel-System von Biometra (Göttingen) verwendet. Gearbeitet wurde mit 8% und 12%igen Trenngelen, sowie 4%igen Sammelgelen. Die Proteinproben wurden mit 1x SDS-PAGE-Auftragspuffer versetzt und nach dem Erhitzen für 10 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  mindestens 5 min auf Eis gelagert. Bis zu 25  $\mu\text{l}$  der Proben wurden in die Geltaschen gefüllt und bei einer Stromstärke von 20 mA im Sammelgel und 30 mA im Trenngel ca. 50 min bei RT aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x SDS-Elektrophorese-Puffer verwendet. Als Größenstandard wurden SeeBlue<sup>®</sup>Plus2 Prestained (Invitrogen) und PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

### **Färben und Trocknen von SDS-Polyacrylamidgelen**

Für die Färbe-Methode mit Coomassie Brilliant Blue R-250 wurden die Trenngele 30 min in der Coomassie-Färbelösung bei RT geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 2-3 h unter leichtem Schütteln in der Entfärbelösung, bis die Färbung des Hintergrunds minimiert war. Gefärbte Polyacrylamid-Gele wurden zur Aufbewahrung in einem Geltrocknungsrahmen getrocknet und zur Dokumentation eingescannt.

## **4.3.2 Immunoblot**

### **Proteintransfer auf eine PVDF-Membran**

Nachdem die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, konnten sie mit Hilfe des „Semi-Dry-Verfahrens“ in einer Fastblot-Apparatur (Biometra) auf eine PVDF-Membran (PVDF-Immobilon<sup>™</sup>-P-Transfer Membran, Millipore) transferiert werden. Im Anschluss daran konnten die Proteine durch spezifische Antikörper detektiert werden. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran zur besseren Benetzung 1 min in MeOH geschwenkt und danach 10 min in Transferpuffer inkubiert. Währenddessen wurden der Größe des Trenngels entsprechende Whatman-Papierstreifen ebenfalls in Transferpuffer getränkt. In 3 Lagen wurden diese dann auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Auf dem oberen Whatman-Papier wurden nun nacheinander luftblasenfrei das SDS-Gel, die Membran und erneut 3 in Transferpuffer getränkte Whatman-Papierstreifen geschichtet. Jetzt wurde die Kathoden-

Platte aufgelegt und der Proteintransfer mit  $2,1 \text{ mA/cm}^2$  Membranfläche für 1 h bei RT durchgeführt.

### **Immunologische Detektion**

Nach dem Transfer wurden zunächst die Banden des Protein-Größenstandards auf der Membran markiert. Im Anschluss wurde diese zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  in Blockierungslösung geschwenkt. Darauf folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in einer entsprechenden Verdünnung in Blockierungs-Lösung entweder 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  oder ÜN bei  $4^\circ\text{C}$ . Verwendet wurden Antikörper, die in Abschnitt 3.7 aufgeführt sind. Anschließend wurde die Membran viermal je 5 min in 100 ml PBS/0,2% (v/v) Tween-20 gewaschen. Daraufhin folgte die Bindung des HRP-gekoppelten sekundären Ak, ( $\alpha$ -Maus aus Ziege) in einer 1:5000 Verdünnung in Blockierungslösung (1 h,  $37^\circ\text{C}$ ). Dann wurde die Membran dreimal je 5 min in 100 ml PBS/0,2% (v/v) Tween-20 und zweimal in PBS bei RT gewaschen.

Zur Entwicklung wurde die Membran mit Lösungen des ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Pharmacia Biotech) getränkt und zwischen Folie in eine Filmkassette gelegt. Durch die von der oxidierten Form der Meerrettichperoxidase katalysierte Spaltung von Luminol wurde eine Lichtemission hervorgerufen. Diese konnte innerhalb von Sekunden durch eine Schwarzfärbung des aufgelegten Röntgenfilms (X-Ray Retina, Fotochemische Werke, Berlin) detektiert werden.

### **4.3.3 Immunfluoreszenz-Färbungen**

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Färbungen von Zellen sollte der Nachweis erbracht werden, dass überexprimierte Rezeptoren an der Oberfläche der transfizierten Zellen exponiert waren.

Die Zelllinien wurden auf einem Objektträger mit 8 Kammern (Lab-Tek™ Chamber Slide™ System, Nunc) ausgesät. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen und Reste des Mediums durch drei Waschschrte mit je 100  $\mu\text{l}$  PBS pro Kammer entfernt. Die folgende Prozedur wurde bei RT durchgeführt. Die verwendeten Volumina waren in der Regel 100  $\mu\text{l}$  pro Kammer, die Antikörperlösungen wurden in 50  $\mu\text{l}$  auf die Zellen gegeben. In 3% Paraformaldehyd in PBS wurden die Zellen für 15 min fixiert. Anschließend folgten erneut drei Waschschrte und die Inkubation in Blockierungslösung (1% BSA in PBS) für 30 min. Der primäre Antikörper wurde in geeigneter Verdünnung in Blockierungslösung für 1 h auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem sekundärem Antikörper in Blockierungslösung ( $\alpha$ -Maus IgG aus Ziege, gekoppelt mit Alexa®-594, 1:1000), welche zusätzlich den DNA-Farbstoff DAPI in einer Konzentration von

200 ng/ml enthielt. Diese Inkubation wurde für 1 h im Dunkeln durchgeführt, da es sich bei Alexa®-594 und DAPI um lichtempfindliche Fluoreszenzfarbstoffe handelt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen mit permanentem Einschlussmedium (DakoCytomation, Via Real, USA) fixiert, ÜN bei 4°C getrocknet und anschließend mikroskopisch analysiert.

#### **4.3.4 *P. falciparum*-Zytoadhäsionsversuche**

Adhäsionsversuche mit IE wurden mit dem Ziel durchgeführt, Rezeptoren zu identifizieren, die *in vivo* an der Interaktion von parasitierten Erythrozyten mit Wirtsendothelzellen beteiligt sein könnten. Für den Versuch ist es notwendig, dass sich die Parasiten im Trophozoiten-Stadium befinden. Es konnte gezeigt werden, dass sich während dieses Stadiums PfEMP1-Moleküle auf der Oberfläche des Erythrozyten befinden, die die Bindung an Wirtszell-Rezeptoren vermitteln (Baruch et al., 1996)).

In die Vertiefungen von 24-Loch-Platten wurden Deckgläschen gelegt, die vor dem Ausplattieren der zu untersuchenden Zelllinie mit einer 1%igen Gelatine-Lösung in PBS beschichtet wurden (30 min, 37°C). Damit war gewährleistet, dass die Zellen während der gesamten Prozedur an den Deckgläschen haften blieben. Jeder Ansatz wurde im Triplikat ausgeführt. Um am Tag des Adhäsionsversuchs eine Konfluenz von ca. 50% zu erreichen, wurden transfizierte CHO $\Delta$ 745-Zellen 48 h vorher mit  $1,5 \times 10^4$  Zellen in 500  $\mu$ l Medium ausgesät. Unmittelbar bevor die Erythrozyten-Suspension auf die Zellen gegeben wurde, wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit serumfreiem Bindungsmedium gewaschen. Um die kultivierten Parasiten im Trophozoiten-Stadium zu erhalten, wurden diese 24 h vor dem Versuch, zum Zeitpunkt, wenn sich die Mehrheit der Parasiten im Ring-Stadium befindet, mittels der Sorbitol-Methode synchronisiert. Für den Adhäsionsversuch wurde die Parasitämie der synchronen Kultur bestimmt und die Erythrozyten vom Medium durch Zentrifugation (800xg, 5 min, RT) getrennt. Die Erythrozyten wurden anschließend mit nicht infizierten Erythrozyten auf eine Parasitämie von 4% eingestellt und in Bindungsmedium aufgenommen, so dass der Hämatokrit 1% betrug. Die Suspension wurde 30 min bei 37°C inkubiert, bevor je Vertiefung 500  $\mu$ l parasitenhaltige Suspension auf die Zellen gegeben wurden. Während der einstündigen Inkubation bei 37°C wurde die Suspension alle 15 min durch langsames Schütteln resuspendiert. Anschließend wurden die Deckgläschen umgedreht und waagrecht in eine im 45°-Winkel aufgestellte 24-Loch-Platte gelegt, so dass sie vollständig mit Bindungsmedium bedeckt waren. Dadurch ist gewährleistet, dass nicht adhärenente Erythrozyten durch die Schwerkraft abfallen konnten. Nach 1 h folgte ein Fixierungsschritt in 1% Glutaraldehyd in PBS für 45 min. Um die infizierten Erythrozyten und die CHO $\Delta$ 745-Zellen für die Auswertung sichtbar zu machen,

wurden diese 15 min in Giemsa-Färbelösung inkubiert. Überflüssige Farbe wurde mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und die Deckgläschen an der Luft getrocknet. Die Deckgläschen wurden anschließend mit permanentem Einschlussmedium auf Objektträgern fixiert und am folgenden Tag mikroskopisch ausgewertet. Dabei wurde die Anzahl infizierter Erythrozyten gezählt, die an 500 transfizierte CHO $\Delta$ 745-Zellen binden. Für die Darstellung wurden Mittelwert und Standardfehler (SF) aus den Dreifach-Bestimmungen pro 100 Zellen ermittelt. Die Adhäsionsversuche wurden mindestens an 3 unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

Antikörper, deren Inhibition der Bindung getestet wurde, lagen während des Adhäsionsversuchs in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml vor. Lösliche, potentielle Inhibitoren der Bindung wie Peptide oder rekombinante Proteine wurden vor dem Versuch 30 min mit infizierten Erythrozyten inkubiert und während des gesamten Versuchs in Bindungssuspension gelassen.

### 4.3.5 Reporteragen-Assay

#### Zielgerichtete Mutagenese

Nachdem drei Abschnitte unterschiedlicher Länge des CD95-Promotors in den pGL3-Basic-Vektor (Promega) eingesetzt worden waren (Abbildung 5-12), wurde an der Position –436 ein Cytosins durch ein Adenosin ersetzt. Dafür wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden Mut-436\_for und Mut-436\_rev (Tabelle 0-4) und der Plasmid-DNA pGL3-CD95-SE, pGL3-CD95-E und pGL3-CD95-670 als Template durchgeführt. Pro Template wurden zwei Ansätze mit jeweils einem Oligonukleotid hergestellt. Im Anschluss an das PCR-Programm I wurden beide Ansätze vereinigt und 1  $\mu$ l Phusion<sup>TM</sup>-Polymerase zugegeben. Nun folgte das zweite PCR-Programm II. Der PCR-Ansatz und die Programme sind im Folgenden beschrieben:

1,0  $\mu$ l DNA-Template (50 ng/ $\mu$ l)  
 1,0  $\mu$ l Primer (10  $\mu$ M, for oder rev)  
 1,1  $\mu$ l 10x Phusion-Polymerase-Puffer  
 0,25  $\mu$ l dNTP's (je 10 mM)  
 0,25  $\mu$ l Phusion<sup>TM</sup> Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l)  
7,4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
 11,0  $\mu$ l

PCR-Programm I:

95°C            30 sec  
 95°C            30 sec

PCR-Programm II:

95°C            30 sec  
 95°C            30 sec

50°C	1 min	5 Zyklen	57,5°C	1 min	5 Zyklen
72°C	15 min		72°C	15 min	
			95°C	30 sec	
			52,5°C	1 min	18 Zyklen
			72°C	18 min	
			4°C		

Im Anschluss wurde zu dem Ansatz 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* zugegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Bei *DpnI* handelt es sich um ein Restriktionsenzym, das in der Lage ist, das Template zu spalten, welches aus *E. coli* stammt und deshalb methyliert ist. Somit bleibt nur die neu synthetisierte Plasmid-DNA intakt, mit der anschließend *E. coli* XL-1 Blue-Zellen transformiert wurden. Die Isolierung der mutagenisierten Plasmide erfolgte durch Mini-Präparation. Zur Überprüfung der erfolgreichen Mutagenese wurde die gesamte Sequenz des Promotor-Bereichs verifiziert.

### Reportergen-Assay des CD95-Promotors

Um den Einfluss der Promotor-Variante -436C>A im CD95-Gen auf die Regulation der Expression zu untersuchen, wurde ein Reportergen-Assay durchgeführt. Dazu bedient man sich eines Reportergens, in diesem Fall des Gens für die Firefly Luciferase aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Das Enzym katalysiert in Gegenwart von ATP und Mg<sup>2+</sup> die oxidative Decarboxylierung von Luciferin. Durch die Messung der dabei entstehenden Lumineszenz im Luminometer (Junior LB9509, Berthold, Wildbad) kann die Expressionsstärke des Enzyms bestimmt und dadurch die Aktivität eines Promotors ermittelt werden.

Zu untersuchende Promotorabschnitte, welche entweder ein Cytosin oder ein Adenosin an Position -436 tragen, wurden im pGL3-Basic-Vektor vor das Luciferase-Gen *luc* eingesetzt. Mit 10 µg Plasmid wurden anschließend je Konstrukt 1,0x10<sup>7</sup> Jurkat-Zellen durch Elektroporation transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde jeder Ansatz in 3 Ansätze geteilt und die Stimulation der Zellen durch Zugabe von PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (750 ng/ml) induziert. Es wurde ein Kontroll-Ansatz mit unstimulierten Zellen mitgeführt. Die Zellen wurden 5 h nach der Stimulation zur Bestimmung der Enzymaktivität verwendet. Die Erzeugung des Zellhomogenats und der Nachweis der Luciferase-Expression erfolgte unter Verwendung des Dual-Luciferase® Reporter Assay Kits nach Herstellerangaben. (Promega, <http://www.promega.com/tbs/tm040/tm040.html>). Um unterschiedliche Ansätze direkt vergleichen zu können, wurde als interne Kontrolle 1 µg des pRL-TK-Vektors co-transfiziert. Dieses Plasmid trägt das Gen für die *Renilla*-Luciferase. Die Messung der Enzymaktivität der *Renilla* Luciferase, welche Coelenterazin als Substrat verwendet, ermöglicht es, die Aktivität



der Firefly Luciferase auf die Transfektionseffizienz und eingesetzte Zellzahl unterschiedlicher Ansätze zu normalisieren. Das Verhältnis der Aktivitäten von Firefly und *Renilla*-Luciferase wurde als relative Promotoraktivität dargestellt.

#### **4.3.6 Immunfluoreszenz-Färbung peripherer mononukleärer Zellen**

Für die Oberflächenfärbung peripherer mononukleärer Zellen wurden Proben von Lymphozyten-Fractionen erwachsener, afrikanischer Probanden aus der Ashanti-Region in Ghana verwendet. Zu Beginn dieser Arbeit lagen die Proben vor.

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Aliquots wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in 5 ml RPMI Medium (4°C) überführt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 4°C mit 500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Zelniederschlag in 1,2 ml 10% FCS in PBS resuspendiert. Die Zellen wurden gleichmäßig in 12 Vertiefungen einer 96-Loch Mikrotiterplatte verteilt und mit 500xg bei 4°C für 5 min sedimentiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 50 µl Blockierungslösung (10% FCS/10% Maus-Serum in PBS) pro Ansatz resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (Abschnitt 3.7) in Blockierungslösung zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 15 min auf Eis im Dunkeln, um fluoreszenz-markierte Antikörper vor dem Ausbleichen zu schützen. Zum Waschen der Zellsuspensionen wurden pro Vertiefung 100 µl 10% FCS/PBS (4°C) hinzugegeben und die Mikrotiterplatte anschließend wie beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, bevor die Inkubation mit jeweils 100 µl PE-markiertem Streptavidin erfolgte. Die Ansätze wurden weitere 15 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein zweiter Waschschrift, bevor die Zellen in 100 µl 10% FCS/PBS aufgenommen wurden und im Durchflusszytometer auf Expression von Oberflächenmarkern und CD95 untersucht wurden. Bis zur Analyse wurden die Proben auf Eis gehalten.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software FACSDiva™ (BD Biosciences) und Flowjo (Tree Star, Ashland, USA). Einerseits wurde der Anteil aller CD95 positiven Zellen in der gesamten Zellfraktion sowie innerhalb der Subklassen bestimmt, andererseits die Expressionsstärke von CD95 der verschiedenen Zelltypen verglichen. Um den Anteil aller CD95 positiven Zellen zu berechnen, wurde zunächst die Hintergrundfluoreszenz mit Hilfe des Signals der Isotyp-Kontrolle festgelegt. Die Expressionsstärke ließ sich indirekt durch den Abgleich der Fluoreszenzintensität des PE mit der Isotyp-Kontrolle ermitteln, indem die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der Isotyp-Kontrolle als Hintergrund abgezogen wurde.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 P-Selektin

#### 5.1.1 Genetische Varianten von P-Selektin

Durch Re-Sequenzierung der Promotor-Region, der kodierenden Bereiche, der Intron-Exon-Übergänge und der 3'-UTR des Gens von P-Selektin (*SELP*) wurden bei 46 Individuen insgesamt 32 Punktmutationen identifiziert (Tabelle 5-1).

**Tabelle 5-1: Varianten und Allelfrequenzen im Gen *SELP***

Region	Position	rs-Nummer	N-Austausch	AS-Austausch	AF Fallgruppe	AF Kontrollgruppe
<b>Promotor</b>	<b>-229</b>	<b>rs3917653</b>	<b>C/G</b>		<b>0</b>	<b>0,04</b>
Intron 2	10959	rs3917696	C/T		0,04	0,07
Exon 3	12982	rs6129	G/A		0,09	0,02
<b>Exon 4</b>	<b>16434</b>	<b>rs3917718</b>	<b>A/G</b>	<b>G179R</b>	<b>0,02</b>	<b>0</b>
<b>Exon 5</b>	<b>16995</b>	<b>rs6125</b>	<b>A/G</b>	<b>V209M</b>	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>
Exon 5	17103		C/T		0	0,04
Intron 5	17182	rs3917722	A/T		0,09	0,04
Exon 6	17717	rs3917724	C/T	T274I	0,15	0,02
Intron 6	18339/40	rs3917730	-/AT		0,41	0,51
<b>Exon 7</b>	<b>18427</b>	<b>rs6131</b>	<b>G/A</b>	<b>S331N</b>	<b>0,30</b>	<b>0,37</b>
Intron 7	18596	rs3917731	A/G		0,04	0,11
<b>Intron 8</b>	<b>22937</b>		<b>T/C</b>		<b>0,02</b>	<b>0,02</b>
Intron 9	23183	rs3917752	G/A		0	0,02
Exon 10	26967	rs3917769	G/A	E542K	0	0,02
Intron 10	27135	rs3917770	C/T		0	0,07
Exon 11	32986	rs6135	C/T		0,41	0,37
	32999	rs6127	A/G	N603D	0,13	0,11
	33004	rs6132	C/T		0,41	0,39
	33047	rs2228672	T/G	S619A	0,02	0,02
	33070	rs3917805	A/G		0,04	0
Intron 11	33919	rs3917811	G/T		0,33	0,39
Exon 12	33940	rs3917812	G/T	G631V	0	0,02
<b>Exon 12</b>	<b>33966</b>	<b>rs6133</b>	<b>G/T</b>	<b>V640L</b>	<b>0,33</b>	<b>0,39</b>
	34028	rs3917813	A/G		0,04	0

N: Nukleotid; AF: Allelfrequenz des seltenen Allels, AS: Aminosäure; Position: Lokalisation der Variante relativ zum Transkriptionsstart; rs-Nummer: NCBI Nummer von annotierten Varianten; Hervorgehobene Varianten wurden in der Gesamtgruppe genotypisiert

Fortsetzung Tabelle 5-1: Varianten und Allelfrequenzen im Gen *SELP*

Region	Position	rs-Nummer	N-Austausch	AS-Austausch	AF Fallgruppe	AF Kontrollgruppe
Exon 12	34030	rs3917814	C/A	T661N	0	0,02
	34066	rs3917815	A/G	N673S	0	0,02
Intron 12	35184	rs1569471	A/C		0,33	0,39
Exon 14	36363	rs3917831	T/C		0,04	0
	36408	rs6128	G/A		0,41	0,41
Intron 14	37382		A/T		0,02	0,02
Intron 16	39986	rs3917853	C/T		0,20	0,13
<b>3'-UTR</b>	<b>40800</b>	<b>rs3917856</b>	<b>A/T</b>		<b>0,07</b>	<b>0</b>

N: Nukleotid; AF: Allelfrequenz des seltenen Allels, AS: Aminosäure; Position: Lokalisation der Variante relativ zum Transkriptionsstart; rs-Nummer: NCBI Nummer von annotierten Varianten; Hervorgehobene Varianten wurden in der Gesamtgruppe genotypisiert

Darunter befinden sich 11 Varianten, die eine Substitution eines Aminosäurerestes im Molekül hervorrufen. Eine Punktmutation wurde im Promotor-Bereich des Gens identifiziert. Acht sogenannte stumme Mutationen wurden gefunden. Dabei handelt es sich um exonische Varianten, die keinen Aminosäure-Austausch nach sich ziehen. Die restlichen 12 Nukleotid-Substitutionen sind in intronischen Regionen bzw. in der 3'-UTR des Gens lokalisiert.

