

**Aus dem**  
**Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin**

Vorstandsvorsitzender: Prof. Dr. Rolf Horstmann

***IL-3*-Polymorphismen und Infektionsdynamik von**  
**Plasmodieninfektionen bei Kindern aus der Ashanti-Region, Ghana**

**Promotion**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich der Universität Hamburg vorgelegt von

Maria Helena Calixto Fernandes

geboren am 19.05.1982 in Serra do Navio, Brasilien

Hamburg im Jahre 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am 23.04.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

|                                         |                               |
|-----------------------------------------|-------------------------------|
| Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: | Prof. Dr. Jürgen May          |
| Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:     | Prof. Dr. Christian Meyer     |
| Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:     | Prof. Dr. Martin Aepfelbacher |

meinem geliebten und unvergessenen Vater

|            |                                                                               |           |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung</b>                                                             | <b>7</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Zielsetzung der Arbeit</b>                                                 | <b>7</b>  |
| <b>1.2</b> | <b>Malaria: Einführung und Epidemiologie</b>                                  | <b>8</b>  |
| <b>1.3</b> | <b>Infektion mit <i>P. falciparum</i></b>                                     | <b>9</b>  |
| 1.3.1      | Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i> und Pathogenese der Malaria             | 9         |
| 1.3.2      | Klinik der Malaria tropica                                                    | 12        |
| 1.3.3      | Immunität gegen Malaria                                                       | 13        |
| <b>1.4</b> | <b>Malaria und genetische Wirtsfaktoren</b>                                   | <b>14</b> |
| 1.4.1      | Wirtsgenetischer Einfluss auf Malaria                                         | 14        |
| 1.4.2      | Genetische Interaktion zwischen Malaria und dem Immunsystem                   | 17        |
| <b>1.5</b> | <b><i>Interleukin-3</i></b>                                                   | <b>19</b> |
| 1.5.1      | Struktur und Funktion des Interleukin-3                                       | 19        |
| 1.5.2      | Genomische Organisation des <i>Interleukin-3</i> -Gens                        | 21        |
| 1.5.3      | Assoziationen von <i>Interleukin-3</i> -Allelen mit spezifischen Erkrankungen | 21        |
| 1.5.4      | Interaktionen zwischen Interleukin-3-Protein und Malariaerregern              | 22        |
| <b>2</b>   | <b>Probanden, Material und Methoden</b>                                       | <b>24</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Herkunft und Einteilung der Probanden</b>                                  | <b>24</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Studienablauf</b>                                                          | <b>25</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Phänotypen</b>                                                             | <b>25</b> |
| <b>2.4</b> | <b>Erhebung sozioökonomischer Indikatoren</b>                                 | <b>26</b> |
| <b>2.5</b> | <b>Abnahme von Blutproben</b>                                                 | <b>27</b> |
| <b>2.6</b> | <b>Laborverfahren</b>                                                         | <b>28</b> |
| 2.6.1      | Präparation genomischer DNS                                                   | 28        |
| 2.6.2      | Oligonukleotide                                                               | 28        |
| 2.6.3      | Amplifikation von Interleukin-3-Abschnitten durch Polymerase-Kettenreaktion   | 28        |
| 2.6.4      | Analyse der Amplifikationsprodukte                                            | 31        |
| 2.6.5      | Aufreinigung der PCR-Produkte                                                 | 31        |
| 2.6.6      | Typisierung ausgesuchter <i>Interleukin-3</i> -Abschnitte                     | 31        |
| 2.6.7      | Auswertung der Sequenzen                                                      | 32        |
| 2.6.8      | Detektion der ausgesuchten Varianten durch FRET-Hybridisierungs-Technik       | 32        |

|                                                                                                                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.7 Auswahl der SNPs</b>                                                                                                                                                 | <b>34</b> |
| 2.7.1 Auswahlkriterien der SNPs                                                                                                                                             | 34        |
| 2.7.2 Verteilung und Frequenzen der untersuchten <i>Interleukin-3</i> -Allele                                                                                               | 35        |
| <b>2.8 Datenverarbeitung</b>                                                                                                                                                | <b>36</b> |
| <b>2.9 Statistische Auswertung</b>                                                                                                                                          | <b>36</b> |
| <b>3 Ergebnisse</b>                                                                                                                                                         | <b>38</b> |
| <b>3.1 Analyse der sozioökonomischen Faktoren</b>                                                                                                                           | <b>38</b> |
| <b>3.2 Assoziationen von <i>Interleukin-3</i>-SNPs mit Malaria</b>                                                                                                          | <b>41</b> |
| 3.2.1 Qualität der Daten und HWG                                                                                                                                            | 41        |
| 3.2.2 Analyse der Genotypenverteilung ausgewählter <i>Interleukin-3</i> -SNPs bei milder klinischer Malaria, <i>P.-falciparum</i> -Parasitämie und Malaria-bedingter Anämie | 42        |
| 3.2.2.1 Multivariante Analyse                                                                                                                                               | 45        |
| 3.2.2.1.1 Signale (p-Werte) multivarianter Analyse                                                                                                                          | 44        |
| 3.2.2.1.2 Relatives Risiko (RR) des <i>Interleukin-3</i> -SNP rs40401                                                                                                       | 45        |
| 3.2.2.2 Kumulative Inzidenz von <i>Interleukin-3</i> rs40401 bei milder klinischer Malaria                                                                                  | 49        |
| 3.2.2.3 TDT und qTDT von <i>Interleukin-3</i> rs40401 bei milder klinischer Malaria                                                                                         | 50        |
| 3.2.2.4 TDT und qTDT von den übrigen <i>Interleukin-3</i> -SNPs bei milder klinischer Malaria                                                                               | 51        |
| 3.2.2.5 Höhe der <i>P.-falciparum</i> -Parasitämie und <i>Interleukin-3</i> rs40401                                                                                         | 51        |
| <b>4 Diskussion</b>                                                                                                                                                         | <b>53</b> |
| <b>4.1 Kritische Bewertung der verwendeten Methodik</b>                                                                                                                     | <b>53</b> |
| 4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)                                                                                                                                       | 53        |
| 4.1.2 Automatische Sequenzierung                                                                                                                                            | 53        |
| 4.1.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)                                                                                                                          | 53        |
| 4.1.4 Management und Eingabe der Daten                                                                                                                                      | 54        |
| 4.1.5 Studiendesign und Statistik                                                                                                                                           | 54        |
| <b>4.2 Diskussion der Studiengruppe</b>                                                                                                                                     | <b>56</b> |
| <b>4.3 Die untersuchten <i>Interleukin-3</i>-Polymorphismen</b>                                                                                                             | <b>57</b> |
| 4.3.1 Funktion der untersuchten <i>Interleukin-3</i> -Polymorphismen                                                                                                        | 58        |

|                                                                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.4 Bedeutungen des <i>Interleukin-3</i>-Gens im Zusammenhang mit Malaria</b>                                         | <b>59</b> |
| 4.4.1 Assoziation von <i>Interleukin-3</i> rs40401 und <i>P.-falciparum</i> -Parasitämie sowie klinischer milder Malaria | 60        |
| 4.4.2 Assoziation von <i>Interleukin-3</i> rs40401 und Malaria-bedingter Anämie                                          | 61        |
| <b>5 Zusammenfassung</b>                                                                                                 | <b>63</b> |
| <b>6 Anhang</b>                                                                                                          | <b>64</b> |
| <b>6.1 Abkürzungen</b>                                                                                                   | <b>64</b> |
| <b>6.2 Hersteller</b>                                                                                                    | <b>66</b> |
| <b>7 Literaturverzeichnis</b>                                                                                            | <b>67</b> |
| <b>8 Eigene Publikation</b>                                                                                              | <b>79</b> |
| <b>9 Danksagung</b>                                                                                                      | <b>80</b> |
| <b>10 Lebenslauf</b>                                                                                                     | <b>81</b> |

## 1 Einleitung

### 1.1 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der Promotionsarbeit war, den Zusammenhang zwischen Einzelmutationen des auf der Chromosomenregion 5q31 gelegenen *Interleukin-3*-Gens (*IL-3*) und dem Zeitpunkt und der Infektionsdynamik der ersten Plasmodien-Infektionen von Kindern aus einer holoendemischen Region West-Afrikas zu untersuchen.

Es wird angenommen, dass die hohe Mortalität der Malaria vor dem reproduktiven Alter einen bedeutenden Selektionsdruck auf das humane Genom ausgeübt hat. Zeitpunkt und Verlauf der ersten Infektionen mit *Plasmodium falciparum* im Kleinkindalter sind entscheidend für das Risiko des Auftretens einer schweren Malaria tropica. Die Arbeitshypothese ist, dass Zeitpunkt der ersten Plasmodium-Infektion und Dynamik folgender Infektionen von genetischen Wirtsfaktoren abhängen. Um solche Genvarianten zu identifizieren und damit die Hypothese zu überprüfen, wurde eine molekularbiologische Typisierung von Varianten des *IL-3*-Gens durchgeführt, die möglicherweise für eine Parasitämie mit *P. falciparum*, eine milde klinische Malaria, und eine Malaria-bedingte Anämie prädisponieren oder vor diesen Ausprägungen schützen können.

Das Gen von *IL-3* wurde aus der Chromosomenregion 5q31-33 ausgewählt, die in Segregationsanalysen mit der Kontrolle von Parasitämie und Reinfektionsdynamik bei jüngeren Individuen assoziiert wurde. Der beobachtete Einfluss wurde einem komplexen genetischen Faktor zugeschrieben und war bei jüngeren Individuen stärker assoziiert als bei älteren Kindern. Neben dem Alter der ersten Infektionen zählt auch der damit verbundene immunologische Status der infizierten Kinder als wichtiger Faktor für den Verlauf der Malariapathogenese [1-3]. Dieser Einfluss ist in Fall-Kontroll- und Querschnitts-Studien schwierig zu untersuchen. Auch in murinen Modellen ist dieser Aspekt nicht experimentell zu analysieren. Longitudinale Studien mit Patienten, wie in dieser Arbeit beschrieben, sind adäquat für die Untersuchung von Risikofaktoren der milden Malaria in den ersten Lebensjahren.

Die Assoziationsanalysen fanden anhand von Daten einer klinisch-epidemiologischen Kohortenstudie mit 1070 Kindern statt, die im Alter von drei Monaten rekrutiert worden sind und über einen Zeitraum von zwei Jahren in einem Gebiet Ghanas untersucht wurden.

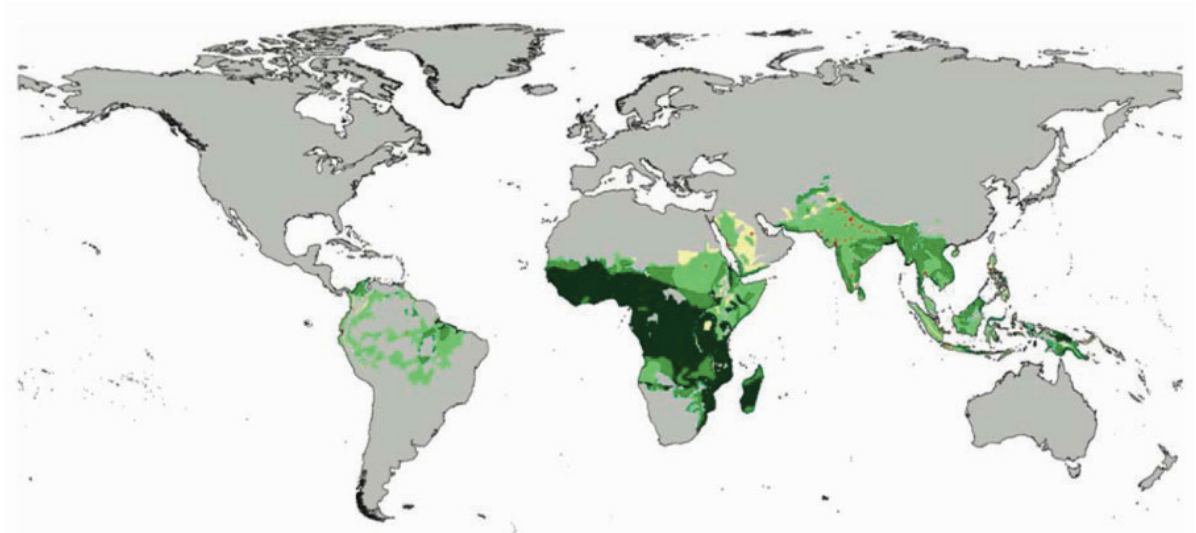
## 1.2 Malaria: Einführung und Epidemiologie

Malaria ist die wichtigste parasitäre Erkrankung des Menschen und gehört zu den Infektionserkrankungen mit der höchsten Morbidität und Mortalität weltweit. Die Malaria betrifft vor allem die Bevölkerung von Ressourcen-armen Ländern mit einem für die Transmission der Parasiten günstigen Klima [4] und ist endemisch in Süd-Ostasien, Südamerika, Ozeanien und Afrika (Abb. 1).

Die Mortalität der Malaria akkurat zu bestimmen ist problematisch. Die meisten Todesfälle einer Malaria geschehen zu Hause und die Informationen über die Todesursache werden meist in Form von Befragungen *post-mortem* erhoben, was eine ungenaue Methode darstellt [5]. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) deuten auf 225 Millionen Erkrankungsfälle weltweit im Jahr 2009 hin. Etwa 781 Tausend Todesfälle wurden registriert, davon 91% in Afrika. Im selben Jahr betrafen 85% der Malariatodesfälle weltweit Kinder unter 5 Jahren [6]. Malaria ist 2008 verantwortlich für 8% der globalen Todesfälle und 27% der Todesfälle in Afrika von Kindern unter 5 Jahren gewesen [7]. Die indirekten Auswirkungen von Malaria auf andere Infektionskrankheiten sowie Anämie und die Ernährungssituation führen zu weiteren Todesfällen [8]. Neben jungen Kindern stellen Schwangere eine weitere wichtige Risikogruppe für die Erkrankung an *P.-falciparum*-Malaria dar. Besonders bei Erstschwangeren führt Malaria zu schwerer Anämie, niedrigem Geburtsgewicht und Frühgeburtlichkeit [9].

Die Entwicklung von Medikamentenresistenzen verstärkt die Mortalität und Morbidität der Malaria. Bedeutsam ist vor allem die Zunahme der Resistenz gegen Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin, welche als sehr preiswerte antiplasmodiale Medikamente in Afrika weitreichende Anwendung finden [10,11].



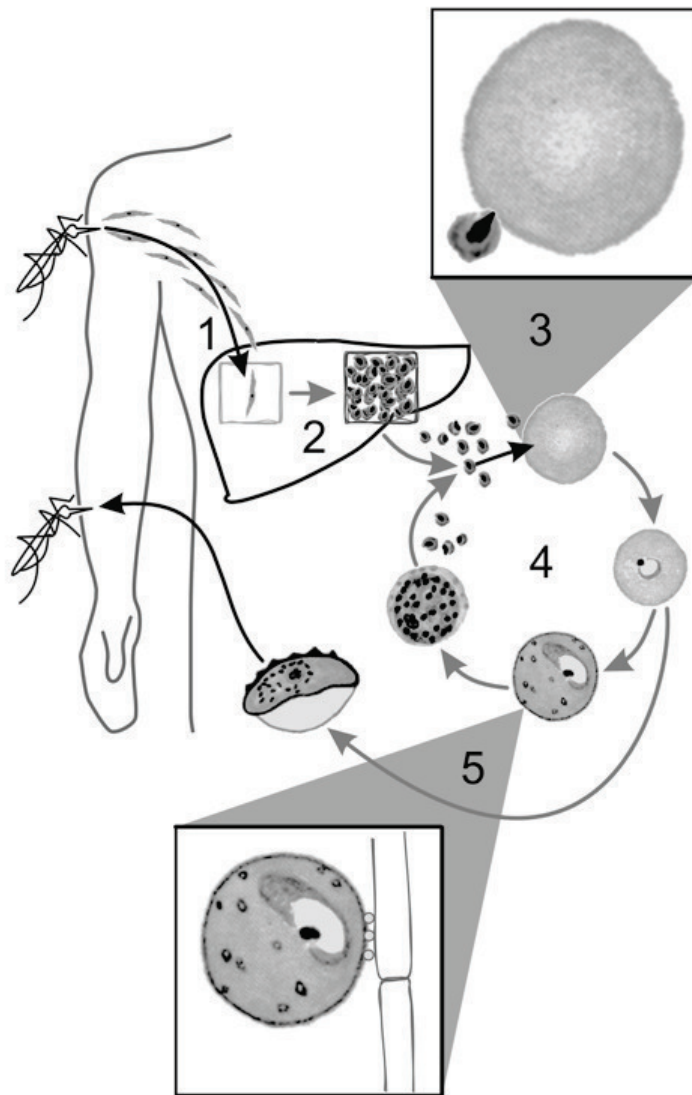


**Abb. 1** Einteilung der Malaria-Endemiegebiete; hellgrün: hypoendemische Gebiete (Infektionsprävalenz bei Kindern  $\leq 10\%$ ); grün: mesoendemische Gebiete (Infektionsprävalenz bei Kindern 11 – 50%); dunkelgrün: holo- und hyperendemische Gebiete (Infektionsprävalenz bei Kindern  $> 50\%$ ); gelb: unklassifizierte Gebiete (Grafik nach Snow *et al.*, 2005 [4]).

### 1.3 Infektion mit *P. falciparum*

#### 1.3.1 Lebenszyklus von *P. falciparum* und Pathogenese der Malaria

Die Malaria ist eine parasitäre Infektion, deren Transmission über den Stich von infizierten weiblichen Anopheles-Moskitos erfolgt und durch Protozoen des Genus *Plasmodium* verursacht wird. Neben *P. falciparum* (Malaria tropica), zählen auch *P. vivax* (Malaria tertiana), *P. ovale* (Malaria tertiana), *P. malariae* (Malaria quartana) und *P. knowlesi* zu den humanpathogenen Malariaparasiten.



**Abb. 2** Lebenszyklus des *Plasmodiums* im Menschen (freundlicherweise vom Klaus Jürries zur Verfügung gestellt).

Durch den Stich der Mücke wird während der Blutmahlzeit Speichel in die menschliche Blutbahn inokuliert, welcher Sporozoiten enthält, die dann innerhalb von wenigen Minuten in Hepatozyten eindringen. Dort können die Sporozoyten sich 9-16 Tagen aufhalten [12]. Jeder Sporozoyt bildet von zehn bis zu mehreren tausend intrazellulären Merozoiten aus (exoerythrozytäre Schizogonie). Kürzlich wurde in einer Studie mit *P. berghei* entdeckt, dass die Parasiten über sogenannte Merosomen durch den Disséschen Raum in die Leberkapillaren geschleust werden [13].

Gefolgt wird die Gewebsschizogonie von der erythrozytären Schizogonie, die mit der komplexen Invasion der roten Blutkörperchen anfängt. Merozoiten binden an Oberflächenmoleküle von Erythrozyten und dringen in die Zelle ein. Im infizierten Erythrozyten durchläuft der Parasit verschiedene Entwicklungsstadien und repliziert sich. Die durch die Lyse infizierter Erythrozyten freigesetzten Merozoiten können weitere nicht infizierte Erythrozyten befallen. Die Parasitenfreisetzung ist die Ursache der fieberhaften Episoden. Die asexuelle Parasitenzahl im Blut ist ein Maß der Infektionsintensität [14].

Die in befallenen Erythrozyten exprimierten Plasmodienantigene und -toxine, wie beispielsweise das Glycosylphosphatidylinositol-Membranprotein [15] und Malariapigment [16], stimulieren die endogene Produktion vom Tumornekrosen-Faktor- $\alpha$  und anderen proinflammatorischen Zytokinen (zum Beispiel bestimmte Interleukine, Interferon- $\gamma$ , und Lymphotoxin- $\alpha$ ) in pathologischen Mengen über T-Zellen und Makrophagen, die zu der klinischen Manifestation der Erkrankung beitragen [17]. In geringe Mengen haben proinflammatorische Zytokine und Mediatoren einen protektiven, antiparasitären Effekt. Werden sie überproduziert, tragen sie zur Pathologie der Infektion bei. Die Überproduktion von Zytokinen führt sowohl zu Fieberentwicklung als auch zu erhöhter Zytoadhärenz, abnormer Erythropoese und Bewußtseinstörungen. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird bei Infektion mit dem *P. falciparum* stark exprimiert, bewirkt eine lokale Stickstoff-Monoxid (NO)-Konzentration im Gewebe und wird mit zerebralen Symptome und immun-suppressiven Effekten assoziiert [18,19]. Andererseits wurde beschrieben, dass hohe systemische NO-Konzentrationen bei afrikanischen Kindern vor schweren Verläufen der Malaria geschützt hat [20]. Eine besondere Rolle spielt Glycosyl-Phosphatidylinositol, welches in Makrophagen die Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-1 und iNOS [21] sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen wie *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) [22] stimuliert.

Nach Durchlaufen mehrerer Entwicklungsstadien, differenziert sich ein Teil der neugebildeten Merozoiten zu Mikro- und Makrogametozyten, welche nach einem Stich einer *Anopheles*-Mücke in den Gastrointestinaltrakt des Insektes aufgenommen werden. In der Mücke findet die sexuelle Reproduktion statt. Der Mückenzyklus wird mit der zu den Speicheldrüsen gewanderten neugebildeten Sporozoiten abgeschlossen [23].

### 1.3.2 Klinik der Malaria tropica

Die fünf verschiedenen Plasmodien unterscheiden sich in Morphologie, Wirtsimmunantwort, Ausbreitungstendenzen, und Ansprechbarkeit auf medikamentöse Behandlung. Gemeinsam neigen sie zu febrilen Episoden und zum periodischen Paroxysm mit Schüttelfrost und Schweissausbruch. Weitere Symptome - Kopf- und Gliederschmerzen, Übelkeit, Schwäche und Prostration - werden auch beobachtet [24]. Jedoch ist *P. falciparum* der klinisch bedeutsamste und gefährlichste Erreger der Malaria.

Die klinische Manifestation der Malaria basiert auf folgenden Mechanismen: der Erythrozytenlyse mit Freisetzung von parasitären und erythrozytären Bestandteilen in den Blutkreislauf, Minderperfusion lebenswichtiger Organe sowie der Begleitreaktionen des Organismus auf diese Vorgänge. Die Klinik zeigt sich als milde Form einer akuten fieberhaften Episode und Anämie, oder als schwere Form, welche ein komplexes Syndrom mit lebensbedrohlichen Komplikationen beinhaltet [25] und bei Kindern bereits nach 1-2 Tagen auftreten kann [26]. Unterschiedliche Komplikationen, wie Bewusstseinstörung bis hin zum Koma, schwerer Anämie sowie metabolische Azidose und Hypoglykämie, können auftreten [27]. Das Koma wird als Symptom einer zerebralen Malaria gedeutet und entsteht infolge einer Sequestrierung parasitierter und auch nicht parasitierter roter Blutkörperchen (Rosettenbildung), die auf die mikrovaskuläre Adhärenz infizierter Erythrozyten an bestimmten Kapillarendothelzellenrezeptoren zurückzuführen ist [27,28].

Ablauf und Ausprägung variieren in Abhängigkeit von Parasit (Ausmaß der Parasitämie, Stämme) und Patient (aktueller Immunstatus und Ernährungszustand, sowie von Alter, Chemoprophylaxe und Therapie). Zu der Arbeitsdefinition der WHO eines Malariafalles gelten „Fieber mit Parasitämie“, welche antimalarisch therapiert werden sollten [6].

Besorgniserregend ist die schwere Form der Malaria, welche in endemischen Gebieten zwischen 1-2% der Einwohner befällt [29]. Unter Betrachtung wirtschaftlicher Faktoren und quantitativer Morbidität steht wiederum die milde Malaria im Vordergrund [4,30, 31].

