

Aus dem Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen

Sektion Humanparasitologie

Leiter: Professor Dr. P. G. Kremsner

**Einfluss von Polymorphismen im Promotor
der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase
auf die Aktivität in vitro**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Anna Lena Stroh

aus

Berlin-Steglitz

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner
1. Berichterstatter: Professor Dr. N. Blin

Ich danke meinen Eltern
Dr. Monika Stroh und Norbert Stroh

Inhaltsverzeichnis

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	6
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1 EINLEITUNG	10
1.1 Definition der Malaria	10
1.2 Epidemiologie	10
1.3 Zyklus der Malariaparasiten	10
1.4 Krankheitsbild und Therapie der Malaria	11
1.5 Mechanismen der Immunantwort bei Malaria tropica	13
1.6 Stickstoffmonoxid-Synthase – Einteilung und Wirkmechanismus	14
1.7 Molekulare Wirkungen von Stickstoffmonoxid.....	16
1.8 Regulation der iNOS	18
1.9 Stickstoffmonoxid und Malaria.....	20
1.10 Zielsetzung	22
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.2 Oligonukleotide.....	26
2.3 Agarosegel-Elektrophorese.....	27
2.4 Verfahren zur Reinigung von DNA	28
2.4.1 Äthanol-fällung	28
2.4.2 NucleoSpin® Extract 2 in 1 Kit.....	28
2.5 Vervielfältigung von Plasmiden in Escherichia coli.....	30
2.5.1 Herstellung von elektrokompenten Escherichia coli.....	30
2.5.2 Elektroporation.....	31
2.5.3 Weitere Verwendung der Klone	31
2.6 E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I.....	32
2.7 QIAGEN Plasmid Maxi Kit.....	33
2.8 QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit.....	35
2.9 Sequenzierung von DNA.....	37
2.9.1 Cycle Sequencing-Reaktion	37
2.9.2 CENTRI-SEP - Reinigung	38
2.9.3 Sequenzier- Elektrophorese	39
2.10 Restriktion mit Endonukleasen.....	39

2.11	Ligation von PCR-Fragmenten und Vektor	40
2.11.1	Restriktion der Fragmente und des Vektors	40
2.11.2	Phenol-Extraktion.....	40
2.11.3	Ligase-Reaktion	41
2.12	Verwendete Medien und Puffer	41
2.13	Verwendete Plasmide	43
2.14	Zellkultur von adhärenenten Lungeneithelzellen (Zelllinie A549).....	44
2.14.1	Kulturmedium.....	44
2.14.2	Auftauen der Zellen.....	45
2.14.3	Teilen der Zellen	45
2.14.4	Zellen zählen	46
2.15	Transfektion von A549	46
2.16	Luziferase-Assay	49
2.17	Statistische Analyse.....	50
3	ERGEBNISSE.....	52
3.1	Aktivitätsmessung mit Wildtyp-Konstrukten	52
3.2	6kb-Konstrukte	59
3.3	Plasmide mit Alu-Element 1	62
3.4	Plasmide mit Alu-Element 2	67
3.5	Plasmide mit beiden Alu-Elementen.....	71
3.6	Plasmide mit der Lambaréné-Mutation	74
3.7	Plasmide mit -2446 G.....	78
4	DISKUSSION.....	81
4.1	Einfluss der Promotor-Abschnitte auf die Promotor-Aktivität	81
4.2	Einfluss des CCTTT-Repeats und der Mutation bei -2446 C→G auf die Promotor-Aktivität	83
4.3	Einfluss der Lambaréné-Mutation (-954 G→C) auf die Promotor-Aktivität	84
4.4	Einfluss der Mutation bei -1026 T→G auf die Promotor-Aktivität	86
4.5	Schlussfolgerung	86
5	ZUSAMMENFASSUNG	87
6	LITERATUR.....	88
	DANKSAGUNG.....	96

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

ABBILDUNGEN

Abb. 1: Biosynthese von NO aus Arginin	16
Abb. 2: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	24
Abb. 3: Prinzip der Gelelektrophorese.....	27
Abb. 4: Prinzip des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	36
Abb. 5: Transfektion	48
Abb. 6: Schematische Darstellung der Länge der Promotorfragmente im iNOS- Gen für die Plasmidkonstrukte und der Position der Mutationen.....	51
Abb. 7: Aktivität der Wildtyp-Konstrukte basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2)	53
Abb. 8: Stimulierbarkeit der Wildtyp-Konstrukte (als Quotient Stim./basal).....	54
Abb. 9: Aktivität der Plasmide mit 6 kb-Insert basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2)	59
Abb. 10: Stimulierbarkeit der Plasmide mit 6kb-Insert	60
Abb. 11: Aktivität Plasmide mit Alu-Element 1 basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2)	62
Abb. 12: Stimulierbarkeit der Plasmide mit Alu-Element 1	63
Abb. 13: Aktivität der Plasmide mit Alu-Element 2 basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2).....	67
Abb. 14: Stimulierbarkeit der Plasmide mit Alu-Element 2	68
Abb. 15: Aktivität der Plasmide mit beiden Alu-Elementen basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2)	71
Abb. 16: Stimulierbarkeit der Plasmide mit beiden Alu-Elementen.....	72
Abb. 17: Aktivität der Plasmide mit Lambaréné-Mutation basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2)	74
Abb. 18: Stimulierbarkeit der Plasmide mit Lambaréné-Mutation	75
Abb. 19: Aktivität der Plasmide mit -2446 G basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2).....	78
Abb. 20: Stimulierbarkeit der Plasmide mit -2446 G.....	79

TABELLEN

Tab. 1: Molekularbiologische Eigenschaften der NOS-Isoenzyme	15
Tab. 2: Auflistung aller für PCR, Sequenzierung und Mutagenese-PCR verwendeten Primer	26
Tab. 3: Alle zur Transfektion verwendeten Vektoren mit Namen, Beschreibung und Herkunft.....	43
Tab. 4: Zur Stimulation verwendete Zytokine	48
Tab. 5: Vergleich der Stimulierbarkeit der Wildtyp-Konstrukte mit Eins	55
Tab. 6: Wildtyp-Konstrukte: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β , Stimulierbarkeit als Quotient Stim./basal	56
Tab. 7: 6kb-Konstrukte: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β , Stimulierbarkeit als Quotient Stim./basal	61
Tab. 8: Vergleich der Stimulierbarkeit der Plasmide g wild und g LaC mit Eins	61
Tab. 9: Plasmide mit Alu-Element 1: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β , Stimulierbarkeit als Quotient Stimulation/basal	64
Tab. 10: Vergleich der Stimulierbarkeit der Plasmide mit Alu-Element 1 mit Eins.....	66
Tab. 11: Plasmide mit Alu-Element 2: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β , Stimulierbarkeit als Quotient Stimulation/basal	67
Tab. 12: Vergleich der Stimulierbarkeit der Plasmide mit Alu-Element 2 mit Eins.....	70
Tab. 13: Plasmide mit beiden Alu-Elementen: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β , Stimulierbarkeit als Quotient Stimulation/basal	73
Tab. 14: Vergleich der Stimulierbarkeit der Plasmide mit beiden Alu-Elementen mit Eins	73
Tab. 15: Vergleich der Stimulierbarkeit der Plasmide mit Lambaréné-Mutation mit Eins	76
Tab. 16: Plasmide mit der Lambaréné-Mutation: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β , Stimulierbarkeit als Quotient Stimulation/basal	76
Tab. 17: Plasmide mit -2446 G: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β , Stimulierbarkeit als Quotient Stim./basal	80
Tab. 18: Vergleich der Stimulierbarkeit der Plasmide mit -2446 G mit Eins	80

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AP-1	Aktivatorprotein 1
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Leukozytendifferenzierungsantigen
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
c-jun	<i>humanes Protoonkogen</i>
c-Myb	<i>humanes Onkogen</i>
CREB	cAMP response-element binding protein
ddNTP	Didesoxyribonukleotid-Triphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
FAD	Flavinadeninnukleotid
FMN	Flavinmonomukleotid
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
I κ Ba	NF- κ B Inhibitor
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
kb	Kilobasenpaare
LAR II	Luciferase Assay Reagent II
LB-Medium	Luria-Bertrani-Medium
LE	Lichteinheit
LPS	Lipopolysaccharid

mRNA	messenger RNA
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- κ B	nuclear factor κ B
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT-1	signal transducer and activator of transcription 1
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF β	transforming growth factor β
U/min	Umdrehungen pro Minute
TH -Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF α	Tumornekrosefaktor α
UV-Licht	ultraviolettes Licht

1 Einleitung

1.1 Definition der Malaria

Die Malaria ist eine durch *Plasmodien* verursachte Protozoeninfektion. Alle humanpathogenen Arten werden durch die weiblichen Stechmücken der Gattung *Anopheles* übertragen. *Plasmodium ovale* und *P. vivax* sind die Erreger der Malaria tertiana, *Plasmodium malariae* verursacht die Malaria quartana. *Plasmodium falciparum* hat als Erreger der Malaria tropica die größte klinische Bedeutung.

1.2 Epidemiologie

Die weltweite Inzidenz der Malaria wird auf 300-500 Millionen Fälle pro Jahr geschätzt, und etwa 3 Millionen Menschen, von denen die meisten Kinder unter 5 Jahren sind, sterben jährlich an der Krankheit. Ungefähr 2,4 Milliarden Menschen in über 100 Ländern leben in Endemiegebieten (Persidis, 2000).

In Afrika südlich der Sahara leben ungefähr 74% der Bevölkerung in hochendemischen Gebieten mit ganzjähriger Transmission und Vorherrschen von *P. falciparum*. Dort treten schätzungsweise 90% der fatalen Malariafälle auf (World Health Organisation (WHO), 1997; Greenwood und Mutabingwa, 2002).

1.3 Zyklus der Malariaparasiten

Der Entwicklungszyklus der humanpathogenen Plasmodien verläuft als sexueller Zyklus in den weiblichen *Anopheles*-Mücken und als asexueller Zyklus im Menschen. Andere Erregerreservoir gibt es nicht.

Die durch den Stich des Vektors in die menschliche Blutbahn entlassenen Sporozoiten dringen in Leberzellen ein, in denen der erste asexuelle Vermehrungszyklus stattfindet. Die Sporozoiten entwickeln sich zu Leberschizonten, die 2000-30 000 Merozoiten enthalten. Diese Merozoiten werden in die Blutbahn freigesetzt, wo sie Erythrozyten befallen. Bei *P. vivax* und *P. ovale*

reifen nicht alle Schizonten heran; zum Teil bilden sich Hypnozoiten, die über Monate und Jahre ruhen und zu Rückfällen führen können.

Innerhalb der Erythrozyten entwickeln sich die Merozoiten zu Ringformen, welche zu amöboiden Trophozoiten heranwachsen und schließlich zu Schizonten reifen, die 8-12, bei *P. falciparum* bis zu 32 Merozoiten enthalten. Beim Platzen der Schizonten gelangen die Merozoiten ins Blut und können erneut Erythrozyten befallen. Ein erythrozytärer Zyklus dauert bei *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. ovale* 48 Stunden, bei *P. malariae* 72 Stunden. *P. vivax* infiziert vor allem junge Erythrozyten, daher ist die Parasitämie selten höher als 2%. Im Gegensatz dazu ist die Parasitämie bei *P. falciparum* nach oben unbegrenzt, da alle reifen Erythrozyten befallen werden können. Auch der Mehrfachbefall von Erythrozyten ist nur bei *P. falciparum* beobachtet.