### 5.1.2 Assoziationsstudien der Varianten von *SELP*

Aus den identifizierten Punktmutationen wurden sieben Varianten nach den in Absatz 4.1.2 genannten Kriterien ausgewählt (hervorgehoben in Tabelle 5-1), um ihre Häufigkeiten in der gesamten Studiengruppe zu ermitteln. Nach der Genotypisierung wurde geprüft, ob die Genotypverteilung den erwarteten Frequenzen nach dem HWE entspricht (Daten nicht gezeigt). Zwei Genvarianten, rs6131 und die Variante 22937, erfüllen das HWE mit einer Sicherheit von 95% nicht und wurden deshalb im Folgenden nicht berücksichtigt. Die prozentuale Häufigkeit der Genotypen in den Studiengruppen ist in Tabelle 5-2 dargestellt. Des Weiteren sind die Ergebnisse der multivariaten logistischen Regression unter Annahme eines additiven Modells mit OR und p-Wert bezogen auf den jeweils häufigeren Genotyp gezeigt.

**Tabelle 5-2: Relative Genotyp-Häufigkeiten und Assoziationstests der Varianten von *SELP***

Locus	Genotyp	Häufigkeit	Häufigkeit	OR (95% KI)	p-Wert
		Fallgruppe (%) n=2400	Kontrollgruppe (%) n=1900		
<b>rs3917653</b>	CC	98,3	97,7	1	0,227
	CG	1,7	2,2	0,77 (0,50-1,18)	
	GG	0	0,1		
<b>rs3917718</b>	GG	95,8	96,5	1	0,407
	AG	4,1	3,5	1,15 (0,82-1,61)	
	AA	0,1	0		
<b>rs6125</b>	GG	93,4	94,1	1	0,413
	AG	6,4	5,7	1,11 (0,86-1,44)	
	AA	0,2	0,2	1,28 (0,27-5,86)	
<b>rs6133</b>	TT	41,0	38,4	1	0,086
	GT	45,3	47,3	0,89 (0,78-1,01)	
	GG	13,7	14,3	0,89 (0,73-1,07)	
<b>rs3917856</b>	AA	96,4	93,9	1	0,003
	AT	3,6	6,1	0,61 (0,44-0,85)	

Odds Ratios (OR) und p-Werte der logistischen Regression hinsichtlich Alter, Geschlecht und Ethnizität adjustiert, KI: Konfidenzintervall

Die statistische Auswertung der Genotypisierungs-Daten der 5 Punktmutationen ergab eine Assoziation des Markers rs3917856 mit dem Krankheitsbild der schweren Malaria. Die Substitution eines Adenosins durch ein Tyrosin in der 3'-UTR des P-Selektin-Gens wurde häufiger in der Kontrollgruppe (6,1%) festgestellt als in der Fallgruppe (3,6%). Daraus lässt sich schließen, dass das Auftreten des AT-Genotypes mit einem Schutz von 39% vor der klinischen Manifestation einer schweren Malaria gegenüber dem AA-Genotyp einhergeht.

Zusätzlich zum additiven Modell wurden für alle Marker der rezessive und der dominante Erbgang als genetische Modelle für die Berechnung zugrunde gelegt. (Daten nicht gezeigt). Für das Gen von P-Selektin wurden insgesamt 5 Varianten und je 3 genetische Modelle auf Assoziation mit dem Vorkommen der schweren Malaria getestet. Um durch multiples Testen zufällig generierte signifikante Resultate zu minimieren, wurde das Signifikanzniveau von 5% für einzelne Varianten auf 0,003 angehoben (Adjustierung nach Bonferroni). Die Assoziation des Polymorphismus rs3917856 liegt auf dem adjustierten Signifikanzniveau von 3% und kann somit als Assoziation betrachtet werden. Die statistische Power, die eine Aussage über die Teststärke oder Sensitivität eines Tests macht, liegt in diesem Fall bei 76%. Dabei wurden folgende Werte für die Berechnung der Power angenommen: AF: 0,02, OR: 0,61, Prävalenz der schweren Malaria: 1%.

Die Assoziation des AT-Genotyps mit dem Schutz vor schwerer Malaria ist nicht spezifisch für die unterschiedlichen klinischen Krankheitsbilder der Malaria wie schwere Anämie, zerebrale Malaria oder andere Komplikationen. Diese Schlussfolgerung wird aus der Analyse der Daten nach der Stratifizierung in Untergruppen deutlich (Tabelle 5-3).

**Tabelle 5-3: Genotyp-Häufigkeiten von rs3917856 in klinischen Subgruppen**

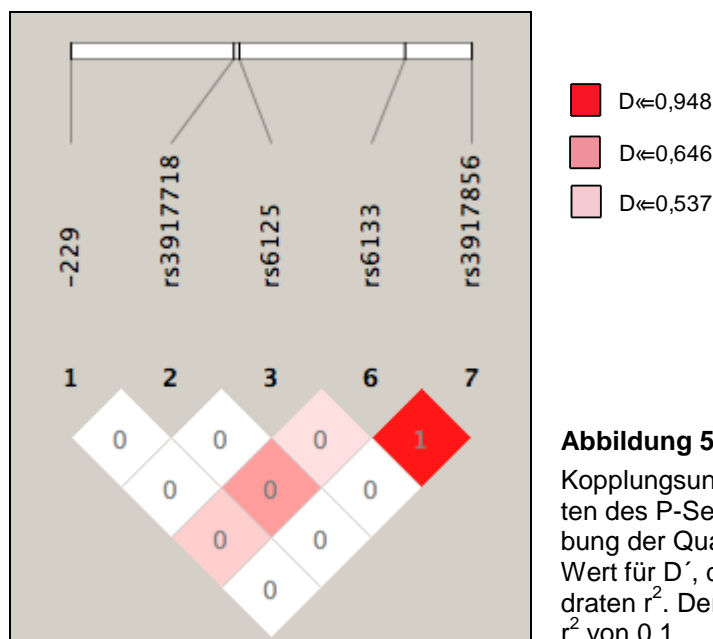
Schwere Anämie				
Genotyp	Fälle (%) n=1426	Kontrollen (%) n=1112	OR (95% KI)	p-Wert
AA	96,1	94,3	1	
AT	3,9	5,7	<b>0,68 (0,46-1,0)</b>	<b>0,049</b>
Zerebrale Malaria				
Genotyp	Fälle (%) n=492	Kontrollen (%) n=386	OR (95% KI)	p-Wert
AA	96,1	93,8	1	
AT	3,9	6,2	0,64 (0,39-1,07)	0,089
Andere				
Genotyp	Fälle (%) n=482	Kontrollen (%) n=349	OR (95% KI)	p-Wert
AA	97,1	93,1	1	
AT	2,9	6,9	<b>0,43 (0,22-0,82)</b>	<b>0,010</b>

Odds Ratios (OR) und p-Werte der logistischen Regression hinsichtlich Alter, Geschlecht und Ethnizität adjustiert; Untergruppen: Schwere Anämie, Zerebrale Malaria und schwere Malaria mit anderen Komplikationen (Andere).

In den Subgruppen sind die Genotyp-Frequenzen in den Fall- und Kontrollgruppen ähnlich wie in der gesamten Studiengruppe verteilt. In der Gruppe der zerebralen Malariafälle ist der Unterschied in der Genotypverteilung nicht signifikant, jedoch ist der gleiche Trend zu beobachten, da hier die OR mit 0,64 im Bereich der OR für die Gesamtgruppe (OR=0,61), der schweren Anämie (OR=0,68) und der Gruppe der anderen schweren Malaria-Fälle (OR=0,43) liegt.

### 5.1.3 Kopplungsungleichgewicht der Varianten von *SELP*

Die Verteilung der Kopplungsungleichgewicht-Koeffizienten  $D'$  und  $r^2$  der 5 Varianten des P-Selektin-Gens ist in Abbildung 5-1 wiedergegeben.



Auffällig ist der relativ hohe Wert für  $D'$  zwischen der Variante rs6133 und dem assoziierten Marker rs3917856 von 0,948, in diesem Fall liegt  $r^2$  jedoch nur bei 0,1. Die charakterisierten Varianten weisen keine bzw. sehr schwache Korrelationen mit anderen genotypisierten Polymorphismen auf.

#### 5.1.4 Rekonstruktion der Haplotypen

Mit Hilfe des Programms Haploview wurden Haplotypen aus den fünf genotypisierten Varianten von P-Selektin rekonstruiert. Zwei Haplotypen waren mit über 5% in der Gesamtgruppe vorhanden. Die Häufigkeiten in Fall- und Kontroll-Gruppe wurden mit dem  $\chi^2$ -Test verglichen (Tabelle 5-4). Haplotypen, die mit einer Frequenz von unter 5% in der gesamten Studiengruppe repräsentiert sind, wurden für die Berechnung nicht berücksichtigt, da seltene Haplotypen keine verlässlichen Daten zulassen.

**Tabelle 5-4: Rekonstruierte Haplotypen aus fünf Varianten von *SELP***

Haplotyp	Häufigkeit		$\chi^2$	p-Wert
	Fallgruppe (%) n=2400	Kontrollgruppe (%) n=1900		
1 CGGTA	57,3	57,9	2,109	0,147
2 CGGGA	34,3	33,9	0,905	0,341

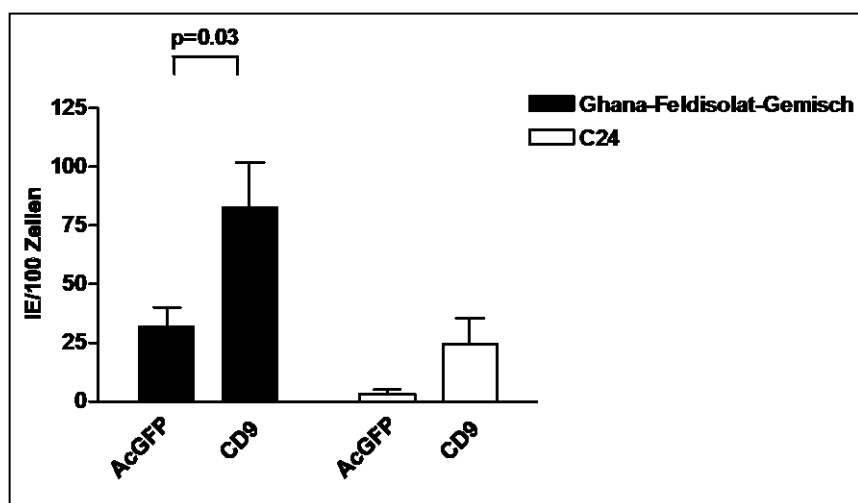
Haplotypen mit >5% Häufigkeit in der Gesamtgruppe mit  $\chi^2$ -Test und p-Wert

Die Häufigkeiten der ermittelten Haplotypen unterscheiden sich nicht signifikant zwischen Fall- und Kontrollgruppe, somit ist in der betrachteten Studiengruppe keine der rekonstruierten Haplotypen mit dem Auftreten der schweren Malaria assoziiert.

## 5.2 CD9

### 5.2.1 CD9 als Rezeptor für *P. falciparum*-infizierte Erythrozyten

Für die Untersuchung der Bindungskapazität des Endothelrezeptors CD9 an IE wurden Zytoadhäsionsversuche mit einer CHO $\Delta$ 745-Zelllinie durchgeführt, die CD9 stabil exprimiert. Diese Zelllinie exprimiert den membranständigen Rezeptor als Fusionsprotein mit GFP am C-Terminus, welcher intrazellulär lokalisiert ist. Die zwei extrazellulären Domänen von CD9 liegen auf der Oberfläche der Zellen exponiert vor (CHO $\Delta$ 745-CD9-GFP). Die Zytoadhärenz von CD9 wurde mit C24, einem laboradaptierten *P.falciparum* Isolat, und einem Ghana-Feldisolat-Gemisch überprüft. Um die unspezifische Hintergrundbindung festzustellen, wurde die Adhärenz der IE an eine Zelllinie bestimmt, die GFP als zytosolisches Protein exprimiert (CHO $\Delta$ 745-AcGFP). Die durchschnittliche Bindung von IE an je 100 Zellen ist mit Standardfehler in Abbildung 5-2 dargestellt.



**Abbildung 5-2:**

Zytoadhäsion von infizierten Erythrozyten (IE) von *P.falciparum* C24 und einem Ghana-Feldisolat-Gemisch an CHO $\Delta$ 745-CD9-GFP (CD9) und CHO $\Delta$ 745-AcGFP (AcGFP).

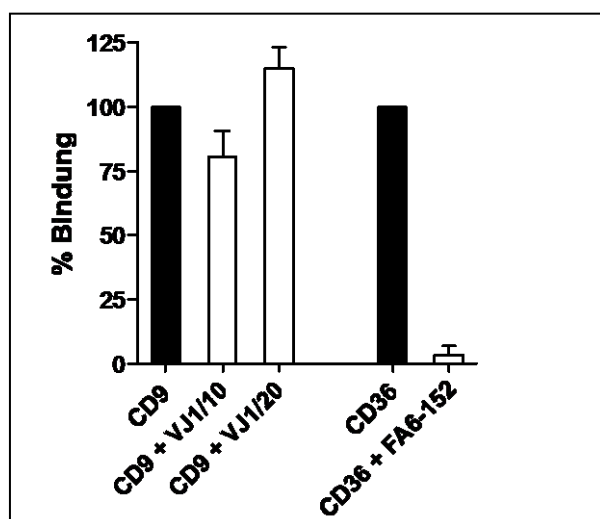
Die CD9 exprimierenden Zellen binden im Durchschnitt  $83 \pm 33$  IE/100 Zellen des Ghana-Feldisolat-Gemisches. Im Gegensatz dazu bindet CHO $\Delta$ 745-AcGFP im Mittel  $33 \pm 8$  IE/100 Zellen. Der Wilcoxon Rank Test bestätigt eine signifikante Erhöhung der Bindung des Ghana-Feldisolat-Gemisches an CD9-exprimierende Zellen in 6 unabhängigen Versuchen im

Vergleich zur GFP-exprimierenden Zelllinie ( $p=0,03$ ). Der laboradaptierte *P.falciparum* Stamm C24 zeigt in 3 Experimenten eine Tendenz zur Bindung an CD9-exprimierende Zellen ( $25\pm 11$  IE/100 Zellen). Im Vergleich zu  $3\pm 2$  IE/100 CHO $\Delta$ 745-AcGFP Zellen ist diese jedoch nicht signifikant (Wilcoxon Rank Test,  $p=0,25$ ).

Aus diesem Versuch lässt sich folgern, dass CD9 als Rezeptor für *P. falciparum* IE fungieren kann.

Um die Spezifität der Bindung von IE an die CD9-exprimierenden Zellen nachzuweisen, wurden drei unterschiedliche Ansätze zur Inhibition der Bindung verfolgt: durch spezifische Antikörper (1), durch Peptide aus den extrazellulären Domänen von CD9 (2) und durch eine rekombinant hergestellte Domäne von CD9 (3).

Zunächst sollte die Bindung durch zwei monoklonale Antikörper gegen extrazelluläre Epitope des CD9 sterisch verhindert werden. Die Antikörper wurden während des Versuchs mit einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml in das Bindungsmedium gegeben. Die relative Bindung in Bezug auf die Anzahl der IE an die CD9-exprimierende Zelllinie ohne Antikörper-Inkubation ist in Abbildung 5-3 wiedergegeben. Als Positivkontrolle wurde die Bindung an eine CD36-exprimierende Zelllinie (CHO $\Delta$ 745-CD36-GFP) durch die Zugabe des monoklonalen Antikörpers FA6-152 gegen die Adhäsionsdomäne von CD36 in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml inhibiert (Daviet et al., 1995).



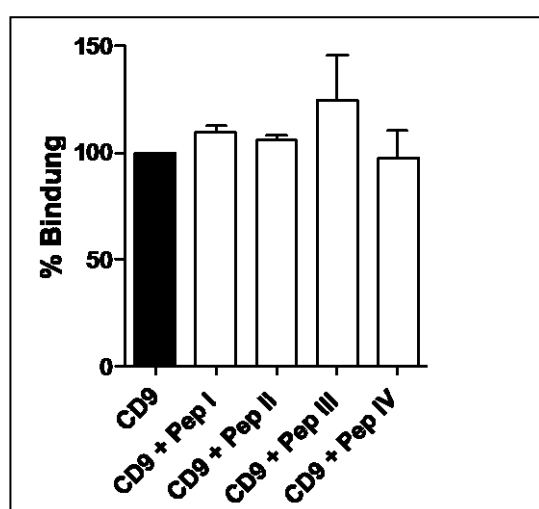
**Abbildung 5-3:**

Relative Zytoadhäsion des Ghana-Feldisolat-Gemisches an CHO $\Delta$ 745-CD9-GFP (CD9), unter Zugabe monoklonaler Antikörper VJ1/10 (CD9+VJ1/10) und VJ1/20 (CD9+VJ1/20). Die Bindung an CHO $\Delta$ 745-CD36-GFP (CD36) konnte durch Zugabe des Antikörpers FA6-152 inhibiert werden (CD36+FA6-152). Alle Antikörper wurden mit 10  $\mu$ g/ml eingesetzt.

In 3 unabhängigen Versuchen wurde die mittlere Zytoadhärenz unter Zugabe von VJ1/10 um 20% im Vergleich zu der Bindung ohne Antikörperzugabe verringert. Die Bindung unter Zugabe des Antikörpers VJ1/20 war um 25% erhöht. Diese Unterschiede waren nicht signifikant. Somit kann durch die Zugabe der zwei verwendeten Antikörper die Bindung der IE an die CD9-exprimierende Zelllinie nicht inhibiert werden.



Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Spezifität der Zytoadhärenz war die Inhibition der Bindung durch Peptide. Es wurden vier Peptide synthetisiert, welche den Sequenzabschnitten der extrazellulären Domänen von CD9 entsprechen. Sie wurden in Konzentrationen von 50-100  $\mu\text{M}$  mit IE inkubiert, um die möglichen Bindungsstellen an CD9 auf den IE zu blockieren. Wird durch Anwesenheit eines der synthetisierten Peptide die Zytoadhärenz verringert, kann dadurch die Bindungsstelle am CD9-Molekül direkt identifiziert werden. Die Abbildung 5-4 zeigt die prozentuale Zytoadhärenz unter Zugabe der 4 Peptide im Vergleich zur ungehinderten Bindung von IE an CHO $\Delta$ 745-CD9.



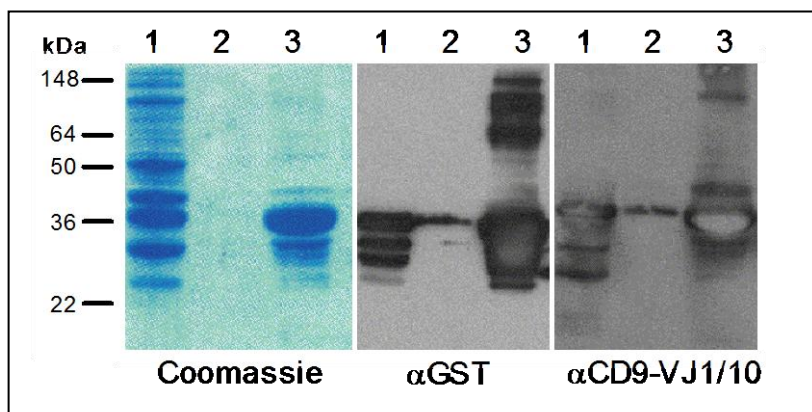
**Abbildung 5-4:**

Relative Zytoadhärenz des Ghana-Feldisolat-Gemisches an CHO $\Delta$ 745-CD9-GFP (CD9) und unter Zugabe der Peptide I-IV. CD9+PepI, 100  $\mu\text{M}$ ; CD9+PepII, 100  $\mu\text{M}$ ; CD9+PepIII, 50  $\mu\text{M}$ ; CD9+PepIV, 80  $\mu\text{M}$ .