Bei deutlicher Parasitämie trägt die Lyse der infizierten Erythrozyten am Ende der Blutschizogonie zum zweiten Hauptmerkmal der milden Malaria bei: der Anämie. In endemischen Gebieten befällt sie vor allem Kleinkinder [32] und kann sich als

chronische, subakute oder akute, zum Teil sogar lebensbedrohliche Form, manifestieren [25]. Ihre Pathogenese ist multifaktoriell und kann sowohl eine intravaskuläre Hämolyse, als auch eine makrophagische Zerstörung von infizierten und nicht infizierten Erythrozyten und Knochenmarksdysfunktion beinhalten [33].

### 1.3.3 Immunität gegen Malaria

Bei kontinuierlicher Parasitenexposition und häufigen Infektionen werden körpereigene Abwehrmechanismen aktiviert und Antikörper gegen die verschiedenen Entwicklungsstadien der Parasiten ausgebildet. Die Mechanismen der Teilimmunität sind sowohl spezies- als auch stadienspezifisch [34] und die Variation der ausgeschütteten Immunglobulinmenge ist alters- und expositionsabhängig [35].

Die Zielpopulation unserer Studie bewohnt die Ashanti-Region in Zentralghana, ein holoendemisches Gebiet für Malaria, in dem ihre Transmission relativ stabil ist. Dort liegt eine hohe Erkrankungsprävalenz im frühen Kindesalter. Bei älteren Kindern treten gehäuft asymptomatischer Parasitämien auf, als Resultat einer partiellen Immunität, die bei Bewohnern endemischer Gebiete in den ersten Lebensjahren ausgebildet wird [36]. Davon ist die Leihimmunität Neugeborener und das hohe Maß an fetalem Hämoglobin in den ersten Monaten zu differenzieren, weshalb Säuglinge in den ersten 3-6 Monaten nur selten an einer Malaria erkranken [37]. Nach kontinuierlichem Nachlassen dieses protektiven Effekts sind die Kinder in den ersten Lebensjahren besonders für schwere Verlaufsformen der Malaria anfällig.

Die Malaria bei Erwachsenen ist meist chronisch und oft durch einen Zustand als asymptomatische Parasitenträger gekennzeichnet [38]. Diese Form der Immunität gegen Plasmodien ist unvollständig und auf regelmäßige Neuinfektionen angewiesen, weshalb sie als Teilimmunität bezeichnet wird. Eine gleichzeitige Koinfektion mit Helminthen kommt in tropischen Gebieten häufig vor und moduliert die Immunantwort auf Malariaparasiten zu einer stärkeren antiinflammatorischen Wirkung [39].

Vermutlich wird die Teilimmunität in einem zweistufigen Mechanismus aufgebaut: jener der klinischen Immunität und der der antiparasitären Immunität. Zuerst entwickelt sich die klinische Immunität, in der pyrogenen Effekte der Malaria-Toxine neutralisiert werden. Im pre-erythrozytären Stadium zeigt sich eine kleine, natürlich erworbene Immunität, die anscheinend CD4+ und CD8+ involviert und Ziel von

Vakzinentestungen ist [40]. Die klinische Immunität kann erneut in zwei Typen unterteilt werden: solche, welche das Risiko eines Malaria-Todesfalles verringert und eine weitere, die die Intensität klinischer Symptomen reduziert [24]. Nach parasitärer Stimulation kommt es zur Bildung von Antikörpern gegen lösliche Malaria-Toxine und Malaria-Antigene, daraus resultiert eine übermäßige Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen, die Zytokine freisetzen [41] und zur weiteren Aktivierung von wirtseigenen Monozyten, neutrophilen Granulozyten, T-Zellen und natürlichen Killerzellen beitragen. Sie nehmen an der Immunantwort der Leber- und Blutstadien teil [42]. Hohe Titer an anti-GPI-Antikörpern werden mit klinischer Immunität gegen Malaria assoziiert [43]. Die erhöhte Produktion von IFN- $\gamma$  über TH1-Zellen im Blutstadium wird vermutlich zu einer überwiegend antiinflammatorischen Antwort umgeschaltet. Hohe IFN- $\gamma$ -Titer werden bei symptomatischen Kindern beobachtet und können vermutlich die Parasitenreplikation bei Malaria limitieren und somit die Krankheitsprogression minimieren [35]. Bei Patienten mit ausgebildeter klinischer Immunität wurden in vitro niedrige IFN- $\gamma$ -Titer nach Stimulation mit Malaria-Antigen festgestellt [44]. Zudem zeigte die Induktion der antiinflammatorischer Zytokine, TGF- $\beta$ , im murinen Modell, eine protektive Immunantwort mit langsamem Parasitenwachstum in der Frühinfektion und eine verringerte Pathologie der Malaria in der Spätinfektion [45]. Die Eliminierung von infizierten Hepatozyten wird von der zellulären Immunantwort unterstützt und vermittelt einen Schutz vor hohen Parasitämien. Die anti-parasitäre Immunität wird sehr langsam erworben, da die Parasiten genetisch und antigenisch unterschiedlich sind [24]. Weiterhin können bestimmte genetische Wirtsfaktoren einen natürlichen Schutz vor Malaria vermitteln.

## **1.4 Malaria und genetische Wirtsfaktoren**

### **1.4.1 Wirtsgenetischer Einfluss auf Malaria**

Der Einfluss der Humangenetik auf die Ausprägung der Malaria ist seit Jahrzehnten bekannt. Genomweite Studien oder die Analyse von Kandidatengenen stellen einen Weg zur Identifizierung des molekulargenetischen Fundaments des Immunabwehr gegen Malaria dar und decken den Zusammenhang zwischen genetischer Prädisposition und Malaria auf.

In genomweiten Studien werden Millionen Basenpaare sequenziert, in der Hoffnung unbekannte Zusammenhänge zu entdecken, die vor allem zur Klassifizierung klinischer Entitäten beitragen können. Am besten eignen sich zur Untersuchung die Allele, welche die grössten Frequenzenunterschiede zwischen den Hauptbevölkerungsgruppen zeigen. Wenn der Einfluss einer bestimmten Basensequenz auf den Verlauf einer Erkrankung hindeutet, bezeichnet man das entsprechende Gen als Kandidatengen.

Zahlreiche Evidenzen deuten auf ethnische Unterschiede in Suszeptibilität und Resistenz gegenüber Malaria und zu diversen genetischen Adaptationen von Malaria hin, insbesondere in Genen, die in Immunität, Entzündung und Zelladhäsion involviert sind [46]. Es wird angenommen, dass die Infektion einen bedeutenden Selektionsdruck auf das humane Genom ausübt, da die Höchstinfectionsrate und Resistenzentwicklung der *P.-falciparum*-Malaria vor der Pubertät stattfindet [47]. Die Protektion bestimmter genetischer Polymorphismen gegen Auswirkungen der Malaria hat zur Selektion dieser Varianten geführt.

Schon in 1948 schrieb Haldane die so genannte „Malaria Hypothese“, um die hohe Frequenzen von Thalassämie in dem damaligen Malariaendemiegebiet des Mittelmeerraums zu erklären: Krankheiten wie Thalassämie stellen balancierte Polymorphismen dar, in welchen der physiologische Nachteil sich mit dem Schutz, den er vor einer Infektionskrankheit bietet, ausgleicht [48]. Letztlich bietet er so einen selektiven Vorteil für das Überleben in Endemiegebieten.

Erblichkeitsschätzungen und Zwillingsstudien bestätigten den Einfluss der Wirtsgenetik auf die milde Form der Malaria [4], die Parasitämie [1,2,3] sowie die Immunantwort auf Malaria [49,50], welche bei jüngeren Individuen stärker ausgeprägt war als bei älteren Kindern [51,52,53]. In burkinische Familien wurden die milde Malaria und die Histokompatibilitätskomplexregion (TNF Genlocus) stark miteinander assoziiert und die genetische Variation innerhalb TNF scheint die Suszeptibilität zu milder Malaria zu beeinflussen [54].

Markeranalysen zeigten einen Einfluss von Varianten des Zytokin-Genclusters 5q31-33, auf die Parasitämie [1,2,3]. Die Chromosomenregion 5q31-33 wurde zuvor bei einer Segregationsanalyse in brasilianischen Familien mit einem Locus assoziiert, der Infektionsintensität, definiert als Höhe fäkaler Eiern, bei *Schistosoma mansoni* kontrolliert [55]. Dies weist darauf hin, dass gleiche Gene die Infektionsintensität



verschiedener Krankheitserreger beeinflussen. Dazu zeigten Studien mit atopischen Familien eine Verlinkung von 5q zu rezessiv vererbtem erhöhten IgE Niveau [56,57]. Verschiedene Gene sind involviert in der Suszeptibilität und/oder Resistenz zur Malaria und sie interagieren mit umweltbedingten Variablen und genetischen Faktoren der Parasiten. Für die Mengeneinschätzung der Suszeptibilität und Resistenz können quantitative Phänotypen gemessen werden, welche nach wiederholten Messungen innerhalb der Studienbevölkerung ermittelt werden. Unter den verschiedenen ethnischen Gruppen, die zum Teil sogar dasselbe Gebiet bewohnen, kann auch die Resistenz gegen Malaria variieren.

Zu den wichtigsten Einzelgenmutationen, die das Vorkommen von Malaria beeinflussen, gehören Hämoglobinopathien wie Thalassämie, Hämoglobin S und HbC. Der Mangel an Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Duffy-Antigen sind wichtige Faktoren zur Malariaprotektion. Es gibt endemische Gebiete, in denen sogar die Mehrheit der Bevölkerung Träger einer oder mehrerer dieser Genanomalien ist [58].

Die  $\alpha$ -Thalassämien sind im Hinblick auf Malaria besser untersucht als die  $\beta$ -Formen, da sie mit den ehemaligen Endemiegebieten für Malaria korrelieren. Zwar erkrankten homozygote Kindern häufiger an *P.-vivax*-Malaria, doch in etwa 50% wird das Risiko einer schweren *P.-falciparum*-Malaria bei Heteterozygoten und Homozygoten für  $\alpha$ +-Thalassämien gesenkt und vermittelt einen gewissen Schutz vor anderen schweren Infektionen [59]. Es ist denkbar, dass diese Kinder häufiger eine milde Malaria bekommen und somit eine ausgeprägtere Teilimmunität entwickeln.

Die Hämoglobin S-Variante trägt zu etwa 2% der gesamten Variation bei. Dies ist ein Hinweis auf die noch wenig umfangreiche Aufklärung von genetischen Resistenzfaktoren [51]. Aus Fall-Kontroll-Studien ergeben sich Hinweise auf 60-80%ige Senkung schwerer Malariakomplikationen bei heterozygoten HbS-Trägern. Neueste Studien weiterhin zeigten weiterhin erhöhte IgG-Antikörper Titer zu verschiedenen Malariaantigenen bei den Sichelzellträgern [60,61] und eine Erhöhung des HbS-Schutzes vor Malaria bei zunehmendem Alter [62].

Die Schutzwirkung von HbC vor leichter und schwerer Malaria ist zwar geringer die des HbS [63], aber die homozygoten HbC-Träger sind mit 93%iger Reduktion von klinischer Manifestationen der Malaria assoziiert. Deshalb wird angenommen, dass



HbC die HbS zukünftig in den zur Selektion exponierten Populationen verdrängen wird [24].

Studien zum Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel zeigen kontroverse Ergebnisse bezüglich des geschlechtsspezifischen Einflusses der verschiedenen Varianten auf die Ausprägung von Malaria. Eine neue Studie in Sub-Sahara-Afrika deutet auf eine Schutzwirkung für die männlichen Homozygoten und weiblichen Heterozygoten vor einer schweren Malaria [64].

Zu den eindrucksvollsten Krankheitssuszeptibilitäten innerhalb der Menschheit zählt der genetische SNP des FY Genes, der die meiste Bevölkerung des Sub-Saharan Afrikas eine komplette Resistenz zur *P.-vivax*-Malaria bietet [65,66]. Das Duffy-Antigen ist ein Chemokinrezeptor, welcher in Erythrozyten der meisten Bevölkerung vorkommt. Er ist zugleich auch Rezeptor für diese Plasmodiumart, der den Kontakt mit der Wirtszelle erlaubt und bei Duffy-negativen Merkmalsträgern verändert ist [46].

#### 1.4.2 Genetische Interaktion zwischen Malaria und dem Immunsystem

Es sind eine Reihe genetischer Varianten bekannt, die den Infektionsverlauf, vor allem der schweren Malaria tropica, indirekt über die Immunabwehr modifizieren können. Nur wenige Studien beschreiben den genetischen Einfluss auf die Infektionsdynamik und auf die milde Malaria, was Ziel dieser Arbeit ist.

Konkrete Evidenzen zum Selektionsdruck von Malaria auf das Immunsystem können den genauen Mechanismus der protektiven Immunität in natürlich exponierten Populationen aufdecken und die Entwicklung von effektiven Impfstoffen und Medikamenten bewirken. Ein wichtiger Schritt zur Erklärung dieses Mechanismus ist die Erforschung der Wirkung von funktionellen Variationen eines spezifischen Immun-Gens auf den Krankheitsverlauf der Malaria. Immunologisch wichtige Moleküle wie Zytokine und Rezeptoren sind häufige Untersuchungsparameter in Analysen.

Es ist bislang bekannt, dass einzelne Polymorphismen immunologischer Faktoren den Verlauf der Malaria zu beeinflussen können. Beispielsweise gibt es Varianten humaner Leukozyten-Antigene (HLA)-Loci (HLA-Klasse-I-Variante HLA-B\*53 und Haplotypen der HLA-Klasse-II HLA-DRB1\*1302/DQB1\*0501), die an Antigenpräsentation-beteiligte Proteine kodieren und auf eine Protektion gegen und auf eine Protektion gegen schwere Malaria in Afrika hinweisen [67]. Ein wesentlicher

Effekt der HLA Region wurde auch im Zusammenhang mit milder Malaria in einer Kopplungsanalyse von dizygotischen Zwillingen in Gambia festgestellt [68]. Allerdings kann die HLA Assoziation mit Malaria sehr interpopulationheterogen sein, da HLA Molekülen mit der geographisch variablen Polymorphie der Parasiten interagieren [69].

Allele des CD40 Ligandes sind assoziiert mit einem Schutz gegen schwere Malaria bei Afrikanern und die Interaktion von CD40 (B-Zellen) mit dem CD40 Ligand (in T-Zellen exprimiert) reguliert den Immunglobulin-Klassenwechsel [70].

Das Zytokin  $\text{TNF-}\alpha$  kann antiparasitär wirken, indem es Makrophagen und neutrophile Granulozyten zur Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und Sauerstoffradikalen stimuliert [71] und die Phagozytose von infizierten Erythrozyten anregt [72]. Auch in der Malariapathogenese scheint  $\text{TNF-}\alpha$  eine Rolle zu spielen. Verschiedene Varianten, die zu einer erhöhten Expression des  $\text{TNF-}\alpha$ -Gens führen, korrelieren mit zerebraler Malaria und schwerer Anämie, als Malariakomplikation. Antagonisiert wird  $\text{TNF-}\alpha$  durch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 [73], dessen erhöhte Serumspiegel eine protektive Wirkung gegen schwere Malaria indiziert und dessen Produktion genetisch festgelegt ist [74].

Neben  $\text{TNF-}\alpha$  ist auch  $\text{IFN-}\gamma$  ein wichtiger Risikofaktor für die Ausprägung einer schweren Malaria. Es wird von TH1-Zellen und natürlichen Killerzellen produziert und aktiviert vor allem die Makrophagen. In einer Studie mit *Mandinka*, der haupt-ethnischen Gruppe Gambias, zeigten die Heterozygotenträger für die IFNGR1-56-Variante einen Schutz gegen zerebrale Malaria [75].

Burkinische Fulani, die an weniger Malariaattacken leiden und mehr antimalarische Antikörper bilden als die ethnische Nachbargruppen, zeigten in einer Studie eine erhöhte Antikörperkonzentration gegen Plasmodien bei den Träger der Promotor-Variante IL4-524 T. Dieser Einfluss kann zur Malariaresistenz beitragen [76].

Studien deuteten auf eine protektive Rolle von IL-12 in Malaria hin, möglicherweise weil sie die Produktion von  $\text{IFN-}\gamma$  und die Differenzierung von TH1-Zellen induziert. Bei tansanischen Homozygotenträger einer Promotorvariante dieses Gens, assoziiert mit niedriger IL-12-Sekretion, war die NO-Produktion erniedrigt und die Mortalität bei zerebraler Malaria erhöht. Dieser Befund konnte bei kenianischen Kindern nicht bestätigt werden [77].

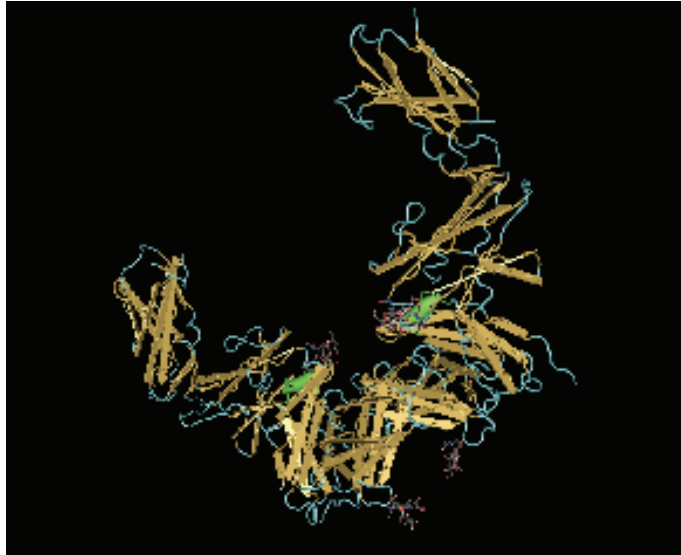
Interleukine-1 werden meist von Makrophagen produziert und sind wichtige inflammatorische Mediatoren einer Immunantwort auf Fieber und Infektion. Mutationen auf dem IL1A- bzw. andere auf dem IL1B-Gen zeigten eine geringfügige Assoziation zur Suszeptibilität von milder bzw. schwerer Malaria [78].

Die meisten Studienergebnisse variieren noch sehr, sodass bisher noch keine eindeutigen Aussagen getätigt werden können. Allerdings muss man das Alter und die immunologische Eigenschaften der infizierten Kindern und die Parasitenstämme berücksichtigen, die zur unterschiedlichen Auswirkung eines gleichen Polymorphismus in den verschiedenen Malariaregionen führen können [46].

## **1.5 Interleukin-3**

### **1.5.1 Struktur und Funktion des Interleukin-3**

Interleukine zählen zu den Zytokinen und sind körpereigene Botenstoffe des Immunsystems. Die Interleukin-3 (engl. *colony-stimulating factor, multiple*) gehört, zusammen mit IL-5 und dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), zur Familie der hämatopoetische Zytokinen, die aus vier kurzkettigen  $\alpha$ -Helix Bündel bestehen. Jeder dieser Zytokine bindet an dem einzigen  $\alpha$ -Rezeptor-Untereinheit (z. B. IL-3R $\alpha$  für IL-3) an. Es gibt eine gemeinsame  $\beta$ -Rezeptor-Untereinheit,  $\beta_c$ , die keine Zytokine binden kann, die aber Signaltransduktion vermittelt [79].



**Abb. 3** Struktur der extrazellulären Domäne der gemeinsamen humanen  $\beta$ -Rezeptor-Untereinheit, welche in IL-3, IL-4 und GM-CSF die Signaltransduktion vermittelt (Graphik: Carr et al. 2006).

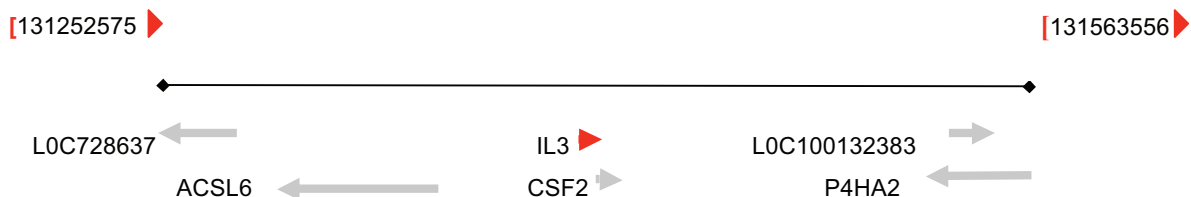
IL-3 ist meist ein Produkt von aktivierten CD4<sup>+</sup>-Zellen, natürlichen Killerzellen und Mastzellen und wird beispielsweise nach Antigen- oder Mitogenstimulation von Lyt-1<sup>+</sup> -2, einem Antigen zur T-Zell-Differenzierung, produziert [80,81,82]. Über die Regulation der T-Zell-Sekretion von IL-3 ist wenig bekannt. Es wurden verschiedene T-Zell-Linien identifiziert, die IL-3 in konstanter Menge produzieren, oder dazu induziert werden [83,84,85].

Eine wichtige Verbindung zwischen dem hämatopoetischen System und dem Immunsystem stellt IL-3 dar. Dieses Zytokin wirkt in der Proliferation von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Progenitorzellen mit, indem sie zu deren Differenzierung, Proliferation und Apoptose beiträgt, und aktiviert am Ende reife Neutrophilen oder Makrophagen [82]. Obwohl eine Unterbrechung der *IL-3*-Gen-Expression keine Beeinträchtigung der basalen Hämatopoese verursacht, ist sie für die Aufrechterhaltung eines hohen Basophilen- und Mastzellen-Titers erforderlich, die wichtige Effektorzellen in der TH2 Immunität zur Parasiten und anderen akuten oder chronischen immunologischen Antworten wie IgE-assoziierte allergischen Reaktionen darstellen [86,87]. IL-3 spielt auch eine wichtige Rolle in der Aktivierung lokaler Eosinophilen [88], induziert und ermöglicht die Freisetzung von Histaminen und IL-4 aus Basophilen [89,90] und fördert in vitro die Proliferation von Mastzellen und Basophilen aus Knochenmarkzellen [91,92,93].

Zusammen mit IL-4 oder Interferon- $\beta$  (IFN $\beta$ ), die auch zu den wichtigsten Zytokinen der Malariaimmunantwort bzw. -pathogenese gehören, ermöglicht IL-3 die Differenzierung von Monozyten zur dendritischen Zellen [94,95]. In Makrophagen, erhöht IL-3 die von Lipopolysaccharid-induzierte IL-1 Sekretion und die Expression der Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC-Klasse-II) [96,97].

Die Rolle von IL-3 in der Arthritis ist noch nicht geklärt. Nachdem IFN- $\gamma$  im Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis gefunden wurde, hat man sie auf IL-3-ähnliche Aktivität untersucht, und keine IL-3 messenger RNA (mRNA) gefunden [98]. Auf die Proliferation gezüchteter fibroblasten-ähnlicher Synoviozyten hat IL-3 keinen Effekt gezeigt [99]. Im murinen Modell einer Studie über kollageninduzierte Arthritis, wurde die IL-3 Expression bei aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen von IL-4 und IL-6 unterdrückt und von auf B-Zellen wirkenden Lipopolysaccharide stimuliert [100].

#### 1.5.2 Genomische Organisation des *Interleukin-3*-Gens



**Abb. 4** Genomische Organisation der Interleukin-3 (Graphik: NCBI).

Das *IL-3*-Gen ist im humanen Genom auf dem langen Arm des Chromosoms 5 (5q23-5q31) und kodiert ein Protein mit 152 Aminosäuren, davon 19 sind Signal-sequenzen [101,102].