Einige Parasiten durchlaufen in den Erythrozyten nicht die asexuelle Vermehrung, sondern differenzieren sich zu männlichen Mikrogametozyten oder weiblichen Makrogametozyten. Diese können sich im menschlichen Organismus nicht weiter vermehren, sondern müssen bei einer Blutmahlzeit von einer *Anopheles*-Mücke aufgenommen werden, um dort die geschlechtliche Vermehrung zu beginnen.

1.4 Krankheitsbild und Therapie der Malaria

Der klinische Verlauf der Malaria hängt sehr stark von der angeborenen oder erworbenen Immunität gegen die Parasiten ab.

Heterozygote Träger des Sichelzell-Gens (HbS) erkranken zwar nicht seltener, aber an leichteren Formen der Malaria (Lell et al., 1998) und hereditäre Ovalozytose schützt sowohl vor häufiger als auch vor schwerer Erkrankung (Foo et al., 1992). Bewohner von Endemiegebieten entwickeln durch viele wiederholte Plasmodieninfektionen eine Teilimmunität, die sie nicht vor einer Infektion, jedoch vor schweren Verlaufsformen schützt. Diese Teilimmunität wird nur durch ständige Neuinfektionen aufrechterhalten und ist bei Bewohnern von Gebieten mit hyperendemischer Malaria am ausgeprägtesten. Bei einem längeren Aufenthalt in Nicht-Endemiegebieten geht die Teilimmunität verloren.

Kinder sind besonders häufig von schwerer Malaria betroffen. Es konnte gezeigt werden, dass Kinder, die in Gebieten mit hoher Malariatransmission leben, durchschnittlich früher in ihrem Leben an schwerer Malaria erkranken als solche, die in mesoendemischen Regionen wohnen. Insgesamt jedoch ist das Risiko, an schwerer Malaria zu erkranken, für Kinder aus Wohnorten mit ganzjähriger starker Transmission geringer als für solche aus Gebieten mit geringeren Transmissionsraten. Als Grund dafür wird diskutiert, dass die Kinder aus hyperendemischen Regionen durch wiederholte Infektionen eine eigene Immunität entwickeln, solange sie noch durch Antikörper aus der Muttermilch geschützt sind (Snow et al., 1997).

Teilimmune Malaria-tropica-Patienten haben eine geringfügige Parasitämie, eine leichte Anämie und eine vergrößerte Milz. Es können kurze Fieberepisoden, Kopf-, Gelenk- und Bauchschmerzen oder Erbrechen und Durchfall vorkommen.

Schwere Malaria tritt außer bei Kindern und Nichtimmunen vor allem bei Schwangeren auf. Eine unkomplizierte Malaria tropica mit Fieber, Hepatosplenomegalie und Anämie entwickelt sich ohne adäquate Therapie bei diesen Patienten rasch zur schweren Malaria.

Als Kriterien für eine schwere Malaria wurden von der Weltgesundheitsorganisation folgende Symptome definiert: zerebrale Malaria, schwere Anämie, Niereninsuffizienz, Lungenödem, Hypoglykämie, Kreislaufchock, Spontanblutungen, wiederholte generalisierte Krämpfe, Azidose, Hämoglobinurie und Hyperparasitämie. Bewusstseinsstörungen und Atemnot wurden als leicht zu erfassende Indikatoren einer infausten Prognose bei Kindern ermittelt (Marsh et al., 1995), eine andere Studie nennt zerebrale Malaria, Hypoglykämie, hohen Puls und hohe Atemfrequenz, Hyperlaktatämie und Parasitämie (Waller et al., 1995).

Die Therapie der Malaria wird durch zunehmende Resistenzen gegen die gängigen Chemotherapeutika erschwert. In Afrika gibt es in praktisch allen Endemiegebieten Resistenzen gegen das billige Chloroquin. Unkomplizierte Malaria wird dort meist dennoch mit Chloroquin behandelt, das eine gewisse klinische Wirksamkeit behält, aber oft kann es die Parasitämie nicht beseitigen.

Alternativen sind Amodiaquin, Sulfadoxin-Pyrimethamin oder Mefloquin. Das Mittel der Wahl gegen komplizierte Malaria ist Chinin. Artemisinine sind genauso wirksam, aber teurer, und Chloroquin kann nur bei sicher sensitiven Plasmodienstämmen – z.B. bei Infektionen aus Mittelamerika – angewendet werden (Winstanley, 2001).

1.5 Mechanismen der Immunantwort bei Malaria tropica

Die durch Plasmodium falciparum beim Wirt ausgelöste Immunantwort dient der Kontrolle der Vermehrung und letztendlich der Elimination der Parasiten. Jedoch können die dabei beteiligten Zytokine auch für Pathologie und Symptome der Malaria wie zum Beispiel Hyperlaktatämie, Hypoglykämie und Koma verantwortlich gemacht werden (Clark et al., 1997).

Die Abwehr stützt sich sowohl auf zelluläre als auch Antikörper-vermittelte Mechanismen. Die Immunantwort gegen prä-erythrozytäre Stadien ist vor allem durch CD8+-T-Zellen vermittelt und beteiligt IFN γ , Stickstoffmonoxid, IL-12 und natürliche Killerzellen, während die Abwehr von erythrozytären Stadien durch T-Helfer-Zellen, Antikörper und Stickstoffmonoxid gekennzeichnet ist (Good und Doolan, 1999).

Eine Behandlung von thailändischen Malaria-tropica-Patienten mit Immunglobulin G von semi-immunen afrikanischen Erwachsenen führte zu einer starken Reduzierung der Parasitämie und Symptombefreiheit, allerdings nicht zu einer endgültigen Parasitenelimination. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass Antikörper gegen nicht-variable Antigene einen wichtigen Teil der Abwehr darstellen (Sabchareon et al., 1991). Antikörper gegen variable Oberflächenantigene werden von Kindern in Endemiegebieten parallel zur Teilimmunität entwickelt, klinisch relevante Malariaepisoden werden meist durch Parasiten verursacht, die vom Plasma nicht erkannte Oberflächenantigene exprimieren (Ofori et al., 2002).

Es wurde gezeigt, dass die absolute Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut während einer akuten Malaria niedriger ist als normal. Dabei weisen Patienten mit zerebraler Malaria besonders niedrige CD4+-Zell-Konzentrationen auf. Die rasche Normalisierung der T-Zell-Anzahl weist darauf hin, dass T-Zellen

während einer akuten Malaria zeitweise aus der peripheren Blutbahn entfernt sind. Zusätzlich wurde eine erniedrigte Dichte von T-Zell-Rezeptor/CD3 Komplexen auf der Oberfläche der T-Zellen gefunden, was eine Hyporesponsivität der Z-Zellen impliziert (Hviid et al., 1997).

Das Verhältnis der durch die zwei T-Zell-Subtypen, TH1 und TH2, vermittelten Abwehr spielt eine wichtige Rolle: Im Tiermodell mit Mäusen tragen TH1-Zellen zur Kontrolle der frühen Infektion bei, während TH2-Zellen zusammen mit Antikörpern bei der Elimination der Parasiten mitwirken (Taylor-Robinson, 1995). Bei Menschen wurde eine erhöhte Aktivität der TH1-Zytokine $\text{IFN}\gamma$ und IL-12 während einer frischen Malaria festgestellt (Torre et al., 2002), eine andere Studie fand jedoch einen Wechsel von einer TH2- zu einer TH1-betonten Immunantwort während akuter unkomplizierter Malaria (Winkler et al., 1998).

Bei gabunesischen Kindern ist die in vitro-Produktion der Mono- und Lymphozyten von IL-10 und Antikörpern mit einer schnelleren Parasitenelimination korreliert (Luty et al., 1998). Kinder mit schwerer Malaria haben im Vergleich zu Kindern mit leichter Malaria erniedrigte IL-12- und $\text{IFN}\alpha$ -Plasma-Aktivitäten, während die Plasmakonzentrationen von TNF und IL-10 erhöht sind (Luty et al., 2000). Bei Kindern mit leichter Malaria ist die Produktion von $\text{IFN}\gamma$ der Mono- und Lymphozyten als Reaktion auf Leberstadium- und Merozoiten-Antigen-Peptide mit späterer Reinfektion und niedrigeren Reinfektionsraten korreliert (Luty et al., 1999). $\text{IFN}\gamma$ - und $\text{TNF}\alpha$ -Produktion sind mit einem niedrigen Risiko für Fieber und klinische Symptome assoziiert (Dodoo et al., 2002). $\text{TNF}\alpha$ kann eine zelluläre, antiparasitäre Immunantwort durch Stimulation von neutrophilen Granulozyten vermitteln (Kumaratilake et al., 1991).

1.6 Stickstoffmonoxid-Synthase – Einteilung und Wirkmechanismus

Im menschlichen Organismus wurden drei verschiedenen Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) identifiziert. Die endotheliale eNOS und die neuronale nNOS sind die konstitutionellen Stickstoffmonoxid-Synthasen, sie werden durch

Kalzium-Ionen und Calmodulin reguliert. eNOS wird außer im Gefäßendothel, wo sie NO als Mediator der Vasodilatation bildet, in Thrombozyten und in bestimmten Neuronen des ZNS exprimiert. nNOS findet sich in Neuronen des ZNS und in peripheren Nervenzellen. Hier dient NO als Neurotransmitter, der unter anderem bei der Gedächtnisbildung und Schmerzmodulation eine Rolle spielt.

Die induzierbare iNOS wird in vielen verschiedenen Geweben, wie zum Beispiel Endothelzellen und glatten Muskelzellen; vor allem jedoch in aktivierten Immunzellen exprimiert, zu deren Zytotoxizität gegen Tumorzellen, Bakterien, Viren und Parasiten NO beiträgt. iNOS wird durch Genexpression reguliert und kann große Mengen an NO freisetzen (Moncada et al., 1997; Änggård, 1994).

Tabelle 1: Molekularbiologische Eigenschaften der NOS-Isoenzyme
(aus Moncada et al., 1997)

Gen	eNOS	nNOS	iNOS
Lokation	7q35-7q36	12q24.2	17cen-17q11.2
Struktur	26 Exons	29 Exons	27 Exons
Größe	21 kb	160 kb	37 kb
Peptidgröße	1203aa	1434	1153aa
(abgeleitet)	133 kDa	160 kDa	131 kDa

Alle NO-Synthasen bilden NO aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff, NADPH wird als Elektronenlieferant benötigt. Kofaktoren sind FMN, FAD, Häm und Tetrahydrobiopterin, zusätzlich brauchen die konstitutionellen NO-Synthasen noch Calmodulin und Kalzium-Ionen. Die Reaktion selbst ist in Abbildung 1 dargestellt: im ersten Schritt wird die Guanidino-Gruppe von L-Arginin hydroxyliert; es entsteht N^o-hydroxy-L-Arginin, von dem nun unter Bildung von Citrullin Stickstoffmonoxid abgespalten wird. Die beiden Atome des molekularen Sauerstoffs verteilen sich auf Stickstoffmonoxid und die Ureido-Gruppe des Citrullins. Aus Citrullin und einem Ammoniak-Molekül kann wieder Arginin gebildet werden. Diese Reaktion dient sowohl der Elimination von Ammoniak als auch der Regeneration von Arginin zur Bildung von Stickstoffmonoxid (Änggård, 1994; Nathan, 1992; Stamler et al., 1992).