Durch Zugabe der Peptide konnte in 3 unabhängigen Versuchen keine signifikante Verringerung der Bindung beobachtet werden. In allen 4 Ansätzen war die Höhe der Bindung im Bereich der Bindung ohne Peptide.

Der dritte Ansatz, um die Spezifität der Adhärenz der IE an CD9-exprimierende Zellen zu untersuchen, verfolgte die Inhibition der Bindung mittels Blockierung der Bindungsstelle durch die rekombinant exprimierte große extrazelluläre Domäne von CD9 („large extracellular domain“: LEL). Im prokaryotischen Expressionssystem von *E.coli* wurde die große extrazelluläre Domäne von Aminosäure 112 bis 192 als GST-Fusionsprotein (GST-CD9-LEL) exprimiert und aus dem Zellhomogenat mit GST-Sepharose isoliert (Abbildung 5-5, Coomassie). Mit Hilfe von zwei Antikörpern, welche gegen Epitope im GST bzw. der großen extrazellulären Domäne von CD9 gerichtet waren, konnte das Fusionsprotein im Immunoblot identifiziert werden (Abbildung 5-5,  $\alpha\text{GST}$  und  $\alpha\text{CD9-VJ1/10}$ ). Das theoretische Molekulargewicht des Fusionsproteins beträgt 38 kDa, zusammengesetzt aus den Molekulargewichten des GST (29 kDa) und der großen extrazellulären Domäne von

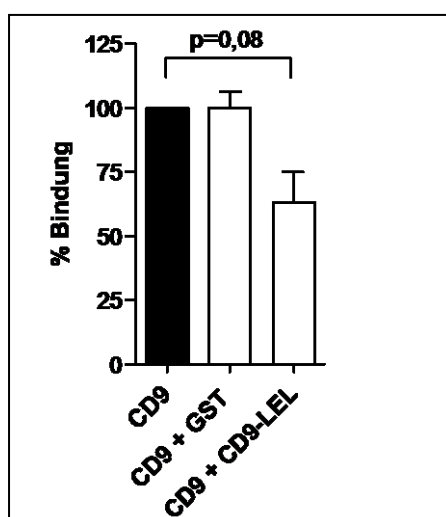
CD9 (9 kDa). Auf dieser Höhe ist sowohl im Coomassie-Gel als auch auf den Immunoblots eine dominierende Proteinbande zu erkennen. GST wurde ebenfalls rekombinant exprimiert und entsprechend der gleichen Behandlung wie GST-CD9-LEL unterzogen.



**Abbildung 5-5:**

Coomassie-gefärbtes 15%-SDS-Gel mit Zellhomogenat (1), Durchfluss nach Bindung an GST-Sepharose (2) und Eluat (3) der Isolation von GST-CD9-LEL. Immunoblot mit anti-GST Antikörper (Mitte) und einem anti-CD9-Antikörper ( $\alpha$ CD9-VJ1/10, rechts). Jeweils 25  $\mu$ l der Fraktionen pro Bahn

Sowohl das eluierte GST-CD9-LEL als auch GST allein wurde gegen PBS dialysiert. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proteine mit 30  $\mu$ g/ml in die Suspension mit IE gegeben. Nach 30 min wurde die Bindung der IE an CD9-exprimierende Zellen überprüft. Die Höhe der Bindung dieses Inhibitionsversuchs ist in Abbildung 5-6 relativ zur Zytoadhärenz ohne zusätzliche Proteine im Bindungsmedium dargestellt.



**Abbildung 5-6:**

Relative Zytoadhärenz des Ghana-Feldisolat-Gemisches an CHO $\Delta$ 745-CD9-GFP (CD9) und unter Zugabe der Proteine GST (+GST) und GST-CD9-LEL (+CD9-LEL) mit einer Konzentration von 30  $\mu$ g/ml.

Es ist zu erkennen, dass die Anwesenheit des gereinigten GST die Bindung der IE an die CD9-exprimierenden Zellen nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu wurde die Zytoadhärenz in Anwesenheit der rekombinant exprimierten GST-CD9-LEL im Mittel um 37% vermindert. Der Unterschied zur ungehinderten Bindung war statistisch nicht signifikant (Mann Whitney Test,  $p=0,08$ ), kann jedoch als Trend betrachtet werden. Die Tendenz könnte durch

Wiederholung des Experiments mit unterschiedlichen Konzentrationen der rekombinanten Proteine bestätigt werden, um einen möglichen dosisabhängigen Effekt zu beschreiben.

Aus den gezeigten Versuchen lässt sich folgern, dass CD9 die Bindung von *P. falciparum* IE in vivo vermitteln könnte. Ein eindeutiger Nachweis der spezifischen Interaktion von CD9 mit IE mit Hilfe von blockierenden Antikörpern bzw. Peptiden konnte nicht erbracht werden. Dennoch ist durch die Verminderung der Bindung der IE an CHO $\Delta$ 745-CD9-GFP in Anwesenheit der rekombinanten großen extrazellulären Domäne von CD9 ein Hinweis auf die Wechselwirkung zwischen CD9 und infizierten Erythrozyten gegeben.

## 5.2.2 Genetische Varianten von CD9

Die Ergebnisse der Re-Sequenzierung des Promotor-Bereichs, der kodierenden Bereiche, der Intron-Exon-Übergänge, sowie der 3'-UTR des CD9-Gens von 46 Individuen aus der Studiengruppe sind in Tabelle 5-5 dargestellt. Unter 17 identifizierten Varianten waren 5 in der Promotor-Region des Gens und 2 in exonischen Bereichen lokalisiert.

**Tabelle 5-5: Varianten und Allelfrequenzen von CD9**

Region	Position	rs-Nummer	N-Austausch	AS-Austausch	AF Fallgruppe	AF Kontrollgruppe
<b>Promotor</b>	<b>-940</b>		<b>A/C</b>		<b>0,15</b>	<b>0,07</b>
	-893		A/G		0	0,02
	-273		G/T		0,02	0
	-244		G/C		0	0,13
	-132		C/G		0	0,02
<b>Exon 1</b>	<b>-68</b>	<b>rs11539945</b>	<b>C/T</b>		<b>0,39</b>	<b>0,46</b>
Intron 1	132	rs11574684	G/A		0,04	0
	<b>229</b>	<b>rs797774</b>	<b>G/A</b>		<b>0,07</b>	<b>0,17</b>
Intron 2	34722	rs3181292	C/T		0,02	0,02
<b>Exon 3</b>	<b>32158</b>		<b>C/T</b>		<b>0,04</b>	<b>0,06</b>
Intron 4	34722	rs11568265	C/G		0,02	0
Intron 5	34836	rs11568266	G/A		0,04	0
	<b>34935</b>	<b>rs2072372</b>	<b>A/C</b>		<b>0,20</b>	<b>0,41</b>
Intron 6	35160	rs11568267	G/A		0,02	0
<b>Intron 7</b>	<b>35161</b>	<b>rs3181298</b>	<b>C/A</b>		<b>0,04</b>	<b>0,07</b>
	<b>37202</b>	<b>rs11568274</b>	<b>C/T</b>		<b>0,04</b>	<b>0,15</b>
	<b>37223</b>	<b>rs11568275</b>	<b>G/C</b>		<b>0,17</b>	<b>0,15</b>

N: Nukleotid; AF: Allelfrequenz des seltenen Allels, AS: Aminosäure; Position: Lokalisation der Variante relativ zum Transkriptionsstart; rs-Nummer: NCBI Nummer von annotierten Varianten; Hervorgehobene Varianten wurden in der Gesamtgruppe genotypisiert

### 5.2.3 Assoziationsstudien der Varianten von *CD9*

Aus insgesamt 17 identifizierten Punktmutationen wurden 8 Polymorphismen in der Gesamtgruppe genotypisiert. Die statistische Auswertung der Varianten mit multivariater logistischer Regression unter Annahme des additiven Modells zeigte keine signifikante Assoziation mit dem Auftreten einer schweren Malaria. In der Tabelle 5-6 sind die Häufigkeiten der Genotypen und die Resultate der Analysen zusammengestellt.

**Tabelle 5-6: Relative Genotypen-Häufigkeiten und Assoziationstest der Varianten von *CD9***

Locus	Genotyp	Häufigkeit	Häufigkeit	OR (95% KI)	p-Wert
		Fallgruppe (%) n=2400	Kontrollgruppe (%) n=1900		
<b>Promotor -940</b>	AA	78,1	77,8	1	
	AC	20,1	21,3	0,94 (0,81-1,09)	0,398
	CC	1,8	0,9	<b>1,95 (1,10-3,45)</b>	<b>0,022</b>
<b>rs11539945</b>	CC	36,6	38,4	1	
	CT	47,8	46,3	1,10 (0,92-1,30)	0,298
	TT	15,6	15,3	1,06 (0,84-1,35)	0,615
<b>rs797774</b>	GG	73,1	72,9	1	
	AG	24,5	25,0	0,99 (0,86-1,14)	0,895
	AA	2,4	2,1	1,16 (0,77-1,76)	0,485
<b>Exon 3 Pos. 32158</b>	CC	94,9	94,5	1	
	CT	5,1	5,5	0,86 (0,56-1,31)	0,475
<b>rs2072372</b>	AA	62,8	63,2	1	
	AC	32,3	33,2	0,97 (0,85-1,10)	0,629
	CC	4,9	3,6	<b>1,38 (1,01-1,88)</b>	<b>0,041</b>
<b>rs3181298</b>	CC	86,2	88,9	1	
	AC	13,2	10,6	<b>1,31 (1,09-1,58)</b>	<b>0,005</b>
	AA	0,6	0,5	1,31 (0,59-2,91)	0,515
<b>rs11568274</b>	CC	89,3	88,0	1	
	CT	10,5	11,5	0,83 (0,61-1,12)	0,199
	TT	0,2	0,5	0,41 (0,07-2,35)	0,312
<b>rs11568275</b>	GG	73,1	74,3	1	
	GC	24,7	23,5	1,06 (0,92-1,22)	0,420
	CC	2,2	2,2	1,00 (0,67-1,52)	0,986

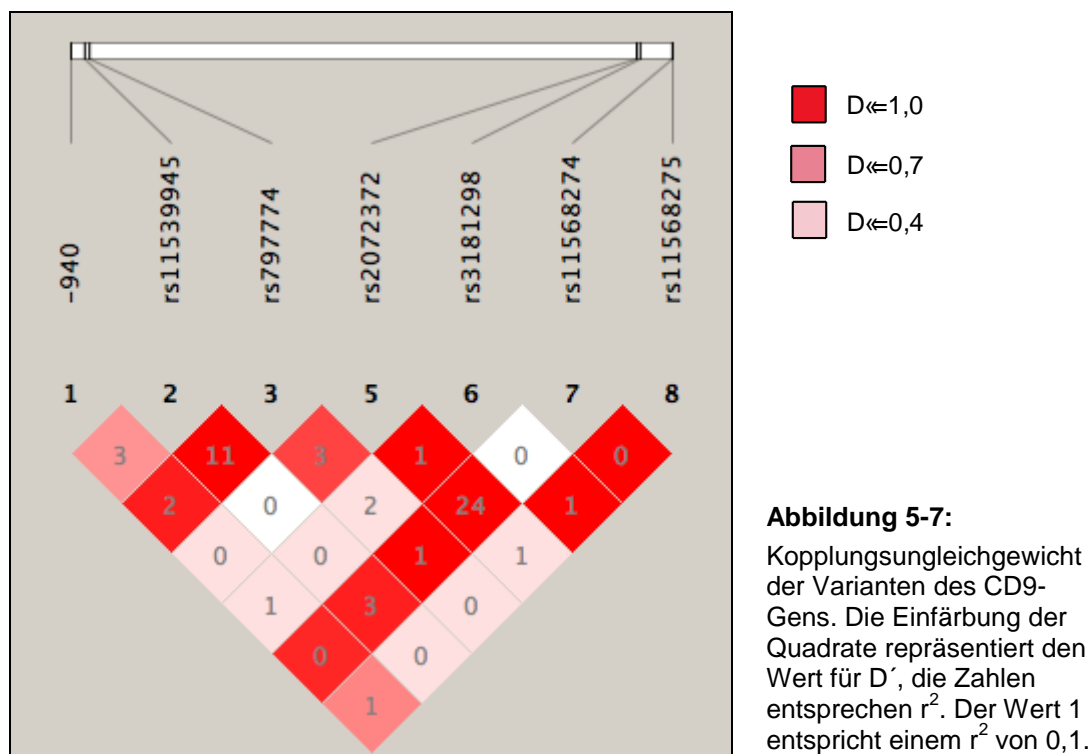
Odds Ratios (OR) und p-Werte der logistischen Regression hinsichtlich Alter, Geschlecht und Ethnizität adjustiert, KI: Konfidenzintervall

Zusätzlich zum additiven Modell wurden der rezessive und der dominante Erbgang als genetische Modelle für die Berechnung zugrunde gelegt (Daten nicht gezeigt). Die hervorgehobenen ORs und entsprechende p-Werte zeigen 3 signifikante Unterschiede in der

Genotypverteilung mit einem Signifikanzniveau von unter 0,05. Weil insgesamt 8 Varianten und 3 genetische Modelle auf Assoziation getestet wurden, muss das Signifikanzniveau für einzelne Varianten auf 0,002 angehoben werden, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Somit können die hier festgestellten signifikanten Unterschiede nicht als Assoziationen betrachtet werden, da sie nach der Korrektur nicht mehr unter dem erforderlichen Signifikanzniveau liegen. Durch Stratifizierung der Malaria-Fälle in schwere Anämie und zerebrale Malaria und schwere Malaria mit anderen Komplikationen konnte ebenfalls keine Assoziation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

### 5.2.4 Kopplungsungleichgewicht der Varianten von CD9

Um das Kopplungsungleichgewicht zu ermitteln, wurde die Korrelation der genotypisierten Polymorphismen festgestellt und graphisch dargestellt (Abbildung 5-7). Der Polymorphismus an Position 32158 mit einer Allelfrequenz von 2,5% wurde für diese und die anschließende Haplotyp-Analyse ausgeschlossen.



## 5.2.5 Rekonstruktion der Haplotypen

Neben der Analyse der Varianten im Einzelnen wurden aus den 7 genotypisierten Varianten Haplotypen rekonstruiert. Mit Hilfe des Programms Haploview wurden rekonstruierte Haplotypen auf ihre Assoziation mit dem Auftreten einer schweren Malaria getestet. Die Haplotypen und ihre relativen Häufigkeiten in Fall- und Kontrollgruppe sind in Tabelle 5-7 zusammengefasst. Traten Haplotypen mit Häufigkeiten unter 5% auf, wurden sie bei der Analyse nicht berücksichtigt. Als Test auf Assoziation wurde der  $\chi^2$ -Test durchgeführt. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Häufigkeiten ermittelter Haplotypen zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

**Tabelle 5-7: Rekonstruierte Haplotypen aus sieben Varianten von CD9**

	Haplotyp	Häufigkeit Fallgruppe (%) n=2400	Häufigkeit Kontrollgruppe (%) n=1900	$\chi^2$	p-Wert
1	ATGACCG	25,1	25,8	0,455	0,500
2	ACGACCG	18,8	18,3	1,785	0,182
3	ACAACCG	10,4	11,2	1,408	0,235
4	CCGACCG	6,5	6,3	0,105	0,746
5	ACGCCTG	5,6	5,7	0,063	0,802
6	ACGACCC	5,1	5,1	0,0	0,989

Haplotypen mit >5% Auftreten in der Gesamtgruppe mit  $\chi^2$ -Test und p-Wert

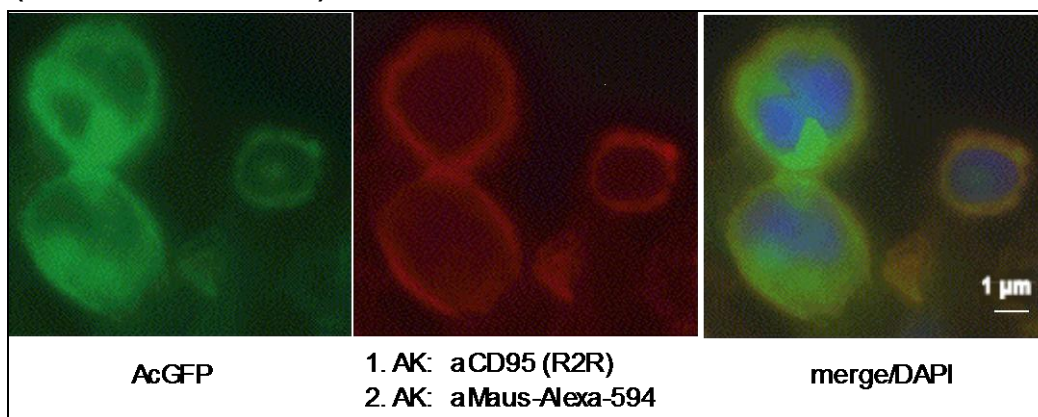
## 5.3 CD95

### 5.3.1 Charakterisierung einer Zelllinie, die CD95 exprimiert

Durch Transfektion von CHO $\Delta$ 745-Zellen wurde eine Zelllinie hergestellt, die CD95 stabil auf der Oberfläche exprimiert (CHO $\Delta$ 745-CD95-AcGFP). Die Aufnahmen der fluoreszierenden Zellen zeigen, dass die Lokalisation des Fusionsproteins CD95-AcGFP auf der Zelloberfläche zunächst nicht eindeutig ist. (Abbildung 5-8, AcGFP). Durch den Nachweis mit einem monoklonalem Antikörper gegen CD95 (R2R) in der Immunfluoreszenzfärbung konnte gezeigt werden, dass das CD95-Molekül auf der Zelloberfläche exponiert ist. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 20  $\mu$ g/ml auf fixierten, nicht-permeabilisierten CHO $\Delta$ 745-CD95-AcGFP-Zellen eingesetzt. Die Fluoreszenz im roten Emissionsbereich des sekundären Antikörpers  $\alpha$ Maus IgG1 Alexa Fluor 594 ist auf die Peripherie der Zellen beschränkt. Das

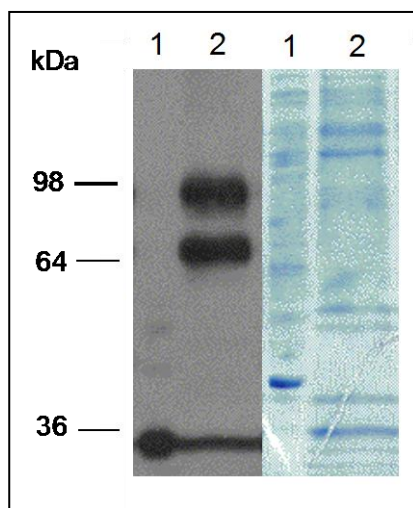
bedeutet, dass der monoklonale Antikörper lediglich CD95-Moleküle markiert, die auf der Zelloberfläche exponiert sind. Die Überlagerung der zwei Bilder (rechts) beweist eine Ko-Lokalisation der zwei Farben an der Oberfläche der Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass transfizierte Zellen in der Lage sind, das AcGFP-Konstrukt von CD95 zu synthetisieren, zu prozessieren und an die Zelloberfläche zu exportieren.