Das *IL-3*-Gen und das GM-CSF-Gen liegen auf dem Chromosom 5 nur 9 kb von einander entfernt. Diese Verknüpfung von zwei Genen, die sich in ihrer Struktur und Funktion ähneln, ist auf ein gemeinsames Stammgen zurückzuführen [103].

#### 1.5.3 Assoziationen von *Interleukin-3*-Allelen mit spezifischen Erkrankungen

SNP-Analysen zeigten, dass eine Mutation in der Promoter-Region des *IL-3*-Gens mit rheumatoider Arthritis assoziiert ist [104]. Dieser *IL-3*-Polymorphismus befindet

sich auf Position -16 (T→C) und hatte auf ein relatives Risiko von 5,3 für rheumatoide Arthritis bei gleichzeitigem Vorkommen mit einer Mutation des IL-1β-Gens, welches mit einer Suszeptibilität zur Malaria assoziiert ist.

Die Expression von SNPs des *IL-3*-Promoters und -Enhancers scheint, zusammen mit der des CSF2RB-Gens, geschlechtsspezifisch und von der Familienanamnese abhängig, an einer Protektion zur Schizophrenie beteiligt zu sein [105].

Der rs40401, ein non-synonymer, exonischer SNP des *IL-3*-Gens, lokalisiert auf Position +79 wurde in der chinesischen Population mit der Suszeptibilität für Morbus Basedow, einer Autoimmunkrankheit der Schilddrüse, assoziiert [106]. Dieser SNP verursacht einen Aminosäureaustausch von Prolin auf Serin, da auf dem ersten Nukleotid der 27sten Codon Cytosin gegen Thymin substituiert wird (C → T) (Ser27Pro). Dieser SNP kommt häufig in der japanischen Population vor [107]. Der Prolin-Allel derselben SNP ist mit einem geringeren Risiko für Asthma und Atopie assoziiert [108].

Schweiger *et al.* haben *IL-3*-SNPs *in vitro* (*recombinant human IL-3/proline 8* [rhIL-3/P8] und *recombinant human IL-3/serine 8* [rhIL-3/S8]) untersucht und beobachteten eine erhöhte Wirksamkeit auf die Proliferation von erythroleukemischen Zellen (TF-1), eine geringe Kapazität die Sekretion von IL-4 zu induzieren und keine nachweisbare Wirkung auf die Sekretion von TNF-α [109]. Alle drei Zytokine, *IL-3*, *IL-4* und TNF-α spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Malaria.

#### 1.5.4 Interaktionen zwischen Interleukin-3-Protein und Malariaerregern

Erhöhte Serumwerte für spezifische und polyklonale IgE sind Markenzeichen der Atopie und Helminthiasis [110]. Einwohner von Malaria Endemiegebieten zeigten hohe Serumtiter bei totaler und antimalarisch-spezifischer IgE [111,112]. Die Rolle von *IL-3* in der Pathogenese der Malaria ist wenig beschrieben, dennoch ist der Einfluss von *IL-3* auf die Proliferation der Basophilen, Mastzellen und Eosinophilen bekannt, welche Bindungsstellen für IgE sind und in parasitären Infektionen stark erhöhte Werte zeigen.

Studien zeigten eine *in vitro* inhibitorische Wirkung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf Erythropoese und verwiesen auf eine potentielle Behandlung von Anämie mit *IL-3*. Basierend auf diesen Studienergebnissen und mit dem Zweck

der Bestimmung des IL-3 Spiegels im Serum von Patienten mit akuter *P.-falciparum*-Malaria, hat die Arbeitsgruppe Burgmann *et al.* einen vorübergehenden IL-3 Serumanstieg bei anämischen Patienten festgestellt. Es blieb unklar, ob dieser Anstieg als Ursache einer inadäquaten Antwort auf Anämie oder Erythropoetin Produktion zu interpretieren ist [113].

Bei Patienten aus einem hochendemischen Malariagebiet korrelierte eine erhöhte Ausschüttung von IL-3 mit einer verstärkten Kapazität zur Adhäsion von mit *P. falciparum* parasitierten Erythrozyten und einer Rosettenbildung [114].

## 2 Probanden, Material und Methoden

### 2.1 Herkunft und Einteilung der Probanden

Von Januar 2003 bis Januar 2004 wurden 1070 Kinder zwischen dem zweiten und dritten Lebensmonat in Gesundheitseinrichtungen von neun Dörfern im Bezirk Afigya Sekyere für die Studie rekrutiert. Afigya Sekyere besteht aus 139.736 (2006) Einwohnern und liegt im Regenwaldgürtel der Ashanti-Region in Ghana. Die Region ist holoendemisch für *P.-falciparum*-Malaria mit konstanter Malariatransmission über das ganze Jahr und saisonalen Höhepunkten. Das Klima ist tropisch und die Temperaturen variieren zwischen 20,4°C-33,5°C [115], mit Wechsel von Regen- und Trockenzeiten. Es regnet vor allem von Mai bis Oktober. Dort herrschen *P.-falciparum*-Infektion (80 – 90%) und die Vektoren *Anopheles gambiae* und *A. funestus* vor. Die entomologische Inokulationsrate in der Studienregion liegt bei >400 infektiösen Mückenstichen pro Jahr pro Person, mit einem Gipfel von >100 infektiösen Stichen pro Monat pro Person am Ende der Regenzeit [116].

Der Großteil der Probanden gehörte der Volksgruppe Akan, der Rest verteilte sich im Wesentlichen auf ethnische Gruppen aus dem Norden (zusammengefasst als „*Northerners*“) und Ewe.

Die Kinder wurden 21 Monate lang monatlich untersucht und der Krankheitsstatus (Fieber und klinische Malaria [Phänotyp-Definitionen s.u.]), die Krankheitsgeschichte, die Einnahme von antimalarischen Medikamenten und zwischenzeitliche Krankenhausaufenthalte bewertet. Kapilläres Blut aus der Fingerbeere oder Ferse wurden abgenommen und daraus ein dicker Tropfen und Blutausschrieb für die quantitative Bestimmung der Parasitämie und Speziesidentifizierung gewonnen. Die Hämoglobinwerte wurden photometrisch gemessen (Hemocue, Grossostheim, Deutschland). Im Falle der Erkrankung eines Kindes wurde es nach den lokalen Richtlinien entsprechend behandelt. Behandlungen und Dokumentation waren gleich in den passiven (d.h. aufgrund von Erkrankungen) und aktiven (d.h. geplanten) Untersuchungen. Die Untersuchungskohorte rekrutierte sich ursprünglich von einer klinischen Studie zur intermittierenden präventiven Therapie der Malaria bei Kleinkindern (IPTi), die von Januar 2003 bis September 2005 durchgeführt wurde [117]. Blutproben und klinische Daten dieser Studie wurden zur Durchführung der vorliegenden Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.



## **2.2 Studienablauf**

Ein Kind wurde in die Studie eingeschlossen, wenn ein Elternteil oder Erziehungsberechtigter über die Arbeitsziele und Grundsätze der Studie aufgeklärt wurde und die Einwilligung unterschrieben oder durch Daumenabdruck bestätigt war. Die Eltern von den Studienkindern haben eine Einverständniserklärung erhalten, welche von dem Komitee für Menschenforschung, Publikationen und Ethik, School of Medical Sciences, University of Science and Technology, Kumasi, Ghana, genehmigt wurde. Nach erlangter Zustimmung wurden Sozioökonomische, demographische und anderen Grunddaten in einem detaillierten Fragebogen dokumentiert und 2 ml venöses Blut entnommen. Von beiden Eltern wurden 5 ml venöses Blut für eine mögliche Durchführung von Transmissions-Ungleichgewicht-Tests (TDT) gewonnen.

Jedes Kind bekam eine Identifikationskarte bei der Registrierung bekommen und wurde vom Studienteam bis zum Alter von 2 Jahren monatlich neu untersucht. In jeder Nachuntersuchung führte der Studienarzt eine standardisierte klinische Untersuchung durch, in der folgende Parameter bestimmt wurden:

- Krankenstatus (vor allem Zeichen einer Anämie oder Fieber).
- Krankengeschichte seit der letzten Untersuchung (vor allem Fieber).
- Einnahme von antimalarischen Medikamenten seit der letzten Untersuchung.

Folgende Parameter wurden von hierfür ausgebildeten technischen Assistenten aus dem kapillären Blut aus der Fingerbeere oder Ferse bestimmt:

- quantitative Parasitämie und Speziesidentifizierung (dicker und dünner Blutausschlag).
- Hämoglobin (direkte photometrische Messung).

Alle relevanten medizinischen Informationen haben Studienmitarbeiter erhalten, die vom Gesundheitspersonal im Gewichtsausweis und Krankenakten regelmäßig dokumentiert wurden. Die Kosten für medizinische Behandlungen und Krankenhaus wurden von Projektgeldern während der gesamten Studienzeit gedeckt.

## **2.3 Phänotypen**

Folgende Phänotypen wurden als Variablen für die Analysen benutzt:

- milde klinische Malaria; auch Malariaepisode (Temperatur von  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  und Fieber in den letzten 48 Stunden und gleichzeitige Parasitämie  $> 500/\mu\text{l}$ ).
- Parasitämie mit *P. falciparum* (Parasitämie  $> 500/\mu\text{l}$ ).
- Malaria-bedingte Anämie (gemessenes Hämoglobin  $< 7,5 \text{ g/dl}$ ).

Die Körpertemperatur wurde rektal oder tympanisch gemessen. Jede asexuelle Parasitämie ohne offensichtliche Erkrankung und mit einer Körpertemperatur von  $38^{\circ}\text{C}$  wurde als asymptomatische Parasitämie betrachtet. Die schwere Malaria wurde nach WHO Richtlinien definiert. Eine klinische Malaria wurde mit einer 3 tägigen Therapie mit Amodiaquine (10 mg/kg/Tag) und Artesunate (4 mg/kg/Tag) behandelt. Kinder mit schwerer Malaria (WHO definition) wurden im Krankenhaus aufgenommen und gemäß Krankenhausrichtlinien behandelt. Kinder mit Hämoglobinwerte unter 8 g/dl bekamen eine orale Eisen-Sulfat-Lösung und Folsäure als Supplementierung bekommen. Alle anderen vorkommenden Erkrankungen wurden gemäß den nationalen Richtlinien entsprechend behandelt.

## 2.4 Erhebung sozioökonomischer Indikatoren

Einen Monat nach der Rekrutierung fand die erste Untersuchung statt. In dem ersten Besuch wurden Angaben zu Residenz, Gesundheitszustand und biometrischen Daten ermittelt. Die Positionsbestimmung des Wohnsitzes der Kinder wurde mit Hilfe eines Global Positioning System (GPS) und eines frei verfügbaren geographischen Informationssystems [118] dokumentiert.

Eine detaillierte Befragung wurde von Interviewern dokumentiert und beinhaltete die folgenden Fragen über dem sozioökonomischen Umfeld:

- Familienbezogene Fragen: Schulausbildung der Mütter (Alphabetismus, Analphabetismus).
- Beruf der Mütter (Landwirtin, nicht Landwirtin).
- Haushaltsbezogene Fragen: Küche im Haus (Innen, Aussen); Wasser (Wasserleitung, öffentliche Wasserversorgung); Strom (ja, nein).
- Malariabezogene Fragen: Malariakenntnis (adäquat: Mückenstich, inadäquat); Schutzmaßnahme gegen Mosquito (Moskitonetz, Fliegengitter, keine).
- Eigenschaften der Dörfer: Fläche, Einwohnerzahl.

- Probandenbezogene Fragen: Geschlecht (männlich, weiblich); ethnische Gruppe (Akan, *Northerners*, Ewe); Jahreszeit der Geburt (Regenzeit, Trockenzeit); Sichelzellanämieträger (HbAA, HbAS).

Drei ethnische Gruppen wurden abhängig von ihrer Stammeszugehörigkeit gebildet: Subgruppen der Akan (Ashanti, Fante, Akuapem, Akyem) sind die einheimische Ethnie und die *Northerners* und Ewe sind in die Ashantiregion migriert und jetzt permanente Anwohner in dem Gebiet. Unter *Northerners* wurden Stammesgruppen subsumiert, die ursprünglich im Norden des Landes beheimatet sind. Die Kenntnisse über Malaria wurden als adäquat definiert, wenn die Mutter wusste, dass Moskitostiche in den Übertragungsprozess involviert waren. Der Beruf der Mütter wurde in Landwirtin und nicht Landwirtin gruppiert aufgrund einer erwarteten Abweichung der Moskitostiche innerhalb beider Gruppen. Die finanzielle Lage der Familie wurde als gut betrachtet, wenn die Küche innerhalb des Hauses gelegen war und das Haus Elektrizität sowie fließendes Wasser aufwies. Fehlte einer dieser Parameter, wurde die Familie als arm definiert. Hatte die Mutter einen Grundschulabschluss, wurde sie als alphabetisiert klassifiziert.

## 2.5 Abnahme von Blutproben

Die in den Nachuntersuchungen entnommenen venösen Blutproben und Blutaussstriche wurden zum Hauptlabor des Projektes im Kumasi Center for Collaborative Research in Tropical Medicine (KCCR) transportiert. Um DNS zu konservieren, wurden 2 ml von 8 M Urea zu 2 ml der venösen Blutprobe (Endkonzentration 4 M) zugefügt. Die Blutzellzahlen und die Parasitämie wurden am selben Tag bestimmt. Dicker und dünner Tropfen wurden luftgetrocknet, nach Giemsa gefärbt und im Lichtmikroskop mit einem Ölimmersionsobjektiv mit 1000x-Vergrößerung von zwei verschiedenen Studienmitarbeitern gelesen. Die Parasitenzahl wurde im dicken Tropfen gezählt (Parasitenzahl/200 Leukozyten bzw. im Fall von < 10 Parasiten/200 Leukozyten, Ausweitung der Zählung auf 500 Leukozyten erhöht). Parasitendichten wurden durch Übernahme einer gesamten Leukozytenzahl von 8000/ $\mu$ l berechnet. Bei abweichender Parasiten Positivität/Negativität, Parasitendichte (Verhältnis > 3,0), oder Speziesidentifizierung, wurden die Objekt-träger neu untersucht und die endgültige Parasitämie als die

mittlere Parasitendichte der positiven Ergebnisse definiert. Für die Speziesbestimmung wurden die Blutausstriche benutzt.

## 2.6 Laborverfahren

### 2.6.1 Präparation genomischer DNS

Die Granulozytenkonzentrat wurde aus Vollblut zur Präparation genomischer DNS separiert. Die Extraktion genomischer DNS aus dem gesamten Blut beruhte auf der reversiblen Adsorption der Nukleinsäure an paramagnetische Kugeln in einem 96-Well-Format (NucleoMag 96 Blood, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Der Überstand wurde anschließend entfernt und es erfolgten mehrfache Waschschrte, damit Salze und Verunreinigungen entfernt wurden. Die DNS wurde im letzten Schritt in Elutionspuffer aufgenommen.

Die gewonnene DNS wurde quantifiziert, eine Konzentration von 5ng/μl durch einen DNS Fluoreszenzfarbstoff eingestellt und die Fluoreszenz wurde im Mikroplattenleser gemessen (PicoGreen dsDNA Quantitation Assay/Kit, Molecular Probes, USA).

### 2.6.2 Oligonukleotide

Um bestimmte Abschnitte des *IL-3*-Gens anhand der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) zu amplifizieren, sowie die Sequenzierung und die FRET-Hybridisierungsreaktion durchzuführen, wurden Oligonukleotide (engl. *primer*) verwendet. Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Computerprogramms MacVector v7.2.2 ermittelt. Ihre Auswahl beruhte auf Komplexität, Schmelztemperatur und Nukleotidzusammensetzung am 5'- und 3'-Ende der Zielsequenz, sowie einer Überprüfung auf Bildung sogenannter *Primer-Dimer* (gegenseitiges Binden der *Primer*).

### 2.6.3 Amplifikation von *Interleukin-3*-Abschnitten durch Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR dient der enzymatischen *in-vitro*-Herstellung mehrfacher Kopien bestimmter Basensequenzen und ermöglicht dadurch, dass geringste DNS-Mengen analysiert werden [119]. Das Prinzip der PCR beruht auf einer Funktionsweise der natürlichen Replikation, wobei synthetisierten Oligonukleotide als Startmolekül dienen, die an

DNS-Matritze hybridisieren. Durch die DNS-Polymerase, am ihrem 3'-Ende beginnt die Synthese eines neuen DNS-Doppelstrangs. Gezielte DNS-Sequenzen können zwischen den *Primern* vervielfältigt werden, indem gegenläufige *Primer* verwendet werden. Die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte ist entscheidend, da sie zu einer exponentiellen Amplifikation führt.

Definierte Abschnitte des *IL-3*-Gens wurden auf diese Weise amplifiziert. Ein Zyklus bestand aus je drei Teilschritten:

1. Denaturierung: Hierbei wurde der DNS-Doppelstrang bei einer Temperatur von 95°C in zwei Einzelstränge aufgetrennt, wobei Oligonukleotide und Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) im Überschuss vorhanden waren.
2. *Primer*-Anlagerung (enlg. *annealing*): Während des Abkühlens auf eine Temperatur von 72°C lagerten sich die zwei jeweils sequenzspezifische Oligonukleotide flankierend an die Zielregion auf den beiden DNS-Einzelsträngen an.
3. *Primer*-Extension: Bei einer Temperatur von 72°C erfolgte mit Hilfe einer DNS-Polymerase, ausgehend von den Sequenz-flankierenden *Primern*, die Ketten-verlängerung. Die Polymerase wird aus thermostabiler *Thermus aquaticus* (Taq) gewonnen [120], die bis zu 94°C übersteht und ihre optimale Arbeitstemperatur bei etwa 72°C erreicht. Die Synthese erfolgte am freien 5'-OH-*Primer*-Ende.

Die neusynthetisierten DNS-Stränge dienten in den darauffolgenden Zyklen jeweils als Matrizen für die weitere DNS-Synthese. Im Idealfall wurde während des Vorgangs eine exponentielle Akkumulation der Zielsequenz um annähernd  $2^n$  erreicht (n steht für Anzahl der Zyklen, die durchlaufen wurden).

Ein Ansatz ohne Zugabe von DNS wurde mitgeführt und diente als Negativkontrolle. Sofern dieser Ansatz positiv ausfiel, wurde die Amplifikation wiederholt.

**Tab. 1** PCR-Programm

| PCR-Phase              | Zeit (min)     | Temperatur (°C) |
|------------------------|----------------|-----------------|
| Initiale Denaturierung | 94°C           | 45 sec          |
| Denaturierung          | 94°C           | 45 sec          |
| <i>Annealing</i>       | T <sub>m</sub> | 45 sec          |
| Extension              | 72°C           | 45 sec          |
| <i>Final</i> Extension | 72°C           | 10 min          |

T<sub>m</sub>, Schmelztemperatur.

Eine Fehlhybridisierung zwischen Oligonukleotid und Matritze, welche aufgrund niedriger Temperaturen teilweise vorkommen kann, führt im weiteren Verlauf zu unspezifischen Amplifikationsprodukten. In diesen Fällen, wurde die *Taq*- durch die *HotStarTaq*-DNS-Polymerase ersetzt, welche keine Polymerase-Aktivität bei Raumtemperatur zeigt.

Zur Ampfilikation von Genabschnitten, welche häufig in ähnlicher Basenfolge im humanen Genom vorliegen, empfiehlt sich die sogenannte *Touch-down*-PCR. Die *Annealing*-Phase beginnt einige Grad Celsius über dem errechneten Wert der Schmelztemperatur der Oligonukleotide (T<sub>m</sub>). Diese wird mit folgender Formel annäherungsweise bestimmt:

$$T_m = 2N(A+T) + 4N(G+C)$$

A, Adenin; T, Thymin; G, Guanin; C, Cytosin; N, Anzahl der Basen.

Die Temperatur wird nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen bis zu einer Endtemperatur von ca. 10°C unter der errechneten T<sub>m</sub> gesenkt. Die ersten *Primer*-Matritzenhybride werden mit hoher Spezifität gebildet, indem zunächst eine sehr hohe *Annealing*-Temperatur gewählt wird. Das spezifische Produkt wurde bereits exponentiell amplifiziert, bis die *Annealing*-Temperatur, die unspezifische Hybridisierungen zulässt, erreicht wird. Währenddessen wurden auch unspezifische

Produkte, die in den weiteren Zyklen entstehen, vermindert. Die *HotStarTaq*-DNS-Polymerase wurde wegen der hohen initialen *Annealing*-Temperatur verwendet.

#### 2.6.4 Analyse der Amplifikationsprodukte

Amplifizierte DNS-Fragmente können nach ihrer Länge durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden. In der Elektrophoresekammer, unter einer Spannung von etwa 100mV, laufen negativ geladene DNS-Amplifikate unterschiedlich schnell in Richtung der Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ( $\mu$ ) und  $\log 10$  der Basenzahl sind umgekehrt proportional [121]. Zudem besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Wanderungsgeschwindigkeit und der Gelkonzentration. Die Längenbestimmung der amplifizierten DNS-Produkte wird durch eine Laufspur, die Fragmente definierter Länge enthält, ermöglicht. Im Anschluss werden DNS-Produkte anhand eines interkalierenden Farbstoffs (Ethidiumbromid) angefärbt und durch UV-Licht der Wellenlänge 302 nm sichtbar gemacht.

#### 2.6.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mit Hilfe des *QIAquick PCR-Purification Kit* entsprechend der Instruktionen des Herstellers durchgeführt und das aufgereinigte Produkt konnte als Ausgangsprodukt für die Sequenzierungen verwendet werden.

#### 2.6.6 Typisierung ausgesuchter *Interleukin-3*-Abschnitte

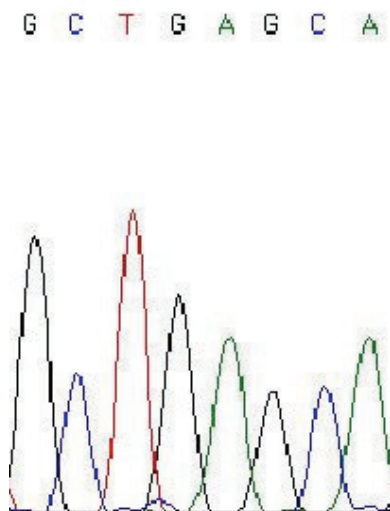
Die Typisierung der ausgesuchten Genabschnitte erfolgte mit Fluoreszenzmarkierten Nukleotiden, anhand automatischer Sequenzierung.

Es wurde das Prinzip der zyklischen Sequenzierung (lineare Amplifizierung) angewendet, mit hitzestabiler DNS-Polymerase [122]. Die Reaktion lief in mehreren Zyklen aus Denaturierung, Renaturierung und DNS-Synthese ab, mit Temperaturänderungen bei den einzelnen Schritten. Im Unterschied zu PCR wurde pro Reaktionsansatz nur ein Oligonukleotid verwendet (entweder *forward*, *reverse* oder *nested*).

Die Sequenzierungsansätze wurden erneut aufgereinigt um damit überschüssige, nicht-eingebaute *Dye*-Terminatoren zu entfernen. Das Produkt wurde anschließend nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* [123], auf beiden Strängen automatisch sequenziert. Die Bruchstücke wurden mittels Kapillarelektrophorese der Länge nach sortiert. Im Anschluß wurden die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale der basenspezifischen Didesoxynukleotiden (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP) mittels eines Lasers erfasst und im Sequenzchromatogramm aufgezeichnet.

#### 2.6.7 Auswertung der Sequenzen

Die Sequenz-Rohdaten wurden als Elektropherogramm dargestellt und die resultierenden DNS-Sequenzen wurden mit publizierten Referenzsequenzen verglichen.