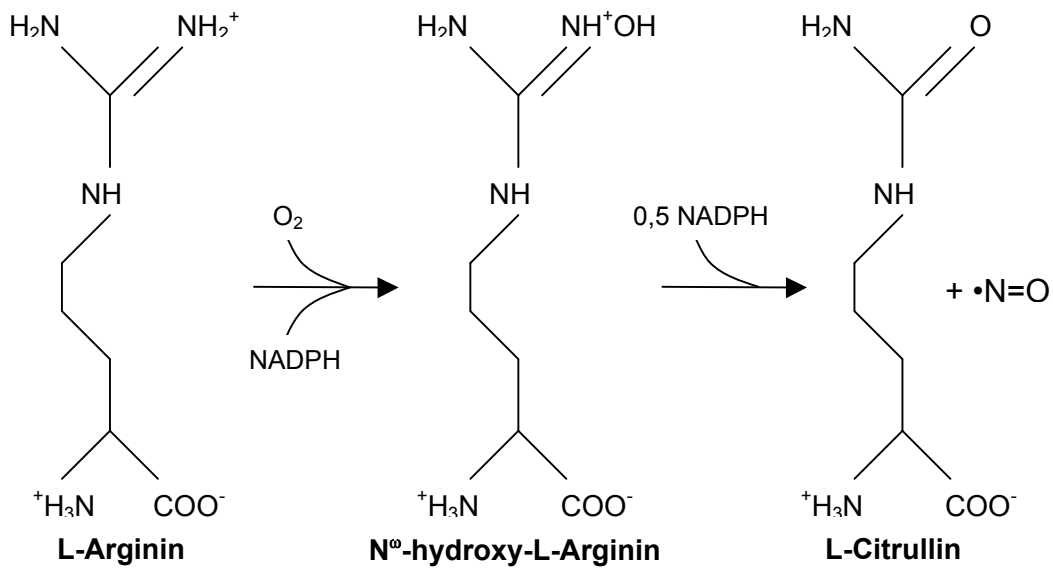


Abbildung 1: Biosynthese von NO aus Arginin

1.7 Molekulare Wirkungen von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ist sowohl in Wasser als auch in Lipiden löslich. Deshalb kann vom Ort seiner Bildung frei ins Gewebe diffundieren. Obwohl NO ein freies Radikal ist und seine biologische Aktivität auf dieser Eigenschaft beruht, ist seine Reaktivität relativ gering; es interagiert praktisch nur mit Metallen, Sauerstoff und anderen Radikalen. Mit molekularem Sauerstoff reagiert es zu N₂O₃, mit dem Superoxid-Anion zu Peroxinitrit (ONOO⁻). Wenn NO begrenzt und kurz produziert wird, wirkt es in der Regel direkt und als Signalmolekül oder als Antioxidanz – wie zum Beispiel bei der Reduktion von Fe⁴⁺=O zu Fe³⁺ und NO₂⁻. Indirekte Effekte von NO – durch ONOO⁻ und N₂O₂ – herrschen vor, wenn NO in großer Menge vorliegt und wirken meist toxisch (Liudet et al., 2000).

Wichtigster Signalweg von NO ist die Aktivierung der Guanylatzyklase durch Bindung an deren Häm-Einheit. Die Guanylatzyklase katalysiert die Bildung von zyklischem Guanosin-Monophosphat (cGMP) aus Guanosin-Triphosphat, und der daraus resultierende Anstieg von cGMP führt zur Aktivitätsänderung von cGMP-regulierten Ionenkanälen, Proteinkinasen und Phosphodiesterasen, die den cAMP-Spiegel der Zelle verändern. Über diesen Weg wirkt NO als Neurotransmitter, senkt den intrazellulären Kalziumspiegel und führt zu

Vasodilatation und zur verminderten Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten (Beck et al., 1999; Liaudet et al., 2000)

NO inhibiert Cytochrom P450 reversibel, indem es mit der Häm-Einheit interagiert und so verhindert, dass Sauerstoff bindet. Dadurch wird der Stoffwechsel von vielen verschiedenen Metaboliten wie Steroidhormonen und Pharmaka beeinflusst. Es wurde gezeigt, dass NO sowohl als Aktivator als auch Inhibitor der Cyclooxygenase wirken kann, was bei der Regulation von Entzündungsreaktionen eine Rolle spielt. Während geringe Mengen NO die Cyclooxygenase aktivieren, bildet NO bei höherer Konzentration stabile Verbindung mit dem Häm-Eisen des Enzyms und vermindert dessen Aktivität (Liaudet et al., 2000).

Auch die NO-Synthasen werden von NO durch Bindung an deren Häm inhibiert. Auf diese negative Rückkopplung scheinen eNOS und nNOS viel empfindlicher zu reagieren als die iNOS, was nahe legt, dass vermehrte NO-Bildung durch die iNOS zur Aktivitätsverminderung der konstitutiven NOS führt (Liaudet et al., 2000).

Die mitochondriale Atmung wird durch NO und Peroxinitrit vermindert. Geringe Konzentrationen von NO inhibieren die Cytochromoxidase kompetitiv mit Sauerstoff. Dieser Mechanismus könnte bei der Regulation der Zellatmung beteiligt sein: es wurde gezeigt, dass Mitochondrien ihre eigene NO-Synthase exprimieren und dass bei Abwesenheit von NO der Sauerstoffverbrauch von Zellen steigt. Höhere Mengen NO und der NO-Metabolit Peroxinitrit inhibieren Enzyme der Atmungskette irreversibel (Brown, 1999).

Weitere zytotoxische Effekte von NO sind die Reaktion mit dem Eisen-Schwefel-Zentrum der mitochondrialen Aconitase, einem Schlüsselenzym des Zitratzyklus, und die Reaktion mit einem Tyrosylradikal der Ribonukleotid-reduktase, die zur Inhibition der DNA-Synthese führt (Liaudet et al., 2000).

Mit Sauerstoff reagiert NO zu N_2O_3 , welches mit Aminen und Thiolen zu N-Nitrosaminen und S-Nitrosothiolen reagiert. Da S-Nitrosothiole relativ stabil sind und NO abgeben können, wirken sie als Speicher- und Transportmoleküle für NO. Die direkten Wirkungen von S-Nitrosothiolen betreffen Ionenkanäle, die Kreatinkinase, Proteinkinase C, G-Proteine, Tyrosinkinase, Tyrosinphosphatase

und die Adenylatzyklase. Die Steroidbindungskapazität des Glukokortikoid-Rezeptors wird vermindert und der Glukosemetabolismus der Zelle gestört (Liaudet et al., 2000).

NO beeinflusst die Genexpression durch Strukturveränderungen von Transkriptionsfaktoren. Durch S-Nitrosylation wird die NF- κ B-Aktivität vermindert und dessen Gegenspieler I κ B α stabilisiert. Dieser Effekt reduziert die proinflammatorische Reaktion von Zellen. Die Transkriptionsfaktoren AP-1, c-jun, CREB, c-Myb werden ebenfalls durch S-Nitrosylation reguliert (Liaudet et al., 2000).

Mit dem Superoxid-Anion reagiert NO zu Peroxinitrit (ONOO⁻), als dessen physiologische Funktionen Vasodilatation und Inhibition von Thrombozyten- und Leukozytenaggregation identifiziert wurden. Durch Oxidation von Lipiden, Thiolen, Proteinen und Nukleinsäuren wirkt Peroxinitrit zytotoxisch. Der Hauptmechanismus dieser Zytotoxizität ist die DNA-Schädigung durch Strangbrüche und Oxidation und Nitration einzelner Basen. Zusätzlich wird die Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase aktiviert, die durch Strangbrüche getriggert NAD⁺ zu ADP-Ribose und Nikotinamid umsetzt und so schnell die zellulären NAD⁺-Speicher leert, was wiederum Glykolyse und ATP-Bildung verhindert und zum Zelltod führt (Liaudet et al., 2000).

1.8 Regulation der iNOS

Der wichtigste Regulationsmechanismus der iNOS ist die Beeinflussung der Transkriptionsrate.

Die iNOS wird in praktisch jedem Gewebe gebildet, und es hängt vom Zelltyp ab, welche Kombination von Faktoren den stärksten induzierenden oder inhibierenden Effekt hat. Proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1- β , Interferon- γ und Lipopolysaccharid induzieren die Produktion von iNOS-mRNA und sind zugleich die wichtigsten Regulatoren. Die Signalwege von Proteinkinase A, Proteinkinase C und Tyrosinkinase spielen eine modulatorische Rolle (Wang und Marsden, 1995).

Für die Induktion der iNOS scheint besonders der Promotor distal von –3,8 kb eine Rolle zu spielen. Nach Zytokinstimulation zeigte der Promotor bis –5,8 kb 3-fache, der Promotor bis –7,0 kb 5-fache und ein Promotorkonstrukt bis –16 kb 10-fache Aktivität (de Vera et al., 1995).

Die Zytokininduktion wird unter anderem von NF- κ B reguliert. Es wurden fünf NF- κ B-Bindungsstellen zwischen –5,2 kb und –6,1 kb identifiziert. Dabei zeigte sich, dass die Stelle bei –5,8 kb für die Zytokininduktion unerlässlich ist und sowohl NF- κ B als auch STAT-1 bindet, während NF- κ B-Bindungsstellen bei –5,5 kb und –6,1 kb und die STAT-1-Bindungsstelle bei –5,2 kb kooperativ wirken (Taylor et al., 1998; Ganster et al., 2001). Eine induzierende Aktivatorprotein 1-Bindungsstelle befindet sich bei –5,3 kb (Marks-Konczalik et al., 1998).

Im proximalen Promotor wurde eine NF- κ B-Bindungsstelle bei –100 bp identifiziert, die Zytokininduktion vermittelt (Nunokawa et al., 1996).

Auch untranslatierte 3'-Regionen haben einen Einfluss auf die Zytokin-Induzierbarkeit. Ein transfiziertes Promotorstück mit 3'-Region unterdrückte im Vergleich zum Promotor allein die basale Expression und verstärkte die Reaktion auf Zytokine (Nunokawa et al., 1997).

Als weitere Repressoren wirken eine NF- κ B-repressing factor-Bindungsstelle bei –6,7 kb, deren Mutation die basale, jedoch nicht die stimulierte Promotoraktivität erhöht (Feng et al., 2002).

Pance und Kollegen identifizierten eine Aktivatorprotein-1-Sequenz zwischen –351 und –632, die andere Promotoren unterdrückt und deren Deletion die iNOS-Promotoraktivität erhöht (Pance et al., 2002).

Die Untersuchung eines Polymorphismus bei –0,7 kb zeigte, dass die Deletion von 4 bp zu verminderter Komplikationsrate bei Diabetes II-Patienten führt und bei der Transfektion eines 1,1 kb-Promotorstücks die Genexpression im Vergleich zum +-Allel um den Faktor 25 vermindert (Morris et al., 2002).

Glucokortikoide inhibieren die NF- κ B-vermittelte Induktion der iNOS. Bei Ratten verminderten sie die durch LPS und IFN γ stimulierte iNOS-mRNA-Produktion, beeinflussten das Aktivatorprotein-1 jedoch nicht (Matsumura et al., 2001).

Zytokine sind zwar die wichtigsten Stimulantien der iNOS, jedoch nicht die einzigen. UV-Licht kann die Expression der iNOS in Abwesenheit von Zytokinen induzieren oder deren Effekt verstärken (Suschek et al., 2001). Die mRNA-Konzentration von iNOS wird durch den Eisen-Chelator Desferrioxamin verstärkt und durch das Eisenion Fe^{3+} vermindert (Weiss et al., 1994).