**Abbildung 5-8: Fluoreszenz-Aufnahmen der CD95-exprimierenden Zelllinie (CHO $\Delta$ 745-CD95-AcGFP).**



Links: AcGFP; Mitte: anti-CD95-R2R/Alexa Fluor 594; Rechts: Überlagerung der Bilder mit DAPI-Färbung (merge/DAPI)

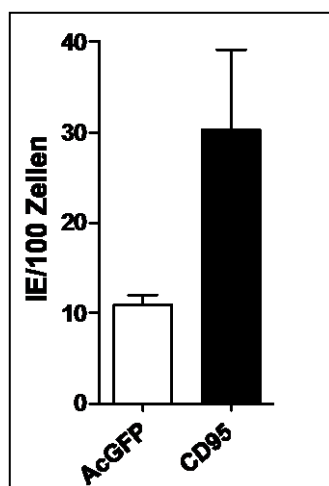
Um zu prüfen, ob das Fusionsprotein CD95-AcGFP vollständig synthetisiert wird, wurde ein Immunoblot mit dem Zellhomogenat der hergestellten Zelllinie (CHO $\Delta$ 745-CD95-AcGFP) durchgeführt. Dafür wurde ein primärer Antikörper verwendet, der AcGFP markiert. Wie in Abbildung 5-9 zu sehen, konnte eine Bande sichtbar gemacht werden, die dem erwarteten Molekulargewicht von 72 kDa für das Fusionsprodukt entspricht (CD95: 45 kDa, AcGFP: 27 kDa). Neben dieser Bande tritt noch eine weitere bei ca. 27 kDa auf, welche das Molekulargewicht von AcGFP allein repräsentiert. Das Zellhomogenat der Zelllinie, die AcGFP zytosolisch exprimiert, zeigt auf dieser Höhe ebenfalls eine Bande. Zusätzlich ist in Bahn 2 noch eine weitere Bande bei ca. 90 kDa zu erkennen. Da CD95 ein glykosyliertes Transmembranmolekül ist, könnten die zwei Banden dem Molekulargewicht unterschiedlicher Stadien des prozessierten Rezeptors entsprechen.

**Abbildung 5-9:**

Immunoblot (links) und Coomassie-Gel (rechts) mit Zellhomogenaten von CHO $\Delta$ 745-AcGFP (1) und CHO $\Delta$ 745-CD95-AcGFP (2). Als primärer Antikörper wurde  $\alpha$ AcGFP JL-8 (1:4000) verwendet.

### 5.3.2 Bindung von IE an CD95

Die Bindungseigenschaft des CD95 Rezeptors wurde in drei Zytoadhärenz-Tests überprüft. Die infizierten Erythrozyten des Ghana-Feldisolat-Gemisches waren fähig, an CD95 exprimierende Zellen zu binden (Abbildung 5-10). Die durchschnittliche Bindung betrug  $30 \pm 9$  IE pro 100 Zellen der Zelllinie CHO $\Delta$ 745-CD95-AcGFP im Vergleich zu  $10 \pm 1$  IE 100 Zellen von CHO $\Delta$ 745-AcGFP. Die Zytoadhärenz ist erhöht, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (Wilcoxon Rank Test  $p=0,25$ ).

**Abbildung 5-10:**

Zytoadhäsion von infizierten Erythrozyten (IE) des Ghana-Feldisolat-Gemisches an CHO $\Delta$ 745-CD95-GFP (CD95) und CHO $\Delta$ 745-AcGFP (AcGFP).



### 5.3.3 Genetische Varianten von *CD95*

Durch die Re-Sequenzierung der Promotor-Region, der kodierenden Bereiche, der Intron-Exon-Übergänge sowie der 3'-UTR genomischer DNA von 46 Individuen wurden folgende Punktmutationen detektiert (Tabelle 5-8).

**Tabelle 5-8: Varianten und Allelfrequenzen von *CD95***

Region	Position	rs-Nummer	N-Austausch	AS-Austausch	AF Fallgruppe	AF Kontrollgruppe
<b>Promotor</b>	<b>-671</b>	<b>rs1800682</b>	<b>A/G</b>		<b>0,21</b>	<b>0,21</b>
	<b>-436</b>	<b>rs9658676</b>	<b>C/A</b>		<b>0,04</b>	<b>0,20</b>
	-99	rs12251390	G/A		0,02	0,02
	-95	rs2274355	G/A		0,19	0,21
	-56	rs9658678	C/-		0,04	0,04
	-34	rs5030766	A/G		0,15	0,11
<b>Exon 2</b>	<b>12167</b>	<b>rs3218619</b>	<b>G/A</b>	<b>A16T</b>	<b>0,08</b>	<b>0,15</b>
	<b>12262</b>	<b>rs3218621</b>	<b>G/A</b>		<b>0,06</b>	<b>0,21</b>
Intron 3	16761	rs2031611	G/C		0,27	0,13
<b>Exon 4</b>	<b>18042</b>	<b>rs3218614</b>	<b>C/T</b>	<b>T122I</b>	<b>0,02</b>	<b>0,06</b>
Intron 6	19806	rs2296600	C/G		0,31	0,27
Exon 6	19920	rs28362322	A/G		0,02	0
Exon 7	21195	rs2234978	C/T		0,31	0,23
3'-UTR	23715	rs9658774	A/G		0,10	0,19
	24551		C/T		0,02	0,02
	24657		C/T		0,27	0,27

N: Nukleotid; AF: Allelfrequenz des seltenen Allels, AS: Aminosäure; Position: Lokalisation der Variante relativ zum Transkriptionsstart; rs-Nummer: NCBI Nummer von annotierten Varianten; Hervorgehobene Varianten wurden in der Gesamtgruppe genotypisiert

In der genomischen Sequenz der 46 Individuen wurden insgesamt 16 Varianten identifiziert. 6 Varianten sind im Promotor-Bereich lokalisiert, 4 in exonischen Bereichen, von denen zwei Polymorphismen einen nicht-synonymen Aminosäure-Austausch nach sich ziehen. Die restlichen 5 Varianten befinden sich in intronischen Bereichen oder in der 3'-UTR von *CD95*.

### 5.3.4 Assoziationsstudien der Varianten von *CD95*

Insgesamt wurden fünf Varianten auf Assoziation mit einer erhöhten bzw. reduzierten Empfänglichkeit für schwere Malaria in der Gesamtgruppe überprüft. Die Häufigkeiten der Genotypen sowie die Ergebnisse der logistischen Regression unter Annahme des additiven Modells sind in Tabelle 5-9 aufgeführt.

**Tabelle 5-9: Relative Genotyp-Häufigkeiten und Assoziationstest der Varianten von CD95**

Locus	Genotyp	Häufigkeit	Häufigkeit	OR (95% KI)	p-Wert
		Fallgruppe (%) n=2400	Kontrollgruppe (%) n=1900		
rs1800682	GG	61,8	60,7	1	
	AG	33,4	34,3	0,96 (0,83-1,11)	0,525
	AA	4,8	5,0	0,93 (0,68-1,27)	0,621
rs9658676	CC	82,7	77,7	1	
	AC	16,4	20,6	<b>0,75 (0,64-0,88)</b>	<b>9,0 x10<sup>-5</sup></b>
	AA	0,9	1,7	<b>0,48 (0,28-0,83)</b>	<b>0,009</b>
rs3218619	GG	71,8	72,4	1	
	AG	26,5	25,3	1,07 (0,90-1,23)	0,369
	AA	1,7	2,3	0,72 (0,39-1,04)	0,130
rs3218621	GG	79,0	77,7	1	
	AG	19,7	21,1	0,92 (0,79-1,06)	0,240
	AA	1,3	1,2	1,07 (0,62-1,81)	0,799
rs3218614	CC	90,4	88,9	1	
	CT	9,2	11,0	<b>0,79 (0,65-0,97)</b>	<b>0,025</b>
	TT	0,4	0,1	<b>10,08 (1,28-79,5)</b>	<b>0,028</b>

Odds Ratios (OR) und p-Werte der logistischen Regression hinsichtlich Alter, Geschlecht und Ethnizität adjustiert, KI: Konfidenzintervall

Das Auftreten eines Adenosins anstelle eines Cytosins an der Position -436 im Promotor von CD95 (rs9658676) wurde als Variante identifiziert, die signifikant häufiger bei Kontrollen als bei Fällen gefunden wurde. Die detaillierte Analyse der Genotypenverteilung dieser Variante in den Untergruppen der Kinder mit schwerer Anämie und zerebraler Malaria, sowie der Kinder mit schwerer Malaria und anderen Komplikationen ist im Folgenden tabellarisch dargestellt (Tabelle 5-10). In der jeweils letzten Zeile ist das Ergebnis unter Annahme des dominanten genetischen Erbgangs gezeigt.

**Tabelle 5-10: Genotyp-Häufigkeiten und Assoziation von rs9658676 in klinischen Subgruppen**

Genotyp	Schwere Malaria			p-Wert
	Fälle (%) n=2400	Kontrollen (%) n=1900	OR (95% KI)	
CC	82,7	77,7	1	
AC	16,4	20,6	<b>0,75 (0,64-0,88)</b>	<b>0,00009</b>
AA	0,9	1,7	<b>0,48 (0,28-0,83)</b>	<b>0,009</b>
AC+AA	17,3	22,3	<b>0,73 (0,63-0,86)</b>	<b>0,0002</b>

**Fortsetzung Tabelle 5-10: Genotyp-Häufigkeiten und Assoziation von rs9658676 in klinischen Subgruppen**

<b>Schwere Anämie</b>				
<b>Genotyp</b>	<b>Fälle (%) n=1525</b>	<b>Kontrollen (%) n=1694</b>	<b>OR (95% KI)</b>	<b>p-Wert</b>
CC	82,8	77,5	1	
AC	16,3	20,8	<b>0,76 (0,63-0,92)</b>	<b>0,004</b>
AA	0,9	1,7	<b>0,47 (0,24-0,93)</b>	<b>0,029</b>
AC+AA	17,2	22,5	<b>0,73 (0,61-0,88)</b>	<b>0,001</b>
<b>Zerebrale Malaria</b>				
<b>Genotyp</b>	<b>Fälle (%) n=536</b>	<b>Kontrollen (%) n=555</b>	<b>OR (95% KI)</b>	<b>p-Wert</b>
CC	83,2	80,5	1	
AC	15,7	17,7	<b>0,73 (0,56-0,95)</b>	<b>0,020</b>
AA	1,1	1,8	0,57 (0,24-1,38)	0,214
AC+AA	16,8	19,5	<b>0,72 (0,56-0,93)</b>	<b>0,011</b>
<b>Andere</b>				
<b>Genotyp</b>	<b>Fälle (%) n=481</b>	<b>Kontrollen (%) n=464</b>	<b>OR (95% KI)</b>	<b>p-Wert</b>
CC	81,9	74,4	1	
AC	17,5	23,7	<b>0,67 (0,49-0,92)</b>	<b>0,013</b>
AA	0,6	1,9	0,29 (0,08-1,09)	0,066
AC+AA	18,1	25,7	<b>0,64 (0,47-0,87)</b>	<b>0,005</b>

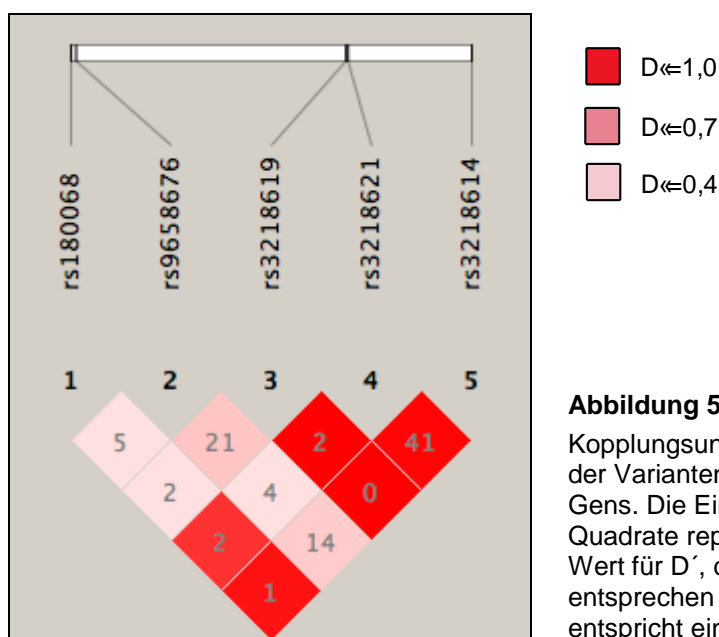
Odds Ratios (OR) und p-Werte der logistischen Regression hinsichtlich Alter, Geschlecht und Ethnizität adjustiert; Subgruppen: Schwere Anämie, Zerebrale Malaria und schwere Malaria mit anderen Komplikationen (Andere).

Die ORs in den Untergruppen der Patienten unterscheiden sich nicht wesentlich von denen, die für die Gesamtgruppe berechnet wurden. Die Unterschiede in der Genotypverteilung sind für Fälle mit Zerebraler Malaria nicht signifikant, was jedoch an der Anzahl der untersuchten Individuen liegen könnte, denn die ORs von 0,60-0,86 sind vergleichbar mit den ORs der Gesamtgruppe. Die Stratifizierung in Subgruppen macht deutlich, dass sich der Schutz mit dem Auftreten des A-Allels an der Stelle -436 vor dem Transkriptionsstart auf das Auftreten einer schweren Malaria im Allgemeinen bezieht und nicht auf eine der Ausprägungen der Erkrankung. Die Annahme des dominanten genetischen Modells bringt keine wesentliche Veränderung der ORs und p-Werte mit sich. Daraus lässt sich schließen, dass hier ein additiver Effekt vorliegen könnte. Unter der Annahme eines additiven Modells würde man durch das homozygote Auftreten des Adenosins in Bezug auf das heterozygote Auftreten

eine Verdopplung des Effekts erwarten. So würde man bei einer OR von 0,75 für den AC-Genotyp in der Gesamtgruppe eine OR von 0,38 für den AA-Genotyp erwarten. Diese Annahme wird in diesem Fall nicht exakt erfüllt ( $OR=0,48$ ). Möglicherweise kommt die homozygote Form mit insgesamt 1,25 % zu selten vor, um diesen Effekt entsprechend der Theorie feststellen zu können.

### 5.3.5 Kopplungsungleichgewicht der Varianten von *CD95*

Um den Effekt der Kombination einzelner Varianten auf das Auftreten einer schweren Malaria zu analysieren, wurden rekonstruierte Haplotypen auf Assoziation mit der Krankheit geprüft. Zunächst wurde das Kopplungsungleichgewicht der genotypisierten Marker erstellt, und die Korrelation der Varianten wurde graphisch dargestellt (Abbildung 5-11). Für die Analyse wurden Varianten ausgeschlossen, die mit einer Allelfrequenz von unter 5% auftraten. Die Intensität der Rotfärbung der Quadrate repräsentiert die Höhe der Korrelation, in der die dunkleren Quadrate einem  $D'$  von 1,0 entsprechen. Die Zahlen in den Quadraten entsprechen dem Wert von  $r^2$ .



**Abbildung 5-11:**

Kopplungsungleichgewicht der Varianten des CD95-Gens. Die Einfärbung der Quadrate repräsentiert den Wert für  $D'$ , die Zahlen entsprechen  $r^2$ . Der Wert 1 entspricht einem  $r^2$  von 0,1.

Aus der Darstellung wird deutlich, dass die assoziierte Variante rs9658676 schwach mit den anderen genotypisierten Varianten korreliert. Der höchste  $r^2$ -Wert ist 0,21,  $D'$  nimmt höchstens den Wert 0,558 (rs9658676 und rs3118619) an.

### 5.3.6 Rekonstruktion der Haplotypen

Unter der Verwendung des Programms Haploview rekonstruierte Haplotypen sind in Tabelle 5-11 wiedergegeben.

**Tabelle 5-11: Rekonstruierte Haplotypen der genotypisierten Varianten von *CD95***

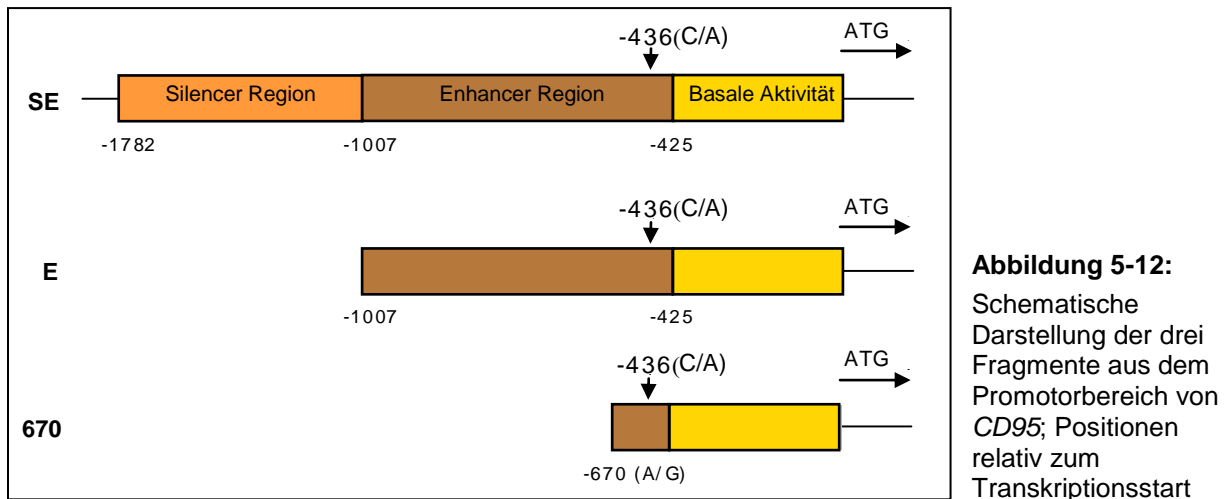
	Haplotyp	Häufigkeit	Häufigkeit	$\chi^2$	p-Wert
		Fallgruppe (%) n=2400	Kontrollgruppe (%) n=1900		
1	GCGGC	57,7	56,6	0,945	0,331
2	ACGGC	16,0	15,7	0,157	0,692
3	GCAGC	8,0	6,9	2,992	0,084
4	GCGAC	6,2	6,1	0,022	0,883
<b>5</b>	<b>AAAGC</b>	<b>4,7</b>	<b>6,1</b>	<b>6,713</b>	<b>0,010</b>

Haplotypen mit >5% Auftreten in der Gesamtgruppe mit  $\chi^2$ -Test und p-Wert

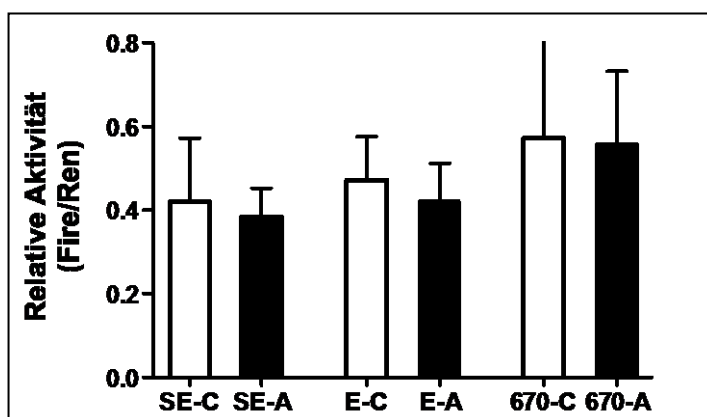
Mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests wurden die Häufigkeiten der rekonstruierten Haplotypen in Fall- und Kontrollgruppe miteinander verglichen. Lediglich der Haplotyp 5 (AAAGC) zeigt eine Assoziation mit dem Schutz vor schwerer Malaria ( $p=0,01$ ). Durch die Haplotyp-Analyse konnte keine Erniedrigung des p-Werts beobachtet werden. Die Darstellung der Korrelation der genotypisierten Varianten zeigt, dass die assoziierte Variante (rs9658676) mit einem  $r^2$  von höchstens 0,21 mit anderen Polymorphismen korreliert. Diese Resultate liefern Anhaltspunkte dafür, dass die Variante allein mit der Manifestation der Erkrankung assoziiert ist. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass in dieser Arbeit nicht charakterisierte Marker, die mit dem Polymorphismus rs9658676 korrelieren, eine stärkere Assoziation mit diesem Phänotyp aufweisen.

### 5.3.7 Funktionelle Analyse von *CD95* –436C>A

Um den Einfluss der Promotorvariante an der Position –436 auf die Regulation der Expression von *CD95* zu untersuchen, wurden Reporter-gen-Versuche durchgeführt. Dafür wurden 3 Fragmente mit unterschiedlicher Länge des 5'-Endes von *CD95* in einen Expressionsvektor vor das Luciferase-Gen gesetzt. Anschließend wurde der Basenaustausch des Cytosins durch Adenin mit ziel-gerichteter Mutagenese eingeführt. In der Abbildung 5-12 sind die Fragmente schematisch dargestellt.