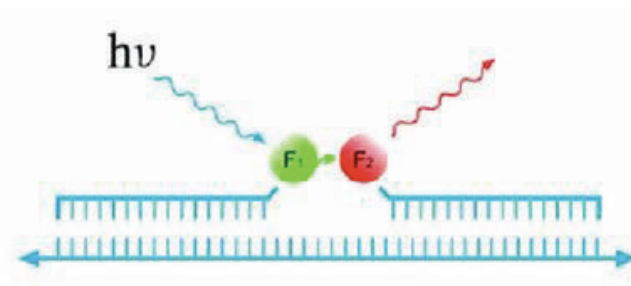
**Abb. 5** Beispiel einer Rohdatenanalyse einer automatischen Sequenzierung in Form eines Chromatogramms. Die relative Intensität der Sekundärstrahlung der vier Nukleotide wird nach Laseranregung durch die vier unterschiedlich farbigen Kurven angegeben.

#### 2.6.8 Detektion der ausgesuchten Varianten durch FRET-Hybridisierungstechnik

Hochauflösungs-Schmelzkurven wurden während einer langsamen und kontinuierlichen Erwärmung durch den Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) erreicht. Das Prinzip von FRET basiert auf dem Energietransfer von einem



fluoreszierenden Molekül (Fluorescein) auf ein anderes (LC Red 640). Die Farbstoffe sind an zwei Sonden [*sensor*- (dt. Sensor) und *anchor*- (dt. Anker) Sonde] gebunden, die sich an die DNS-Zielsequenz anlagern. Dann wird Fluorescein von einer bestimmten Lichtwellenlänge angeregt, was zu einem Energietransfer führt. Dies regt das LC Red 640-Molekül an und emittiert Licht einer größeren Wellenlänge, welches im Hochdurchsatzverfahren mittels eines fluoreszierenden Schmelzkurventests in 384-well Mikroplatten eines homogenes Systems (LightTyper, Roche Holding GmbH, Mannheim, Deutschland) als Signalwechsel aufgezeichnet wird (Abb. 6).

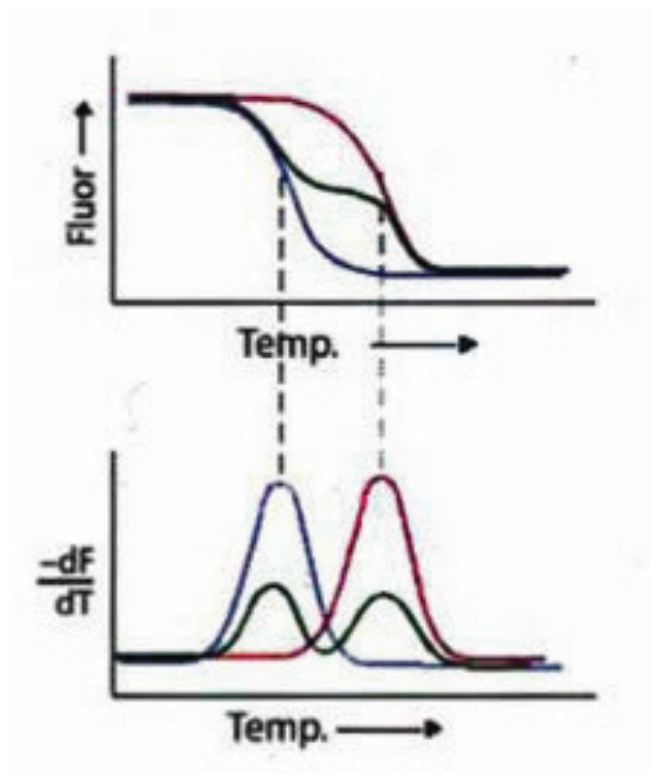


**Abb. 6** Das Prinzip von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). F1 steht für Fluorescein-Molekül und F2 für LC Red 640-Molekül. Zwischen F1 und F2 findet nach Anregung durch Licht ein Energietransfer statt (Quelle: Handbuch *LightTyper*, Roche, Deutschland).

Die *sensor*-Sonde enthält die Sequenz der Mutationsvariante. Liegt eine Mutation vor, dann bleibt sie länger an der DNS-Matrize haften als bei Vorliegen der Wildtypsequenz, die sich in einer Base von der Sequenz der *sensor*-Sonde unterscheidet. Der Schmelzpunkt ( $T_m$ ) bezeichnet die Temperatur, bei der das Signal abnimmt, da die Sonde von der Matrize abfällt und der Energietransfer nicht mehr stattfindet.

Alle Reagenzien wurden am Anfang der Reaktion zugegeben und die Proben wurden zwischen der Amplifikation und Genotypisierung nicht manipuliert, sodass es zu keiner Verunreinigung der Proben kommen konnte.

Mit Hilfe des Programms *Roche Light Typer Software* 1.1.2 (Roche Holding GmbH, Mannheim, Deutschland) wurden Schmelzkurven generiert und die Genotypisierung automatisch durchgeführt (Abb. 7).



**Abb. 7** Das Licht, welches die Sensor-Sonde emittiert, wird vom *LightTyper*-Instrument als Signalwechsel aufgezeichnet. Anhand der Bewertung spezifischer Muster und Höhen der Schmelzkurven wurde der entsprechende Genotyp zugeordnet.

## 2.7 Auswahl der SNPs

### 2.7.1. Auswahlkriterien der SNPs

Aufgrund des bekannten Einflusses der Chromosomenregion 5q31 auf die *P.-falciparum*-Parasitämie und der Überproduktion von Zytokinen, welche in die Pathophysiologie der Malaria beteiligt sind, wurden in dieser Arbeit 5 verschiedene SNPs innerhalb des *IL-3*-Gens für die Analyse ausgewählt. Die Kriterien für die Auswahl der SNPs waren:

- Nur die SNPs mit einer bekannten Allelenfrequenz von 10% oder höher wurden einbezogen, um eine adäquate statistische Aussagekraft von > 80% zu erreichen.
- Signifikante Unterschiede in der Allelverteilung zwischen afrikanischen (Yoruba, YRI) und kaukasischen (Utah Residenten, CEU) Ethnien, die zu einer Selektion von einer der Varianten aufgrund eines starken Drucks von äußerlichen Faktoren wie Malaria hinwies.

- Locus in der putativen Promotorregion (möglichst Bindungsstelle von Transkriptionsfaktoren).
- Locus in der translatierten Region (mit Aminosäurenaustausch, möglichst relevanter Austausch).
- Locus im Intronbereich (nur berechenbare Spleißstellen).
- Funktionelle Beeinflussung der Transkription, Translation, Regulation bekannt.

### 2.7.2 Verteilung und Frequenzen der untersuchten *Interleukin-3*-Allele

**Tab. 2** Funktion, Art und Position erhobener Varianten

| <i>IL-3</i> -SNP | Lage        | Relative Position<br>(Mutation) | AS-Austausch | Ethnie    | Allelträger<br>in % |
|------------------|-------------|---------------------------------|--------------|-----------|---------------------|
| rs3091336        | Promotor    | -4651 (A → G)                   | Kein         | Yoruba    | 58%                 |
|                  |             |                                 |              | Kaukasier | 100%                |
| rs40401          | Coding Exon | 78 (C → T)                      | 27 P → S     | Yoruba    | 70%                 |
|                  |             |                                 |              | Kaukasier | 21%                 |
| rs11575020       | Downstream  | 5130 (A → G)                    | Kein         | Yoruba    | 6%                  |
|                  |             |                                 |              | Kaukasier | 0%                  |
| rs168681         | Downstream  | 6050 (A → G)                    | Kein         | Yoruba    | 77%                 |
|                  |             |                                 |              | Kaukasier | 64%                 |
| rs3091338        | Downstream  | 6338 (C → T)                    | kein         | Yoruba    | 7%                  |
|                  |             |                                 |              | Kaukasier | 47%                 |

Die Polymorphismen wurden auf den fünf unten gelisteten Genabschnitten auf Bande 31.1 des Chromosoms 5q untersucht:

- 1 *IL-3* rs3091336
- 2 *IL-3* rs40401
- 3 *IL-3* rs11575020
- 4 *IL-3* rs168681

5 *IL*-3 rs3091338

Alle fünf Varianten wurden in der Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) gefunden (Tab. 2).

Vier der fünf Varianten liegen auf dem Promotor und eine im Exon (*IL*-3 rs40401), welches zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Serin auf dem ersten Nukleotid des 27sten Codons führt.

## 2.8 Datenverarbeitung

Für die Dokumentation der Untersuchungen, der Krankenhausbesuche und der sozioökonomischen Befragungen wurden vorbereitete Fragebögen benutzt. Von dort wurden die Daten in eine Computer-gestützte Datenbank (4th Dimension, 4D v6.8.5, San Jose, USA) doppelt eingegeben. Die Patientendaten wurden vertraulich behandelt und mit Passwörtern geschützt. Die Daten wurden für die Analyse in die Statistik-Programme transferiert und mit den Genotypisierungdaten verknüpft.

## 2.9 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen umfassten in der Kinderkohorte die Untersuchung eines Zusammenhangs und die Berechnung der Inzidenzdichte und der relativen Risikos milder Malaria, *P.-falciparum*-Parasitämie und Malaria-bedingter Anämie mit den Genotypen der ausgesuchten *IL*-3-Polymorphismen.

Die Exploration der erhobenen klinisch epidemiologischen und molekularbiologischen Daten wurde mit dem Computerprogramm Intercooled Stata MP (v10, StataCorp, College Station, USA) durchgeführt.

Hazard der ersten oder der einzelnen Episoden (milde klinische Malaria, *P.-falciparum*-Parasitämie und Malaria-bedingte Anämie) wurden mit Cox Regression bewertet und in Kaplan-Meier Überlebensdiagrammen dargestellt. Die Inzidenzdichten wurden berechnet und repräsentierten die Gesamtzahl der neuen Episoden eines der drei genannten Phänotypen in Zusammenhang mit den *IL*-3-SNPs-Genotypen, pro Personenzzeit (Person-Jahr-*at-risk*, PYAR) innerhalb einer 18 monatigen Untersuchungsperiode, welche am Tage des Recruitments (Kinder im 3. Lebens-monat) begann. Die Inzidenzdichte war die Gesamtzahl der neuen Episoden eines Phänotyps, bezogen auf die Personenzzeit. Das Risiko für mehrere Episoden

(für milder klinische Malaria, *P.-falciparum*-Parasitämie und Malaria-bedingter Anämie) wurde durch die multivariante Poisson Regression ermittelt und das Relative Risiko (RR), als Verhältnis zweier Inzidenzdichten, wurde mit dem zugehörigen 95%igen Konfidenzintervall (95% CI) für jeden Genotyp gegen einen „Referenz“-Genotyp geschätzt. Der „Referenz“-Genotyp wurde definiert als der Homozygot mit der höchste Anzahl von an der Studie beteiligten Kinder. Die Modelle wurden korrigiert für den Studienarm (antimalarische Behandlung), nicht aber für die Merkmalsträger der Sichelzellanämie, da dies keine relevanten Wertänderungen zeigte ( $< 10\%$ ). Nach einer antimalarischen Behandlung oder Malariaepisoden wurden die Kinder von der Risikogruppe einer Plasmodium-Infektion für die folgenden 21 Tage ausgeschlossen. Ein Alpha-Wert wurde unter  $p < 0,05$  als signifikant bewertet. Individuen, bei denen mehr als 80% der Genotypen nicht ermittelt werden konnten, wurden von den Analysen ausgeschlossen. Paarweise Variantenvergleiche wurden nur durchgeführt, wenn die Varianten  $< 500$  kb voneinander entfernt lagen.

Zum Vergleich der Verteilung der *IL-3*-Genotypen mit den *IL-3*-Allelfrequenzen in der gesamten Studienkohorte wurde das Hardy-Weinberg Gleichgewicht (HWG, engl. *HWE*) angewendet, und somit die Qualität die Genotypisierung kontrolliert. Die Voraussetzungen des HWGs wurden bei den Kontrollen durch einen HWG-Test geprüft, der auf einer z-Statistik und der Berechnung des Kappawertes basiert. Dieser Test errechnet, ob die Anzahl der beobachteten Allelfrequenzen  $p$  und  $q$  von den erwarteten Allelfrequenzen entsprechend den beobachteten Genträgern  $p^2$ ,  $pq$  und  $q^2$  statistisch abweicht.

Ist eine Krankheit mit einem genetischen Marker stark assoziiert, kann der Transmissions-Test für Kopplungsungleichgewicht [Transmission/Ungleichgewicht-Test (TDT)] eine Kopplung erkennen. Für die einzelne Assoziationen wurde die Bonferroni-Holm-Korrektur [124] benutzt. TDT wurden durchgeführt um festzustellen, welche Transmissionen informativ sind und um beobachtete und erwartete Transmissionen von jedem Allel zu erfassen [125]. Ein quantitativer TDT (qTDT) wurde durchgeführt, um die Inzidenzdichte der Malariaepisoden für mögliche ethnische Abweichungen zu kontrollieren [126].

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Polymorphismen auf verschiedenen Abschnitten des *IL-3*-Gens untersucht. Es wurden Abschnitte ausgewählt, bei denen ein funktioneller Zusammenhang mit den Phänotypen denkbar war. Basierend auf der Hypothese, dass eine Veränderung der *IL-3*-Transkription und -Translation das Risiko für Manifestationen der milden Malaria beeinflusst, wurden Promotor- und exonische Varianten untersucht.

#### 3.1 Analyse der sozioökonomischen Faktoren

Die Verteilung der ethnischen Zugehörigkeit, Geburtsjahreszeit, Beruf der Mütter, der Anwendung von Schutzmaßnahmen und der finanziellen Herkunft der Familie wurden statistisch analysiert und zeigten sich in den neun Dörfern sehr heterogen. Die übrigen Parameter waren gleichmäßig verteilt (Tab. 3).

Bivariate Poisson-Regressionen zur Einschätzung des Effektes dieser Parameter auf die Inzidenzdichte (engl. *incidence rate*, IR) der Malaria wurden durchgeführt. Eine signifikant niedrigere Malariainzidenz wurde bei Kindern beobachtet, die in der Regenzeit geboren waren (RR bereinigt für Wohnort 0,81;  $p$ -Wert = 0,002), sowie bei Kindern von alphabetisierten Müttern (RR, 0,77;  $p$  = 0,011), bei Kindern aus Familien, die Schutzmaßnahmen gegen Moskitos anwendeten (RR für Bettnetzbenutzung, 0,70;  $p$  < 0,001; für Fliegengitteranwendung, 0,50;  $p$  < 0,001) und bei Kindern aus Familien mit gutem finanziellen Hintergrund (RR, 0,66;  $p$  < 0,001). Im Kontrast dazu wurde ein höheres Risiko für Malaria bei Kindern gesehen, die aus dem Norden des Landes stammten (RR, 1,33  $p$  = 0,002) oder deren Mütter in der Landwirtschaft tätig waren (RR, 1,36;  $p$  < 0,001). Geschlecht, Kenntnisse der Mütter über Malariaübertragung und Sichelzellanämiemerkmale zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Malariainzidenzdichte. Die Dorffläche ( $R^2$  = 0,74;  $p$  = 0,003) und ihre Einwohnerzahl ( $R^2$  = 0,68;  $p$  = 0,006) korrelierte mit der Malariainzidenz negativ [127].

**Tab. 3** Verteilung der Ortschaften und der individuelle sozioökonomische Eigenschaften innerhalb der 9 Studiendörfer

| Eigenschaft             | Dörfer    |              |            |           |             |             |            |              |            |
|-------------------------|-----------|--------------|------------|-----------|-------------|-------------|------------|--------------|------------|
|                         | Afamanaso | Agona        | Asamang    | Bedomase  | Bipoa       | Jamasi      | Kona       | Tano-Odumasi | Wiamoase   |
| Fläche, km <sup>2</sup> | 0,35      | 1,22         | 0,99       | 0,27      | 0,60        | 1,34        | 0,80       | 0,56         | 1,78       |
| Einwohnerzahl           | 2508      | 9321         | 5277       | 1492      | 3875        | 9096        | 5853       | 3453         | 12877      |
| Geschlecht              |           |              |            |           |             |             |            |              |            |
| Männlich                | 31 (55,4) | 71 (50,4)    | 58 (50,9)  | 28 (53,9) | 61 (51,3)   | 78 (51,3)   | 71 (51,1)  | 56 (47,9)    | 82 (45,6)  |
| Weiblich                | 25 (44,6) | 70 (49,7)    | 56 (49,1)  | 24 (46,2) | 58 (48,7)   | 74 (48,7)   | 68 (48,9)  | 61 (52,1)    | 98 (54,4)  |
| Ethnische Gruppe        |           |              |            |           |             |             |            |              |            |
| Akan                    | 52 (92,9) | 112 (80,6)** | 107 (93,9) | 51 (98,1) | 114 (96,6)* | 104 (68,9)* | 124 (89,2) | 95 (81,9)*   | 163 (90,6) |
| Ewe                     | 4 (7,1)   | 27 (19,4)    | 6 (5,3)    | 1 (1,9)   | 4 (3,4)     | 45 (29,8)   | 14 (10,1)  | 20 (17,2)    | 17 (9,4)   |
| <i>Northerners</i>      |           |              | 1 (0,9)    |           |             | 2 (1,3)     | 1 (0,7)    | 1 (0,9)      |            |
| Geburtsjahreszeit       |           |              |            |           |             |             |            |              |            |
| Trockenzeit             | 26 (46,4) | 88 (62,4)    | 55 (48,3)  | 29 (55,8) | 59 (49,6)   | 98 (64,5)   | 57 (41,0)  | 51 (43,6)    | 115 (63,9) |
| Regenzeit               | 30 (53,6) | 53 (37,6)    | 59 (51,8)  | 23 (44,2) | 60 (50,4)   | 54 (35,5)   | 82 (59,0)  | 66 (56,4)    | 65 (36,1)  |
| Sichelzellanämie        |           |              |            |           |             |             |            |              |            |
| HbAA                    | 37 (71,2) | 105 (77,2)   | 86 (77,5)  | 35 (77,8) | 83 (79,8)   | 107 (74,3)  | 99 (73,3)  | 95 (83,3)    | 127 (75,2) |
| HbAS                    | 5 (9,6)   | 11 (8,1)     | 15 (13,5)  | 6 (13,3)  | 16 (15,4)   | 17 (11,8)   | 18 (13,3)  | 5 (4,4)      | 17 (10,1)  |
| Ausbildung der Mütter   |           |              |            |           |             |             |            |              |            |
| Analphabetismus         | 5 (9,4)   | 20 (15,9)    | 6 (5,6)    | 3 (7,9)   | 11 (10,3)   | 26 (21,3)   | 17 (13,3)  | 23 (20,7)    | 21 (14,5)  |
| Alphabetismus           | 48 (90,6) | 106 (84,1)   | 102(94,4)  | 35 (92,1) | 96 (89,7)   | 96 (78,7)   | 111 (86,7) | 88 (79,3)    | 124 (85,5) |

(fortgesetzt)

| Eigenschaft              | Dörfer    |            |           |           |           |            |            |                  |            |
|--------------------------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------------|------------|
|                          | Afamanaso | Agona      | Asamang   | Bedomase  | Bipoa     | Jamasi     | Kona       | Tano-<br>Odumasi | Wiamoase   |
| Beruf der Mütter         |           |            |           |           |           |            |            |                  |            |
| Nicht Landwirtin         | 28 (50,0) | 120 (85,7) | 84 (74,3) | 43 (82,7) | 80 (68,4) | 130 (90,3) | 127 (91,4) | 88 (75,2)        | 129 (71,7) |
| Landwirtin               | 28 (50,0) | 20 (14,3)  | 29 (25,7) | 9 (17,3)  | 37 (31,6) | 14 (9,7)   | 12 (8,6)   | 29 (24,8)        | 51 (28,3)  |
| Malariakenntnis          |           |            |           |           |           |            |            |                  |            |
| Inadäquat                | 9 (17,0)  | 25 (20,0)  | 11 (10,0) | 6 (14,6)  | 24 (22,0) | 13 (11,11) | 15 (11,7)  | 14 (12,8)        | 28 (19,4)  |
| Adäquat                  | 44 (83,0) | 100 (80,0) | 99 (90,0) | 35 (85,4) | 85 (78,0) | 104 (88,9) | 113 (88,3) | 95 (87,2)        | 116 (80,6) |
| Schutzmaßnahme           |           |            |           |           |           |            |            |                  |            |
| Keine                    | 16 (30,2) | 12 (9,6)   | 29 (26,4) | 14 (34,2) | 33 (30,3) | 16 (13,7)  | 36 (28,1)  | 8 (7,4)          | 14 (9,7)   |
| Moskitonetz              | 13 (24,5) | 49 (39,2)  | 25 (22,7) | 9 (22,0)  | 31 (28,4) | 46 (39,3)  | 49 (38,3)  | 46 (42,6)        | 57 (39,6)  |
| Fliegengitter            | 6 (11,3)  | 10 (8,0)   | 17 (15,5) | 7 (17,1)  | 11 (10,1) | 12 (12,3)  | 14 (10,9)  | 3 (2,8)          | 3 (2,1)    |
| Finanzieller Hintergrund |           |            |           |           |           |            |            |                  |            |
| schlechte                | 41 (80,4) | 94 (75,2)  | 92 (86,0) | 26 (65,0) | 91 (83,5) | 80 (68,4)  | 105 (84,0) | 70 (64,2)        | 70 (48,6)  |
| gute                     | 10 (19,6) | 31 (24,8)  | 15 (14,0) | 14 (35,0) | 18 (16,5) | 37 (31,6)  | 20 (16,0)  | 39 (35,8)        | 74 (51,4)  |

\* fehlende Werte =1; \*\* fehlende Werte =2



### **3.2 Assoziationen von *Interleukin-3*-SNPs mit Malaria**

#### **3.2.1 Qualität der Daten und HWG**

Insgesamt wurden die fünf *IL-3*-Varianten bei 1017 Kinder einer Studienkohorte von 1070 untersucht. Die 53 übrigen Kinder mussten ausgeschlossen werden, weil bei ihnen kein Material für die Durchführung der Genotypisierung vorlag. Der Prozentanzahl an vermissten Genotypen (Gesamt n = 1017) betrug 4,6% bei rs3091336, 3,7% bei rs40401, 2,2% bei rs11575020, 2,6% bei rs168681 und 3,1% bei rs3091338.

Die Genotypenverteilung der einzelnen untersuchten *IL-3*-Varianten in der gesamten Studiengruppe stimmten nach dem Hardy-Weinberg Gesetz überein (Tab. 4).

**Tab. 4** Untersuchung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts

| SNP        | Genotypen<br>(Frequenz) | Allele<br>(Frequenz) | Genotyp<br>(tatsächliche/erwartete<br>Frequenz) | HWG $p$ |
|------------|-------------------------|----------------------|-------------------------------------------------|---------|
| rs3091336  | AA (0,10)               | A (0,32)             | AA (97 / 97)                                    | 1,0     |
|            | AG (0,44)               | G (0,68)             | AG (420 / 426,8)                                |         |
|            | GG (0,46)               |                      | GG (453 / 446,2)                                |         |
| rs40401    | CC (0,12)               | C (0,35)             | CC (119 / 117,5)                                | 0,262   |
|            | CT (0,46)               | T (0,65)             | CT (450 / 450,3)                                |         |
|            | TT (0,42)               |                      | TT (410 / 411)                                  |         |
| rs11575020 | AA (0,77)               | A (0,88)             | AA (780 / 766,2)                                | 0,999   |
|            | AG (0,21)               | G (0,12)             | AG (201 / 208,9)                                |         |
|            | GG (0,02)               |                      | GG (14 / 19,9)                                  |         |
| rs168681   | AA (0,02)               | A (0,14)             | AA (18 / 19,8)                                  | 0,474   |
|            | AG (0,24)               | G (0,86)             | AG (234 / 237,8)                                |         |
|            | GG (0,74)               |                      | GG (739 / 733,3)                                |         |
| rs3091338  | CC (0,76)               | C (0,87)             | CC (748 / 748,6)                                | 0,757   |
|            | CT (0,22)               | T (0,13)             | CT (223 / 216,7)                                |         |
|            | TT (0,02)               |                      | TT (14 / 19,7)                                  |         |

HWG  $p$ , Hardy-Weinberg Gleichgewicht  $p$ -Wert, der die Wahrscheinlichkeit ist, mit der ihre Abweichung vom HWG durch Zufall erklärt werden kann.