$IFN\gamma$ und Lipopolysaccharid beeinflussen auch die post-transkriptionelle Regulation der iNOS, indem sie die mRNA stabilisieren. Den gleichen Effekt haben auch Dibutyryl-cAMP und Forskolin. Dagegen wurde gezeigt, dass TGF- β (Transforming Growth Factor) in manchen Zelltypen die iNOS-mRNA destabilisiert und die Translation der iNOS vermindert (Wang und Marsden, 1995).

1.9 Stickstoffmonoxid und Malaria

Stickstoffmonoxid-Aktivität schützt vor *Plasmodium falciparum* in vitro. Der NO-Produzent S-nitroso-acetyl-Penicillamin wirkt in höheren Konzentrationen zytotoxisch, in kleineren zytostatisch auf die Parasiten (Balmer et al., 2000). Eine andere Studie fand, dass NO selbst das Parasitenwachstum nicht beeinträchtigt, die NO-Metaboliten Nitrit und Nitrat jedoch in millimolaren Konzentrationen toxisch wirken. Noch empfindlicher reagierte *P. falciparum* auf Cystein- und Gluthathion-Nitrosothiole (Rockett et al., 1991).

Es ist unklar, ob Stickstoffmonoxid in vivo zur Entstehung von komplizierter und zerebraler Malaria beiträgt oder ob es eine protektive Rolle spielt.

Im Zentralnervengewebe verstorbener Malariapatienten wurde iNOS durch immunhistochemische Färbung in Endothel, Neuronen, Astrozyten und Mikroglia gefunden. Die Färbbarkeit war bei akuten Fällen höher als bei sich vom Koma erholenden und niedrig bei Kontrollen (Maneerat et al., 2000). Zwei andere Studien fanden dagegen keinen Zusammenhang zwischen erhöhter NO-Bildung und schwerer Malaria: Bei erwachsenen Malariapatienten konnte keine Korrelation zwischen Nitrat und Nitrit im Liquor und Komatiefe einerseits und der Nitrat- und Nitrit-Konzentration im Plasma und der Krankheitsschwere andererseits gefunden werden (Dondorp et al., 1998). Auch besteht keine

Assoziation zwischen dem Spiegel reaktiver Stickstoffverbindungen im Plasma und Komatiefe oder –länge (Taylor et al., 1998).

Bei asymptomatischen Kindern in Malariaendemiegebieten ist die NO-Produktion bei Säuglingen am höchsten, nimmt im Kleinkindesalter ab und ab dem fünften Lebensjahr wieder zu. Die Morbidität von zerebraler Malaria hat das genau umgekehrte Muster (Anstey et al., 1999).

Bei Patienten mit unkomplizierter Malaria wurden höhere iNOS-mRNA-Spiegel im Blut gefunden als bei an komplizierter Malaria erkrankten. Die iNOS wurde vor allem in Monozyten exprimiert, deren Anzahl bei Patienten mit unkomplizierter Malaria höher war (Chiwakata et al., 2000). Auch hatten Kinder mit leichter Malaria in der Anamnese höhere NOS-Aktivität in mononukleären Zellen des peripheren Blutes als Kinder mit schwerer Malaria (Perkins et al., 1999). Bei Kindern aus Tansania waren Nitrat- und Nitrit-Konzentrationen in Urin und Plasma umgekehrt mit der Krankheitsschwere korreliert (Anstey et al., 1996). Eine andere Studie fand dagegen erhöhte Plasmakonzentrationen von Stickstoffmonoxid bei schwerer Malaria im Vergleich zu unkomplizierter. Jedoch wiesen hohe NO-Spiegel während der akuten Krankheit auf eine beschleunigte Erholung hin. Allerdings waren die NO-Spiegel bei schwerer Krankheit am höchsten (Kremsner et al., 1996).

Ein Grund für die unterschiedlichen NO-Konzentrationen ist die unterschiedliche Genexpression der iNOS-Synthase bei den einzelnen Patienten. Dafür sind unter anderem Promotor-Polymorphismen verantwortlich:

Eine Mutation im Promotor der iNOS bei –954 (G→C) wurde häufiger bei Kindern mit leichter als mit schwerer Malaria in der Anamnese gefunden. Die Träger dieser iNOS^{Lambaréné}-Mutation hatten ein kleineres Risiko für Malaria-Reinfektionen als die anderen Patienten (Kun et al., 1998). Die Mutation wurde bei Bewohnern von Malaria-Endemiegebieten in Afrika, Thailand und Papua Neu Guinea gefunden, nicht jedoch bei kaukasischen Deutschen. Ex vivo-Experimente zeigten, dass Träger von iNOS^{Lambaréné} eine erhöhte NO-Basalaktivität haben, die sich durch Zytokine nicht mehr weiter erhöhen lässt (Kun et al., 2001).

Eine andere Studie zeigte keine Korrelation zwischen der iNOS^{Lambaréné}-Mutation und NO-Produktion, iNOS-Expression oder Krankheitsschwere (Levesque et al., 1999).

Als weiterer Polymorphismus wird das CCTTT-Repeat bei -2,5kb diskutiert. Eine Arbeitsgruppe identifizierte lange Repeats als Risikofaktor für schwere Malaria, während eine andere Gruppe keinen Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf fand (Ohashi et al., 2002; Hobbs et al., 2002).

1.10 Zielsetzung

Stickstoffmonoxid, und dabei besonders das durch die iNOS gebildete NO, spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr und der Pathologie der Malaria. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen mehrerer Polymorphismen im Promotor der iNOS, darunter die iNOS^{Lambaréné}-Mutation, zu untersuchen. Es sollen Plasmide mit verschiedenen Promotorstücken und Mutationen in humane Zellen transfiziert werden und die jeweilige Promotoraktivität unter dem Einfluss verschiedener Zytokine erfasst werden. Dadurch soll die Bedeutung, die diese Polymorphismen bei der Regulation der iNOS haben, aufgeklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein von Kary Mullis entwickeltes in vitro-Verfahren (Mullis et al., 1986), das es erlaubt, DNA-Abschnitte bestimmter Länge und definierter Sequenz selektiv zu vervielfältigen. Man benötigt dazu nur eine kleine Menge DNA, die das zu amplifizierende Stück enthält, zwei etwa 20 Basenpaare lange Oligonukleotide (Primer), die chemisch synthetisiert werden, eine ausreichende Menge der vier Desoxyribonukleotid-Triphosphate und DNA-Polymerase. Die spezielle Taq-Polymerase für die PCR wird aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen.

Zunächst wird die DNA-Doppelhelix durch Erhitzen auf 94°C in zwei Einzelstränge zerlegt und so denaturiert. Dann wird der Ansatz auf 40-60°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur können sich die beiden Oligonukleotide, die jeweils zum 3'-Ende des zu amplifizierenden Abschnittes komplementär sind (s. Abb. 2), an die DNA-Einzelstränge anlagern. Diesen Vorgang nennt man Annealing; die Idealtemperatur dafür hängt von der Sequenz der Oligonukleotide ab. Diese dienen als Startermoleküle für die Taq-Polymerase, die nun komplementär zum Ursprungsstrang einen neuen DNA-Strang in 5'-Richtung synthetisiert. Das Temperaturoptimum für diese Extension liegt bei 72°C. Die so erhaltenen doppelsträngigen DNA-Moleküle werden im nächsten Zyklus wieder getrennt und liegen als Matrizen für eine weitere Annealing- und Extensionsreaktion vor. Ab dem dritten Zyklus werden DNA-Doppelstränge gebildet, deren Länge genau dem Abstand zwischen den beiden Primern entspricht, ihr Anteil verdoppelt sich etwa mit jedem neuen Zyklus, bis schließlich fast ausschließlich der gewünschte DNA-Abschnitt vorliegt.

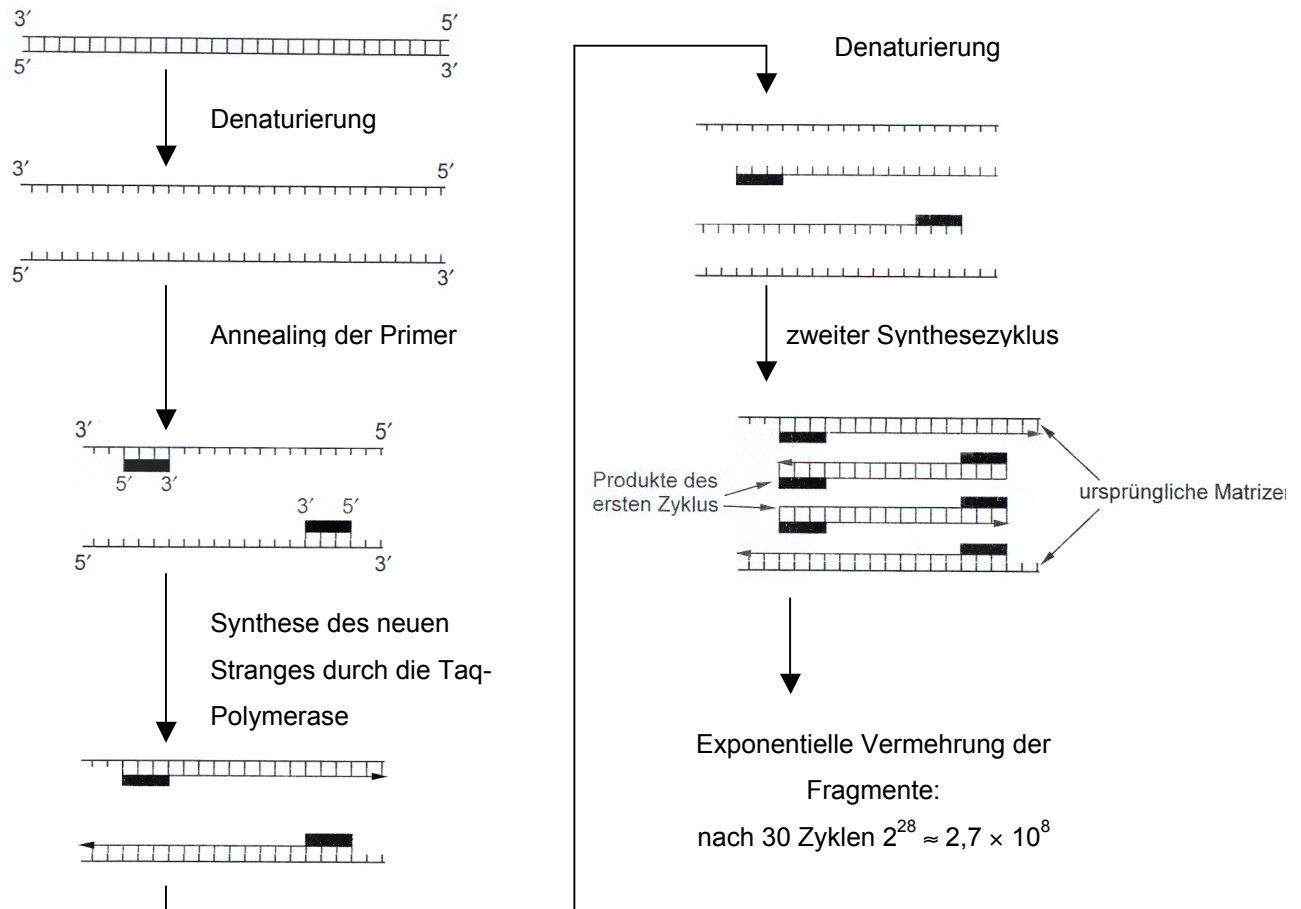


Abbildung 2: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR wurde mit zwei verschiedenen Geräten durchgeführt:

Für den RapidCycler (Idaho Technology, Salt Lake City, USA) wird der Reaktionsansatz in einer 96-well-Platte auf Eis gemischt und in eine Glaskapillare mit 30 µl Fassungsvermögen aufgezogen, die anschließend mit einer Gasflamme an beiden Enden zugeschmolzen wird.