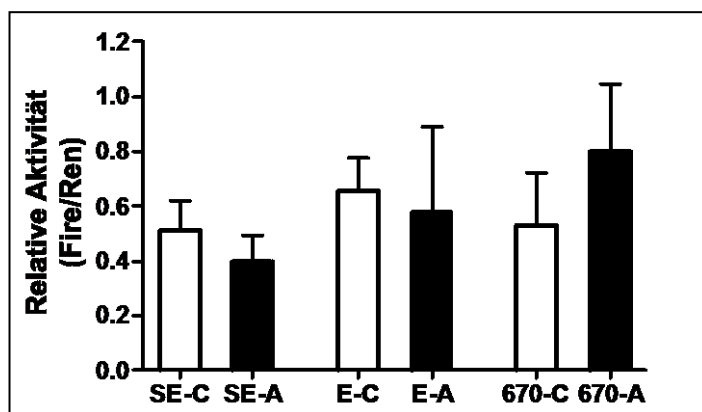
Das Fragment SE besteht aus 1782 Basenpaaren (bp) und beinhaltet die sogenannten Silencer und Enhancer Regionen, sowie die Region, die eine basale Promotoraktivität besitzt (Rudert et al., 1995). Das Fragment E besteht aus der Enhancer- und der Basalaktivitäts-Region. Das Fragment 670 beginnt an Position  $-669$ , da sich an  $-670$  ein bekannter Polymorphismus befindet, der die Promotoraktivität beeinflusst (Kanemitsu et al., 2002). Die Promotoraktivitäten der drei Konstrukte wurden durch die Aktivität der Firefly-Luciferase in den Zelllysaten transfizierter Jurkat-Zellen ermittelt und als relative Aktivität in Bezug auf die Aktivität der Renilla-Luciferase dargestellt (Abbildung 5-13).



**Abbildung 5-13:** Relative Aktivität der Firefly Luciferase (Fire) bezogen auf die Aktivität der Renilla Luciferase (Ren) aus 3 Versuchen mit einem Cytosin bzw. Adenosin an der Position  $-436$  der drei Konstrukte (SE-C/A, E-C/A und 670-C/A)

Aus der Abbildung wird deutlich, dass sich die Promotoraktivitäten der zwei Varianten nicht signifikant unterscheiden. Bei keinem der drei Konstrukte konnte eine Erhöhung bzw. eine Verringerung der Promotoraktivität durch die Variante festgestellt werden.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde überprüft, ob die Promotor-Varianten die Aktivität des Promotors unter Stimulation der Zellen beeinflussen. Dazu wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion für 5 h mit den stimulatorischen Molekülen PMA/Ionomycin inkubiert. Es ist zu erkennen, dass die Promotoraktivität durch die Stimulation bei allen Konstrukten leicht erhöht ist (Abbildung 5-14).



**Abbildung 5-14:** Relative Aktivität der Firefly Luciferase (Fire) bezogen auf die Aktivität der Renilla Luciferase (Ren) nach Stimulation mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (750 ng/ml) aus 3 Versuchen mit einem Cytosin bzw. Adenosin an der Position –436 der drei Konstrukte (SE-C/A, E-C/A und 670-C/A)

Es ist ein leichter Anstieg der Aktivität vom längeren Konstrukt SE bis zum kürzeren Konstrukt 670 zu beobachten. Nur das Promotor-Fragmenten SE beinhaltet die sogenannte „Silencer-Region“, somit ist zu erwarten, dass das Konstrukt SE die niedrigste Aktivität aufweist. Signifikante Unterschiede in der gemessenen Promotor-Aktivität zwischen Adenosin- bzw. Cytosin-tragenden Konstrukten an Position –436 fanden sich auch nach Stimulation nicht.

### 5.3.8 Einfluss von –436C>A auf die Oberflächenexpression von CD95 auf peripheren mononukleären Zellen

Um den Einfluss der assoziierten Variante an Position -436 im Promotorbereich auf die Expression von CD95 zu bestimmen, wurde die CD95-Oberflächenexpression von Zellfraktionen aus dem peripheren Blut von Individuen aus dem Studiengebiet untersucht. Vor der Analyse mittels FACS wurde der Polymorphismus bei jedem der Probanden genotypisiert.

Die Zellfraktionen wurden gleichzeitig mit FITC-markierten monoklonalen Antikörpern gegen einen Zellpopulationsmarker und mit einem anti-CD95-IgG1-Antikörper inkubiert, der mit Biotin gekoppelt wurde. In einem zweiten Schritt wurde Streptavidin, welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE markiert war, hinzu gegeben. Durch die hochaffine Wechselwirkung von Biotin mit Streptavidin wird CD95 auf der Zelloberfläche spezifisch markiert. Die Höhe der Expression des CD95 auf der Oberfläche dieser Zellen wird durch die Messung der Fluoreszenz-Intensität des PE ermittelt. In der Gesamtzellfraktion der peripheren

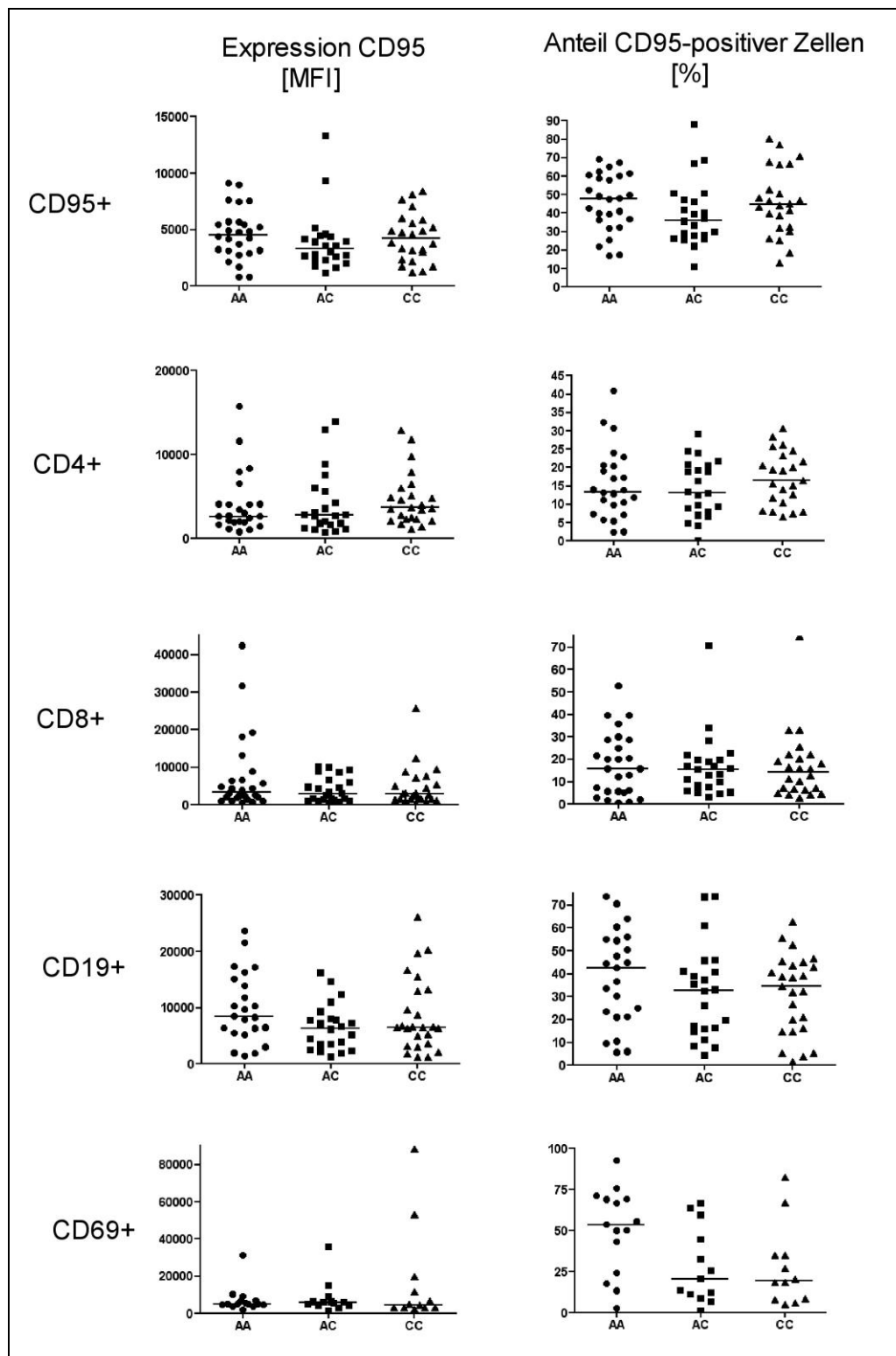
mononukleären Zellen befinden sich Monozyten, Granulozyten, B- und T-Zellen, die im aktivierten oder naiven Zustand vorliegen können. Durch Markierung der Subpopulationen mit Antikörper gegen CD4 (T-Helfer-Zellen), CD8 (zytotoxische T-Zellen) und CD19 (B-Zellen) wurde die Expression von CD95 zusätzlich zur Gesamtzellfraktion auch in diesen Populationen untersucht. Mit einem Antikörper gegen CD69 war es möglich, den Aktivierungszustand der Zellen festzustellen. CD69 ist ein Molekül, welches auf T- und B-Lymphozyten und auf Makrophagen nach Antigen-Stimulation oder mitogener Stimulation als Oberflächenmarker exprimiert wird.

Die mittlere Fluoreszenz-Intensität der gesamten Zellfraktion bzw. der Zellgruppen nach Stratifizierung der Genotypen ist in Abbildung 5-15 (linke Spalte) dargestellt. Zusätzlich wurde der Anteil der CD95-positiven Zellen der peripheren mononukleären Zellen und ihrer Subpopulationen bestimmt und zwischen den 3 Genotypen verglichen (Abbildung 5-15, rechte Spalte). In den Subpopulationen und in der Gesamtpopulation wurden keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der CD95 Expression festgestellt. (Kruskall-Wallis-Test, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ). Der Median der Fluoreszenzintensität der drei Genotyp-Gruppen liegt nahezu in jeder Population auf vergleichbarer Höhe. In der Analyse des prozentualen Anteils der CD95-positiven Zellen waren mit Ausnahme der CD69-positiven Zellen keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Individuen mit dem AA-Genotyp an der Position -436 zeigten einen erhöhten Anteil an CD95-positiven Zellen unter CD69-positiven Zellen (Kruskall-Wallis-Test,  $p = 0,04$ ). Dieser Unterschied steht jedoch nicht im Einklang mit den Ergebnissen der genetischen Analyse, in der ein Schutz gegenüber schwerer Malaria für die Genotypen AA und AC festgestellt wurde. Der Anteil CD95-positiver Zellen der Probanden mit dem AC-Genotyp (Median: 20,5%) liegt im selben Bereich wie der Probanden mit dem CC-Genotyp (Median: 19,7%). Zu erwarten wäre jedoch, dass sich die Gruppe mit dem CC-Genotyp an der Position -436 in der Expression von CD95 von den Genotypen AC und AA unterscheidet.

Abschließend lässt sich sagen, dass keine Unterschiede hinsichtlich der CD95-Expression bei den untersuchten Probanden in den charakterisierten Zellfraktionen festgestellt werden konnte, die eine protektive Auswirkung für Träger des A-Allels in Bezug auf eine schwere Malariainfektion erklären.



Abbildung 5-15: CD95-Expression auf peripheren mononukleären Zellen von 70 Probanden stratifiziert nach  $-436C>A$  Genotypen (AA, AC und CC) und Zell-Subpopulationen CD4-positive (CD4+), CD8-positive (CD8+), CD19-positive (CD19+), CD69-positive (CD69+) und Gesamtzellfraktion (CD95+)



## 6 Diskussion

### 6.1 P-Selektin

#### 6.1.1 Genetische Varianten von *SELP*

In den re-sequenzierten Abschnitten von *SELP* wurden insgesamt 32 Varianten identifiziert. Von diesen wurden 5 Punktmutationen auf Assoziation mit schwerer Malaria überprüft, darunter eine Promotor-Variante, 4 strukturelle Varianten und eine Variante in der 3'-UTR. Mit Ausnahme der Punktmutation rs3917856 in der 3'-UTR wurde kein Einfluss der Varianten auf das Auftreten der schweren Malaria oder die klinischen Manifestationen festgestellt.

Zwei Strukturvarianten von P-Selektin, V640L (rs6133) und T715P (rs6136), sowie zwei Promotor-Polymorphismen -2123C>G und -1969A>G wurden bisher im Zusammenhang mit Krankheiten beschrieben: Der Aminosäureaustausch von Valin zu Lysin an Position 640 erhöht das Risiko einer Atopie in einer irischen Population (Bourgain et al., 2003). Das Auftreten von T715P in Kombination mit Haplotypen aus den zwei Punktmutationen im Promotor hat Auswirkungen auf die Konzentration löslichen P-Selektins im Blut und gilt als prädisponierender Faktor für Erkrankungen der Herzkranzgefäße und Herzinfarkt bei Europäern (Barboux et al., 2001; Herrmann et al., 1998). Während für die Variante rs6133 kein Einfluss auf die Manifestation einer schweren Malaria festgestellt wurde, war die Mutation T715P in der betrachteten Studienkohorte nicht vorhanden.

#### 6.1.2 Assoziation von rs3917856 mit der Manifestation einer schweren Malaria

Die Assoziationsstudien ergaben, dass das Auftreten des A-Allels der Variante rs3917856 in der 3'-UTR von *SELP* einen Schutz vor schwerer Malaria bietet. Es wurde eine OR von 0,61 (95% KI: 0,44-0,85) im Vergleich zum Referenz-Genotyp berechnet ( $p=0,003$ ).

Hinweise darauf, ob die Variante rs3917856 auch bei anderen Krankheiten eine Rolle spielt, gibt es bisher nicht. Das Auftreten des A-Alles an Position 40800 von *SELP* wurde lediglich in zwei afrikanisch-stämmigen Populationen mit Allelfrequenzen von 0,04 bzw. 0,06 beschrieben (dbSNP Datenbank). Das Fehlen dieses Polymorphismus in Gebieten, in denen die Malaria nicht endemisch ist, könnte auf eine natürliche Selektion hinsichtlich der

Ausbreitung der Malaria hindeuten.

Die Assoziation ist für schwere Anämie und zerebrale Malaria nicht signifikant, mit ORs von 0,43 bzw. 0,68 ist jedoch die gleiche Verteilung wie in der Gesamtgruppe zu sehen. Möglicherweise wird die Signifikanz in diesem Fall nicht erreicht, da das Auftreten des A-Allels mit einer Allelfrequenz von 0,04 relativ selten ist. In Fall-Kontroll-Studien ist die statistische Power, um einen krankheits-assoziierten Locus zu detektieren, u.a. von der Häufigkeit des untersuchten Allels abhängig. Bei einer seltenen Erkrankung wie der schweren Malaria mit einer Prävalenz von 1% und einem Allel mit einer Häufigkeit von 4%, benötigt man eine Studiengruppe aus mindestens 3000 Fällen und 3000 Kontrollen, um eine statistische Power von 81% zu erreichen. Das korrigierte Signifikanzniveau von 0,003 wird somit lediglich in der Gesamtgruppe erreicht, wo die Anzahl der Studienteilnehmer mit 4300 und die statistische Power mit 61% am höchsten sind.

Um weitere Hinweise zu erlangen, welche Rolle der Nukleotidaustausch an der Position 40800 im Gen von P-Selektin spielt, sollte das Resultat durch weitere Methoden verifiziert werden. Beispielsweise werden Kopplungsanalysen angewendet, um seltene Varianten als prädisponierende bzw. schützende Faktoren für eine Erkrankung zu identifizieren. Als Kopplungsanalysen werden Familienanalysen bezeichnet, bei denen die Segregation von Merkmalen in Familien mit der Segregation von Allelen bestimmter Marker verglichen wird. Man ermittelt dadurch die chromosomale Region, die mit einer Erkrankung assoziiert ist. Bei einer hohen Markerdichte lässt sich dieser Locus eingrenzen, um anschließend den kausalen genetischen Polymorphismus zu identifizieren. Bisher wurden einige Kopplungsanalysen in Bezug auf das Auftreten der schweren Malaria veröffentlicht. Chromosomale Regionen wie 5q31, 5p15, 13q13 und 12q21 wurden als Krankheitsloci mit unterschiedlichen Phänotypen in einer senegalesischen Population identifiziert (Sakuntabhai et al., 2008). Zwei weitere Studien konnten eine Abhängigkeit der Parasitendichte von Markern der Region 5q31-q33 zeigen (Garcia et al., 1998; Flori et al., 2003). Bei einer Kopplungsanalyse mit Proben einer Studienpopulation mit chronischer milder Malaria wurde die Region 10p15 mit der Anzahl an Fieberepisoden assoziiert (Timmann et al., 2007). Jedoch konnte keine der bisher durchgeführten Kopplungsanalysen einen Locus beschreiben, der in der Region von *SELP* auf Chromosom 1 liegt (1q23-25).

Mit der Durchführung eines familienbasierten Assoziationstests, dem Transmission-Disequilibrium-Test (TDT), könnte zusätzlich eine größere Verlässlichkeit bezüglich der beschriebenen Assoziation erreicht werden. Mit dem TDT wird eine Abweichung von der erwarteten Häufigkeit der Vererbung eines Alleles unter Berücksichtigung des Krankheitsstatus des Kindes festgestellt. Der Test wird auf Kernfamilien angewandt, die beide Eltern und ein betroffenes Kind umfassen. Dadurch ist diese Analyse nicht anfällig

gegenüber Variationen im genetischen Hintergrund der untersuchten Individuen, die bei einer Fall-Kontroll-Studie berücksichtigt werden müssen.

Hinweise auf die funktionelle Relevanz des Polymorphismus rs3917856 in der 3'-UTR des P-Selektin Gens gibt es bisher nicht. Die Substitution eines Thymin durch ein Adenosin 188 bp hinter dem Stop-Codon könnte diverse funktionelle Auswirkungen haben, da bekannt ist, dass Elemente von 3'-UTRs die Gen-Expression regulieren. Im primären Transkript sind 3'-UTRs an der Formation des 3'-Endes der reifen mRNA beteiligt (Zhao et al., 1999). Ist die mRNA bereits prozessiert, regulieren Bereiche in 3'-UTRs die Stabilität der mRNA, den nukleären Export, die subzelluläre Lokalisation und die Effizienz der Translation eines Transkripts (Conne et al., 2000; Mignone et al., 2002; Chabanon et al., 2004). Die regulatorischen Funktionen der Sequenzen der 3'-UTRs werden durch die Kombination ihrer Primär-Sequenz mit ihrer Sekundär-Struktur bestimmt. Eine systematische Analyse von Varianten in 3'-UTRs, deren Auftreten in Zusammenhang mit anderen Erkrankungen stehen, konnte wiederkehrende regulatorische Motive identifizieren (Chen et al., 2006).

Durch Sequenzvergleiche mit regulatorischen Elementen in der 3'-UTR humaner Gene sind keine Homologien zu der Region gefunden worden, in der sich der Basenaustausch bei *SELP* befindet. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Variante einen direkten Einfluss auf die Expression von P-Selektin auf der Zelloberfläche hat. Experimentell könnte diese Hypothese durch einen Reporter-gen-Versuch überprüft werden. Fragmente der 3'-UTR des Gens werden mit bzw. ohne Nukleotidaustausch eingesetzt und die mRNA-Stabilität mittels Enzymaktivität eines Reporter-gens bestimmt. Ein weiterer Ansatz, um die Auswirkung des Polymorphismus zu charakterisieren, ist die Durchführung eines elektrophoretischen „Mobility shift assays“. Dadurch kann eine Wechselwirkung der Region um die Variante mit regulatorischen Molekülen identifiziert werden.

Es ist bekannt, dass P-Selektin als Wirtsrezeptor die Sequestrierung von IE vermittelt (Ho et al., 1998). Sollte das A-Allel von rs3917856 dazu führen, dass die Expression von P-Selektin auf der Oberfläche von Endothelzellen erniedrigt wird, könnte die Folge eine entsprechend verringerte Zytadhäsion von IE am Endothel sein. Die lokale Inflammation würde in einem geringeren Ausmaß ablaufen und die dadurch hervorgerufene Pathogenese verringert. Die Eliminierung von IE durch die Milz könnte effektiver ablaufen, da sich mehr IE in der Blutzirkulation befinden. Basierend auf dieser Hypothese ist eine schützende Funktion der Variante während einer Malariaepisode denkbar.