### 3.2.2 Analyse der Genotypenverteilung ausgewählter *Interleukin-3*-SNPs bei milder klinischer Malaria, *P.-falciparum*-Parasitämie und Malaria-bedingter Anämie

Bei der Datenanalyse wurde ein deutlich signifikanter Zusammenhang zwischen dem Risiko der Entwicklung für eine milde klinische Malaria, eine *P.-falciparum*-Parasitämie und eine Malaria-bedingte Anämie und dem *IL-3*-rs40401-Genotyp festgestellt. Einen signifikanten, aber vergleichbar geringen Einfluss, hatten auch der *IL-3* rs168681-Genotyp auf die milde klinische Malaria und der *IL-3*-rs11575020-Genotyp auf die *P.-falciparum*-Parasitämie und Malaria-bedingte Anämie. Die übrigen untersuchten SNPs zeigten keine signifikante Assoziation mit dem Auftreten eines der drei Phänotypen (Tab. 5).

**Tab. 5** Assoziation der Phänotypen milde klinische Malaria, *P.-falciparum*-Parasitämie und Malaria-bedingte Anämie

| IL-3 Genotyp         |    |     | Klinische Malaria |                     |                       | Parasitämie      |                     |                       | Anämie           |                     |       |
|----------------------|----|-----|-------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|-------|
| SNP                  | gt | N   | Rate (CI)         | RR (CI)             | P                     | Rate (CI)        | RR (CI)             | P                     | Rate (CI)        | RR (CI)             | p     |
| rs3091336<br>(n=970) | GG | 453 | 1,2<br>(1,1-1,3)  | 1                   |                       | 3,3<br>(3,1-3,4) | 1                   |                       | 0,7<br>(0,6-0,8) | 1                   |       |
|                      | AG | 420 | 1,2<br>(1,1-1,3)  | 0,99<br>(0,89-1,09) | 0,80                  | 3,2<br>(3,1-3,4) | 0,99<br>(0,92-1,05) | 0,66                  | 0,7<br>(0,6-0,8) | 1,02<br>(0,89-1,16) | 0,82  |
|                      | AA | 97  | 1,1<br>(1,0-1,3)  | 0,95<br>(0,80-1,13) | 0,56                  | 3,1<br>(2,8-3,4) | 0,94<br>(0,85-1,05) | 0,29                  | 0,7<br>(0,6-0,9) | 1,03<br>(0,83-1,29) | 0,77  |
| rs40401<br>(n=979)   | TT | 410 | 1,1<br>(1,0-1,1)  | 1                   |                       | 3,0<br>(2,8-3,1) | 1                   |                       | 0,7<br>(0,6-0,8) | 1                   |       |
|                      | CT | 450 | 1,2<br>(1,1-1,3)  | 1,12<br>(1,01-1,25) | 0,028                 | 3,3<br>(3,1-3,4) | 1,10<br>(1,03-1,17) | 0,005                 | 0,6<br>(0,6-0,7) | 0,94<br>(0,82-1,08) | 0,38  |
|                      | CC | 119 | 1,6<br>(1,4-1,8)  | 1,50<br>(1,32-1,73) | $1,95 \times 10^{-8}$ | 3,8<br>(3,5-4,1) | 1,29<br>(1,17-1,41) | $1,03 \times 10^{-7}$ | 0,9<br>(0,8-1,1) | 1,35<br>(1,12-1,62) | 0,002 |

(fortgesetzt)

| IL-3 Genotyp           |    |     | Klinische Malaria |                     |       | Parasitämie      |                     |       | Anämie           |                     |       |
|------------------------|----|-----|-------------------|---------------------|-------|------------------|---------------------|-------|------------------|---------------------|-------|
| SNP                    | Gt | n   | Rate (CI)         | RR (CI)             | p     | Rate (CI)        | RR (CI)             | P     | Rate (CI)        | RR (CI)             | p     |
| rs11575020<br>(n=1017) | AA | 780 | 1,2<br>(1,1-1,2)  | 1                   |       | 3,2<br>(3,1-3,3) | 1                   |       | 0,7<br>(0,6-0,7) | 1                   |       |
|                        | AG | 201 | 1,2<br>(1,1-1,3)  | 1,03<br>(0,92-1,16) | 0,63  | 3,2<br>(3,0-3,4) | 1,00<br>(0,93-1,08) | 0,95  | 0,7<br>(0,6-0,8) | 0,97<br>(0,83-1,13) | 0,66  |
|                        | GG | 14  | 1,4<br>(1,0-2,0)  | 1,17<br>(0,81-1,70) | 0,39  | 4,5<br>(3,6-5,5) | 1,39<br>(1,12-1,73) | 0,003 | 1,2<br>(0,8-1,8) | 1,80<br>(1,21-2,68) | 0,004 |
| rs168681<br>(n=1017)   | GG | 739 | 1,1<br>(1,1-1,2)  | 1                   |       | 3,2<br>(3,0-3,3) | 1                   |       | 0,7<br>(0,6-0,7) | 1                   |       |
|                        | AG | 234 | 1,3<br>(1,2-1,5)  | 1,16<br>(1,04-1,29) | 0,009 | 3,4<br>(3,2-3,6) | 1,09<br>(1,01-1,16) | 0,024 | 0,7<br>(0,6-0,8) | 1,06<br>(0,91-1,22) | 0,45  |
|                        | AA | 18  | 1,2<br>(0,9-1,7)) | 1,05<br>(0,75-1,49) | 0,77  | 3,2<br>(2,5-4,0) | 0,99<br>(0,79-1,24) | 0,95  | 0,9<br>(0,6-1,4) | 1,34<br>(0,89-2,01) | 0,16  |
| rs3091338<br>(n=1017)  | CC | 748 | 1,2<br>(1,1-1,2)  | 1                   |       | 3,2<br>(3,1-3,3) | 1                   |       | 0,7<br>(0,7-0,8) | 1                   |       |
|                        | CT | 223 | 1,2<br>(1,1-1,4)  | 1,06<br>(0,94-1,18) | 0,34  | 3,3<br>(3,1-3,5) | 1,03<br>(0,96-1,10) | 0,46  | 0,7<br>(0,6-0,8) | 1,00<br>(0,86-1,16) | 0,97  |
|                        | TT | 14  | 1,1<br>(0,7-1,6)  | 0,91<br>(0,60-1,37) | 0,64  | 3,0<br>(2,3-3,9) | 0,94<br>(0,73-1,21) | 0,62  | 0,6<br>(0,4-1,1) | 0,88<br>(0,51-1,52) | 0,65  |

Gt, Genotyp; RR, Relatives Risiko; CI, 95% Konfidenzintervall.

### 3.2.2.1 Multivariate Analyse

In einem logistischen Regressionsmodell wurde der Effekt der Genotypen der *IL-3*-SNPs auf die milde klinische Malaria, die *P.-falciparum*-Parasitämie und die Malaria-bedingte Anämie untersucht.

#### 3.2.2.1.1 Signale (*p*-Werte) multivarianter Analyse

Das stärkste Signal ( $p_{rs40401} = 1,95 \times 10^{-8}$ ,  $p < 0,05$ ) wird in der Tabelle 5 dargestellt und ergab sich für den SNP *IL-3* rs40401 und die milde klinische Malaria. Derselbe SNP war auch mit der *P.-falciparum*-Parasitämie ( $p_{rs40401} = 1,03 \times 10^{-7}$ ) und der Malaria-bedingten Anämie stark assoziiert ( $p_{rs40401} = 0,002$ ). Ein vergleichbar geringerer aber noch signifikanter Einfluss zeigte *IL-3* rs11575020 auf die *P.-falciparum*-Parasitämie (rs11575020<sup>GG</sup>  $p = 0,003$ ) und die Malaria-bedingte Anämie (rs11575020<sup>GG</sup>  $p = 0,004$ ) und *IL-3* rs168681 auf die milde klinische Malaria (rs168681<sup>AG</sup>  $p = 0,009$ ).

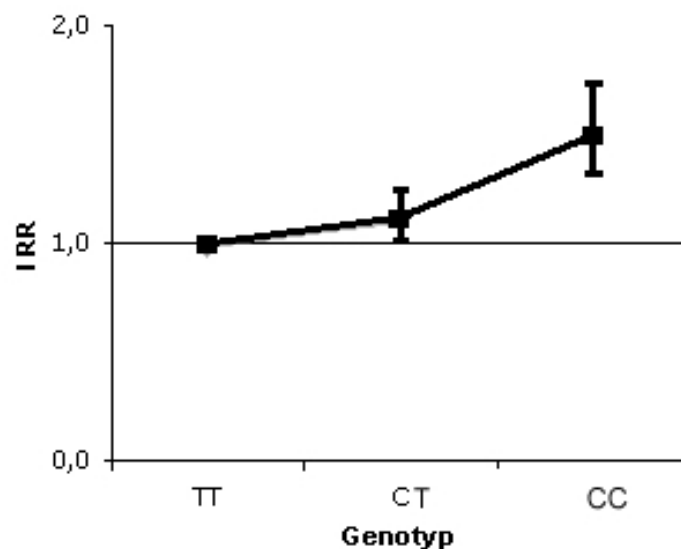
#### 3.2.2.1.2 Relatives Risiko (RR) des *Interleukin-3*-SNP rs40401

*Phänotyp: milde klinische Malaria (Temperatur von  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  und Fieber in den letzten 48 Stunden und gleichzeitige Parasitämie  $> 500/\mu\text{l}$ )*

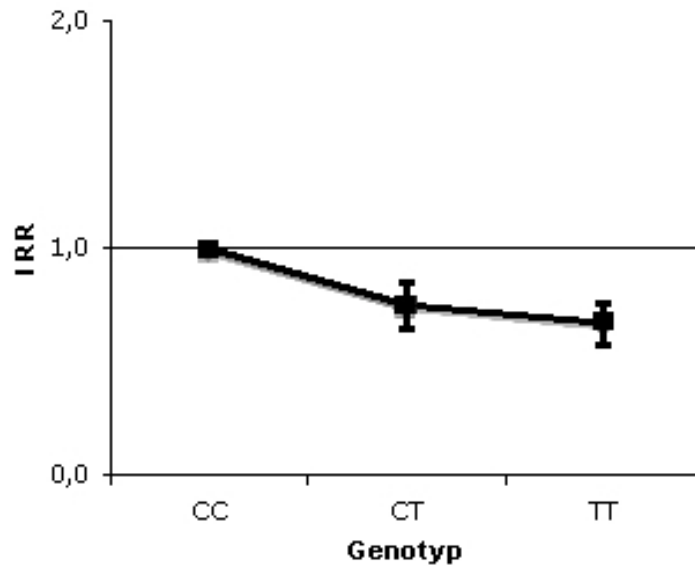
Der heterozygote Genotyp *IL-3* rs40401<sup>CT</sup> zeigte im Vergleich zum Wildtyp *IL-3* rs40401<sup>TT</sup> ein 1,12fach und der homozygote *IL-3* rs40401<sup>CC</sup> ein 1,50fach erhöhtes Risiko, eine milde klinische Malaria zu entwickeln (Tab. 5). Das entspricht einer Suszeptibilität im Heterozygoten (*IL-3* rs40401<sup>CT</sup>) und im Homozygoten (*IL-3* rs40401<sup>CC</sup>) des Locus *IL3* rs40401 auf Malariaepisoden. Kinder mit dem Genotyp *IL-3* rs40401<sup>TT</sup> hatten eine Malaria-Inzidenzdichte von 1,1 (CI 1,0-1,1) pro Person pro Jahr unter Risiko (PYAR) und Heterozygoten und Homozygoten mit den Allelen rs40401<sup>C</sup> hatten eine erhöhte Malaria Inzidenzdichte von 1,2 (CI 1,1-1,3) und 1,6 (CI 1,4-1,8) per PYAR, entsprechend Tabelle 5. Folglich war die Art des Erbgangs mit 12% (RR 1,12, CI 1,01-1,25;  $p = 0,028$ ) und 50% (RR 1,50, CI 1,32-1,73;  $p = 1,95 \times 10^{-8}$ ) Suszeptibilität für Malariaepisoden, meist wahrscheinlich dominant für den Allel rs40401<sup>C</sup>.

Um den Einfluss im Fall einer Protektion zu testen, wurde die multivariante Poisson Regression mit dem reversen Wildtyp ermittelt (definiert als der Homozygot mit der niedrigsten Anzahl an der Studie beteiligten Kinder), nämlich *IL-3* rs40401<sup>CC</sup>. Der heterozygote Genotyp *IL-3* rs40401<sup>CT</sup> wies im Vergleich zum Wildtyp *IL-3* rs40401<sup>CC</sup> ein 0,75fach, der homozygote *IL-3* rs40401<sup>TT</sup> ein 0,67fach niedrigeres Risiko auf, eine milde klinische Malaria zu entwickeln. Das entspricht einer Protektion im Heterozygoten (*IL-3* rs40401<sup>CT</sup>) und Homozygoten (*IL-3* rs40401<sup>TT</sup>) des Locus *IL3* rs40401 gegen Malariaepisoden. Kinder mit dem Genotyp *IL-3* rs40401<sup>CC</sup> hatten eine Malaria Inzidenzdichte von 1,6 (CI 1,4-1,8) pro Person pro Jahr unter Risiko (PYAR) und Heterozygoten und Homozygoten mit den Allelen rs40401<sup>T</sup> hatten eine reduzierte Malaria Inzidenzdichte von 1,2 (CI 1,1-1,3) und 1,1 (CI 1,0-1,1) per PYAR. Folglich war die Art des Erbgangs mit 25% Protektion bei Heterozygoten (RR 0,75, CI 0,65-0,86;  $p = 4,1 \times 10^{-5}$ ) und 33% Protektion bei Homozygoten (RR 0,67, CI 0,58-0,77;  $p = 2,0 \times 10^{-8}$ ) eher dominant für das Allel rs40401<sup>T</sup> (RR 0,71, CI 0,62-0,81,  $p = 2,0 \times 10^{-7}$ ).

Beide RRs mit den entsprechenden 95% CI für die zwei verschiedenen „Referenz“-Wildtypen sind in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt.



**Abb. 8** Darstellung für Allel C als Risikofaktor: die Kurve deutet auf einen dominanten Effekt von C hin.



**Abb. 9** Darstellung für Allel T als Schutzfaktor: die Kurve deutet auf einen dominanten Effekt von T hin.

*Phänotyp: P.-falciparum-Parasitämie (Parasitämie > 500/μl)*

Der heterozygote Genotyp *IL-3* rs40401<sup>CT</sup> zeigte ein 1,1fach, der homozygote *IL-3* rs40401<sup>CC</sup> ein 1,29fach erhöhtes Risiko im Vergleich zum Wildtyp *IL-3* rs40401<sup>TT</sup> eine *P.-falciparum*-Parasitämie zu entwickeln (Tab. 5). Dem entspricht eine Suszeptibilität in dem Heterozygoten (*IL-3* rs40401<sup>CT</sup>) und Homozygoten (*IL-3* rs40401<sup>CC</sup>) des Locus *IL3* rs40401 zu *P.-falciparum*-Parasitämie, wenn der *IL-3* rs40401<sup>TT</sup> der „Referenz“-Genotyp ist. Kinder mit dem Genotyp *IL-3* rs40401<sup>TT</sup> hatten eine parasitämische Inzidenzdichte von 3,0 (CI 2,8-3,1) pro Person pro Jahr unter Risiko (PYAR) und Heterozygoten und Homozygoten mit den Allelen rs40401<sup>C</sup> hatten eine erhöhte Inzidenzdichte von 3,3 (CI 3,1-3,4) und 3,8 (CI 3,5-4,1) per PYAR, entsprechend Tabelle 5. Folglich, die Art des Erbgangs war mit 10% (RR 1,10, CI 1,03-1,17;  $p = 0,005$ ) und 29% (RR 1,29, CI 1,17-1,41;  $p = 1,03 \times 10^{-7}$ ) Suszeptibilität für *P.-falciparum*-Parasitämie, meist wahrscheinlich dominant für den Allel rs40401<sup>C</sup>. Auch hier wurde die multivariante Poisson Regression mit dem reversen Wildtyp ermittelt, nämlich *IL-3* rs40401<sup>CC</sup>. Der heterozygote Genotyp *IL-3* rs40401<sup>CT</sup> beinhaltete ein 0,85fach, der homozygote *IL-3* rs40401<sup>TT</sup> ein 0,78fach niedrigeres Risiko im Vergleich zum Wildtyp *IL-3* rs40401<sup>CC</sup>, eine *P.-falciparum*-Parasitämie zu

entwickeln. Das entspricht einer Protektion in dem Heterozygoten ( $IL-3$  rs40401<sup>CT</sup>) und Homozygoten ( $IL-3$  rs40401<sup>TT</sup>) des Locus  $IL3$  rs40401 gegen Malariaepisoden bei  $IL-3$  rs40401<sup>CC</sup> als „Referenz“-Genotyp. Kinder mit dem Genotyp  $IL-3$  rs40401<sup>CC</sup> hatten eine parasitämische Inzidenzdichte von 3,8 (CI 3,5-4,1) pro Person pro Jahr unter Risiko (PYAR) und Heterozygoten und Homozygoten mit den Allelen rs40401<sup>T</sup> hatten eine reduzierte Inzidenzdichte von 3,3 (CI 3,1-3,4) und 3,0 (CI 2,8-3,1) per PYAR.

*Phänotyp: Malaria-bedingte Anämie (gemessener Hämoglobin < 7,5 g/dl)*

Der heterozygote Genotyp  $IL-3$  rs40401<sup>CT</sup> wies ein 0,94fach, der homozygote  $IL-3$  rs40401<sup>CC</sup> ein 1,35fach erniedrigtes bzw. erhöhtes Risiko im Vergleich zum Wildtyp  $IL-3$  rs40401<sup>TT</sup> auf, eine Malaria-bedingte Anämie zu entwickeln (Tab. 5). Das entspricht einer Protektion in dem Heterozygoten ( $IL-3$  rs40401<sup>CT</sup>) und einer Suszeptibilität in dem Homozygoten ( $IL-3$  rs40401<sup>CC</sup>) des Locus  $IL3$  rs40401 zu Malaria-bedingter Anämie, wenn der  $IL-3$  rs40401<sup>TT</sup> der „Referenz“-Genotyp ist. Kinder mit dem Genotyp  $IL-3$  rs40401<sup>TT</sup> hatten eine Anämie Inzidenzdichte von 0,7 (CI 0,6-0,8) pro Person pro Jahr unter Risiko (PYAR) und Heterozygoten und Homozygoten mit den Allelen rs40401<sup>C</sup> hatten eine erhöhte Inzidenzdichte von 0,6 (CI 0,6-0,7) und 0,9 (CI 0,8-1,1) per PYAR (Tab. 5). Folglich wies die Art des Erbgangs eine 6%ige (RR 0,94, CI 0,82-1,08;  $p = 0,38$  n.s.) Protektion und 35%ige (RR 1,35, CI 1,12-1,62;  $p = 0,002$ ) Suszeptibilität für Malaria-bedingte Anämie auf, sodass man bei dem Allel rs40401<sup>C</sup> von keinem dominanten Erbgang sprechen kann.

Die multivariante Poisson Regression wurde auch mit dem reversen Wildtyp ermittelt, nämlich  $IL-3$  rs40401<sup>CC</sup>. Der heterozygote Genotyp  $IL-3$  rs40401<sup>CT</sup> zeigte ein 0,70fach, der homozygote Genotyp  $IL-3$  rs40401<sup>TT</sup> ein 0,74fach niedrigeres Risiko im Vergleich zum Wildtyp  $IL-3$  rs40401<sup>CC</sup>, eine Malaria-bedingte Anämie zu entwickeln. Das entspricht eine Protektion in dem Heterozygote ( $IL-3$  rs40401<sup>CT</sup>) und Homo-zygote ( $IL-3$  rs40401<sup>TT</sup>) des Locus  $IL3$  rs40401 gegen Malaria-bedingte Anämie bei  $IL-3$  rs40401<sup>CC</sup> als „Referenz“-Genotyp. Kinder mit dem Genotyp  $IL-3$  rs40401<sup>CC</sup> hatten eine Anämie Inzidenzdichte von 0,9 (CI 0,8-1,1) pro Person pro Jahr unter Risiko (PYAR) und Heterozygoten und Homozygoten mit den Allelen

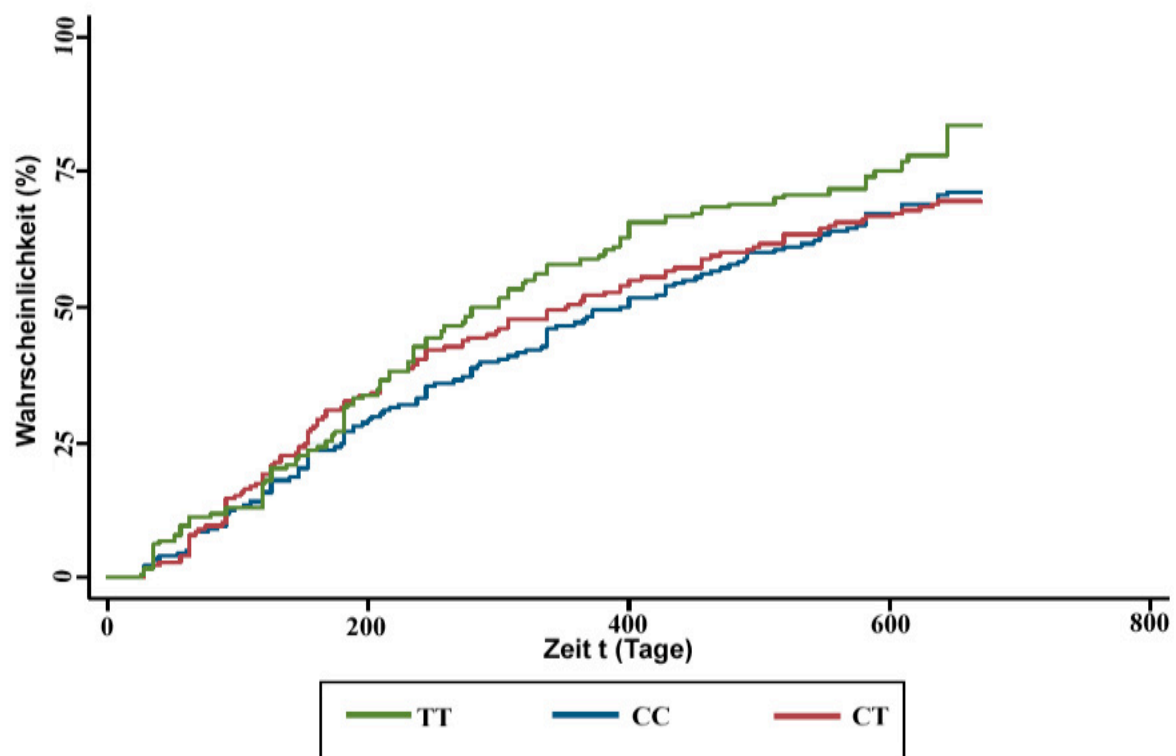


rs40401<sup>T</sup> hatten eine reduzierte Inzidenzdichte von 0,6 (CI 0,6-0,7) und 0,7 (CI 0,6-0,8) per PYAR, entsprechend.