- Ansatz (30 µl):
- 19-21 µl H₂O
 - 3 µl Reaktionspuffer (RP 30)
 - 0,2 µl dNTPs (40 mM) (QIAGEN, Hilden, Deutschl.)
 - 3 µl Taq-Polymerase (0,4 U/µl)
 - 1 µl (20 pMol) Primer 1 (vorwärts)

1 μ l (20 pMol) Primer 2 (rückwärts)
1-3 μ l Template DNA

PCR-Bedingungen:	erste Denaturierung	95°C	30 Sekunden
	Denaturierung	95°C	5 Sekunden
	Annealing	45-60°C	5 Sekunden
	Extension	72°C	25 Sekunden
	Anzahl der Zyklen	35-40	

Nach Beendigung der Reaktion wird die Glaskapillare geritzt und aufgebrochen, der Inhalt wird in ein 500 μ l Eppendorf-Röhrchen überführt.

Für den DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, Wellesley, USA) wird der Ansatz in 500 μ l-Eppendorfgefäßen auf Eis pipettiert und mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt.

Ansatz (50 μ l):

- 33,8-37,8 μ l H₂O
- 5 μ l Reaktionspuffer (QIAGEN, Hilden, Deutschland)
- 3 μ l MgCl₂ (QIAGEN, Hilden, Deutschland)
- 1 μ l dNTPs (40 mM)
- 0,2 μ l Taq-Polymerase (1 U/ μ l)
- 1 μ l (20 pMol) Primer 1 (vorwärts)
- 1 μ l (20 pMol) Primer 2 (rückwärts)
- 1-5 μ l Template DNA

PCR-Bedingungen:	erste Denaturierung	94°C	2 Minuten
	Denaturierung	94°C	30-45 Sek.
	Annealing	40-60°C	30-45 Sek.
	Extension	72°C	1-4 Minuten
	letzte Extension	72°C	10 Minuten
	Anzahl der Zyklen	35-40	

Zur Kontrolle wird eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt (s. 2.3)

2.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die als Primer für PCR, Mutagenese-PCR und Sequenzierung dienten, wurden mit H₂O dest. auf eine Konzentration von 100 pMol/μl eingestellt und vor Gebrauch noch einmal 1:5 mit H₂O dest. verdünnt. Alle in Tab. 2 aufgeführten Oligonukleotide wurden von INTERACTIVA Biotechnologie GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2: Auflistung aller für PCR, Sequenzierung und Mutagenese-PCR verwendeten Primer

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Länge
ALS-nosMutA	GAG CTC TGA TAT CCA TGT CT	20-mer
ALS-nosMutB	AGA TGG AGT CTC ATT CTG TC	20-mer
ALS-delSimA	TCA GCA TGG TGC CTA GGA CA	20-mer
ALS-delSimC	TAA GCC AGA GTT CTA AGC C	19-mer
ALS-delSimB1	GTG ACA AGA CGA ATG CAG T	19-mer
ALS-delSimB2	TAT GGT CGC GCC ACT GCA	18-mer
ALS-delSimB3	ACT GCA CCC TAG CCT GTC TC	20-mer
ALS-delSimD	TGA GTC CAA GCA CCA GGC TT	20-mer
ALS-delLambB	GCT ACC ACT GTC CAC TCA T	19-mer
ALS-delLambC	TGA CAG AAT GAG ACT CCA TCT	21-mer
ALS-delLambD1	AGG TGG CAG TTC ATC AGC A	19-mer
ALS-delLambD2	TCA CCC AAC CCA CCT CTT TC	20-mer
Primer mit EcoRI-Site zur Herstellung von Fragmenten für die Ligation:		
EcoAlu1 A1	TTT GAA TTC ACT GCA TTC GTC TTG TCA C	28-mer
EcoAlu1 A2	TTT GAA TTC GAG ACA GGC TAG GGT GCA GT	29-mer
EcoAlu1 B	TTT GAA TTC GGC TTA GAA CTC TGG CTT A	28-mer
EcoAlu1+2	TTT GAA TTC AGA TGG AGT CTC ATT CTG TCA	30-mer
Primer für die Mutagenese-PCR:		
954C A	AGC TTC AGA GTT CGA CAC CAG CAT GGA CAA C	31-mer
954C B	GTT GTC CAT GCT GGT GTC GAA CTC TGA AGC T	31-mer
-2446 F	GGA GCT GGG CAT GCC ACC ATA CCC AGC TAA TTT	33-mer
-2446 R	AAA TTA GCT GGG TAT GGT GGC ATG CCC AGC TCC	33-mer

2.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die Gelelektrophorese wird benützt, um DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen und sichtbar zu machen.

DNA ist negativ geladen, sie bewegt sich im elektrischen Feld zur Anode. Zur Größenaufftrennung macht man sich die Tatsache zunutze, dass kleine DNA-Fragmente im Agarosegel schneller vorankommen und in einer gegebenen Zeit weiter wandern als große DNA-Stücke. Mit Ethidiumbromid kann man die Fragmente analysieren: es interkaliert in die DNA und macht unter UV-Licht die einzelnen DNA-Banden sichtbar.

Agarose wird 1%ig in TBE-Puffer (s. 2.12.4) aufgekocht, leicht abkühlen gelassen, mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 4 µg/ml) versehen und in eine Trägerschale gegossen. Ein Probenkamm wird in das Gel gesteckt, damit es nach dem Abkühlen Probenaschen zum Auftragen der DNA-Proben hat.

Das abgekühlte Gel wird ohne Kamm in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Die zu analysierenden Proben werden mit Probenpuffer (s. 2.12.5) gemischt und in die Geltaschen pipettiert, außerdem wird ein DNA-Größenmarker (GibCo™ Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgetragen. Dann wird eine Spannung von 80-200 Volt (je nach Größe des Gels) an die Elektrophoresekammer angelegt, und nach Ablauf von 20 Minuten – 1 Stunde kann man die DNA-Banden unter UV-Licht betrachten und die Größe der Fragmente anhand des Größenmarkers abschätzen. Zur Dokumentation wird das Gel fotografiert, oder einzelne Banden werden zur Extraktion ausgeschnitten (s. 2.4.2)

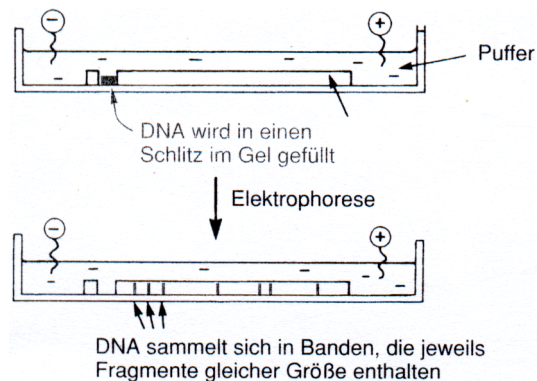


Abbildung 3: Prinzip der Gelelektrophorese

2.4 Verfahren zur Reinigung von DNA

2.4.1 Äthanol-fällung

Gelöste DNA wird durch Äthanol ausgefällt; diesen Effekt kann man sich für die Reinigung oder Konzentrierung einer DNA-Lösung zunutze machen.

Zur Lösung werden 1/10 Volumen Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumen 96% Äthanol pipettiert. Diese Mischung wird gut durchmischt, zwei Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann für 10 Minuten bei 13 000 U/min in einer Mikrozentrifuge (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschl.) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet kurz getrocknet. Anschließend wird es mit 150 µl – 1 ml 70% Äthanol gewaschen (das Volumen richtet sich nach Gefäß- und Pelletgröße) und für 10 Minuten an der Luft getrocknet oder für 3 Minuten in die Vakuumzentrifuge gestellt. Danach wird die DNA in H₂O resuspendiert.

2.4.2 NucleoSpin® Extract 2 in 1 Kit

Das NucleoSpin® Extract 2 in 1 Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) hat zwei Anwendungen: es wird zur Aufreinigung von PCR-Produkten und zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen verwendet.

Protokoll zur DNA-Extraktion aus Agarosegelen:

1. Die gewünschte Bande wird aus dem Agarosegel über UV-Licht mit einem sauberen Skalpell so klein wie möglich ausgeschnitten, das Gelstück dann in ein Eppendorfgefäß überführt und gewogen (Waage: AE 260 Delta Range, Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz).
2. Pro 100 µg Gel werden 300 µl Puffer NT1 hinzugefügt und die Probe dann bei 50°C 5-10 Minuten inkubiert, bis sich das Gel vollständig aufgelöst hat. Regelmäßiges Vortexen beschleunigt diesen Vorgang.
3. Eine NucleoSpin-Extrakt-Zentrifugensäule wird in ein 2 ml Sammelröhrchen gestellt, mit dem aufgelösten Gel gefüllt und 1 Minute bei 10 000 U/min zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschl.). Der Säulendurchfluss wird verworfen.

4. 600 µl Puffer NT3 werden in die Säule pipettiert und bei maximaler Geschwindigkeit 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wird wieder verworfen.
5. 200 µl Puffer NT3 werden zugegeben und 2 Minuten bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert, um den Puffer komplett zu entfernen.
6. Die Zentrifugensäule wird in ein sauberes Eppendorfgefäß gestellt und 25-50 µl Elutionspuffer NE oder H₂O dest. auf die Membran der Säule pipettiert. Nach 1 Minute Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.
7. Mit der so erhaltenen Probe wird eine Gelelektrophorese durchgeführt, um ihren DNA-Gehalt zu kontrollieren.

Protokoll zu Reinigung von PCR-Produkten:

1. Die PCR-Probe wird unter der Mineralölphase vorsichtig herauspipettiert und in einem sauberen Gefäß mit 4 Teilen Puffer NT2 gemischt.
2. Eine Nucleospin-Extrakt-Zentrifugensäule wird in ein Sammelröhrchen gestellt und mit der Probe gefüllt. Sie wird 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Säulendurchfluss verworfen.
3. 600 µl Puffer NT3 werden in die Säule pipettiert und bei maximaler Geschwindigkeit 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wird wieder verworfen.
4. 200 µl Puffer NT3 werden zugegeben und 2 Minuten bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert, um den Puffer komplett zu entfernen.
5. Die Zentrifugensäule wird in ein sauberes Eppendorfgefäß gestellt und 25-50 µl Puffer NE oder H₂O dest. auf die Membran pipettiert. Vorwärmen der Flüssigkeit auf 70°C verbessert die Elution großer Fragmente. Nach 1 Minute Inkubationszeit wird 1 Minute bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert.
6. Der DNA-Gehalt des Eluats wird mit einer Gelelektrophorese (s. 2.3) kontrolliert.