P-Selektin übernimmt eine entscheidende Rolle bei der Leukozyten- und Thrombozyten-Adhäsion an stimulierte Endothelzellen (Frenette et al., 1995). Somit ist es denkbar, dass neben einem putativen Einfluss des Polymorphismus auf die Adhäsion

parasitierter Erythrozyten auch die Adhäsion des Rezeptors an Leukozyten und Thrombozyten oder die Interaktion mit dem Liganden P-Selektin Glykoprotein Ligand (PSGL1) beeinflusst wird. Die Adhäsion der Leukozyten am Ort der Entzündung und folglich natürliche inflammatorische Prozesse verhindert werden.

Die hier dargestellte Assoziation liefert einen Hinweis auf die Rolle P-Selektins während einer Infektion mit *P. falciparum*, über die involvierten Prozesse kann jedoch nur spekuliert werden. Durch das Resultat wird die interessante Frage aufgeworfen, in welchem Zelltyp und inwiefern der charakterisierte Polymorphismus Auswirkungen auf die Expression bzw. die Funktion von P-Selektin hat.

## 6.2 CD9

### 6.2.1 CD9 als Wirtsrezeptor für IE

Die Bindung von IE eines Gemisches verschiedener Feldisolate von *P. falciparum* aus Ghana im Zytoadhäsionsversuch an CD9 lieferte einen Hinweis darauf, dass CD9 als Wirtsrezeptor für *P. falciparum* dienen könnte. Zusätzlich wurde eine Tendenz der Bindung des laboradaptierten *P. falciparum*-Isolats C24 an CHO $\Delta$ 745-CD9 festgestellt. Die Untersuchungen weiterer Isolate aus anderen Endemiegebieten auf Adhärenz an CD9 könnte Aufschluss darüber geben, ob CD9 als Wirtsrezeptor für IE im Allgemeinen zu betrachten ist.

Es gelang allerdings nicht, die Bindung durch Peptide aus den extrazellulären Bereichen des Rezeptors spezifisch zu inhibieren. Möglicherweise überlappen die Peptide nicht mit der Bindungsstelle oder liegen nicht in der richtigen Konformation vor, um die Bindungsdomänen auf IE zu blockieren.

Auch durch Zugabe der monoklonalen Antikörper gegen CD9 war kein inhibitorischer Effekt zu beobachten. Vor den Inhibitionsversuchen wurden die Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen der CD9-exprimierenden Zelllinie verwendet, wodurch die Zellen eindeutig von beiden Antikörpern markiert wurden. Daraus lässt sich schließen, dass der Rezeptor an der Oberfläche der Zellen in seiner korrekten Konformation vorliegen muss und von den Antikörpern gebunden wird. Möglicherweise stimmt die Bindedomäne der zwei Antikörper VJ1/10 und VJ1/20 an CD9 nicht mit der Adhäsionsdomäne des Rezeptors an IE überein. Es könnten monoklonale Antikörper mit bekannter Erkennungssequenz in Inhibitionstests eingesetzt werden, um die Domäne zu identifizieren, die an der Interaktion mit IE beteiligt ist.

Die Zugabe der rekombinant exprimierten extrazellulären Domäne von CD9 führte zu einer zur Reduktion der Bindung um 37%. Die Tendenz der Inhibition ist ein erster Hinweis auf die Spezifität der Bindung von IE an die große extrazelluläre Domäne von CD9. Eine Bestätigung dieses Ergebnisses könnte erzielt werden, indem unterschiedliche Konzentrationen des GST-CD9-LEL eingesetzt werden, um einen dosisabhängigen Effekt zu beobachten. Ein weiterer Ansatz wäre ein proteinbiochemischer Nachweis der Interaktion von IE mit der rekombinanten extrazellulären Domäne von CD9.

### **6.2.2 Fehlende Assoziation genetischer Varianten von CD9 mit schwerer Malaria**

Das Gen von CD9 ist auf Chromosom 12 lokalisiert (12p13.31). In der Literatur sind im gesamten Gen 255 Mutationen bekannt. Darunter sind lediglich 3 Varianten, die einen nicht-synonymen Aminosäure-Austausch nach sich ziehen (dbSNP Datenbank). Die kodierenden Bereiche des Gens sind stark konserviert, wie die Ergebnisse der Re-Sequenzierung genomischer DNA der ghanaischen Studiengruppe bestätigen. Es wurden insgesamt 17 Varianten identifiziert, darunter 5 Promotor-Polymorphismen und lediglich 2 exonische Mutationen. Für die 8 genotypisierten Polymorphismen wurde kein Zusammenhang mit einem der definierten Phänotypen von Malaria-Patienten der untersuchten Studiengruppe beobachtet.

Über funktionelle Auswirkungen der hier charakterisierten Varianten gibt es keine Hinweise. Über die in den Datenbanken geführten Nukleotid-Austausche im CD9-Gen ist nicht bekannt, inwiefern sie zelluläre Prozesse beeinflussen. Durch Sequenzanalogien innerhalb der Tetraspanine und künstlich eingeführte Mutationen konnten Aminosäuren charakterisiert werden, die für die Funktion von CD9 essentiell zu sein scheinen (Kovalenko et al., 2005). Bis heute sind keine Erkrankungen bekannt, die auf genetischen Veränderungen im CD9-Gen beruhen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD9 ein hoch konserviertes Molekül ist.

### **6.2.3 Funktion von CD9 in der Pathogenese der Malaria tropica**

Aus einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2003 geht hervor, dass Tetraspanine auf allen Zellen des Immunsystems vorliegen (Tarrant et al., 2003). Hier kommen sie assoziiert mit anderen Oberflächenmolekülen in Mikrodomänen vor und regulieren Prozesse wie Wechselwirkungen zwischen immunrelevanten Zellen. Dazu gehören die Adhäsion und

Migration von Zellen und die Formation von membran-assoziierten Signalkomplexen (Levy und Shoham, 2005).

Über detaillierte Prozesse, in denen CD9 eine Rolle spielt, ist nichts bekannt. Somit kann über die Konsequenzen einer Adhäsion von IE an CD9 nur spekuliert werden.

Anhaltspunkte zur Funktion von Tetraspaninen im Verlauf einer Infektion mit *P. falciparum* gibt es bereits für CD81, ein Rezeptor, der für die Invasion von Sporozoiten in Hepatozyten verantwortlich ist (Silvie et al., 2003). Vor kurzem wurde die Sporozoiten-bindende Domäne von CD81 identifiziert, die sich in dem großen extrazellulären Teil des Transmembran-Moleküls befindet (Yalaoui et al., 2008). Weil die Sequenzen von CD9 und CD81 innerhalb der Tetraspanine die größte Homologie aufweisen, könnten diese Resultate Hinweise auf eine entsprechend exponierte Domäne von CD9 liefern, die an der Interaktion mit IE beteiligt sein könnte.

Es ist denkbar, dass IE zusätzlich mit Molekülen interagieren, die in Mikrodomänen mit CD9 assoziiert auf der Zelloberfläche vorliegen. Tetraspanine sind in der Lage, andere membranständige Proteine in sogenannten Tetraspanin-Netzwerken anzuordnen (Boucheix und Rubinstein, 2001; Hemler, 2003). Somit könnten die Konformation und die Exposition bestimmter Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch CD9-Expression beeinflusst werden. Falls diese CD9-assoziierte Moleküle auch als Rezeptoren für IE dienen, könnte die Folge sein, dass IE vermehrt sequestrieren können.

Die Funktion als Bindungspartner für immunologisch wirksame Zellen könnte durch die Bindung von IE an CD9 erhebliche Auswirkungen auf die Pathogenese der schweren Malaria haben. Adhärenente IE könnten Bindungsstellen für immunologisch wirksame Zellen an CD9 blockieren und somit Mechanismen bei der Immunantwort stören bzw. verhindern. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass die große extrazelluläre Domäne von CD9 an der Fusion von Monozyten beteiligt sein muss (Takeda et al., 2003). Dieser und weitere Prozesse, in denen CD9 eine essentielle Rolle spielt, könnten durch gebundene IE verhindert werden. Zukünftige Erkenntnisse über die Funktion des Rezeptors werden hilfreich sein, um die Rolle von CD9 bei einer Infektion mit *P. falciparum* aufzuklären.

## **6.3 CD95**

### **6.3.1 CD95 als Wirtsrezeptor für IE**

Die Zytoadhärenz von IE an CD95 ist ein Hinweis darauf, dass die Sequestrierung von *P. falciparum* an Endothelzellen neben anderen Wirtsrezeptoren auch durch CD95 vermittelt

werden könnte. Wie im Fall von CD9 können Experimente mit weiteren *P. falciparum*-Isolaten Aufschluss über die Relevanz der Adhäsion geben.

Ein direkter Kontakt von IE mit humanen Endothelzellen hat einen apoptose-induzierenden Effekt, der nicht durch lösliche Mediatoren des Parasiten hervorgerufen wird (Pino et al., 2003). Somit ist es möglich, dass CD95 durch die Bindung an PfEMP1 oder ein anderes Oberflächenmolekül von IE aktiviert wird und dadurch eine Signaltransduktion mit apoptotischer Wirkung ausgelöst wird. Als direkte Folge könnte der induzierte Zelltod von Endothelzellen eintreten, wodurch das Endothel in Kapillaren des Gehirns und anderen Organen zerstört wird. Im experimentellen Modell für die zerebrale Malaria mit CD95-defizienten Mäusen wurde beobachtet, dass diese Mäuse keine Symptome der zerebralen Malaria entwickelten (Ohno et al., 2005). Die Parasitendichte war dabei unabhängig von der CD95-Defizienz. In einer weiteren Studie konnte eine gesteigerte Expression von CD95 und dem Liganden FasL in Hirnzellen von Mäusen mit Symptomen der zerebralen Malaria festgestellt werden (Potter et al., 2006). Untersuchte Astrozyten waren Caspase-positiv, woraus die Autoren den Schluss zogen, dass CD95 und die Interaktion mit dem Liganden eine Funktion bei der Ausprägung der zerebralen Malaria im Mausmodell übernehmen.

Es sollte angemerkt werden, dass die Rückschlüsse aus Experimenten mit dem *P. berghei* ANKA-Mausmodell nicht ohne weiteres auf die Infektion des Menschen mit *P. falciparum* zu übertragen sind. Es wurde mehrfach gezeigt, dass im Tiermodell andere pathophysiologische Prozesse als beim Menschen ablaufen. In Mäusen, die empfänglich für *P. berghei* ANKA sind, sequestrieren mononukleäre Zellen an Endothelzellen von Hirnkapillaren (Thumwood et al., 1988; Neill und Hunt, 1992). Im Gegensatz dazu wurden bei Patienten mit zerebraler Malaria adhärente IE in den Kapillaren des Gehirns entdeckt (Taylor et al., 2004).

### **6.3.2 Assoziation von CD95 –436C>A mit einem Schutz vor Malaria tropica**

Die Nukleotidaustausch an Position –436 in der Promotor-Region von *CD95* geht mit einem Schutz vor schwerer Malaria einher. Die Ergebnisse aus den Berechnungen lassen den Schluss zu, dass hier ein additiver Effekt vorliegt. Heterozygote Träger des Adenosins haben ein um 25% verringertes Risiko, an schwerer Malaria zu erkranken (OR 0,75; 95% KI: 0,65-0,85), bei homozygoten Trägern beträgt der Schutz 52% (OR 0,48, 95% KI: 0,28-0,83).

In der charakterisierten Studienpopulation beträgt die Allelfrequenz des Adenosins 12% in der Kontrollgruppe und 10% in der Fallgruppe (Daten nicht gezeigt). In der Literatur



wurde das Allel in einer europäischen Population mit 3%, und der nigerianischen Yoruba-Population mit 16% beschrieben (dbSNP Datenbank). Die Tatsache, dass das Auftreten der Variante bei afrikanischen Populationen am höchsten ist, könnte auf einen natürlichen Selektionsmechanismus hinweisen, da hier die Endemie der Malaria am höchsten ist. Ein prominentes Beispiel für die natürliche Selektion hervorgerufen durch eine Infektion mit *P. falciparum* ist die Verbreitung der Sichelzellanämie. Die Erkrankung wird hervorgerufen durch eine Mutation im *HBB* Gen und tritt in Afrika mit einer durchschnittlichen Allelfrequenz von 10% am häufigsten auf. Homozygote Träger des Sichelzell-Allels leiden an der Erkrankung, durch das heterozygote Auftreten des Allels besitzt ein Mensch jedoch einen 90%igen Schutz vor schwerer Malaria (Ackerman et al., 2005).

Die Resultate aus der Fall-Kontrollstudie zeigen, dass der Polymorphismus den Trägern des A-Allels nicht nur einen Schutz vor zerebraler Malaria, sondern auch vor schwerer Anämie bietet. Daraus lässt sich folgern, dass CD95 nicht ausschließlich in die Pathogenese der zerebralen Malaria involviert ist, sondern auch eine entscheidende Rolle im Verlauf der Immunreaktion bei einer Malariaepisode spielen könnte.

In Bezug auf die Auswirkung der Variante bei einer chronischen, milden Infektion mit *P. falciparum* konnte mit Hilfe des TDT keine Assoziation festgestellt werden. Auch bei der Anwendung der Parasitendichte als quantitativer Phänotyp wurde weder in der beschriebenen Studiengruppe noch in den Familien mit milder Malaria ein Einfluss des Polymorphismus detektiert (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dessen muss man den Schluss ziehen, dass die Punktmutation - unabhängig von der Parasitendichte - einen Einfluss auf die Entwicklung einer schweren Malaria nimmt.

### 6.3.3 Funktionelle Analyse von CD95 –436C>A im Reporteragen-Assay

Für die Charakterisierung der Promotor-Variante an Position –436 wurden 3 Konstrukte unterschiedlicher Länge im Reporteragen-Assay untersucht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Promotoraktivität beobachtet, weder bei unstimulierten Jurkat-Zellen noch nach Stimulation mit PMA oder Ionomycin.

Ausschlaggebend bei einem Reporteragen-Assay ist, dass Transkriptionsfaktoren in der Zelle vorhanden sein müssen, die mit der zu untersuchenden Promotor-Region interagieren. Bei der hier verwendeten Jurkat-Zelllinie handelt es sich um eine immortalisierte T-Zelllinie. CD95 wird natürlicherweise in T-Lymphozyten exprimiert, wo es nach Aktivierung die Apoptose induziert. Folglich gehören die Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der Expression von CD95 beteiligt sind, zur Ausstattung der Jurkat-Zellen. Promotor-Haplotypen von CD95

wurden erfolgreich unter Verwendung dieser Zelllinie charakterisiert (Nolsoe et al., 2005). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der hier untersuchte Polymorphismus die Bindungseigenschaft anderer Transkriptionsfaktoren an die DNA beeinflusst, die nicht in Jurkat-Zellen induziert werden. Untersuchungen weiterer Zellpopulationen im Reporter-Gen-Assay können Anhaltspunkte dazu liefern.

In dieser Arbeit wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin inkubiert. Die Substanzen sind unspezifische stimulatorische Moleküle für T-Zellen. Periphere mononukleäre Zellen werden durch die Stimulantien aktiviert und produzieren eine Reihe von intrazellulären Zytokinen (Baran et al., 2001). Trotz der weitreichenden stimulatorischen Wirkung ist denkbar, dass der Einfluss der Variante erst nach spezifischer Aktivierung in einer bestimmten immunrelevanten Zellpopulation messbar wird.

Die Möglichkeit, dass die Regulation durch eine andere Variante vorgenommen wird, die mit rs9658676 im Kopplungsungleichgewicht vorliegt, kann in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden. Alternativ könnte der Polymorphismus oder assoziierte Polymorphismen in Zellen eine Rolle spielen, die hier nicht untersucht wurden.

Analysen mit Hilfe des Programms P-Match (Chekmenev et al., 2005) ergaben, dass der Nukleotid-Austausch in einer Sequenz liegt, die als Erkennungssequenz des Transkriptionsfaktors Myeloid-Zink-Finger-Protein-1 (MZF-1) dienen könnte (Daten nicht gezeigt). Wenn an der Position -436 das Cytosin vorliegt, gelten die 6 umgebenen Nukleotide als Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor (GAGCAT) in immunrelevanten Zellen. Möglicherweise wird die Bindungsaffinität an dieser Stelle durch den Austausch beeinflusst. Experimentell kann diese Hypothese mit einem „Mobility shift assay“ überprüft werden. Dadurch können mit der DNA interagierende Proteine abhängig von der Variante identifiziert werden.

### **6.3.4 Einfluss von -436C>A auf die Oberflächenexpression von CD95 auf peripheren mononukleären Zellen**

Bei gesunden afrikanischen Erwachsenen ist die Expression von CD95 in den untersuchten Zellpopulationen unbeeinflusst vom Genotyp an Position -436 im Promotor des Gens. Weder der Anteil der CD95-positiven Zellen noch die Expressionsstärke differierte zwischen den drei Genotypen. Neben der Expression von CD95 in der Fraktion aller peripheren mononukleären Zellen wurden T-Helfer-Zellen (CD4+), zytotoxische T-Zellen (CD8+), B-Zellen (CD19+) sowie die CD69-positive Zellpopulation charakterisiert. Die Markierung mit CD69 wurde durchgeführt, um den Aktivierungszustand der Zellen zu bestimmen, da die

Expression von CD95 bei stimulierten Immunzellen erhöht ist (Krammer, 2000). CD69 ist ein Molekül, welches nach Antigen-Stimulation sehr schnell als Oberflächenmarker exponiert wird und gilt daher als früher Aktivierungsmarker auf Leukozyten (Sancho et al., 2005).

Anhand des unterschiedlichen Anteils an CD95-positiven Zellen unter CD96-positiven Zellen ließ sich der protektive Effekt des A-Allels nicht erklären. Der genetische Effekt weist darauf hin, dass ein Unterschied zwischen Trägern der Genotypen AA bzw. AC und Trägern des CC-Genotyps hinsichtlich der CD95-Expression zu erwarten ist. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte lediglich einen p-Wert von 0,04. Möglicherweise ist die signifikante Erhöhung des Anteils an CD95-positiven Zellen ein falsch positives Ergebnis, das durch multiples Testen generiert wurde. Um diese Hypothese zu prüfen, müssten Zellpopulationen weiterer Probanden der gleichen Analyse unterzogen werden, um die Anzahl und damit die Aussagekraft des statistischen Tests zu erhöhen.

Dadurch, dass in diesen Experimenten die Zellzahl limitiert war, konnten doppelt markierte Zellpopulationen, wie z.B. CD69- und CD4-positive Zellen nicht auf CD95-Expression untersucht werden, da die Fluoreszenzintensitäten für kleine Zellpopulationen nicht repräsentativ sind. In diesem Experiment wurde nur ein kleiner Teil der peripheren mononukleären Zellpopulation untersucht, und es ist nicht auszuschließen, dass die Expression von CD95 in anderen Zellsubklassen durch die Variante beeinflusst wird. Zudem ist es möglich, dass ein Effekt *in vivo* erst nach Stimulation der Zellen durch pro-inflammatorische Zytokine zum Tragen kommt.

### **6.3.5 Funktion von CD95 während einer Infektion mit *P. falciparum***

Der aktivierungs-induzierte Zelltod ist bei anderen parasitären Erkrankungen wie z.B. der Chagas-Krankheit oder einer Infektion mit *Schistosoma mansoni* beobachtet worden (DosReis et al., 1995; Estaquier et al., 1997). Über die apoptose-induzierenden Signale ist im Detail jedoch nur sehr wenig bekannt. Die Apoptose ist ein effizienter Feed-Back-Mechanismus, um die Zellhomeostase zu erhalten, wenn hohe Dosen von Antigenen zu eliminieren sind (Raff et al., 1993).

Zur Rolle der Apoptose im Verlauf der Immunantwort auf eine Infektion mit *P. falciparum* wurden einige Studien durchgeführt. Während einer Malariaepisode wurde ein Anstieg der Apoptose-Rate von peripheren Lymphozyten beobachtet (Balde et al., 1995). Eine Reduktion der Anzahl an zirkulierenden T-Lymphozyten, die sogenannte malaria-assoziierte Lymphopenie, wurde mehrfach beschrieben (Lisse et al., 1994; Wells et al., 1979). Zusätzlich weist die erhöhte Konzentration von FasL, dem Liganden von CD95, während einer Infektion mit *P. falciparum* darauf hin, dass die Regulation durch die Interaktion von CD95 mit FasL eine entscheidende Rolle bei der schweren Malaria

übernimmt (Kern et al., 2000). Die Adhäsion von IE an zirkulierende Lymphozyten könnte den Regulationsmechanismus erheblich stören, indem gebundene Trophozoiten die Bindung des Liganden an CD95 kompetitiv hemmen. Aktivierte Lymphozyten würden daran gehindert, apoptotisch zu werden, wodurch immunpathologische Prozesse verstärkt ablaufen könnten.