### 3.2.2.2 Kumulative Inzidenz von *Interleukin-3* rs40401 bei milder klinischer Malaria

Ist *IL-3* rs40401<sup>CC</sup> der „Referenz“-Genotyp, geht man von einer Protektion des Allels *IL-3* rs40401<sup>T</sup> aus. Bei Kindern mit dieser Variante zeigte die Cox Regression ein vermindertes Risiko für die erste oder einzige Malariaepisode (rs40401<sup>CT</sup>, Hazardrate 0,81, CI 0,64-1,03,  $p = 0,088$ ; rs40401<sup>TT</sup>, HR 0,78, CI 0,62-0,99,  $p = 0,040$ ).

Die Form der Graphen unterstreicht den Standpunkt eines dominanten Effekts des Polymorphismus (Abb. 10). Gegen Ende des zweijährigen Beobachtungszeitraums wurde bei 23,7% und 33,8% der Kinder mit den Allelen rs40401<sup>CC</sup> und rs40401<sup>T</sup> eine Malariaepisode weder beobachtet noch berichtet.



**Abb. 10** Im Kaplan-Meier Überlebensdiagramm für Malaria Episoden bei Kindern zwischen 3 und 24 Monaten stellt sich die kumulative Inzidenz der ersten oder der einzelnen milden klinischen Episoden dar.

### 3.2.2.3 TDT und qTDT von *Interleukin-3* rs40401 bei milder klinischer Malaria

Für den SNP mit dem signifikantesten  $p$ -Wert, rs40401, wurde der Phänotyp einer oder mehrerer Malariaepisoden (milde klinische Malaria) während der ersten 24 Lebensmonate für Populationsabweichungen mit dem manifestationsangepassten TDT kontrolliert. TDT kann nur bei Trios Mutter-Vater-Kind durchgeführt werden und mindestens ein Elternteil muss heterozygot sein. Es wurden insgesamt 448 Kernfamilien betroffener Nachkommen genotypisiert und in TDT Analysen einbezogen. Im Locus *IL-3* rs40401 konnten signifikante Assoziationen bestätigt werden. Bei den Kindern mit einer Inzidenzdichte  $> 1$  Malariaepidosde/PYAR, unterschied sich die Anzahl der beobachteten Eltern-Nachkommen Transmission im Locus *IL-3* rs40401 signifikant von der in der Mendelsche Regel erwarteten ( $p = 0,019$ ). Um die Rate der Malariaepisoden für mögliche ethnischen Abweichungen zu kontrollieren, wurde in dem Locus *IL-3* rs40401 ein quantitativer TDT (qTDT) durchgeführt (Tab. 6) und dieser Locus zeigte signifikante Assoziation mit der Malaria Inzidenzdichte ( $F$ -Wert 16,3,  $p$ -Wert  $6 \times 10^{-5}$ ). Ein familienbasierter Assoziationstest für quantitative Merkmale (QFAM) wurde durchgeführt, um eine Assoziation mit dem quantitativen Phänotyp Inzidenzdichte der Malaria zu testen [128,126].

**Tab. 6** Klassische und quantitative Transmission/Ungleichgewicht-Test

| SNP          | TDT               |          |                    | qTDT      |                    |                           |
|--------------|-------------------|----------|--------------------|-----------|--------------------|---------------------------|
|              | beobachtet<br>T/U | erwartet | $p$ -Wert          | $F$ -Wert | $p$ -Wert          | $p_{\text{Bonferroni}}^a$ |
| IL-3 rs40401 | 143/106           | 124,5    | 0,019 <sup>b</sup> | 16,3      | $6 \times 10^{-5}$ | $1,0 \times 10^{-4}$      |

<sup>a</sup> Bonferroni Signifikanzniveau.

<sup>b</sup>  $p$ -Wert mit adaptiver Permutation  $p=0,019$ , OR 1,35 (rs40401<sup>C</sup> vs. rs40401<sup>T</sup>), 249 informative Transmissionen.

T/U, Verhältnis übertragen/nicht übertragen.

#### 3.2.2.4 TDT und qTDT von den übrigen *Interleukin-3*-SNPs bei milder klinischer Malaria

Für die übrigen SNPs (rs3091336, rs11575020, rs168681, rs3091338) wurde ebenso der Phänotyp einer oder mehrerer Malariaepisoden (auch milde klinische Malaria) während der ersten 24 Lebensmonate für Populationsabweichungen mit dem TDT kontrolliert. In dem Locus *IL-3* rs168681 konnten signifikante Assoziationen bestätigt werden (Tab. 7). Bei den Kindern mit einer Inzidenzdichte von über einer Malariaepidosde/PYAR, unterschied sich die Anzahl beobachteter Eltern-Nachkommen Transmissionen im Locus *IL-3* rs168681 auch signifikant von der in der Mendelsche Regel erwarteten ( $p = 0,034$ ). Für die SNPs *IL-3* rs3091336, *IL-3*rs11575020 und *IL-3*rs3091338 konnte keine signifikanter Zusammenhang bestätigt werden.

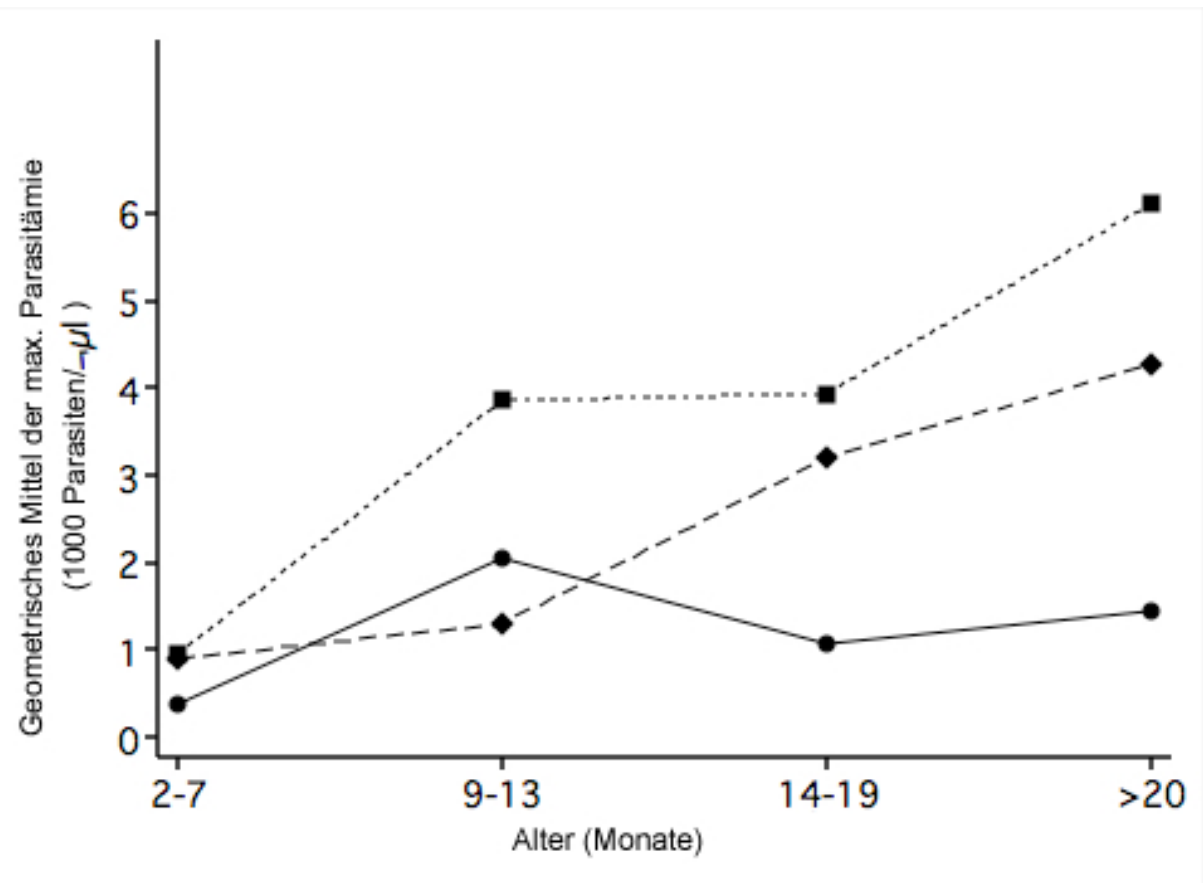
**Tab. 7** TDT der übrigen Varianten

| SNP        | T/U    | $p$ -Wert |
|------------|--------|-----------|
| rs3091336  | 103:95 | 0,570     |
| rs11575020 | 62:51  | 0,301     |
| rs168681   | 65:43  | 0,034     |
| rs3091338  | 63:52  | 0,305     |

T/U, Verhältnis übertragen/nicht übertragen.

#### 3.2.2.5 Höhe der *P.-falciparum*-Parasitämie und *Interleukin-3* rs40401

Das geometrische Mittel der Parasitämien wuchs erwartungsgemäß mit dem Alter an und war bei den Kindern mit dem *IL-3*-Genotyp rs40401<sup>TT</sup> höher als bei den Heterozygoten rs40401<sup>CT</sup>. Bei Kindern mit dem Genotyp rs40401<sup>CC</sup> war ein Anstieg der Parasitämie kaum zu verzeichnen.



**Abb. 11** Geometrisches Mittel der max. Parasitämien aller Untersuchungen jedes Kindes innerhalb von Altersbereichen stratifiziert nach IL-3-Genotypen. Durchgehende Linie, rs40401<sup>CC</sup>; gestrichelte Linie, rs40401<sup>CT</sup>; gepunktete Linie, rs40401<sup>TT</sup>.

## 4 Diskussion

### 4.1 Kritische Bewertung der verwendeten Methodik

#### 4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient zur Vervielfältigung von DNS-Abschnitten aus sehr geringen Menge an genomischer Ausgangssubstanz. Wurden die Proben manuell pipettiert, konnte es zur Kontamination von Proben kommen. Dies konnte durch negative Kontrollen widerlegt werden. Bei Verwendung der kostengünstigen *Taq*-Polymerase (durchschnittliche Fehlerdichte  $8,0 \times 10^{-6}$ ) und aufgrund ihrer weniger akkuraten DNS-Amplifikation konnte es zum Einbau von falschen Nukleotiden in die sich amplifizierende Sequenz kommen. Eine Alternative dazu wäre die Anwendung einer korrekturaktive Polymerase (*proof reading activity*; durchschnittliche Fehlerdichte  $2,0 \times 10^{-6}$ ), die bei Fehlererkennung die Kettenverlängerung abbricht und somit weniger fehlerhafte Amplifikate produziert [129]. Da hier bestimmte Kandidaten-SNPs mit bekannten Mutationen untersucht wurden, waren zufällige Nukleotidaustausche als Fehlermöglichkeit irrelevant.

#### 4.1.2 Automatische Sequenzierung

Bei der Sequenzierreaktion kann es beim manuellen Pipettieren der Proben zu Verunreinigungen beim Reaktionsansatz kommen, die ebenso wie bei der PCR durch Positiv- und Negativansätze erfasst werden konnten.

#### 4.1.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

FRET-Hybridisierungstechnik hat sich für eine schnelle Erfassung von Einzel-Nukleotid-Polymorphismen etabliert. Die Genotypisierung mehrerer Proben ist innerhalb von wenigen Minuten nach der Amplifikation möglich. Diese Methodik ist locus-spezifisch und benötigte die Konstruktion allelspezifischer *Primer*, welche nur für diese Genotypisierung angewendet wurden. Der Vorteil von FRET ist die geringe Menge an genomischem Ausgangsmaterial. Durch die hohen Preise für markierte Oligonukleotide und Genotypisierungsgerät, lohnt sich diese Technik bei einem hohen Probenumsatz. Das System ist homogen und alle Reagenzien wurden zu Beginn der Reaktion zugegeben, was Verunreinigungen und Aufmerksamkeitsfehler

minimierte. Das Vorliegen zusätzlicher Mutationen nahe der zu typisierenden Stelle kann die Schmelzkurve des Assays verändern und folglich können an falsch positive Ergebnisse resultieren. Umgekehrt werden unbekannte Mutationen nicht entdeckt, wenn die Schmelzkurven nicht verändert werden.

#### 4.1.4 Management und Eingabe der Daten

Die Daten wurden von einem ersten Studienmitarbeiter entsprechend einem standardisierten Protokoll in die Datenbank übertragen, und die Eingabe von einem zweiten Mitarbeiter kontrolliert. Das Risiko von Übertragungsfehler wurde dadurch minimiert.

#### 4.1.5 Studiendesign und Statistik

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Longitudinalstudie durchgeführt, bei der die Patienten im Sinne einer Panelstudie zu mehreren Zeitpunkten untersucht wurden. Auf diese Art lassen sich intra- und interindividuelle Veränderung erfassen und ermöglicht die Analyse unterschiedliche Infektionsverläufe, wie asymptomatische Parasitämie, Malaria mit Fieber und ohne Begleitsymptomen und Malaria mit Begleitsymptome. Diese unterschiedlichen Infektionsverläufe korrekieren mit Unterschieden in der Inzidenz von Malariaepisoden und der Dynamik häufigen Auftretens von Malariaepisoden [130,131].

Gegenüber einer anderen Form der Longitudinaluntersuchung, der Trenderhebung, bei der für jede Untersuchung neue Teilnehmer ausgewählt werden, haben Paneluntersuchungen den Vorteil, dass die gemessene Variable am selben Proband über mehrere Messzeitpunkte hinweg untersucht wird, was Kausalbeziehungen zwischen mehreren im Panel erhobenen Variablen aufzeigen kann. Auf diese Weise sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass Zufälle die mögliche Erklärung für die erhobenen Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein einer *IL-3*-Variante und der Malariaepisode (bzw. Parasitämie und Anämie) sein könnten. Nicht gemessene Unterschiede zwischen den Studienkindern können auch teilweise für die Assoziation zwischen den Genotypen der Varianten und den Phänotypen mit verantwortlich sein. Die statistisch signifikanten Signale ( $p$ -Werte und 95%-Konfidenzintervale) wurden für die antimalarische Behandlungen korrigiert aber in die Analyse können weder das

Studiendesign, noch die Möglichkeit, dass die Beobachtungen auf dem Boden systemischer Fehler entstanden sind, berücksichtigt werden.

Die Longitudinaluntersuchung, ebenso wie eine Fall-Kontrollstudie, ermöglichen keinen Rückschluss auf die Ursache des Aussetzens bestimmter Symptome. Das Vorhandensein eines Zusammenhangs zwischen einem SNP des *IL-3*-Gens und einer Malariaepisode (bzw. Parasitämie oder Anämie) impliziert nur eine statistische Abhängigkeit der beiden Variablen, dennoch keine Aussage über die Ursache und Wirkung. Diese statistische Analyse ist trotzdem kein Beweis dafür, dass genau dieser SNP für die gefundene Assoziationen verantwortlich ist. Alters- und Testzeiteffekte sind konfundiert, man kann also schwer feststellen, ob bei einer Erhebung der beobachtete Effekt wirklich auf die Altersunterschiede der Probanden zurückzuführen ist oder ob der Zeitpunkt der Messung den Effekt mit beeinflusst. Das gilt vor allem für die Höhe einer *P.-falciparum*-Parasitämie, welche aus unterschiedlichen Gründen individuellen Schwankungen unterliegt. Besonders bei asymptomatischen Parasitentägern kann die Anzahl der Parasiten pro  $\mu$ l Blut sehr gering sein. Aus diesem und anderen Gründen (z. B. ethnische Unterschiede in Populationen, Ausprägung eines Merkmals wegen Selektionsdruck) besteht keine Übertragbarkeit auf andere Kohorten. Alterseffekte und individuelle immunologische Faktoren jedes Probanden wären auch in Murinen Modellen nicht experimentell reproduzierbar.

Gegenüber einer Querschnittstudie, bei der alle relevanten Variablen gleichzeitig mit einer einmaligen Messung erhoben werden, hat diese Form der Längsschnittstudie den Vorteil, dass Veränderungen auf Individualdatenniveau am selben Proband festgestellt werden können. Eine Kombination aus Längsschnitt- und Querschnitt-Studie wäre eine Möglichkeit einige Konfundierungen auszuschalten.

Das Problem der Panelmortalität kann bei Sterblichkeit, Umzügen, Verweigerungen und ähnlichen Ausfällen aus dem Panel, auftreten. Alle Individuen, bei denen > 80% der Genotypen vermisst waren, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

Trotz des höheren personellen und finanziellen Aufwandes der Teilnehmerverwaltung und -betreuung, der längeren Dauer und der Notwendigkeit einer großen Probandenanzahl, stellt das Longitudinalstudiendesign die weitaus zuverlässigste Untersuchungsmethode für die Hypothese dieser Arbeit dar.

## 4.2 Diskussion der Studiengruppe

Die Kinderkohorte stammte von einer IPTi Studie, die im Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine (KCCR) etabliert wurde. KCCR ist ein Gemeinschaftsunternehmen zwischen dem Gesundheitsministerium der Republik Ghana, der Kwame Nkrumah University of Science and Technology (KNUST), Kumasi, Ghana, und dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNI), Hamburg, Deutschland.

Die Probanden wurden sukzessive in die Studie aufgenommen und stammten aus derselben Region. Es war davon auszugehen, dass die Kinder einem ähnlichen Risiko ausgesetzt waren, an einer milden Malaria zu erkranken und somit einem ähnlichen Selektionsdruck ausgesetzt waren. Die Kriterien für die Probandenaufnahme und den Ablauf der Studie waren protokolliert und gleich für jeden Teilnehmer. Dadurch, dass die Kinder nicht extra nach Kumasi für die Untersuchungen fahren mussten, sondern die Studienmitarbeiter sich bis in den Ortschaften bewegten, haben, war ein gewisser Abstand zwischen den Dörfern und der Einfluss sozioökonomischer Faktoren kein Ausschlusskriterien für ihren Teilnahme. Die Familien der Probanden waren somit repräsentativ für die Bevölkerung und die Kinder repräsentativ für die milden Malariaepisoden in ihrem Alter in der Region. Man geht deshalb von keiner Störgröße aus, die sich aus einer Selektion ergeben (Selektions**bias**) und die Genotypenfrequenzen verfälschen könnte. Weiter kommt es in Malaria Endemiegebieten häufig vor, dass die Menschen zwar einen für Malariaparasit zufällig positiven Blutausstrich bei gleichzeitiger malariaähnlicher Symptomatik haben; diese jedoch nicht wegen einer manifesten Malaria, sondern aufgrund unabhängiger Erkrankungen wie eine Pneumonie, Helminthiasis oder Septikämie auftreten [39,132,133].

Hinsichtlich der Abstammung waren die Probanden wenig heterogen. Circa 16% der Teilnehmer hatten keine Ashanti Herkunft. Epidemiologische Beobachtungen und *in-vitro*-Untersuchungen verschiedener Ethnien, haben bedeutende Unterschiede auf der Grundlage genetischer Faktoren in parasitologischen, immunologischen und klinischen Parametern der Malaria dargestellt. Beispielsweise leidet die westafrikanische Volksgruppe *Fulani* an weniger Malariaattacken und zeigt eine geringere Prävalenz einer *P.-falciparum*-Infektion auf als die benachbarten Bevölkerungsgruppen [76,134]. Eine mögliche funktionelle Grundlage dieser



Malariaprotektion ist eine hohe Antikörperantwort auf Malariaantigene [135,136]. Diese epidemiologische Daten wurden *in-vitro* untersucht und die Fulani zeigten einen höheren Antikörperspiegel gegen *P.-falciparum*-Antigene als bei den *Mossi* und *Rimaibé*, die ebenso in Burkina Faso unter denselben Umweltbedingungen leben [76,136].

Eine mögliche Informationsabweichung (enlg. *bias*) ergab sich aus individuellen Beurteilungen der Ärzte bei der klinischen Untersuchung der Kinder, die sich aber jederzeit an dem Studienprotokoll orientierten. Dadurch wurden die Abweichungen minimiert und ein mit den *IL-3*-SNPs assoziierter systematischer Fehler konnte verringert werden. Fraglich kann die Validität der Eingabe der Mütter bezüglich der sozioökonomischen Faktoren und des klinischen Berichts (z.B. Fieber in den letzten 48 Stunden), sein. Ein solcher *Reportingbias* wäre aber wahrscheinlich eher indifferentiell und damit nicht sehr relevant.

Der prozentuale Anteil an vermissten Kindern lag bei jedem Polymorphismus zwischen 2,2% bis 4,6%, was bei einer Studienkohorte von über 1000 Teilnehmer eine geringe Bedeutung hat und somit die Ergebnisse unwesentlich beeinflusst. Bezüglich der Ausprägung einer Malaria-bedingte Anämie wurde der hereditäre Faktor Sichelzellanämie der Kinder kontrolliert. Bei der Korrektur der Analyse für diese Variable änderten sich die Werte um weniger als 5%. Ursachen wie Mangelernährung (Folat- und Eisenmangel) und HIV-Infektion konnten nicht erfasst werden.

#### **4.3 Die untersuchten *Interleukin-3*-Polymorphismen**

Individuen, die Regionen mit einer hohen Malariaprävalenz bewohnen, werden vor schwerer Erkrankung bewahrt [137], wie beispielsweise die Träger der Mutationen im Hämoglobin oder in immunologischen Faktoren. Sie sind gegenüber einer schweren Malaria und der damit verbundenen Fatalität teilweise geschützt [46]. Der genetische Einfluss auf die milde Malaria ist wenig beschrieben. Genauso wenig weiß man über die genaue Rolle des *IL-3* in der Pathophysiologie der Malaria. Die Datenanalyse der vorliegenden Arbeit ergab einen Zusammenhang eines *IL-3*-Polymorphismus (*IL-3* rs40401) mit der Protektion gegen eine milde Malaria, bzw. *P.-falciparum*-Parasitämie. Dieselbe Mutation senkte das Risiko für die Malaria-bedingte Anämie.

#### 4.3.1 Funktion der untersuchten *Interleukin-3*-Polymorphismen

Unter den fünf untersuchten Varianten führte ein einzelner exonischer Poly-morphismus zum Aminosäureaustausch (*IL-3* rs40401). Die restlichen vier lagen auf Promotorbereichen (davon drei am Anfangsende des Gens) und induzieren keinen Aminosäureaustausch, können aber möglicherweise die Promotoraktivität des *IL-3*-Gens beeinflussen.

Der Polymorphismus *IL-3* rs40401, welcher in allen untersuchten Probanden das stärkste Signal (*p*-Wert) hat, ist exonisch, non-synonym, auf Position +79 lokalisiert und wurde in der chinesischen Population mit Suszeptibilität zum Morbus Basedow, einer Autoimmunkrankheit der Schilddrüse, assoziiert [105]. Er verursacht aufgrund einer Substitution von Cytosin gegen Thymin (C → T) im ersten Nukleotid der 27sten Codon (Ser27Pro) einen Aminosäureaustausch von Prolin auf Serin. Die Mutation *IL-3* rs40401<sup>C>T</sup> kommt signifikant häufiger in der afrikanische Population (70% in Yoruba) als bei Kaukasiern (21%) und Asiaten (56%) vor (Tab. 2). Es kann vermutet werden, dass durch die Migration des Menschen aus Afrika nach Norden Selektionsdruck durch Malaria nachgelassen hat und der Vorteil des Allels rs40401<sup>T</sup> gegenüber Malaria weniger bedeutsam wurde als der Nachteil gegenüber Autoimmunkrankheiten. So wurde der Polymorphismus bei diesen Populationen langsam gegen rs40401<sup>C</sup> balanciert. In einer Studie mit einer koreanischen Kohorte wurde nachgewiesen, dass der Prolin Allele derselben Polymorphismus mit einem dominanten und einem protektiven Effekt auf die Entwicklung von Asthma bei nicht-Atopikern und mit einem geringeren Risiko für Atopie bei gesunden Kontrollpersonen assoziiert ist [108]. Erhöhte Serumwerte für IgE sind Markenzeichen der Atopie und Helminthiasis [110]. Auch Einwohner endemischer Malariagebieten zeigen hohe Serummittel mit totaler und antimalarisch-spezifischer IgE [111,112]. Die direkte Beteiligung von *IL-3* in der Pathogenese der Malaria ist wenig beschrieben, aber der Einfluss von *IL-3* auf die Proliferation von Basophilen, Mastzellen und Eosinophilen ist bekannt, welche Bindungsstellen für IgE sind und in parasitären Infektionen stark erhöhte Werte zeigen.