2.5 Vervielfältigung von Plasmiden in Escherichia coli

Plasmide können mit Hilfe des Bakteriums *Escherichia coli* (E. coli) vervielfältigt werden. Man schleust Plasmid-DNA in E. coli ein und kultiviert diese in Gegenwart eines Antibiotikums, bis sie sich ausreichend vermehrt und eine ausreichende Menge Plasmid gebildet haben. Dabei selektiert das Antibiotikum die transformierten Bakterien, da das Plasmid ein Resistenzgen gegen das jeweils geeignete Antibiotikum trägt. Zellen, die das Plasmid nicht aufgenommen oder verloren haben, sterben ab.

Alle hier verwendeten Plasmide tragen ein Ampizillin-Resistenzgen.

2.5.1 Herstellung von elektrokompenten Escherichia coli

Für die Elektroporation müssen sich die E. coli-Bakterien in einer salzarmen und damit wenig leitfähigen Umgebung befinden. Deshalb werden sie nach folgendem Protokoll gewaschen:

1. 5 ml einer Übernachtskultur mit dem E. coli-Stamm XL-1 blue werden 1:100 mit LB-Medium verdünnt und bei 37°C auf einem Schüttler wachsen gelassen, bis die Kultur eine optische Dichte von 0,5-0,7 bei 600 nm hat.
2. Die Kultur wird in 50 ml Falcon-Röhrchen umgefüllt, 15-30 Minuten auf Eis gestellt und dann 15 Minuten bei 4°C und 4000 g zentrifugiert (Zentrifuge CR 4 22, Jouan, Winchester, USA). Der Überstand wird verworfen.
3. Das Bakterienpellet wird in 500 ml eiskaltem H₂O dest. resuspendiert und dann nochmals 15 Minuten bei 4°C und 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen.
4. Das Pellet wird nun in 100 ml eiskaltem H₂O dest. resuspendiert und wie in Schritt 3 zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.
5. Das Pellet wird in 8 ml 10% Glycerol resuspendiert und wie in Schritt 3 zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

6. Das Pellet wird in 1,5 ml 10% Glyzerol resuspendiert und in 40 μ l Aliquots in Eppendorfgefäße aufgeteilt. Diese können sofort verwendet oder bei -80°C gelagert werden.

2.5.2 Elektroporation

Bei der Elektroporation wird die Zellmembran von elektrokompetenten E. coli durch einen kurzen elektrischen Puls für Plasmid-DNA durchlässig gemacht.

1. Elektrokompetente E. coli werden bei Raumtemperatur aufgetaut, mit 1-10 μ l gelöster Plasmid-DNA gemischt und 1 Minute auf Eis inkubiert.
2. Die Mischung wird in Küvetten mit 1 mm Elektrodenabstand (PeqLab Biotechnology, Erlangen, Deutschland) pipettiert. Die Transformation erfolgt mit dem Electro Cell Manipulator (BTX Genetronics, San Diego, USA) mit folgenden Einstellungen:

Voltage	1500 V
Resistor	125 Ω
Capacitor	50 μ F

3. Sofort nach dem Puls werden 950 μ l LB-Medium in die Küvette pipettiert. Dann wird die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für eine halbe Stunde bei 37°C geschüttelt.
4. Die Zellsuspension wird für 30 Sekunden zentrifugiert, der zellfreie Überstand verworfen und von den Zellen wird 1/10 auf einer ampizillinhaltigen Agarplatte (s. 2.12.2), 9/10 auf einer zweiten ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5.3 Weitere Verwendung der Klone

Von der Agarplatte werden Einzelkolonien mit einem sterilen Holzstäbchen aufgenommen und abhängig von den Folgeexperimenten in 1,5 ml LB-Medium (für Mini-Präparation (s. 2.6)) oder in 100 ml LB-Medium (für Maxi-Präparation (s. 2.7)) zur Übernachtskultur bei 37°C auf einem Schüttler überführt. Alternativ

kann die Kolonie auf eine frische Agarplatte getupft und das Holzstäbchen in 50 µl H₂O dest. gewaschen werden. Die Agarplatte wird bei 37°C inkubiert und die 50 µl Zellsuspension wird für 10 Minuten bei 100°C gekocht und anschließend für 5 Minuten bei 13000 U/min in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand kann als Matrize für eine PCR verwendet werden.

2.6 E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I

Das E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab Biotechnology, Erlangen, Deutschland) wird verwendet, um Plasmid-DNA aus höchstens 5 ml einer Übernachtskultur mit E. coli-Bakterien in LB-Medium zu extrahieren.

Das folgende Protokoll wird mit einer Mikrozentrifuge (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschl.) und 13 000 U/min bei allen Zentrifugations-schritten durchgeführt.

1. 1,5-5 ml Übernachtskultur werden in Eppendorfgefäße umgefüllt und für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen.
2. Das so erhaltene Bakterienpellet wird sorgfältig in 250 µl mit RNase A ergänzter Lösung I resuspendiert. Dazu ist oft längeres Vortexen notwendig.
3. 250 µl Lösung II werden zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Wenn so noch keine klare Lösung entstanden ist, wird kurz bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Das klare Lysat wird nun mit 350 µl Lösung III versetzt, welches das Lysat neutralisiert und Zelldebris ausfällt. Nach Invertieren entsteht ein flockiges Präzipitat, dass durch 10minütiges Zentrifugieren pelletiert wird.
5. Der Überstand aus Schritt 4 wird vorsichtig abpipettiert und in eine HiBind[®]-Miniprep-Zentrifugensäule gefüllt, die zuvor in ein 2 ml Sammel-Tube gestellt wurde. Die Zentrifugensäule wird dann für 1 Minute zentrifugiert, bis das Lysat vollständig die Silikat-Membran der Säule passiert hat. Der Säulendurchfluss im Sammel-Tube wird verworfen.

6. Für diesen optionalen Waschschrift werden 500 μl HB-Puffer in die Zentrifugensäule pipettiert, diese für 1 Minute zentrifugiert und anschließend der Durchfluss im Sammel-Tube verworfen.
7. 750 μl des mit Äthanol komplettierten Waschpuffers werden in die Säule gefüllt und dann für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Dieser Waschschrift kann wiederholt werden.
8. Die Zentrifugensäule wird durch einminütiges Zentrifugieren im leeren Sammel-Tube vollständig getrocknet.
9. Jetzt wird die Plasmid-DNA aus der Silikatmembran der Zentrifugensäule eluiert. Dazu stellt man die Säule in ein sauberes Eppendorfgefäß, pipettiert 50 μl H_2O dest. direkt auf die Membran und zentrifugiert für 1 Minute.
10. Die Konzentration der im Eppendorfgefäß aufgefangenen DNA-Lösung wird mit Photometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm Wellenlänge bestimmt.

2.7 QIAGEN Plasmid Maxi Kit

Das QIAGEN Plasmid Purification Protokoll (QIAGEN, Hilden, Deutschland) dient zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus einer 100 ml E. coli-Übernachtskultur. Die Bakterienkultur sollte 12-16 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert worden sein und eine Zelldichte von $3\text{-}4 \times 10^9$ Zellen/ml erreicht haben.

1. Die 100 ml Übernachtskultur werden auf zwei 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und für 15 Minuten bei 4°C und $6000 \times g$ zentrifugiert (Zentrifuge CR 4 22, Jouan, Winchester, USA). Der Überstand wird sorgfältig abgekippt.
2. Die Bakterienpellets werden in 10 ml Puffer P1 durch Vortexen komplett resuspendiert. Es sollten keine Zellklumpen mehr in der Suspension schwimmen.

3. Der Bakteriensuspension werden 10 ml Puffer P2 zugegeben und die Mischung nach 4-6maligem Invertieren für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. SDS und NaOH im Puffer lysieren die Zellen und denaturieren DNA und Proteine.
4. Nun werden 10 ml des zuvor auf 4°C gekühlten Puffers P3 zugegeben, invertiert und die erhaltene Mischung für 20 Minuten auf Eis gestellt. Dabei wird das Lysat mit Kaliumacetat neutralisiert; SDS, Zelldebris, Proteine und chromosomale DNA werden durch die hohe Salzkonzentration als Salz-Detergenz-Komplexe präzipitiert. Die kleinere Plasmid-DNA renaturiert und bleibt in Lösung.
5. Die nun flockige Mischung wird bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand sofort in ein sauberes 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Das Zelldebris-Pellet wird verworfen.
6. Während der Zentrifugation wird ein QIAGEN-tip 500 vorbereitet, indem man 10 ml Puffer QBT in die Säule füllt und vollständig durchlaufen lässt.
7. Der Überstand wird nochmals bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert, dann sorgfältig abpipettiert, in das vorbereitete QIAGEN-tip gefüllt und durchlaufen gelassen, wobei die Plasmid-DNA an die Membran der Säule bindet.
8. Nun wird die Säule zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen. Der Puffer soll Kontaminationen wie RNA oder Protein entfernen.
9. Zur Elution wird die Säule in ein frisches 50 ml Falcon-Röhrchen gestellt und von 15 ml Puffer QF durchlaufen gelassen.
10. Die DNA im Eluat wird durch 10,5 ml Isopropanol ausgefällt und sofort bei $6000 \times g$ und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt, um das Pellet nicht zu verlieren.
11. Dann wird das DNA-Pellet mit 5 ml 70% Äthanol gewaschen und bei $6000 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgekippt.
12. Nach einer Lufttrocknungszeit von 5-10 Minuten, in der verbliebenes Äthanol verdunstet, wird das Pellet mit 100-200 μ l H₂O dest. gelöst.

11. Die Konzentration der DNA wird mit Photometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm Wellenlänge bestimmt.

2.8 QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit

Das QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene Cloning Systems, La Jolle, USA) dient dazu, mittels PCR Punktmutationen in ein Plasmid einzuführen.

Als Matrize für die Mutagenese-PCR dient ein doppelsträngiger Vektor. Es werden zwei ca. 30 bp lange Primer synthetisiert, die komplementär zueinander und komplementär zu der zu mutierenden Stelle im Plasmid sind und in ihrer Mitte die Mutation enthalten (s. Abb. 4) Diese Primer lagern sich während der PCR an das denaturierte Plasmid an – der jeweils neu synthetisierte Strang enthält den Primer und damit die Mutation, und nach einigen Zyklen entstehen hauptsächlich Plasmide, bei denen beide Stränge mutiert sind.

Um die nicht-mutierten Ursprungsplasmide aus der Probe zu entfernen, wird diese nach der Mutagenese-PCR mit der Restriktions-Endonuklease Dpn I verdaut. Dieses Enzym schneidet methylierte DNA und damit nur Plasmide, die von Bakterien gebildet wurden, jedoch nicht die durch PCR synthetisierten. Anschließend wird die Probe in E. coli transformiert.

Mutagenese-PCR

Ansatz (50 µl):	5 µl 10× Reaktionspuffer
	1 µl dNTPs
	0,7 µl (125 ng) Primer 1
	0,7 µl (125 ng) Primer 2
	50 ng/100ng Template DNA (0,8-15 µl)
	18,2-40,8 µl H ₂ O dest.
	1 µl PfuTurbo DNA Polymerase (2,5 U/µl)

Die PfuTurbo DNA Polymerase wird als letztes zugegeben und anschließend der Reaktionsansatz mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt.