Durch die hier charakterisierte Assoziation von CD95 mit schwerer Malaria konnte ein Hinweis auf pathophysiologische und immunregulatorische Prozesse gefunden werden, die während einer Infektion mit *P. falciparum* eine Rolle spielen. Weitere funktionelle Studien können Aufschluss darüber geben, welche Zellpopulationen und Mechanismen von dem Nukleotid-Austausch an Position –436 im Promotor von *CD95* beeinflusst werden.

## Literaturverzeichnis

- Ackerman, H., S. Usen, M. Jallow, F. Sisay-Joof, M. Pinder and D. P. Kwiatkowski (2005). A comparison of case-control and family-based association methods: the example of sickle-cell and malaria. *Ann Hum Genet* 69(Pt 5): 559-65.
- Aitman, T. J., et al. (2000). Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature* 405(6790): 1015-6.
- Andrews, P. W., B. B. Knowles and P. N. Goodfellow (1981). A human cell-surface antigen defined by a monoclonal antibody and controlled by a gene on chromosome 12. *Somatic Cell Genet* 7(4): 435-43.
- Artavanis-Tsakonas, K., J. E. Tongren and E. M. Riley (2003). The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol* 133(2): 145-52.
- Balde, A. T., J. L. Sarthou and C. Roussillon (1995). Acute Plasmodium falciparum infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. *Immunol Lett* 46(1-2): 59-62.
- Baran, J., D. Kowalczyk, M. Ozog and M. Zembala (2001). Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. *Clin Diagn Lab Immunol* 8(2): 303-13.
- Barboux, S. C., et al. (2001). Association between P-selectin gene polymorphisms and soluble P-selectin levels and their relation to coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(10): 1668-73.
- Barreiro, O., M. Yanez-Mo, M. Sala-Valdes, M. D. Gutierrez-Lopez, S. Ovalle, A. Higginbottom, P. N. Monk, C. Cabanas and F. Sanchez-Madrid (2005). Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood* 105(7): 2852-61.
- Barrett, J. C., B. Fry, J. Maller and M. J. Daly (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21(2): 263-5.
- Baruch, D. I., J. A. Gormely, C. Ma, R. J. Howard and B. L. Pasloske (1996). Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8): 3497-502.
- Baruch, D. I., B. L. Pasloske, H. B. Singh, X. Bi, X. C. Ma, M. Feldman, T. F. Taraschi and R. J. Howard (1995). Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 82(1): 77-87.
- Bellamy, R., D. Kwiatkowski and A. V. Hill (1998). Absence of an association between intercellular adhesion molecule 1, complement receptor 1 and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and severe malaria in a West African population. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92(3): 312-6.
- Binka, F. N., S. S. Morris, D. A. Ross, P. Arthur and M. E. Aryeetey (1994). Patterns of malaria morbidity and mortality in children in northern Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88(4): 381-5.
- Biswas, A. K., A. Hafiz, B. Banerjee, K. S. Kim, K. Datta and C. E. Chitnis (2007). Plasmodium falciparum uses gC1qR/HABP1/p32 as a receptor to bind to vascular endothelium and for platelet-mediated clumping. *PLoS Pathog* 3(9): 1271-80.

- Borst, P. and P. A. Genest (2006). Parasitology: switching like for like. *Nature* 439(7079): 926-7.
- Boucheix, C., P. Benoit, P. Frachet, M. Billard, R. E. Worthington, J. Gagnon and G. Uzan (1991). Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. *J Biol Chem* 266(1): 117-22.
- Boucheix, C. and E. Rubinstein (2001). Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 58(9): 1189-205.
- Bourgain, C., S. Hoffjan, R. Nicolae, D. Newman, L. Steiner, K. Walker, R. Reynolds, C. Ober and M. S. McPeck (2003). Novel case-control test in a founder population identifies P-selectin as an atopy-susceptibility locus. *Am J Hum Genet* 73(3): 612-26.
- Chabanon, H., I. Mickleburgh and J. Hesketh (2004). Zipcodes and postage stamps: mRNA localisation signals and their trans-acting binding proteins. *Brief Funct Genomic Proteomic* 3(3): 240-56.
- Chekmenev, D. S., C. Haid and A. E. Kel (2005). P-Match: transcription factor binding site search by combining patterns and weight matrices. *Nucleic Acids Res* 33(Web Server issue): W432-7.
- Chen, J. M., C. Ferec and D. N. Cooper (2006). A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Hum Genet* 120(1): 1-21.
- Combes, V., A. R. Rosenkranz, M. Redard, G. Pizzolato, H. Lepidi, D. Vestweber, T. N. Mayadas and G. E. Grau (2004). Pathogenic role of P-selectin in experimental cerebral malaria: importance of the endothelial compartment. *Am J Pathol* 164(3): 781-6.
- Conne, B., A. Stutz and J. D. Vassalli (2000). The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med* 6(6): 637-41.
- Craig, A., D. Fernandez-Reyes, M. Mesri, A. McDowall, D. C. Altieri, N. Hogg and C. Newbold (2000). A functional analysis of a natural variant of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1Kilifi). *Hum Mol Genet* 9(4): 525-30.
- Cramer, J. P., F. P. Mockenhaupt, S. Ehrhardt, J. Burkhardt, R. N. Otchwemah, E. Dietz, S. Gellert and U. Bienzle (2004). iNOS promoter variants and severe malaria in Ghanaian children. *Trop Med Int Health* 9(10): 1074-80.
- Daviet, L., M. C. Morel-Kopp, C. Kaplan and J. L. McGregor (1995). A structural/functional domain on human CD36 is involved in the binding of anti-Nak(a) antibodies. *Thromb Haemost* 73(3): 543-5.
- DosReis, G. A., M. E. Fonseca and M. F. Lopes (1995). Programmed T-cell death in experimental chagas disease. *Parasitol Today* 11(10): 391-4.
- Ekvall, H. (2003). Malaria and anemia. *Curr Opin Hematol* 10(2): 108-14.
- Estaquier, J., M. Marguerite, F. Sahuc, N. Bessis, C. Auriault and J. C. Ameisen (1997). Interleukin-10-mediated T cell apoptosis during the T helper type 2 cytokine response in murine *Schistosoma mansoni* parasite infection. *Eur Cytokine Netw* 8(2): 153-60.
- Fernandez-Reyes, D., A. G. Craig, S. A. Kyes, N. Peshu, R. W. Snow, A. R. Berendt, K. Marsh and C. I. Newbold (1997). A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Hum Mol Genet* 6(8): 1357-60.
- Fisher, G. H., F. J. Rosenberg, S. E. Straus, J. K. Dale, L. A. Middleton, A. Y. Lin, W. Strober, M. J. Lenardo and J. M. Puck (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81(6): 935-46.

- Flori, L., B. Kumulungui, C. Aucan, C. Esnault, A. S. Traore, F. Fumoux and P. Rihet (2003). Linkage and association between *Plasmodium falciparum* blood infection levels and chromosome 5q31-q33. *Genes Immun* 4(4): 265-8.
- Frenette, P. S., R. C. Johnson, R. O. Hynes and D. D. Wagner (1995). Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16): 7450-4.
- Fried, M. and P. E. Duffy (1996). Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* 272(5267): 1502-4.
- Fry, A. E., et al. (2008). Variation in the ICAM1 gene is not associated with severe malaria phenotypes. *Genes Immun*.
- Garcia, A., S. Marquet, B. Bucheton, D. Hillaire, M. Cot, N. Fievet, A. J. Dessein and L. Abel (1998). Linkage analysis of blood *Plasmodium falciparum* levels: interest of the 5q31-q33 chromosome region. *Am J Trop Med Hyg* 58(6): 705-9.
- Gardner, M. J., et al. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419(6906): 498-511.
- Guerra, C. A., P. W. Gikandi, A. J. Tatem, A. M. Noor, D. L. Smith, S. I. Hay and R. W. Snow (2008). The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS Med* 5(2): e38.
- Guindo, A., R. M. Fairhurst, O. K. Doumbo, T. E. Wellems and D. A. Diallo (2007). X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS Med* 4(3): e66.
- Gyan, B. A., B. Goka, J. T. Cvetkovic, J. L. Kurtzhals, V. Adabayeri, H. Perlmann, A. K. Lefvert, B. D. Akanmori and M. Troye-Blomberg (2004). Allelic polymorphisms in the repeat and promoter regions of the interleukin-4 gene and malaria severity in Ghanaian children. *Clin Exp Immunol* 138(1): 145-50.
- Hatabu, T., S. Kawazu, M. Aikawa and S. Kano (2003). Binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to the membrane-bound form of Fractalkine/CX3CL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(26): 15942-6.
- Heddini, A., F. Pettersson, O. Kai, J. Shafi, J. Obiero, Q. Chen, A. Barragan, M. Wahlgren and K. Marsh (2001). Fresh isolates from children with severe *Plasmodium falciparum* malaria bind to multiple receptors. *Infect Immun* 69(9): 5849-56.
- Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 397-422.
- Herrmann, S. M., S. Ricard, V. Nicaud, C. Mallet, A. Evans, J. B. Ruidavets, D. Arveiler, G. Luc and F. Cambien (1998). The P-selectin gene is highly polymorphic: reduced frequency of the Pro715 allele carriers in patients with myocardial infarction. *Hum Mol Genet* 7(8): 1277-84.
- Hiller, N. L., S. Bhattacharjee, C. van Ooij, K. Liolios, T. Harrison, C. Lopez-Estrano and K. Haldar (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* 306(5703): 1934-7.
- Ho, M., T. Schollaardt, X. Niu, S. Looareesuwan, K. D. Patel and P. Kubes (1998). Characterization of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte and P-selectin interaction under flow conditions. *Blood* 91(12): 4803-9.

- Horrocks, P., R. Pinches, Z. Christodoulou, S. A. Kyes and C. I. Newbold (2004). Variable var transition rates underlie antigenic variation in malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(30): 11129-34.
- Jenkins, N., Y. Wu, S. Chakravorty, O. Kai, K. Marsh and A. Craig (2007). Plasmodium falciparum intercellular adhesion molecule-1-based cytoadherence-related signaling in human endothelial cells. *J Infect Dis* 196(2): 321-7.
- Joy, D. A., et al. (2003). Early origin and recent expansion of Plasmodium falciparum. *Science* 300(5617): 318-21.
- Kanemitsu, S., K. Ihara, A. Saifddin, T. Otsuka, T. Takeuchi, J. Nagayama, M. Kuwano and T. Hara (2002). A functional polymorphism in fas (CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 29(6): 1183-8.
- Kansas, G. S. (1996). Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88(9): 3259-87.
- Kern, P., M. Dietrich, C. Hemmer and N. Wellinghausen (2000). Increased levels of soluble Fas ligand in serum in Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun* 68(5): 3061-3.
- Kikuchi, M., et al. (2001). Association of adhesion molecule PECAM-1/CD31 polymorphism with susceptibility to cerebral malaria in Thais. *Parasitol Int* 50(4): 235-9.
- Knuepfer, E., M. Rug, N. Klonis, L. Tilley and A. F. Cowman (2005). Trafficking of the major virulence factor to the surface of transfected P. falciparum-infected erythrocytes. *Blood* 105(10): 4078-87.
- Kobbe, R., R. Neuhoff, F. Marks, S. Adjei, I. Langefeld, C. von Reden, O. Adjei, C. G. Meyer and J. May (2006). Seasonal variation and high multiplicity of first Plasmodium falciparum infections in children from a holoendemic area in Ghana, West Africa. *Trop Med Int Health* 11(5): 613-9.
- Kovalenko, O. V., D. G. Metcalf, W. F. DeGrado and M. E. Hemler (2005). Structural organization and interactions of transmembrane domains in tetraspanin proteins. *BMC Struct Biol* 5: 11.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407(6805): 789-95.
- Kun, J. F., J. Klabunde, B. Lell, D. Luckner, M. Alpers, J. May, C. Meyer and P. G. Kremsner (1999). Association of the ICAM-1 Kilifi mutation with protection against severe malaria in Lambarene, Gabon. *Am J Trop Med Hyg* 61(5): 776-9.
- Kwiatkowski, D. P. (2005). How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet* 77(2): 171-92.
- Kyes, S. A., S. M. Kraemer and J. D. Smith (2007). Antigenic variation in Plasmodium falciparum: gene organization and regulation of the var multigene family. *Eukaryot Cell* 6(9): 1511-20.
- Lambros, C. and J. P. Vanderberg (1979). Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 65(3): 418-20.
- Leech, J. H., J. W. Barnwell, L. H. Miller and R. J. Howard (1984). Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Exp Med* 159(6): 1567-75.
- Levy, S. and T. Shoham (2005). The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 5(2): 136-48.
- Lisse, I. M., P. Aaby, H. Whittle and K. Knudsen (1994). A community study of T lymphocyte subsets and malaria parasitaemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88(6): 709-10.



- Luse, S. A. and L. H. Miller (1971). Plasmodium falciparum malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *Am J Trop Med Hyg* 20(5): 655-60.
- Mackintosh, C. L., J. G. Beeson and K. Marsh (2004). Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol* 20(12): 597-603.
- Marti, M., R. T. Good, M. Rug, E. Knuepfer and A. F. Cowman (2004). Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* 306(5703): 1930-3.
- May, J., J. A. Evans, C. Timmann, C. Ehmen, W. Busch, T. Thye, T. Agbenyega and R. D. Horstmann (2007). Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria. *Jama* 297(20): 2220-6.
- McGuire, W., J. C. Knight, A. V. Hill, C. E. Allsopp, B. M. Greenwood and D. Kwiatkowski (1999). Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *J Infect Dis* 179(1): 287-90.
- Miao, W. M., E. Vasile, W. S. Lane and J. Lawler (2001). CD36 associates with CD9 and integrins on human blood platelets. *Blood* 97(6): 1689-96.
- Mignone, F., C. Gissi, S. Liuni and G. Pesole (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 3(3): REVIEWS0004.
- Miller, L. (1996). Malaria. Protective selective pressure. *Nature* 383(6600): 480-1.
- Miller, L. H., D. I. Baruch, K. Marsh and O. K. Doumbo (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415(6872): 673-9.
- Neill, A. L. and N. H. Hunt (1992). Pathology of fatal and resolving Plasmodium berghei cerebral malaria in mice. *Parasitology* 105 ( Pt 2): 165-75.
- Newbold, C., A. Craig, S. Kyes, A. Rowe, D. Fernandez-Reyes and T. Fagan (1999). Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in Plasmodium falciparum. *Int J Parasitol* 29(6): 927-37.
- Newton, C. R., T. E. Taylor and R. O. Whitten (1998). Pathophysiology of fatal falciparum malaria in African children. *Am J Trop Med Hyg* 58(5): 673-83.
- Nolsoe, R. L., J. A. Kelly, F. Pociot, K. L. Moser, O. P. Kristiansen, T. Mandrup-Poulsen and J. B. Harley (2005). Functional promoter haplotypes of the human FAS gene are associated with the phenotype of SLE characterized by thrombocytopenia. *Genes Immun* 6(8): 699-706.
- Ohno, T., F. Kobayashi and M. Nishimura (2005). Fas has a role in cerebral malaria, but not in proliferation or exclusion of the murine parasite in mice. *Immunogenetics* 57(3-4): 293-6.
- Papoff, G., P. Hausler, A. Eramo, M. G. Pagano, G. Di Leve, A. Signore and G. Ruberti (1999). Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* 274(53): 38241-50.
- Petersen, E., B. Høgh, N. T. Marbiah, E. Dolopaie, A. Gottschau, A. P. Hanson and A. Bjorkman (1991). Clinical and parasitological studies on malaria in Liberian adults living under intense malaria transmission. *Ann Trop Med Parasitol* 85(6): 577-84.
- Pino, P., I. Vouldoukis, N. Dugas, G. Hassani-Loppion, B. Dugas and D. Mazier (2003). Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 582-6.

- Pino, P., I. Vouldoukis, J. P. Kolb, N. Mahmoudi, I. Desportes-Livage, F. Bricaire, M. Danis, B. Dugas and D. Mazier (2003). Plasmodium falciparum--infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. *J Infect Dis* 187(8): 1283-90.
- Potter, S. M., T. Chan-Ling, E. Rosinova, H. J. Ball, A. J. Mitchell and N. H. Hunt (2006). A role for Fas-Fas ligand interactions during the late-stage neuropathological processes of experimental cerebral malaria. *J Neuroimmunol* 173(1-2): 96-107.
- Pouvelle, B., V. Matarazzo, C. Jurzynski, J. Nemeth, M. Ramharter, G. Rougon and J. Gysin (2007). Neural cell adhesion molecule, a new cytoadhesion receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes capable of aggregation. *Infect Immun* 75(7): 3516-22.
- Raff, M. C., B. A. Barres, J. F. Burne, H. S. Coles, Y. Ishizaki and M. D. Jacobson (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262(5134): 695-700.
- Rogerson, S. J., S. C. Chaiyaroj, K. Ng, J. C. Reeder and G. V. Brown (1995). Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Exp Med* 182(1): 15-20.
- Ross, R. and J. Smyth (1997). On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malarial blood. 1897. *Indian J Malariol* 34(2): 47-55.
- Rudert, F., E. Visser, L. Forbes, E. Lindridge, Y. Wang and J. Watson (1995). Identification of a silencer, enhancer, and basal promoter region in the human CD95 (Fas/APO-1) gene. *DNA Cell Biol* 14(11): 931-7.
- Sakuntabhai, A., et al. (2008). Genetic determination and linkage mapping of Plasmodium falciparum malaria related traits in Senegal. *PLoS ONE* 3(4): e2000.
- Sancho, D., M. Gomez and F. Sanchez-Madrid (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 26(3): 136-40.
- Scherf, A., R. Hernandez-Rivas, P. Buffet, E. Bottius, C. Benatar, B. Pouvelle, J. Gysin and M. Lanzer (1998). Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in Plasmodium falciparum. *Embo J* 17(18): 5418-26.
- Senczuk, A. M., J. C. Reeder, M. M. Kosmala and M. Ho (2001). Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 functions as a ligand for P-selectin. *Blood* 98(10): 3132-5.
- Siano, J. P., K. K. Grady, P. Millet and T. M. Wick (1998). Short report: Plasmodium falciparum: cytoadherence to alpha(v)beta3 on human microvascular endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg* 59(1): 77-9.
- Siegel, R. M., J. K. Frederiksen, D. A. Zacharias, F. K. Chan, M. Johnson, D. Lynch, R. Y. Tsien and M. J. Lenardo (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288(5475): 2354-7.
- Silvie, O., et al. (2003). Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. *Nat Med* 9(1): 93-6.
- Skol, A. D., L. J. Scott, G. R. Abecasis and M. Boehnke (2006). Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet* 38(2): 209-13.
- Smith, J. D., G. Subramanian, B. Gamain, D. I. Baruch and L. H. Miller (2000). Classification of adhesive domains in the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family. *Mol Biochem Parasitol* 110(2): 293-310.