#### 4.4 Bedeutungen des *Interleukin-3*-Gens im Zusammenhang mit Malaria

Die Protektion genetischer Merkmale von der schweren Form der Malaria ist weitreichend untersucht worden [138,139]. Im Gegensatz dazu ist der Effekt der Humangenetik auf die Infektionsdynamik der *P. falciparum*-Malaria und die milde klinische Form dieser Erkrankung bislang wenig erforscht worden. Immunologische Faktoren, vor allem Zytokine, spielen eine wichtige Rolle in der Pathologie der Malaria. Der direkte Effekt von *IL-3* auf die Krankheitsentstehung ist noch nicht bekannt, aber dieses Gen liegt auf der Chromosomenregion 5q31, welche in früheren Studie mit der Malariaparasitämie stark assoziiert wurde, wodurch dieses Gen eine hohe Relevanz für die Forschung erhält. Die Analyse genetischer Grundlagen der Infektionsdynamik und der milden klinischen Form einer Malaria tropica kann dazu beitragen, pathophysiologische Zusammenhänge aufzudecken.

Die Zielpopulation unserer Untersuchung bewohnt ein holoendemisches Gebiet für Malaria, in der ihre Transmission relativ stabil ist. In diesem Gebiet herrscht eine hohe Erkrankungsprävalenz im frühen Kindesalter. In den ersten 3 bis 6 Monaten erkranken die Kinder selten an Malaria aufgrund der Leihimmunität und des hohen Maßes an fetalem Hämoglobin [37]. Asymptomatische Parasitämien treten häufig beim älteren Kindern als Resultat einer partiellen Immunität auf, die in den ersten Lebensjahren ausgebildet wird [36]. In dieser Phase ist der Einfluss auf die Infektionsdynamik von entscheidender Bedeutung für das Risiko eine schwere Malaria tropica zu entwickeln [140] und wird bei jeder Reinfektion geringer [141]. Nach kontinuierlichem Nachlassen des protektiven Effekts im Säuglingsalter sind die Kinder in den ersten Lebensjahren besonders für schwere Verlaufsformen der Malaria anfällig [27,141]. In Regionen mit hoher Malariatransmission ( > 100 infizierte Stiche pro Person pro Jahr), wie im Fall unseres Studiengebietes, ist die Anämie die häufigste Komplikation, in Gebieten mit niedriger Transmission ( < 15 infizierte Stiche pro Person pro Jahr) ist es die zerebrale Malaria.

#### 4.4.1 Assoziation von *Interleukin-3* rs40401 und *P.-falciparum*-Parasitämie sowie klinischer milder Malaria

Die stärkste Assoziation vermittelte die exonische, non-synonyme *IL-3*-Variante rs40401 im Zusammenhang mit dem Auftreten einer milden klinischen Malaria bzw. einer *P.-falciparum*-Parasitämie.

*IL-3* ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, welcher zum Überleben, zur Vermehrung und zur Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen beiträgt und *in vivo* vorwiegend als proinflammatorisches Zytokin wirkt [82]. Es stellt eine wichtige Verbindung zwischen dem hämatopoetischen System und dem Immunsystem dar. *IL-3* ist nicht essenziell für die Hämatopoese, aber erforderlich für die Aufrechterhaltung eines hohen Basophilen- und Mastzellen-Titers. Diese sind wichtige Effektorzellen in der TH2-Immunität gegenüber Parasiten und anderen akuten oder chronischen immunologischen Antworten wie IgE-assoziierte allergische Reaktionen [86,87]. Erhöhte Serumwerte für IgE sind wiederum Markenzeichen der Atopie und parasitärer Infektionen [110]. *IL-3* spielt auch eine wichtige Rolle in der Aktivierung lokaler Eosinophilen [88].

In einer Studie mit Patienten aus einem hochendemischen Malariagebiet hat eine erhöhte Ausschüttung von *IL-3* die Kapazität zur Adhäsion von mit *P. falciparum* parasitierten Erythrozyten und die Rosettenbildung bei schwerer Malaria verstärkt [114]. Vergleichbare Arbeiten wurden in Thailand durchgeführt und es ergaben sich keine relevanten Unterschiede in der Allelfrequenz der *IL-3*-Variante -16 (T → C) bei Patienten mit mildem und schwerem Malaria [142].

Weder zur Anfälligkeit noch zur Protektion hat die Produktion von *IL-3* bei mit *P. berghei* ANKA-infizierten Mäusen beigetragen [143]. Unterstützt wurden diese Daten durch eine Studie von Asami *et al.* [144], bei der die *IL-3* Produktion in CFU-S (colony-forming units in spleen) in Mäusen viel höher bei den mit nicht-letalem *P. yoelii* 17x-infiziert als bei den mit dem letalen *P. berghei*, welches von einer quantitativen Erhöhung von Makrophagen gefolgt war.

Frühere Studien berichteten über eine signifikant bessere Wirksamkeit des rh*IL-3*/S8 (engl. *recombinant human IL-3/serine 8*) als rh*IL-3*/P8 (engl. *recombinant human IL-3/proline 8*) in Sensibilisierung von Leukozyten zur Freisetzung von *IL-4* und in *TNF-α* [109]. Dies entspricht einer hohen *IL-3* Aktivität und somit höheren *IL-4*- und *TNF-α*-Titern für die Träger der T Allelvariante. Aus einer Studie mit burkinischer

*Fulani* ergab sich eine erhöhte Antikörperkonzentration gegen Plasmodien bei den Trägern der Promotorvariante IL4-524 T. IL-4 und IL-3 sind Zytokine, die eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Malaria spielen und beide scheinen zur Malaria-resistenz beizutragen [76].

Das geometrische Mittel der *P.-falciparum*-Parasitämie von *IL-3* rs40401 wurde ermittelt und zeigte, wie vermutet, keine signifikante Erhöhung in Anwesenheit des *IL-3* rs40401<sup>C</sup> Allels. Die Höhe einer *P.-falciparum*-Parasitämie kann aus unterschiedlichen Gründen individuellen Schwankungen unterliegen. Altersunterschiede der Probanden und Zeitpunkt der Messung sind konfundiert. Besonders bei asymptomatischen Parasitenträgern kann die Anzahl der Parasiten pro µl Blut sehr gering sein. Die Schwankung kann auch mit dem Zeitpunkt der Messung zusammenhängen, da das Blut für die mikroskopische Diagnostik pro Untersuchung einmalig abgenommen wurde.

Die Bedeutung einer strukturellen und funktionellen Änderung auf Proteinebene durch die *IL-3* rs40401<sup>C->T</sup> Mutation ist spekulativ, da physikalische und komparative Erwägungen nicht in der Literatur zu finden sind.

#### 4.4.2 Assoziation von *Interleukin-3* rs40401 und Malaria-bedingter Anämie

Anämie ist eine der häufigsten Manifestationen der Malaria in Gebieten mit hoher Übertragung von *P. falciparum* [145,146,147] und betrifft vor allem Kinder unter fünf Jahren [148]. Auch in unserer Studienpopulation war das Vorkommen einer Malaria-bedingten Anämie verbreitet. Weiter wurde ein signifikant geringeres Risiko einer Anämie bei Patienten mit heterozygotem Genotyp *IL-3* rs40401<sup>CT</sup> und homozygotem *IL-3* rs40401<sup>TT</sup> beobachtet. Dieses Ergebnis unterstreicht die Vermutung, dass die *IL-3* rs40401-Variante die Manifestation bestimmter Symptome der Malaria beeinflussen könnte.

In Malaria-Endemiegebieten ist die Ausprägung der Anämie vom Alter und Gewicht des Kindes, dem Ernährungszustand, dem Bildungsniveau der Eltern, ihrer Entfernung zum nächsten Krankenhaus, dem Gesundheitsbewusstsein, der Art der Unterkunft, der kürzlichen und aktuellen Krankengeschichte und vor allem dem Vorhandensein einer *P.-falciparum*-Malaria, beeinflusst [149].

Im Rahmen einer Plasmodium-Infektion ist es häufig schwer nachzuvollziehen, inwiefern die vorliegende Anämie auf die Malaria zurückzuführen ist. In Tamale,

Norden von Ghana, wurde die Anämie unabhängig von der Ausprägung der Parasitämie mit dem Alter der Patienten und Unterernährung assoziiert [150,151]. Ein stufenweiser Abfall der Hämoglobinwerte wird durch wiederholte oder chronische Infektionen verursacht, potenziell unabhängig von der Parasitämie. Die Höhe der Anzahl der Parasiten im Blut galt in Ergebnisse einer Studie mit tanzanischen Patienten als die weit stärkste Ursache einer schweren Anämie [149]. Forschungsergebnisse deuteten darauf hin, dass der pathophysiologische Mechanismus einer *P.-falciparum*-Malaria-bedingten Anämie sich in den verschiedenen Erkrankungs-stadien unterscheidet, wobei die Anämie bei Kindern mit einer akuten Infektion auf immunologischen und mechanischen Vorgängen und die Anämie mit chronischer Parasitämie auf einer Dyserythropoiese im Knochenmark beruht [145]. Die pathophysiologischen Hintergründe der Anämie bei Malaria sind sehr komplex und multifaktoriell [152,153]. Eine Kombination akuter Eisensequestrierung im retikulo-endothelialen System assoziiert mit einer kürzeren Erythrozyten Überlebenszeit ist lange vermutet worden. Die Immunhämolyse scheint eine geringe Rolle zu spielen. Frühere Studien legen nahe, dass eine herabgesetzte Erythropoese zur Entwicklung einer Anämie beiträgt [154] und eine inadäquate Erythropoetin-produktion wurde in Patienten mit akuter *P.-falciparum*-Malaria festgestellt [155]. Andererseits sind IL-1, TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$ , welche zur Pathologie der Malaria beitragen, mit einer *In-vitro*-Inhibition der Erythropoese verbunden. Zum Zweck der Bestimmung der SCF (engl. *stem cell factor*) und IL-3 Spiegel im Serum von Patienten mit akuter *P.-falciparum*-Malaria hat die Arbeitsgruppe Burgmann *et al.* [113] einen vorübergehenden IL-3 Serumanstieg bei anämischen Patienten beobachtet. Da SCF und IL-3 Wachstumsfaktoren sind, ist ein Anämie-induzierter Anstieg dieser Faktoren zu erwarten. Hinsichtlich der Ergebnisse vorliegender Arbeit, ist die Anwesenheit der IL-3 rs40401<sup>C->T</sup> Mutation in der Studienkohorte mit einem niedrigeren Risiko einer Malaria-bedingten Anämie verbunden.

## 5 Zusammenfassung

Die hohe Mortalität der Malaria vor dem reproduktiven Alter hat einen bedeutenden Selektionsdruck auf das humane Genom ausgeübt. Zeitpunkt und Verlauf der ersten Infektionen mit *P. falciparum* im Kleinkindalter sind entscheidend für das Risiko des Auftretens einer schweren Malaria tropica [156] und sind von genetischen Wirts-faktoren abhängig. In Segregationsanalysen wurde die Chromosomenregion 5q31-33 mit der Kontrolle von Parasitämie und Reinfektionsdynamik bei jüngeren Individuen assoziiert. Wichtige Einflussfaktoren für den Verlauf der Malariapathogenese waren das Alter bei der Erstinfektionen, sowie der damit verbundene immunologische Status der infizierten Kinder [1-3]. Das *IL-3*-Gen liegt auf dem Multigencluster 5q31-33, wobei eine direkte Rolle in der Pathologie der Malaria nicht bekannt ist.

Es wurde eine molekularbiologische Typisierung von fünf ausgesuchten *IL-3*-Varianten (eine exonische und vier auf dem Promotor) basierend auf Blutproben und Daten einer klinisch-epidemiologischen Studie von 1070 Kindern aus Zentralghana durchgeführt. Die Kinder wurden im Alter von 3 Monaten rekrutiert und die Untersuchungen liefen bis zum Erreichen des 2. Lebensjahres. Die anschließende Assoziationsanalyse für Parasitämie mit *P. falciparum*, milde klinische Malaria, und Malaria-bedingte Anämie fanden in einer Längsschnittuntersuchung statt. Neben den Kandidaten-SNPs zeigte der Locus *IL-3* rs40401, welche eine exonische, nicht-synonyme Mutation aufweist, die stärkste Assoziation (rs40401<sup>CT</sup>, RR 0,75;  $p = 4,1 \times 10^{-5}$ ; rs40401<sup>TT</sup>; RR 0,67;  $p = 2,0 \times 10^{-8}$ ) für die milde Malaria auf. Dieser SNP verursacht einen Aminosäurenaustausch von Prolin auf Serin (Ser27Pro) durch die Substitution von Cytosin gegen Thymin (C→T) auf dem ersten Nukleotid der 27sten Codon. Anschließende TDT und qTDT wurden durchgeführt, um informative Transmissionen festzustellen, bzw. In mögliche ethnische Abweichungen zu kontrollieren. Die Ergebnisse unterstreichen die Rolle von *IL-3*-Gen-Varianten für das Risiko einer milden Malaria und weisen auf eine Bedeutung von *IL-3* für die Malariapathogenese hin.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungen

|                    |                                                               |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|
| A                  | Adenin                                                        |
| ANKA               | Angströmquelle Karlsruhe                                      |
| <i>A. funestus</i> | <i>Anopheles funestus</i>                                     |
| ATP                | Adenosintriphosphat                                           |
| BNI                | Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin                     |
| C                  | Cytosin                                                       |
| CD                 | engl. <i>cluster of differentiation</i>                       |
| CFU-S              | engl. <i>colony-forming units in spleen</i>                   |
| CI                 | Konfidenzintervall                                            |
| CTP                | Cytosintriphosphat                                            |
| DNS                | Desoxyribonukleinsäure                                        |
| dNTP               | Desoxynukleotidtriphosphat                                    |
| ddATP              | Didesoxyadenosintriphosphat                                   |
| FRET               | Fluoreszenzresonanz-Energietransfer                           |
| FY                 | Duffy                                                         |
| G                  | Guanin                                                        |
| GM-CSF             | Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor        |
| GPI                | engl. <i>glucose phosphate isomerase</i>                      |
| GPS                | engl. <i>Global Positioning System</i>                        |
| GTP                | Guanosintriphosphat                                           |
| Hb                 | Hämoglobin                                                    |
| HIV                | Humanes Immundefizienz Virus                                  |
| HLA                | Humane Leukozytenantigen                                      |
| HWG                | Hardy-Weinberg Gleichgewicht, engl. <i>HWE</i>                |
| ICAM               | engl. <i>intercellular adhesion molecule</i>                  |
| <i>IL</i>          | <i>Interleukin</i>                                            |
| INF, IFN           | Interferon (engl. <i>to interfere</i> )                       |
| IPTi               | intermittierende präventive Behandlung von Kleinkindern       |
| IR                 | Inzidenzdichte, engl. <i>incidence rate</i>                   |
| RR                 | Relatives Risiko                                              |
| KCCR               | Kumasi Center for Collaborative Research in Tropical Medicine |



|                      |                                                                       |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| LD                   | Kopplungsungleichgewicht                                              |
| min                  | Minute(n)                                                             |
| ml                   | Milliliter                                                            |
| NCBI                 | National Center for Biotechnology Information                         |
| nm                   | Nanometer                                                             |
| NO                   | Stickstoffmonoxid                                                     |
| P, Pro               | Prolin                                                                |
| PCR                  | Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )    |
| <i>P. berghei</i>    | <i>Plasmodium berghei</i>                                             |
| <i>P. falciparum</i> | <i>Plasmodium falciparum</i>                                          |
| <i>P. vivax</i>      | <i>Plasmodium vivax</i>                                               |
| <i>P. yoelii</i>     | <i>Plasmodium yoelii</i>                                              |
| PYAR                 | engl. <i>person-year-risk</i>                                         |
| qTDT                 | quantitativer Transmissions-Ungleichgewicht-Tests                     |
| RNA                  | Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )                     |
| S, Ser               | Serin                                                                 |
| sec                  | Sekunde(n)                                                            |
| SNP                  | Punktmutation (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )          |
| T                    | Thymin                                                                |
| TDT                  | Transmissions-Ungleichgewicht-Tests                                   |
| Tm                   | Schmelzpunkt                                                          |
| TNF                  | Tumornekrosefaktor                                                    |
| TH                   | T (Thymus) , H (Helfer)                                               |
| VCAM                 | engl. <i>vascular adhesion molecule</i>                               |
| WHO                  | Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organization</i> ) |
| YRI                  | Yoruba                                                                |
| µl                   | Mikroliter                                                            |

## **6.2 Hersteller**

Hemocue, Grossostheim, Deutschland.

NucleoMag 96 Blood, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland.

PicoGreen dsDNA Quantitation Assay/Kit, Molecular Probes, USA.

LightTyper, Roche Holding GmbH, Mannheim, Deutschland.

4th Dimension, 4D v6.8.5, San Jose, USA.

Intercooled Stata MP v10, StataCorp, College Station, USA.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Garcia, A., et al., *Linkage analysis of blood Plasmodium falciparum levels: interest of the 5q31-q33 chromosome region*. Am J Trop Med Hyg, 1998b. **58**: p. 705–709.
2. Rihet, P., et al., *Malaria in humans: Plasmodium falciparum blood infection levels are linked to chromosome 5q31-q33*. Am J Hum Genet, 1998b. **63**: p. 498–505.
3. Flori, L., et al., *Linkage and association between Plasmodium falciparum blood infection levels and chromosome 5q31-33*. Genes and Immunity, 2003. **4**: p. 265–268.
4. Snow, R.W., et al., *The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria*. Nature, 2005. **434**: p. 214–217.
5. Korenromp, E.L., et al., *Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress toward targets based on verbal autopsy*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**: p. 349–58.
6. World Health Organization. *World Malaria Report 2010*. Verfügbar unter [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106_eng.pdf).
7. Ministry of Health, Government of the Republic of Zambia. *Zambia national malaria indicator survey 2008*. Lusaka, 2008. Verfügbar unter [www.nmcc.org.zm/files/ZambiaMIS2008Final.pdf](http://www.nmcc.org.zm/files/ZambiaMIS2008Final.pdf).
8. Rowe, A., *The burden of malaria mortality among African children in the year 2000*. Int J Ep, 2006. **35** (3): p. 691-704.
9. Menendez, C., et al., *The impact of placental malaria on gestational age and birth weight*. J Infect Dis, 2000. **181**: p 1740-1745.
10. Marks, F., et al., *Parasitological Rebound Effect and Emergence of Pyrimethamine Resistance in Plasmodium falciparum after Single-Dose Sulfadoxine-Pyrimethamine*. J Infect Dis, 2005. **192** (11): p. 1962-5.
11. Evans, J.A., et al., *Pre-treatment with chloroquine and parasite chloroquine resistance in Ghanaian children with severe malaria*. Qjm, 2005. **98** (11): p. 789-96.
12. Mota, M.M., et al., *Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection*. Science, 2001. **291**: p. 141–144.
13. Sturm, A., et al., *Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids*. Science, 2006. **313**: p. 1287–1290.
14. Gilles, H.M., *Epidemiology of malaria*. In: Gilles, H.M. and D.A. Warrell, Bruce

- Chwatt's essential malariology, Boston, Edward Arnold, 1993. **3**: p. 124–163.
15. Patel, S.N., et al., *Disruption of CD36 impairs cytokine response to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol and confers susceptibility to severe and fatal malaria in vivo*. J Imm, 2007. **178** (6): p. 3954-61.
16. Pichyangkul, S., P. Saengkrai, and H.K. Webster, *Plasmodium falciparum pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta*. Am J Trop Med Hyg, 1994. **51**: p. 430–35.
17. Clark, I.A., et al., *Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**: p. 509-39.
18. Clark, I.A., K.A. Rockett, and W.B. Cowden, *Possible central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral malaria*. Lancet, 1992. **340**: p. 894-896.
19. Rockett, K.A., *Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression*. Parasite Immunol, 1994. **16**: p. 243-249.
20. Anstey, N.M., et al., *Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitricoxide synthase type 2 expression*. J Exp Med, 1996. **184**: p. 557-567.
21. Schofield, L. and F. Hackett, *Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites*. J Exp Med, 1993. **177**: p. 145-153.
22. Tachado, S.D., et al., *Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium, Trypanosoma and Leishmania: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties*. Proc Natl Acad Sci, 1997. **94**: p. 4022-4027.
23. Tuteja, R., *Malaria – an overview*. FEBS Journal, 2007. **274** (18): p. 4670-9.
24. Carter, R. and K.N. Mendis, *Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria*. Clinical Microbiology Reviews, 2002. **15** (4): p. 564-94.
25. WHO, *Severe falciparum malaria*. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000. **94** (1): p. 1–90.
26. Molyneux, M., *The Child Health Dialogue - Recognition of Malaria*. Welcome Trust Centre, Blantyre, Malawi, 1999.
27. Maitland, K. and C.R.J.C. Newton, *Acidosis of severe falciparum malaria: heading for a shock ?* Trends Parasitol, 2005. **1**: p. 11-16.
28. Mackintosh, C.L., J.G. Beeson, and K. Marsh, *Clinical features and pathogenesis*

of severe malaria. Trends Parasitol, 2004. **20**: p. 597-603.

29. Greenwood, B., K. Marsh, and B. Snow, *Why do some African children develop severe malaria*. Parasitol Today, 1991. **7**: p. 277–281.
30. Foster, S., and M. Philipps, *Economics and its contribution to the fight against malaria*. Ann Trop Med Parasitol, 1998. **92**: p. 391–398.
31. Chima, R.I., C.A. Goodman, and A. Mills, *The economic impact of malaria in Africa: A critical review of the evidence*. Health Policy, 2003. **63**: p. 17–36.
32. Schellenberg, D., et al., *The silent burden of anaemia in Tanzanian children: A communitybased study*. Bull World Health Organ, 2003. **81**: p. 581–590.
33. Ghosh, K., *Pathogenesis of anemia in malaria: a concise review*. Parasitol Res, 2007. **101** (6): p. 1463-9.
34. Holder, A.A., *Malaria vaccines*. Proc Natl Acad Sci, 1999. **99**: p. 1167–69.
35. Iriemenam, N.C., et al., *Cytokine profiles and antibody responses to Plasmodium falciparum malaria infection in individuals living in Ibadan, southwest Nigeria*. Afr Health Sci, 2009. **9** (2): p. 66-74.
36. Artavanis-Tsakonas, K., et al., *The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**: p. 145-52.
37. Brabin, B., *An Analysis of malaria parasite rates in infants: 40 years after MacDonald*. Trop Dis Bull, 1990. **87** (10): p. 1-21.
38. Bottius, E. and A. Guanzirolli, et al., *Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1996. **90** (1): p. 15-19.
39. Hartgers, F.C., et al., *Responses to malarial antigens are altered in helminth-infected children*. J Infect Dis, 2009. **199** (10): p. 1528-35.
40. Pierce, S.K. and L.H. Miller, *World Malaria Day 2009: what malaria knows about the immune system that immunologists still do not*. J Immunol, 2009. **182** (9): p. 5171-7.
41. Doolan, D.L., H.P. Beck, and M.F. Good, *Evidence for limited activation of distinct CD4+ T cell subsets in response to the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein in Papua New Guinea*. Parasite Immunol, 1994. **16**: p. 129–36.
42. Malaguarnera, L. and S. Musumeci, *The immune response to Plasmodium falciparum malaria*. Lancet Infect Dis, 2002. **2** (8): p. 472-8.