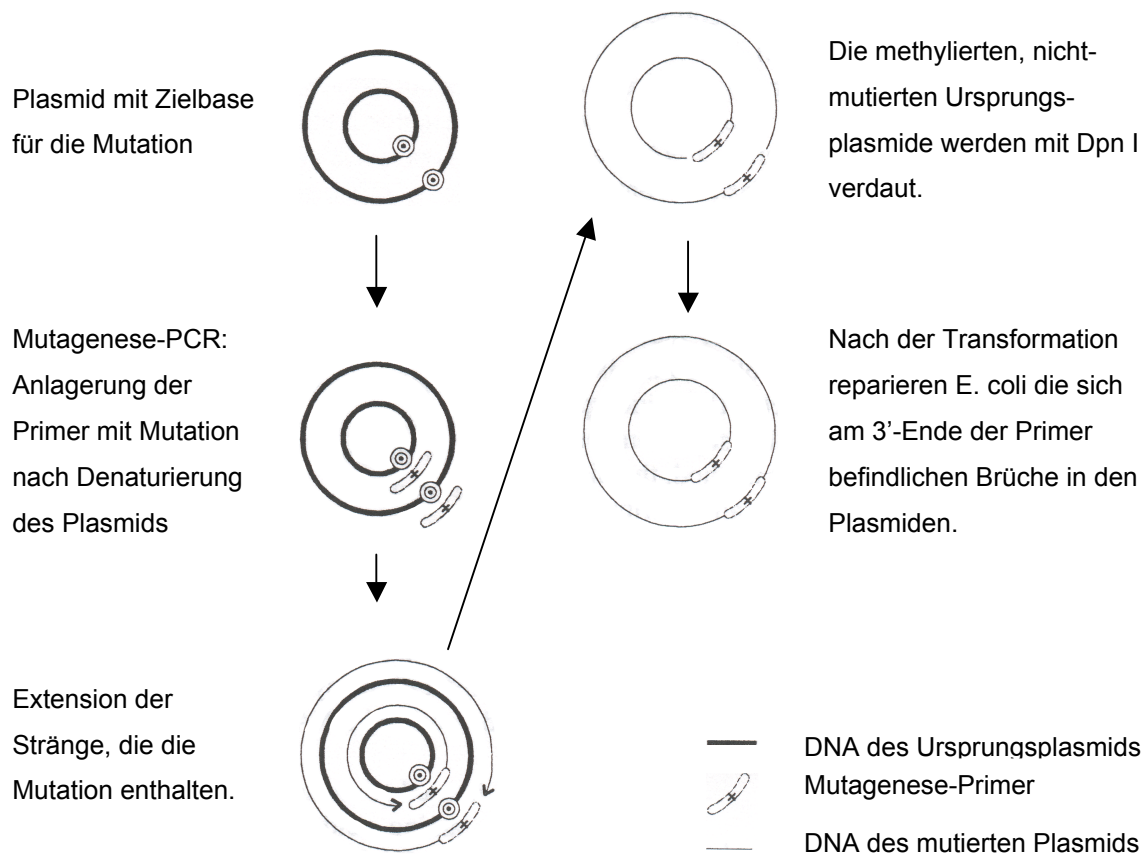


Abbildung 4: Prinzip des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit

PCR-Bedingungen:	erste Denaturierung	95°C	30 Sekunden
	Denaturierung	95°C	30 Sekunden
	Annealing	55°C	1 Minute
	Extension	68°C	11-22 Min.
		(2 Minuten/kb Plasmidlänge)	
	Anzahl der Zyklen	12	

Die PCR wurde mit dem DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, Wellesley, USA) durchgeführt. Zur Kontrolle wurden 5 µl der Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch analysiert (s. 2.3).

Dpn I – Verdau

1 μ l des Restriktionsenzym Dpn I (10 U/ μ l) wird unter die Mineralölschicht zum PCR-Produkt gegeben und durch auf- und abpipettieren vermischt. Der Reaktionsansatz wird kurz zentrifugiert und dann eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Transformation der Plasmide in E. coli

5 μ l der Dpn I-verdauten Probe werden durch Elektroporation in XL-1 blue transformiert und auf Agarplatten ausgestrichen (s. 2.5).

Am nächsten Tag werden die gewachsenen Kolonien gepickt und in 1,5 ml LB-Medium über Nacht kultiviert. Dann werden die Plasmide mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit (s. 2.6) gereinigt und anschließend sequenziert (s. 2.9), um zu kontrollieren, dass sie die gewünschte Mutation besitzen.

2.9 Sequenzierung von DNA

2.9.1 Cycle Sequencing-Reaktion

Um die genaue Basenabfolge eines DNA-Stücks zu ermitteln, wendet man die Kettenabbruch-Methode nach Sanger an (Sanger et al., 1977).

Diese Methode beruht auf einer PCR; die nur mit einem Primer durchgeführt wird und deshalb nur in eine Richtung erfolgt. Dem Reaktionsgemisch gibt man neben den Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (dNTPs) auch eine geringe Menge fluoreszenzmarkierter Didesoxyribonukleotid-Triphosphate (ddNTPs) zu. Wenn ein solches ddNTP in ein DNA-Molekül eingebaut wird, kann die DNA-Polymerase kein weiteres NTP anhängen – die Kette bricht ab. Es entstehen also viele unterschiedlich lange DNA-Moleküle, die abhängig von ihrer letzten Base in unterschiedlichen Farben fluoreszieren. Diese DNA-Moleküle trennt man durch Gelelektrophorese auf und kann dann mit einem Laser die Farben und somit Basen in der richtigen Reihenfolge detektieren.

Die Cycle-Sequencing Reaktion wurde mit dem DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, Wellesley, USA) durchgeführt.

Ansatz (20 μ l): 4 μ l BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, USA)
 0,5 μ l (10 pMol) Primer
 0,5-5 μ l Template DNA (ca. 1 μ g)
 11,5-15 μ l H₂O dest.

PCR-Bedingungen:	Denaturierung	96°C	30 Sekunden
	Annealing	50°C	15 Sekunden
	Extension	60°C	4 Minuten
	Anzahl der Zyklen	30	

2.9.2 CENTRI-SEP - Reinigung

Nach der Cycle-Sequencing Reaktion werden die Reaktionsprodukte mit CENTRI-SEP – Säulen (Princeton Separations, Adelphia, USA) von überschüssigen Nukleotiden, Salzen und anderen Pufferkomponenten nach folgendem Protokoll gereinigt:

1. Die Matrix wird in die Spitze der Säule geklopft und mit 800 μ l H₂O dest. rehydriert. Nach kurzem Vortexen werden Luftblasen durch Antippen der Säule entfernt und das Gel mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur quellen gelassen.
2. Deckel und Endkappe der Säule werden entfernt und überschüssige Flüssigkeit wird in ein Sammelröhrchen ablaufen gelassen.
3. Sobald keine Flüssigkeit mehr aus der Säule tropft, wird sie in einer Mikrozentrifuge (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschl.) bei 3000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wird verworfen.

4. Die Säule wird in ein sauberes Eppendorfgefäß gestellt und die Cycle-Sequencing-Probe wird vorsichtig direkt auf die Mitte des Gels pipettiert.
5. Nun wird die Säule in der gleichen Orientierung wie bei Schritt 3 in die Zentrifuge gestellt und bei 3000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert.
6. Die gereinigte Probe wird in einer Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet.

2.9.3 Sequenzier- Elektrophorese

Die Sequenzier-Elektrophorese wurde mit dem Sequenziergerät ABI 373 A (Applied Biosystems, Foster City, USA) von Andrea Weierich und Silvelia Grummes durchgeführt.

2.10 Restriktion mit Endonukleasen

Endonukleasen schneiden DNA an einer für das jeweilige Enzym spezifischen Sequenz. Man benützt den Enzymverdau, um DNA zu schneiden, Plasmidringe zu öffnen oder um Mutationen zu analysieren.

Die verwendeten Enzyme wurden von New England Biolabs (Beverly, USA) bezogen.

Ansatz (30 µl):

- 3 µl Reaktionspuffer (NEB, Beverly, USA)
- 3 µl Enzym
- 3-8 µl DNA
- evtl. 0,3 µl BSA (je nach Enzym)
- 14,3-21 µl H₂O dest.

Der Ansatz wird bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur 1 Stunde inkubiert und dann zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen (s. 2.3).

2.11 Ligation von PCR-Fragmenten und Vektor

2.11.1 Restriktion der Fragmente und des Vektors

DNA-Fragmente können leicht verknüpft werden, wenn sie zusammenpassende Enden haben. Um das zu gewährleisten, schneidet man die DNA mit dem gleichen Restriktionsenzym, in diesem Fall EcoR I (NEB, Beverly, USA).

Die PCR-Fragmente, zu deren Herstellung Primer mit EcoR I-site verwendet wurden, werden mit diesem Enzym geschnitten (s. 2.10). Dann wird das Enzym durch eine 10minütige Inkubation des Ansatzes bei 70°C deaktiviert. Die Fragmente werden anschließend mit dem NucleoSpin Extract Kit gereinigt (s. 2.4.2)

Das Plasmid A2 wild (s. 2.13) wurde mit EcoR I verdaut, um so das Insert aus dem Vektor auszuschneiden. Nach der Reaktion wird dem Ansatz 1 µl (1u) alkalische Phosphatase zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase entfernt die Phosphatgruppen von den Enden der DNA-Moleküle, die die DNA-Ligase für die Ligation benötigt. Dadurch wird erreicht, dass sich später nicht die beiden Enden des linear vorliegenden Vektors miteinander verbinden, sondern dass die PCR-Fragmente eingebaut werden, deren Enden die Phosphatgruppen noch tragen.

2.11.2 Phenol-Extraktion

Um z.B. alkalische Phosphatase zu deaktivieren und DNA von anderen Proteinen und Verunreinigungen zu befreien, wird eine Phenol-Extraktion durchgeführt.

1. Die Probe wird mit 1 Teil Phenol (pH 8) gemischt und 3 Minuten in einer Mikrozentrifuge bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert.
2. Die obere, wässrige Phase wird in ein sauberes Eppendorf-Röhrchen überführt, mit einem Teil Phenol/Chloroform (1:1) gemischt und wiederum 3 Minuten bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert.
3. Die obere, wässrige Phase wird abgenommen, mit einem Teil Chloroform gemischt und eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

4. Wieder wird die obere, wässrige Phase abgenommen. Sie wird einer Äthanol-fällung unterzogen (s. 2.4.1)

Anschließend an die Phenol-Extraktion wird der Ansatz auf ein Gel aufgetragen.

2.11.3 Ligase-Reaktion

Bei der Ligation verknüpft die DNA-Ligase (NEB, Beverly, USA) die PCR-Fragmente mit dem Vektor durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen und schafft so Plasmide mit neuen Inserts.

Für die Reaktion wurde folgender Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert:

- 3 μ l H₂O dest.
- 2 μ l Reaktionspuffer mit ATP (NEB, Beverly, USA)
- 2 μ l (800 u) Ligase
- 10 μ l Fragment-DNA
- 3 μ l Vektor-DNA

Dann wurde eine Äthanol-fällung durchgeführt, nach der die rekombinierten Plasmide in 10 μ l H₂O gelöst und anschließend komplett in E. coli XL1 blue transformiert werden (s. 2.5).

2.12 Verwendete Medien und Puffer

2.12.1 LB-Medium

- Ansatz für 1 Liter:
- 10 g Bactotryptone
 - 5 g Bacto-Yeast-Extract
 - 5-10g NaCl

Die Chemikalien werden in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und in 1 Liter H₂O dest. mit einem Magnetrührer aufgelöst. Falls erforderlich wird der pH-Wert des Gemisches mit 10 M NaOH auf 7 eingestellt. Anschließend wird das Medium autoklaviert.