- Smythe, J. A., M. G. Peterson, R. L. Coppel, A. J. Saul, D. J. Kemp and R. F. Anders (1990). Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 39(2): 227-34.
- Snow, R. W., C. A. Guerra, A. M. Noor, H. Y. Myint and S. I. Hay (2005). The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434(7030): 214-7.
- Snow, R. W. and K. Marsh (1998). New insights into the epidemiology of malaria relevant for disease control. *Br Med Bull* 54(2): 293-309.
- Stipp, C. S., T. V. Kolesnikova and M. E. Hemler (2003). Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci* 28(2): 106-12.
- Sturm, A., et al. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313(5791): 1287-90.
- Takeda, Y., et al. (2003). Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *J Cell Biol* 161(5): 945-56.
- Tarrant, J. M., L. Robb, A. B. van Spriel and M. D. Wright (2003). Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface. *Trends Immunol* 24(11): 610-7.
- Taylor, T. E., W. J. Fu, R. A. Carr, R. O. Whitten, J. S. Mueller, N. G. Fosiko, S. Lewallen, N. G. Liomba and M. E. Molyneux (2004). Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med* 10(2): 143-5.
- Thumwood, C. M., N. H. Hunt, I. A. Clark and W. B. Cowden (1988). Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria. *Parasitology* 96 ( Pt 3): 579-89.
- Timmann, C., et al. (2007). Genome-wide linkage analysis of malaria infection intensity and mild disease. *PLoS Genet* 3(3): e48.
- Vaishnav, A. K., J. R. Orlinick, J. L. Chu, P. H. Krammer, M. V. Chao and K. B. Elkon (1999). The molecular basis for apoptotic defects in patients with CD95 (Fas/Apo-1) mutations. *J Clin Invest* 103(3): 355-63.
- van der Heyde, H. C., J. Nolan, V. Combes, I. Gramaglia and G. E. Grau (2006). A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol* 22(11): 503-8.
- Vernick, K. D. and A. P. Waters (2004). Genomics and malaria control. *N Engl J Med* 351(18): 1901-4.
- von Kalckreuth, V., J. A. Evans, C. Timmann, D. Kuhn, T. Agbenyega, R. D. Horstmann and J. May (2006). Promoter polymorphism of the anion-exchange protein 1 associated with severe malarial anemia and fatality. *J Infect Dis* 194(7): 949-57.
- Wells, R. A., K. Pavanand, S. Zolyomi, B. Permpnich and R. P. MacDermott (1979). Loss of circulating T lymphocytes with normal levels of B and 'null' lymphocytes in Thai adults with malaria. *Clin Exp Immunol* 35(2): 202-9.
- WHO (2000). Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94 Suppl 1: S1-90.
- Wigginton, J. E., D. J. Cutler and G. R. Abecasis (2005). A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 76(5): 887-93.
- Wirth, D. F. (2002). Biological revelations. *Nature* 419(6906): 495-6.

- Yalaoui, S., et al. (2008). Hepatocyte permissiveness to Plasmodium infection is conveyed by a short and structurally conserved region of the CD81 large extracellular domain. *PLoS Pathog* 4(2): e1000010.
- Yazdani, S. S., P. Mukherjee, V. S. Chauhan and C. E. Chitnis (2006). Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. *Curr Mol Med* 6(2): 187-203.
- Zee, R. Y., N. R. Cook, S. Cheng, R. Reynolds, H. A. Erlich, K. Lindpaintner and P. M. Ridker (2004). Polymorphism in the P-selectin and interleukin-4 genes as determinants of stroke: a population-based, prospective genetic analysis. *Hum Mol Genet* 13(4): 389-96.
- Zhao, J., L. Hyman and C. Moore (1999). Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(2): 405-45.

## Anhang

Tabelle 0-1: Untersuchte Gene und Referenzsequenzen

Gen (Rezeptor)	NCBI Accession	Ensemble Gene ID
SELP (P-Selektin)	NC_000001.9	OTTHUMG00000034685
CD9	NC_000012.10	OTTHUMG00000044400
CD95 (Fas Rezeptor)	NC_000010.9	ENSG00000026103

Tabelle 0-2: Bedingungen für die Amplifikation genomischer DNA

PCR	Annealing Temperatur [°C]	MgCl <sub>2</sub> -Konzentration [mM]	Puffer ± Solution S
<b>SELP</b>			
pselexon-1	55,0	2,5	BD
pselexon-2	56,9	2,5	BD+S
pselexon-3	62,2	2,5	BD+S
pselexon-4	56,0	2,5	B+S
pselexon-5	55,0	1,5	BD
pselexon-6	58,7	2,0	B+S
pselexon-7	58,9	2,5	BD+S
pselexon-8	59,6	1,0	BD+S
pselexon-9	60,0	1,5	BD
pselexon-10	53,5	1,5	B+S
pselexon-11	55,0	1,5	B+S
pselexon-12	55,0	1,5	BD
pselexon-13	52,0	2,0	BD
pselexon-14	57,0	2,5	BD
pselexon-15	53,7	1,5	BD+S
pselexon-16	60,0	2,5	BD
pselexon-17	60,0	3,0	BD
<b>CD9</b>			
cd9_prom1	57,0	1,5	BD+S
cd9_prom2_2	58,0	1,2	BD+S
cd9_ex1	54,0	1,5	BD+S
cd9_ex2	61,0	1,5	BD
cd9_ex3	58,0	2,0	BD+S
cd9_ex4	58,0	2,0	BD+S
cd9_ex5-6	57,0	2,0	BD
cd9_ex7	58,0	2,0	BD+S
cd9_ex8	60,0	2,0	BD
cd9_ex8_2	62,0	2,0	BD+S
<b>CD95</b>			
Fas1	55,0	3,0	BD
Fas2	55,0	3,0	BD
Fas3	60,0	2,0	BD
Fas4	60,0	3,0	BD
Fas5	55,0	2,0	BD
Fas6	55,0	3,0	BD
Fas7	60,0	2,0	BD
Fas8	55,0	2,0	BD
Fas9	60,0	2,0	BD

Tabelle 0-3: PCR-Bedingungen für die Genotypisierung genetischer Varianten

PCR	Annealing Temperatur [°C]	MgCl <sub>2</sub> -Konzentration [mM]	Puffer ± Solution S	Verhältnis for:rev
<b>SELP</b>				
rs3917653	55,0	3,0	BD+S	1:5
rs3917718	55,0	2,0	BD+S	5:1
rs6125	56,0	2,0	BD+S	5:1
rs6131	55,0	1,0	BD+S	5:1
22937	55,0	3,0	BD+S	1:5
rs6133	55,0	2,0	BD	1:10
rs3917856	55,0	2,0	BD+S	1:5
<b>CD9</b>				
Promotor-940	56,0	1,0	B+S	5:1
rs11539945	61,0	1,5	BD+S	1:5
rs797774	58,0	1,0	B+S+DMSO	1:5
Exon 3-32158	58,0	2,0	BD+S	1:5
rs2072372	55,0	1,5	BD+S	1:5
rs3181298	52,0	1,5	BD+S	1:5
rs11568274	55,0	1,5	BD+S	5:1
rs11568275	55,0	1,5	BD+S	1:5
<b>CD95</b>				
rs1800682	55,0	2,0	BD+S	1:5
rs9658676	55,0	1,0	BD+S	1:5
rs3218619	55,0	3,0	BD+S	5:1
rs3218621	55,0	2,0	BD+S	5:1
rs3218614	55,0	2,0	BD+S	1:5

Tabelle 0-4: Oligonukleotide für die Klonierungen und Mutagenese von CD95

Oligonukleotid	Sequenz
fasr_xho1_for	GTTACTCGAGCCACCATGCTGGGCATCTGGACC
fasr_sac2_rev	CAATCCGCGGGACCAAGCTTTGGATTTTCATTTT
pcDNA3.1_for	CCCCTGCTTACTGGCTTATC
pcDNA3.1_rev	GGGGCAAACAACAGATGGCTGGC
CD95-proSE_for	GAGGTACCAAGCTTTTTGGCTACATTTTT
CD95-proE_for	GAGGTACCAAGTAATGATGTCATTATCCAAACATACC
CD95_pro-436_for	GAGGTACCAACGTCTGTGAGCCTCTCATGT
CD95_pro_rev	GAGCTAGCGTTGTTGAGCAATCCTCCGAA
Mut-436_for	CTCACCTGAAGTGAGAATGCCAGCCACTGCAG
Mut-436_rev	CTGCAGTGGCTGGCATTCTCACTTCAGGTGAG
Rvprimer3	CTAGCAAATAGGCTGTCCC
Glprimer2	CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA

Tabelle 0-5: Oligonukleotide für die Re-Sequenzierung

<b>SELP</b>	
pselexon-1_for/rev	TGGTCCTACACATCCCATGG/CTTTCTGAACCTTTACCTGCCTG
pselexon-2_for/rev	AGAAGGAAGCAGAGGGCTTG/GGACAGTTTTCCCATGCCTC
pselexon-3_for/rev	ATACTTGGGATCACGGCCTC/GTATCTTTGTGTTGACTCGGTGG
pselexon-4_for/rev	GAGGGGATGAGTCTGTGGTC/CCATCCTATTCTCACTGGAG
pselexon-5_for/rev	AAATAGTTACAGCTTTTCAGC/AGAAAGCTCATTGTGTCCTC
pselexon-6_for/rev	TGGGAAGGTGTGACTGCTGC/GCACTAAGTAAGGACTGGGTGC
pselexon-7_for/rev	GACCTTTACATCTTGCTAGC/CCGACACTGAGAGCCCTTGG
pselexon-8_for/rev	ACACACTGAAAATGTGGACAGG/TCTCATCCCTGGTCCCAAGC
pselexon-9_for/rev	GCCAATTCAGGAATCCCTG/TCCAGTCCATTTCAAGGTGG

Fortsetzung Tabelle 0-5: Oligonukleotide für die Re-Sequenzierung

<b>SELP</b>	
pselexon-10_for/rev	AGTTACAGAGTTCAGGTTGC/AGATTACCATTGTTGTGGAG
pselexon-11_for/rev	ATGAACTTTGTGTAACACAG/TTTCCAAAAGTAGAACTGTC
pselexon-12_for/rev	TAGCTCTTGCAAGGAGCCTCC/ACTTGCAGGAAGGCAGGTTCC
pselexon-13_for/rev	TCATTTATTGGCAATGTTAG/GGGATGGAAAGCAAGACCAC
pselexon-14_for/rev	TTGTCAGCATTCCCAGGACC/TTTAGGAAGTTCCCTAGGTG
pselexon-15_for/rev	TCTATCCTTAATGACCCTCTC/AAGGAGGCAGGCATTGCATG
pselexon-16_for/rev	CAGAATTCCAAGGGTGGATGG/CTGTGTCCTACTGCCAACAC
pselexon-17_for/rev	CTCCATATGATCCTGTTGTG/AATAGAGGAACACGGCATTG
<b>CD9</b>	
cd9_prom1_for/rev	GTCCGGGAGAAGTCAGATCA/GCGAGGATTTAAAGGGAAGC
cd9_prom2_2_for/rev	ATCTGTCATCCCACCCAGAC/GCATGTGCCGGGAAAA
cd9_ex1_for/rev	ACTAGGCGGGGAAACAGG/CGCACGCCTCATCTCAAG
cd9_ex2_for/rev	CAAGGGTGGTCACAAAGTCC/GCGTGGCTAGAGCAAAGTCC
cd9_ex3_for/rev	AATAAGGAGGTGGGGAGGC/GGTACCTTCCTGACCCCATC
cd9_ex4_for/rev	TCCCAGGGAGTTGTCCTTC/TAAGAGGCCTGGTCAACAGC
cd9_ex5-6_for/rev	GACGTTGTCCAAGCACAGG/ACAGAGGGCCCAAAGTGG
cd9_ex7_for/rev	CTCTGCCACCAGTTCTCC/GGCACGAGGACAAAGTGAG
cd9_ex8_for/rev	CTGGATGCCATTCTCCTTGT/TTCATTGCAGGATTTCTGCTT
cd9_ex8_2_for/rev	TGCATTGCTAGATAAAAGCTGAA/CTGACCAACACGGAGAAACC
<b>CD95</b>	
Fas1_for/rev	GAAAATTGGCCAGGAAATAATG/GGGACTAAGACGGGGTAAGC
Fas2_for/rev	GACCTGCTGCTTTCTTGAG/GGGGAACCAAAAAGTGTAAA
Fas3_for/rev	CTCCCCTTGTTTTAGAAAGAG/CCACAGTAGGCCCAATTTCC
Fas4_for/rev	TGGATCTCAAAAATCCATGC/GGCAAAGCAGGACTAGAACC
Fas5_for/rev	GAATACGTTTGCCAGAGATGC/ACCAAAGTGGTAGCTTTTTATAGG
Fas6_for/rev	GGTCTCCTGCGATGTTTGG/CAAGACTCCATCTCAACAAAATG
Fas7_for/rev	CCTTCTTAATCACTTAATCTAGCTTCC/TGCTGAGCAGGTAGAATTGTATG
Fas8_for/rev	CTGGGTATATGGCAGGATTTG/AAGGTCTTTGAGGTAGAGCCT
Fas9_for/rev	TCTAACTTTGTTTATAACTCTGAGAAG/GGGATCCAAGAAGCATTAAAGA

Tabelle 0-6: Oligonukleotide für die Genotypisierung

Variante	Oligonukleotid	Sequenz
<b>SELP</b>		
<b>rs3917653</b>	selp_prom_for	ATGTACTIONTTAAATTGGAGCTTATATCA
	selp_prom_rev	AGAAATAGTGGTTGCCAAGAG
	selp_prom_sen	CY5-CCTCCAGACCATCTTCCATGG-PHO
	selp_prom_anc	TCCAGGAGTAATTCACCTTGCGCCT-FLU
<b>rs3917718</b>	selp_ex4_for	TGTCCATGACTCTGACCTTTCC
	selp_ex4_rev	GCCTCACCGTATTCACATT
	selp_ex4_sen	GCAGGTGTAGTTCCCGATGG-FLU
	selp_ex4_anc	CY5-CTCGAGGCACTCTCCTTGTTGCTGC-PHO
<b>rs6125</b>	selp_lt2_ex5_for	GTGAGAGAGTGTGGAGAAC
	selp_lt2_ex5_rev	CCATTTACTTGGTACCCGTC
	selp_ex5_sen	CY5-ATGAGCACGTGTTGAGGGAG-PHO
	selp_ex5_anc	TTCCAGAGGGTGGCTGCAGTT-FLU
<b>rs6131</b>	selp_ex7_for	TCCAGCTGTGCAGTGTC
	selp_ex7_rev	CGGGCTGGCACTCAAATTTA
	selp_ex7_sen	CY5-TTCACTGGGGGCTTCCAGG-PHO
	selp_ex7_anc	TGAGCGGATGAACACAGTCCATGGTTC-FLU
<b>22937</b>	selp_ex9_for	GACACTAGAAAGAGTTAATGGTCAA
	selp_ex9_rev	GTACCTAAAGGCACCGAAG
	selp_ex9_sen	TTATTCCTTACTTCCCTCATCCCTCAGC-FLU
	selp_ex9_anc	CY5-TTGCAGTGCCAGGATCTCCAGTTC-PHO

Fortsetzung Tabelle 0-6: Oligonukleotide für die Genotypisierung

Variante	Oligonukleotid	Sequenz
<b>SELP</b>		
<b>rs6133</b>	selp_ex12_for	TAGCCTTAACTCTGTTAACGC
	selp_ex12_rev	AGCCAAAGTAACAAGTGGTATT
	selp_ex12_sen	CY5-TGCACCCCTGGAGTAGGAAG-PHO
	selp_ex12_anc	CAGGAGTGGTGAGGGCTGGACA-FLU
<b>rs3917856</b>	selp_ex17_for	CTGTTTCCTGAGTTTGGGAT
	selp_ex17_rev	GGTCTTCTTGTGAGTCAGATG
	selp_ex17_sen	AGCCACAGAAGCCAGGAG-FLU
	selp_ex17_anc	CY5-AAATGTTTCTGCAGTAGTCTCTGTGCTTTGACT-PHO
<b>CD9</b>		
<b>-940</b>	CD9_prom1-F	GTCCGGGAGAAAGTCAGATCA
	CD9_prom1-R	GCGAGGATTTAAAGGGAAGC
	CD9-940Avs3	Cy5-TTCTCCTGAGCTCACAACTTTCTGTAGCT-PHO
	CD9-940Svs3	GCCGAGCGGGAGC-FLU
<b>rs11539945</b>	CD9_rs.9945-F	CTTTTCCCGGCACATGCGCACC
	CD9_rs.9945-R	GGTGGGCCCTGAGAGGAGCGC
	CD9_rs.9945-A	CY5-CCCAGCTGCGCGCG-PHO
	CD9_rs.9945-S	CGCCAGGTCCCGCCA-FLU
<b>rs797774</b>	CD9_rs.7774-F	TGCTGTTTCGGATTTAACTTCATC
	CD9_rs.7774-R	GCGAGCTAAAGTGCTCAGGACC
	CD9_rs.7774-A_vs2	CY5-CCGGGCGGGACGGC-PHO
	CD9_rs.7774-S_vs2	CTCCAAGGCCGGGTCCA-FLU
<b>ex3nt201</b>	CD9_ex3-F	AATAAGGAGGTGGGGAGGC
	CD9_ex3-R	GGACAGCTCATGCCCTTTGG
	CD9_ex3-A	CY5-CATGATGCTGGTGGGCTTCCT-PHO
	CD9_ex3-S	TCGGAGCCGGCGCC-FLU
<b>rs2072372</b>	CD9_rs.2372-F	GCTGAAAGCCATCCACTATGC
	CD9_rs.2372-R	TCTGAGATAAACTGTTCCACGC
	CD9_rs.2372-A	CY5-TCATCCCCTCCCTGCCTTCTCG-PHO
	CD9_rs.2372-S	TAATCGTCTTCTTACAATTTGTTTC-FLU
<b>rs318129</b>	CD9_rs.1298-F	ACCGTGAAGGTAAACTCAGAC
	CD9_rs.1298-R	CCAAAGTGGGAGAGAAAGAGATG
	CD9_rs.1298-A	CY5-TTCTGCCTGTGAAAGGGCCCCAGGG-PHO
	CD9_rs.1298-S	CCAAGTGCTGCTTCAACAAGACC-FLU
<b>rs11568274</b>	CD9_rs.8274-F	TGCTTCAGCACCTTCTGACTC
	CD9_rs.8274-R	ACTGAAGATCATGCCAAATATCTAGG
	CD9_rs.8274-A	CY5-ATGGGTCACCCAGTCCAAGAAAAATGACAAGGAG-PHO
	CD9_rs.8274-S	GCTGAGGGAAAGGGAGAG-FLU
<b>rs11568275</b>	CD9_rs.8275-F	TGCTTCAGCACCTTCTGACTC
	CD9_rs.8275-R	ACTGAAGATCATGCCAAATATCTAGG
	CD9_rs.8275-A	CY5-CCACCCTGATCCTCATGTTTCTTCCTATC-PHO
	CD9_rs.8275-S	CTCAGCCTTCCTTCACATCA-FLU
<b>CD95</b>		
<b>rs9658676</b>	Fas_1211_for	CTCCTTCAAGACCTCCC
	Fas_1211_rev	GGTTCGTTGCACAAATGG
	Fas_1211_sen	TCCTCACCTGAAGTGAGCATGC-FLU
	Fas_1211_anc	CY5-GCCACTGCAGGAACGCCCG-PHO
<b>rs3218619</b>	Fas_rs*8619_for	TGGGTTACACTTGTTTACCAC
	Fas_rs*8619_rev	CTGTAGTAACAGTCTTCCTCAAT
	Fas_rs*8619_sen	CY5-CTAGCAACAGACGTAAAGAACCTGTAAAA-PHO
	Fas_rs*8619_anc	GTCAGTCACTTGGGCATTAACACTTTTGGACGATA-FLU
<b>rs3218614</b>	Fas4_2_for	CATAGTCTGCTTATAATTAGCCG
	Fas4_2_rev	CTTACTTGGTGCAAGGGTCA
	Fas_rs*8614_sen	CY5-GGACCCAGAATACCAAGTGCA-PHO
	Fas_rs*8614_anc	GATTTTCTAGGCTTAGAAGTGGAATAAACTGCAC-FLU



---

**Fortsetzung Tabelle 0-6: Oligonukleotide für die Genotypisierung**


---

Variante	Oligonukleotid	Sequenz
<i>CD95</i>		
<b>rs1800682</b>	Fas_976_rev	TCAGAGAAAGACTTGCGGG
	Fas_976_for	TGCGATTTGGCTTAAGTTGTTAG
	Fas_976_sen	GTAACTGTCCATTCCAGGAAC-FLU
	Fas_976_anc	CY5-CTGTGAGCCTCTCATGTTGCAG-PHO
<b>rs3218621</b>	fas6.2_sen	TCCAAGTTCTGAGTCTCAAC-FLU
	fas6.2_anc	CY5-GTAGTAACAGTCTTCCTCAATTCCAATCCC-PHO
	fas6.2_for	TGCCCAAGTGACTGACAT
	fas6.2_rev	CTGGAGGACAGGGCTTAT

---