43. Naik, R.S., et al., *Glycosylphosphatidylinositol anchors of Plasmodium falciparum: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis*. J Exp Med, 2000. **192**: p. 1563-1576.
44. Chizzolini, C., et al., *T lymphocyte interferon gamma production induced by Plasmodium falciparum antigen is high in recently infected non-immune and low in immune subjects*. Clin Exp Immunol, 1990. **79**: p. 95-99.
45. Omer, F.M. and E.M. Riley, *Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection*. J Exp Med, 1998. **188**: p. 39-48.
46. Kwiatkowski, D.P., *How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria*. Am J Hum Genet, 2005. **77**: p. 171–192.
47. Miller, L.H., *Protective selective pressure*. Nature, 1996. **383**: p. 480-481.
48. Haldane, J.B.S., *The rate of mutation of human genes*. Hereditas, 1949. **35**: p. 267-273.
49. Sjoberg, K., et al., *Genetic regulation of human anti-malarial antibodies in twins*. Proc Natl Acad Sci, 1992. **89**: p. 2101–2104.
50. Aucan, C., et al., *Familial correlation of immunoglobulin G subclass responses to Plasmodium falciparum antigens in Burkina Faso*. Infect Immun, 2001. **69**: p. 996–1001.
51. Mackinnon, M.J., et al., *Heritability of Malaria in Africa*. PLoS Med, 2005. **2**: p. 340.
52. Jepson, A.P., et al., *Genetic regulation of fever in Plasmodium falciparum malaria in Gambian twin children*. J Infect Dis, 1995. **172**: p. 316–319.
53. Rihet, P., et al., *Human malaria: Segregation analysis of blood infection levels in a suburban area and a rural area in Burkina Faso*. Genet Epidemiol, 1998. **15**: p. 435–450.
54. Flori, L., et al., *Linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in families living in Burkina Faso*. Hum Mol Genet, 2003. **12**: p. 375–378.
55. Marquet, S., et al., *Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by Schistosoma mansoni on chromosome 5q31-q33*. Nat Genet, 1996. **14** (2): p. 181-4.
56. Meyers, D.A., et al., *Evidence for a locus regulating total serum IgE levels*

- mapping to chromosome 5. Genomics*, 1994. **23**: p. 464–470.
57. Xu, J., et al., *Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma*. *Am J Hum Genet*, 2000. **67**: p. 1163–1173.
58. Flint, J., et al., *The population genetics of the haemoglobinopathies*. Baillieres Clin Haematol, 1993. **6** (1): p. 215-62.
59. Allen, S. J., et al., *Alpha-thalassaemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria*. *Proc Natl Acad Sci*, 1997. **94**: p. 14736–14741.
60. Marsh, K., et al., *Antibodies to blood stage antigens of Plasmodium falciparum in rural Gambians and their relation to protection against infection*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicina and Hygiene*, 1989. **83** (3): p. 293-303.
61. Cabrera, G., et al., *The sickle cell trait is associated with enhanced immunoglobulin G antibody responses to Plasmodium falciparum variant surface antigens*. *J Infect Dis*, 2005. **191** (10): p. 1631-8.
62. Williams, T.N., et al., *An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait*. *PLoS Medicine*, 2005. **2** (5): p. 128.
63. Modiano, D., G. Luoni, and B.S. Sirima, *Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria*. *Nature*, 2001. **414**: p. 305-308.
64. Clark, T.G., et al., *Allelic heterogeneity of G6PD deficiency in West Africa and severe malaria susceptibility*. *Eur J Hum Genet*, 2009. **17** (8): p. 1080-5.
65. Miller, L.H., et al., *The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype FyFy*. *N Engl J Med*, 1976. **295** (6): p. 302-4.
66. Tournamille, C., et al., *Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals*. *Nat Genet*, 1995. **10** (2): p. 224-8.
67. Hill, A.V.S., *Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria*. *Nature*, 1991. **352**: p. 595-600.
68. Jepson, A., et al., *Genetic linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in Gambian children: study of affected sibling pairs*. *BMJ*, 1997. **315** (7100): p. 96-7.
69. Frodsham, A.J. and A.V.S. Hill, *Genetics of infectious diseases*. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**: p. 187-194.
70. Sabeti, P., et al., *CD40L association with protection from severe malaria*. *Genes Immun*, 2002. **3**: p. 286–291.

71. Angulo, I. and M. Fresno, *Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9** (6): p. 1145-52.
72. Muniz-Junqueira, M.I., L.L. dos Santos-Netto, and C.E. Tosta, *Influence of tumor necrosis factor-alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic Plasmodium falciparum in vitro*. Cell Immunol, 2001. **208** (2): p. 73-9.
73. Plebanski, M. and A.V. Hill, *The immunology of malaria infection*. Curr Opin Immunol, 2000. **12** (4): p. 437-41.
74. Wilson, J.N., et al., *Analysis of IL-10 haplotypis associations with severe malaria*. Genes Immun, 2005. **6** (6): p. 462-6.
75. Koch, O., et al., *IFNGR1 gene promoter polymorphisms and susceptibility to cerebral malaria*. J Infect Dis, 2002. **185**: p. 1684–1687.
76. Luoni, G., et al., *Antimalarial antibody levels and IL4 polymorphism in the Fulani of West Africa*. Genes Immun, 2001. **2**: p. 411–414.
77. Morahan, G., et al., *A promoter polymorphism in the gene encoding interleukin-12 p40 (IL12B) is associated with mortality from cerebral malaria and with reduced nitric oxide production*. Genes Immun, 2002. **3**: p. 414–418.
78. Walley, A.J., et al., *Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and susceptibility to clinical malaria in a Gambian case-control study*. Eur J Hum Genet, 2004. **12**: p. 132–138.
79. Miyajima, A., et al., *Cytokine receptors and signal transduction*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 295-331.
80. Ihle, J.N., L. Pepersack, and L. Rebar, *Regulation of T cell differentiation: in vitro induction of 20-a-hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes is mediated by a unique lymphokine*. J Immunol, 1981. **126**: p. 2184.
81. Ihle, J.N., J.C. Lee, and L. Reba, *T cell recognition of Moloney leukemia virus proteins. 111. T cell proliierative responses against gp70 are associate with the production of a lymphokine inducing 20-a-hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes*. J Immunol, 1981. **127**: p. 2565.
82. Mroczko, B. and M. Szmitkowski, *Hematopoietic cytokines as tumor markers*. Clin Chem Lab Med, 2004. **42** (12): p. 1347-54.
83. Ihle, J.N., et al., *Interleukin 3: possible roles in the regulation of lymphocyte differentiation and growth*. Immund Rev, 1981. **63**: p. 101.
84. Hapel, A., et al., *Establishment of continuous cultures of Thy 1.2+, Ly 1+,2- T*



cells using purified interleukin 3. *Cell*, 1981. **25**: p. 179.

85. Lee, J.C., A.J. Hapel, and J.N. Ihle, *Constitutive production of a unique lymphokine (IL 3) by the WEHI-3 cell line*. *J Immunol*, 1982. **128**: p. 2393-2398.

86. Paul, W.E., R.A. Seder, and M. Plaut, *Lymphokine and cytokine production by FcεRI+ cells*. *Adv. Immunol*, 1993. **53**: p. 1-29.

87. Lantz, C.S., et al., *Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites*. *Nature*, 1998. **392**: p. 90-3.

88. Yoshimura-Uchiyama, C., et al., *Changing expression of IL-3 and IL-5 receptors in cultured human eosinophils*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **309** (1): p. 26-31.

89. MacDonald, S.M., et al., *Recombinant IL-3 induces histamine release from human basophils*. *J Immunol*, 1989. **142**: p. 3527-32.

90. Le Gros, G., et al., *IL-3 promotes production of IL-4 by splenic non-B, non-T cells in response to Fc receptor cross-linkage*. *J Immunol*, 1990. **145**: p. 2500-6.

91. Ihle, J.N., et al., *Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity*. *J Immunol*, 1983. **131**: p. 282-7.

92. Kirshenbaum, A.S., et al., *IL-3-dependent growth of basophil-like cells and mast-like cells from human bone marrow*. *J Immunol*, 1989. **142**: p. 2424-9.

93. Valent, P., et al., *Interleukin-3 is a differentiation factor for human basophils*. *Blood*, 1989. **73**: p. 1763-9.

94. Ebner, S., et al., *A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern*. *J Immunol*, 2002. **168**: p. 6199-207.

95. Buelens, C., et al., *Interleukin-3 and interferon cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties*. *Blood*, 2002. **99**: p. 993-8.

96. Frendl, G. and D.I. Beller, *Regulation of macrophage activation by IL-3. I. IL-3 functions as a macrophage-activating factor with unique properties, inducing Ia and lymphocyte function-associated antigen-1 but not cytotoxicity*. *J Immunol*, 1990. **144**: p. 3392-9.

97. Frendl, G., M.J. Fenton, and D.I. Beller, *Regulation of macrophage activation by*

- IL-3. II. IL-3 and lipopolysaccharide act synergistically in the regulation of IL-1 expression.* Immunol, 1990. **144**: p. 3400–10.
98. Firestein, G.S., et al., *Cytokines in chronic inflammatory arthritis. I. Failure to detect T cell lymphokines (interleukin 2 and interleukin 3) and presence of macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and a novel mast cell growth factor in rheumatoid synovitis.* J Exp Med, 1988. **168**: p. 1573–86.
99. Alvaro-Gracia, J.M., N.J. Zvaifler, and G.S. Firestein, *Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes.* J Clin Invest, 1990. **86**: p. 1790–8.
100. Brühl, H., et al., *Important role of interleukin-3 in the early phase of collagen-induced arthritis.* Arthritis Rheum, 2009. **60** (5): p. 1352-61.
101. Le Beau, M.M., N.D. Epstein, and S.J. O'Brien, *The interleukin 3 gene is located on human chromosome 5 and is deleted in myeloid leukemias with a deletion of 5q.* Proc Natl Acad Sci, 1987. **84**: p. 5913-7.
102. Yang, Y.C.S., *Molecular cloning of a primate cDNA and the human gene for interleukin 3.* Lymphokines, 1988. **15**: p. 375-91.
103. Yang, Y.C., et al., *The human genes for GM-CSF and IL-3 are closely linked in tandem on chromosome 5.* Blood, 1988. **71**: p. 958–961.
104. Yamada, R., et al., *Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease.* Am J Hum Genet, 2001. **68**: p. 674–85.
105. Chu, X., et al., *Polymorphisms in the interleukin 3 gene show strong association with susceptibility to Graves' disease in Chinese population.* Genes Immun, 2009. **10** (3): p. 260-6.
106. Chen, Q., et al., *Association study of CSF2RB with schizophrenia in Irish family and case-control samples.* Mol Psychiatry, 2008. **13** (10): p. 930-8.
107. Makashima, H., et al., *Two polymorphisms within interleukin-3 (hIL3) gene detected by mismatch PCR/RFLP.* Genes Immun, 1999. **1** (2): p. 156-8.
108. Park, B.L., et al., *Interleukin 3 (IL3) polymorphisms associated with decreased risk of asthma and atopy.* J Hum Genet, 2004. **49** (10): p. 517-27.

109. Schweiger, A., et al., *Differences in proliferation of the hematopoietic cell line TF-1 and cytokine production by peripheral blood leukocytes induced by 2 naturally occurring forms of human IL-3*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107** (3): p. 505-10.
110. Jarrett, E.E. and H.R. Miller, *Production and activities of IgE in helminth infection*. Prog Allergy, 1982; **31**: p. 178-233.
111. Desowitz, R.S., *Plasmodium-specific immunoglobulin E in sera from an area of holoendemic malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1989. **83** (4): p. 478-9.
112. Perlmann, H., et al., *IgE elevation and IgE anti-malarial antibodies in Plasmodium falciparum malaria: association of high TgE levels with cerebral malaria*. Clin Exp Immunol, 1994. **97** (2): p. 284-92.
113. Burgmann, H., et al., *Levels of stem cell factor and interleukin-3 in serum in acute Plasmodium falciparum malaria*. Clin Diagn Lab Immunol, 1997. **4** (2): p. 226-8.
114. Ringwald, P., et al., *Parasite virulence factors during falciparum malaria: rosetting, cytoadherence, and modulation of cytoadherence by cytokines*. Infect Immun, 1993. **61** (12): p. 5198-204.
115. World Meteorological Organization, *Weather information for Kumasi*. Ghana Meteorological Services Department, 2007. Verfügbar unter <http://www.worldweather.org/151/c00922.htm>.
116. Kreuels, B., et al., *Spatial variation of malaria incidence in young children from a geographically homogeneous area with high endemicity*. J Infect Dis, 2008. **197** (1): p. 85-93.
117. Kobbe, R., et al., *Malaria incidence and efficacy of intermittent preventive treatment in infants (IPTi)*. Malar J, 2007. **6**: p. 163.
118. GRASS Development Team, *Geographic Resources Analysis Support System (GRASS)*. 2007. Verfügbar unter <http://grass.itc.it/>.
119. Saiki, R.K., et al., *Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**: p. 487.
120. Chien, A., D.B. Edgar, and J.M. Trela, *Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus*. J Bacteriol, 1976. **127** (3): p. 1550-7.
121. Helling, R.B., et al., *Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoidbacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. Replication and transcription of eukaryotic DNA in Escherichia coli*. J Virol, 1974. **14**

(5): p. 1235-44.

122. Kretz, K., W. Callen, and V. Hedden, *Cycle sequencing*. PCR Methods Appl, 1994. **3** (5): p. 107-12.

123. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci, 1977. **74** (12): p. 5463-7.

124. Sonnenberg, A., *Bonferroni-Holm sequential test procedure*. Z Gastroenterol, 1985. **23** (12): p. 703-4.

125. Spielman, R.S., R.E. McGinnis, and W.J. Ewens, *Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)*. Am J Hum Genet, 1993. **52** (3): p. 506-16.

126. Abecasis, G.R., L.R. Cardon, and W.O. Cookson, *A general test of association for quantitative traits in nuclear families*. Am J Hum Geget, 2000. **66** (1): p. 279-92.

127. Kreuels, B., et al., *Spatial variation of malaria incidence in young children from a geographically homogeneous area with high endemicity*. J Infect Dis, 2008. **197** (1): p. 85-93.

128. Fulker, D.W., et al., *Combined linkage and association sib-pair analysis for quantitative traits*. Am J Hum Genet, 1999. **64** (1): p. 259-67.

129. Cline, J., J.C. Braman, and H.H. Hogrefe, *PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases*. Nucleic Acids Res, 1996. **24** (18): p. 3546-51.

130. Williams, T., et al., *High incidence of malaria in alpha-thalassaemic children*. Nature, 1996. **383**: p. 522-525.

131. Luty, A.J., *Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with Plasmodium falciparum in young African children*. J Infect Dis, 1999. **179**: p. 980-988.

132. Schellenberg, D., et al., *The silent burden of anaemia in Tanzanian children: a communitybased study*. Bull World Health Organ, 2003. **81** (8): p. 581-90.

133. Evans, J.A., et al., *High mortality of infant bacteraemia clinically indistinguishable from severe malaria*. Qjm, 2004. **97** (9): p. 591-7.

134. Modiano, D., et al., *Different response to Plasmodium falciparum malaria in west African sympatric ethnic groups*. Proc Natl Acad Sci, 1996. **93** (23): p. 13206-11.

135. Modiano, D., A. Chiucchiuini, and V. Petrarca, et al., *Humoral response to*

- Plasmodium falciparum* Pf155/ring-infected erythrocyte surface antigen and Pf332 in three sympatric ethnic groups of Burkina Faso. Am J Trop Med Hyg, 1998. **58**: p. 220–224.
136. Modiano, D., A. Chiucchiuini, and V. Petrarca, et al., *Interethnic differences in the humoral response to non-repetitive regions of the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein*. Am J Trop Med Hyg, 1999. **61**: p. 663–667.
137. Weatherall, D.J., *Common genetic disorders of the red cell and the 'malaria hypothesis'*. Ann Trop Med Parasitol, 1987. **81** (5): p. 539-48.
138. Hill, A.V., *The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001. **2**: p. 373-400.
139. May, J., et al., *Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria*. JAMA, 2007. **297** (20): p. 2220-6.
140. Luty, A.J., et al., *Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with Plasmodium falciparum in young African children*. J Infect Dis, 1999. **179** (4): p. 980-8.
141. Phillips, R.S., *Current status of malaria and potential for control*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14** (1): p. 208-26.
142. Ohashi, J., et al., *A single-nucleotide substitution from C to T at position -1055 in the IL-13 promoter is associated with protection from severe malaria in Thailand*. Genes Immun, 2003. **4** (7): p. 528-31.
143. de Kossodo, S., and G.E. Grau, *Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria*. J Immunol, 1993. **151** (9): p. 4811-20.
144. Asami, M., et al., *A comparative study of the kinetic changes of hemopoietic stem cells in mice infected with lethal and non-lethal malaria*. Int J Parasitol, 1992. **22** (1): p. 43-7.
145. Abdalla, S., et al., *The anaemia of P. falciparum malaria*. Br J Haematol, 1980. **46** (2): p. 171-83.
146. Rasheed, A., S. Saeed, and S.A. Khan, *Clinical and laboratory findings in acute malaria caused by various plasmodium species*. J Pak Med Assoc, 2009. **59** (4): p. 220-3.
147. Reyburn, H., et al., *Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe Plasmodium falciparum malaria*. Jama, 2005. **293** (12): p. 1461-70.

148. Brown, C.A., *Severe Falciparum Malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000. **94** (1): p. 90.
149. Kahigwa, E., et al., *Risk factors for presentation to hospital with severe anaemia in Tanzanian children: a case-control study*. Trop Med Int Health, 2002. **7** (10): p. 823-30.
150. Koram, K.A., et al., *Seasonal profiles of malaria infection, anaemia, and bednet use among age groups and communities in northern Ghana*. Trop Med Int Health, 2003. **8** (9): p. 793-802.
151. Mockenhaupt, F.P., et al., *Manifestation and outcome of severe malaria in children in northern Ghana*. Am J Trop Med Hyg, 2004. **71** (2): p. 167-72.
152. Phillips, R.E., et al., *The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration*. Q J Med, 1986. **58**: p. 305–323.
153. Phillips, R.E., and G. Pasvol, *Anaemia of Plasmodium falciparum malaria*. Bailliere's Clin Haematol, 1992. **5**: p. 315–330.
154. Woodruff, A.W., V.E. Ansdell, and L.E. Pettitt, *Cause of anaemia in malaria*. Lancet, 1979. **i**: p. 1055–1057.
155. Burgmann, H., et al., *Serum levels of erythropoietin in acute Plasmodium falciparum malaria*. Am J Trop Med Hyg, 1996. **54**: p. 280–283.
156. Williams, T.N., et al., *High incidence of malaria in alpha-thalassaemic children*. Nature, 1996. **383** (6600): p. 522-5.

## 8 Eigene Publikation

- Meyer C.G., Calixto Fernandes M.H., Intemann C.D., Kreuels B., Kobbe R., Kreuzberg C., Ayim M., Ruether A., Loag W., Ehmen C., Adjei S., Adjei O., Horstmann R.D., May J., *IL3 variant on chromosomal region 5q31-33 and protection from recurrent malaria attacks*. Hum Mol Genet, 2011. **20** (6): p. 1173-81.

## 9 Danksagung

Der grösste Dank geht an meinen Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Juergen May, der mit mir eine Gemeinsamkeit Namens Bassum hat. Juergen stand mir mit seinem fundierten Fachwissen zur Seite und gab mir viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit. Für seine Geduld und die vielen geopfertten Momente bedanke ich mich. Er wurde nicht zuletzt auch durch private Gespräche zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter.

Ich danke allen Mitarbeitern des Bernhard-Nocht-Instituts und des *Kumasi Centre for Collaborative Research* (KCCR), die mir stets Ansprechpartner während meines Aufenthaltes in Ghana waren, auch Christina Kreuzberg, der damaligen Studien-ärztin. Ein liebes Dankeschön geht auch an Meral Tosun, die meine Zeit in Kumasi bereicherte und für die gegenseitige emotionale Unterstützung sorgte, auch während angespannter und gestresster Tage: trotz unserer gegensätzlichen Temperamente, waren wir ein echtes Team!

Ich danke der Volkswagenstiftung, die das Forschungsprojekt gefördert hat und ohne dessen finanzielle Unterstützung ein erfolgreicher Abschluss nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Christopher Intemann, der mir stets Ansprechpartner war und meine Auswertungen durch kreativen Ideen, Anregungen und konstruktive Kritik bereicherte.

Meinem Freund und Lebensbegleiter, Alexandre Santos, habe ich die gute Formatierung und den Glauben in alle meine Fähigkeiten zu verdanken.

Meinen Geschwistern danke ich, da sie mir stets Mut zugesprochen haben.

Vielen Dank auch an meine Freunde, die für die erforderliche Abwechslung sorgten und an Ludwig Schretzenmayr und Saskia Altenhof, die mich in der recht komplizierten Deutschen Grammatik unterstütz haben.

Ein besonderes und herzliches Wort des Dankes möchte ich an meinen Eltern richten, die mich immer im Leben begleitet haben und alle meine Entscheidungen begeistert unterstützt haben. Emotional und auch finanziell habe ich meiner Mutter und meinem Vater für meine gesamte akademische Ausbildung zu danken!



## 10 Lebenslauf

### ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT

- ab 09/11            Assistenzärztin, Klinik für Anästhesiologie,  
                         UniversitätsSpital Zürich, Zürich, Schweiz
- 10/09 – 07/11    Assistenzärztin, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,  
                         Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### PROMOTIONSARBEIT

- seit 03/05            Promotion bei Prof. Dr. med J. May,  
                         Abteilung für Infektionsepidemiologie,  
                         Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, Deutschland
- 03–10/05            Auslandsaufenthalt im Rahmen der Promotionstätigkeit am Kumasi  
                         Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine,  
                         Kumasi, Ghana

### PRAKTISCHES JAHR

- 06/07 – 08/07    Innere Medizin, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasilien
- 08/07 – 12/07    Allgemeinchirurgie, Universidade de São Paulo,  
                         São Paulo, Brasilien
- 12/07 – 03/08    Tropenmedizin, Fundação de Medicina Tropical do Amazonas,  
                         Manaus, Brasilien
- 04/08 – 06/08    Innere Medizin, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center,  
                         New York, USA

### HOCHSCHULSTUDIUM

- 04/02-12/08      Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg, Deutschland  
                         erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 04/2004  
                         zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 12/2008

### STIPENDIEN

- 01/99 – 01/00    Stipendiatin der Rotary Foundation
- 07                   Stipendiatin des Auslandsförderprogramms Medi-Chance vom MLP
- 08/07 – 12/07    Stipendiatin des Deutschen Akademischen Austauschdienstes

### SPRACHKENNTNISSE

Portugiesisch (Muttersprache), Deutsch (sehr gut),  
Englisch (sehr gut), Spanisch (sehr gut), Italienisch (mässig)

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Dissertation bisher an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen. Ich habe mich anderweitig um keine Promotion bemüht.

Ferner versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Maria Helena Calixto Fernandes