Danach kann man, sobald das Medium abgekühlt ist, zur weiteren Verwendung 100 µg/ml Ampizillin oder 50 µg/ml Tetracyclin zugeben.

2.12.2 Agarplatten

Zur Herstellung von Agarplatten wird LB-Medium (s. 2.12.1) verwendet, dem man vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugibt. Dann wird die Lösung autoklaviert, und danach soweit abkühlen gelassen, bis sie handwarm und noch nicht fest ist. Nun werden Antibiotika zugegeben, 100 µg/ml Ampizillin oder 50 µg/ml Tetracyclin. Von diesem Gemisch gießt man 25-30 ml in vorbereitete Platten (Durchmesser 8 cm). Die Platten werden sofort geschlossen und nach 1-2 Stunden Verfestigungszeit bei Raumtemperatur umgedreht, im Wärmeschrank bei 37 °C über Nacht getrocknet und dann im Kühlschrank aufbewahrt.

2.12.3 PBS

Ansatz für 1 Liter:	8 g NaCl
	0,2 g KCl
	1,44 g Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O
	0,24 g KH ₂ PO ₄

Das Gemisch wird in eine Schraubflasche eingewogen und in 800 ml H₂O dest. aufgelöst. Es wird mit HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt, mit H₂O dest auf 1 Liter aufgefüllt und autoklaviert.

2.12.4 10× TBE-Puffer

Ansatz für 2 Liter:	216 g Tris (0,9 M)
	111,2 g Borsäure (0,9 M)
	14,88 g EDTA (20 mM)

Die Chemikalien werden in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und in 2 Litern H₂O dest. vollständig aufgelöst. Zum Gebrauch wird diese Lösung 1:10 mit H₂O dest. verdünnt.

2.12.5 Probenpuffer für Agarosegele

Bei der Agarosegel-Elektrophorese werden die DNA-Proben zusammen mit folgendem Puffer gemischt und aufgetragen:

- 0,1 % Xylencyanol
- 0,1 % Bromphenolblau
- 40 % Glycerin
- 10 mM EDTA

2.13 Verwendete Plasmide

Tabelle 3: alle zur Transfektion verwendeten Vektoren mit Namen, Beschreibung und Herkunft

Name	Beschreibung	Herkunft
pRL-SV40	Enthält SV40-Promotor und Renilla-Luciferase-Gen	Promega, Madison, USA
pGL3-Basic	Enthält firefly luciferase-Gen und keinen Promotor	Promega, Madison, USA
pGL3-Control	Enthält firefly luciferase-Gen und SV40-Promotor	Promega, Madison, USA
g wild	pGL3 mit -5900/+100 iNOS - Promotor-Insert	Kirk Rockett, University of Oxford
A2 OxG	pGL3 mit -1212/-849 iNOS -Promotor-Insert und -1026 G	Kirk Rockett, University of Oxford
A2 wild	pGL3 mit -1212/-849 iNOS -Promotor-Insert und -1026 T	Kirk Rockett, University of Oxford
g LaC	pGL3 mit -5900/+100 iNOS - Promotor-Insert und -954 C	Anna Lena Stroh, diese Arbeit

A1+ 24G	pGL3 mit -2724/-2230 iNOS - Promotor-Insert und -2446 G	Anna Lena Stroh, diese Arbeit
A1+ wild	pGL3 mit -2724/-2230 iNOS - Promotor-Insert und -2446 C	Anna Lena Stroh, diese Arbeit
A1- 24G	pGL3 mit -2566/-2230 iNOS - Promotor-Insert und -2446 G	Anna Lena Stroh, diese Arbeit
A1- wild	pGL3 mit -2566/-2230 iNOS - Promotor-Insert und -2446 C	Anna Lena Stroh, diese Arbeit
A1+2 24G	pGL3 mit -2566/-754 iNOS -Promotor-Insert und -2446 G	Anna Lena Stroh, diese Arbeit
A1+2 wild	pGL3 mit -2566/-754 iNOS -Promotor-Insert und -2446 C	Anna Lena Stroh, diese Arbeit
A1+2 24G LaC	pGL3 mit -2566/-754 iNOS -Promotor-Insert, -2446 G und -954 C	Anna Lena Stroh, diese Arbeit
A2 LaC	pGL3 mit -1212/-849 iNOS -Promotor-Insert, -1026 T und -954 C	Anna Lena Stroh, diese Arbeit
A2 OxG LaC	pGL3 mit -1212/-849 iNOS -Promotor-Insert, -1026 G und -954 C	Anna Lena Stroh, diese Arbeit

2.14 Zellkultur von adhärennten Lungenepithelzellen (Zelllinie A549)

Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden in einer Sterilbank (HERA safe, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschl.) durchgeführt.

Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

2.14.1 Kulturmedium

Dem Medium Nut-Mix F12 (HAM) with Glutamax 1 (GibCo™ Invitrogen, Carlsbad, USA) wird 1% Penicillin/Streptomycin (GibCo™ Invitrogen, Carlsbad, USA) zugegeben, um bakterielle Infektionen der Zellkultur zu vermeiden, und

10% fetal bovine serum (GibCo™ Invitrogen, Carlsbad, USA), um zusätzlich zum Zellwachstum nötige Faktoren zur Verfügung zu stellen.

Das Transfektionsmedium enthält 10% fetal bovine serum, aber kein Antibiotikum.

2.14.2 Auftauen der Zellen

Die in 1 ml-Röhrchen mit einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml bei -80°C eingefrorenen Zellen werden bei Raumtemperatur aufgetaut und dann schnell gewaschen. Dazu pipettiert man die Zellen mit 5 ml Kulturmedium in ein 15 ml Falcon-Röhrchen und zentrifugiert sie für 2 min bei 1000 U/min. Der Überstand wird abgenommen und das verbleibende Zellpellet in 8 ml Kulturmedium resuspendiert, um es in eine 75 cm^3 Zellkulturflasche zu überführen.

Im Brutschrank werden die Zellen bei 37°C und einem CO_2 -Gehalt von 5% in liegenden Kulturflaschen inkubiert. Nach 12-24 Stunden wird das Kulturmedium gewechselt, um nicht-adhärente, tote Zellen zu entfernen.

2.14.3 Teilen der Zellen

Alle drei bis vier Tage wird das Kulturmedium in der Zellkulturflasche gewechselt. Sobald der Zellrasen konfluiert, müssen die Zellen geteilt werden. Dazu wird das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit 5 ml PBS gewaschen, dann werden sie mit 3 ml $1\times$ Trypsin + EDTA (GibCo™ Invitrogen, Carlsbad, USA) einige Minuten bei 37°C inkubiert, bis sie sich vom Boden lösen. Dieser Zellsuspension wird nun serumhaltiges Kulturmedium zugegeben, um das Trypsin zu inhibieren. Die Suspension wird dann in einem 15 ml-Falcon-Röhrchen für 2 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Nun kann es auf mehrere Kulturflaschen verteilt oder anderweitig verwendet werden.

2.14.4 Zellen zählen

Um die Konzentration einer Zellsuspension festzustellen, werden 9 Teile der Suspension (z.B. 90 μ l) mit einem Teil Trypan Blue Solution (0,4 %) (GibCo™ Invitrogen, Carlsbad, USA) (z.B. 10 μ l) gemischt. Diese Mischung wird 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um dem Farbstoff zu erlauben, in die toten Zellen zu dringen, und dann in der Neubauer-Kammer ausgezählt. Man zählt in 3 äußeren Quadraten die nicht blauen, also lebendigen Zellen und errechnet den Durchschnitt. Daraufhin kann man die Zellkonzentration mit (Durchschnitt \times $1,1 \times 10^4$ Zellen/ml) berechnen.

2.15 Transfektion von A549

Das Ziel der Transfektion ist, Plasmid-DNA in die Zellkerne der A549 Lungenzellen zu bringen, und somit die Expression des Plasmid-Gens durch die Zellen zu ermöglichen.

DNA wird von eukaryonten Zellen nicht ohne weiteres aufgenommen. Von den in Vorexperimenten erprobten Transfektions-Reagenzien hat sich Effectene (QIAGEN, Hilden, Deutschland) für A549 Lungenzellen als am effektivsten erwiesen.

Effectene ist ein nicht-liposomales kationisches Lipid. Die Transfektion erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird die DNA mit Hilfe des Enhancer kondensiert, dann wird Effectene zugegeben, das die DNA-Moleküle umhüllt und damit von den Zellen aufnehmbare Transfektions-Komplexe bildet.

Die genaue Vorgehensweise ist im Folgenden beschrieben.

Tag 1 - Zellen säen:

1. Die Zellen werden in der 75 cm³ Kulturflasche einmal mit 5 ml sterilem PBS gewaschen, um das Trypsin-inhibierende Serum zu entfernen.
2. Dann werden sie mit 3 ml Trypsin + EDTA einige Minuten bei 37 °C inkubiert, bis sie sich vom Flaschenboden gelöst haben.

3. Nach Zugabe von 5 ml Kulturmedium werden die Zellen in ein 15 ml-Röhrchen überführt und bei 1000 U/min 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt.
4. Das Pellet wird in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellkonzentration dieser Suspension festgestellt (s. 2.14.4).
5. Die Zellen sollen in einer 96-well-Platte mit 15 000 Zellen/well vorliegen, also wird die Zellsuspension auf eine Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt und davon 100 μ l in jede Vertiefung pipettiert.
6. Die Platte kommt dann für 23,5 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in den Brutschrank.

Tag 2 – Transfektion und Stimulation

1. Für jedes zu transfizierende Plasmid wird ein DNA-Mastermix hergestellt. Dazu werden in dieser Reihenfolge
 - 360 μ l EC-Buffer (QIAGEN, Hilden, Deutschland)
 - 4,5 μ l pRL-SV40-Plasmid (100 μ g/ml)
 - 13,5 μ l Proben-Plasmid (100 μ g/ml) und
 - 14,5 μ l Enhancer (QIAGEN, Hilden, Deutschland)
 in ein 1,5 ml-Röhrchen pipettiert. Dieser Ansatz wird gut gemischt und kurz abzentrifugiert.
2. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden 297 μ l davon mit 25,5 μ l Effectene-Transfection-Reagent (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gemischt und ebenfalls kurz abzentrifugiert. Der nun vollständige Mastermix muss 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Während dieser Zeit werden die am Vortag gesäten Zellen zur Transfektion vorbereitet: das Kulturmedium wird abgenommen und durch 180 μ l Transfektionsmedium (ohne Antibiotikum) pro Vertiefung ersetzt.
4. Nun werden in einem 1,5 ml-Röhrchen 300 μ l des Mastermixes mit 1000 μ l Transfektionsmedium gemischt und davon schnell 130 μ l in jede zu transfizierende Vertiefung pipettiert.
5. Die Platte wird dann bis zur Stimulation in den Brutschrank gestellt.

Die Stimulation findet 20 Minuten nach der Transfektion statt. Die Zytokine (Tebu, Frankfurt, Deutschland) werden nach folgendem Schema in die Vertiefungen pipettiert:

Tabelle 4: Zur Stimulation verwendete Zytokine

	Zytokinmenge / well	Erreichte Zytokinkonzentration
Stimulation 1	1,3 µl LPS	10 ng/ml LPS
	13 µl IFN γ	500 U/ml IFN γ
Stimulation 2	6,5 µl IFN γ	250 U/ml IFN γ
	15,5 µl TNF α	1000 U/ml TNF α
	3,1 µl IL1 β	100 U/ml IL1 β

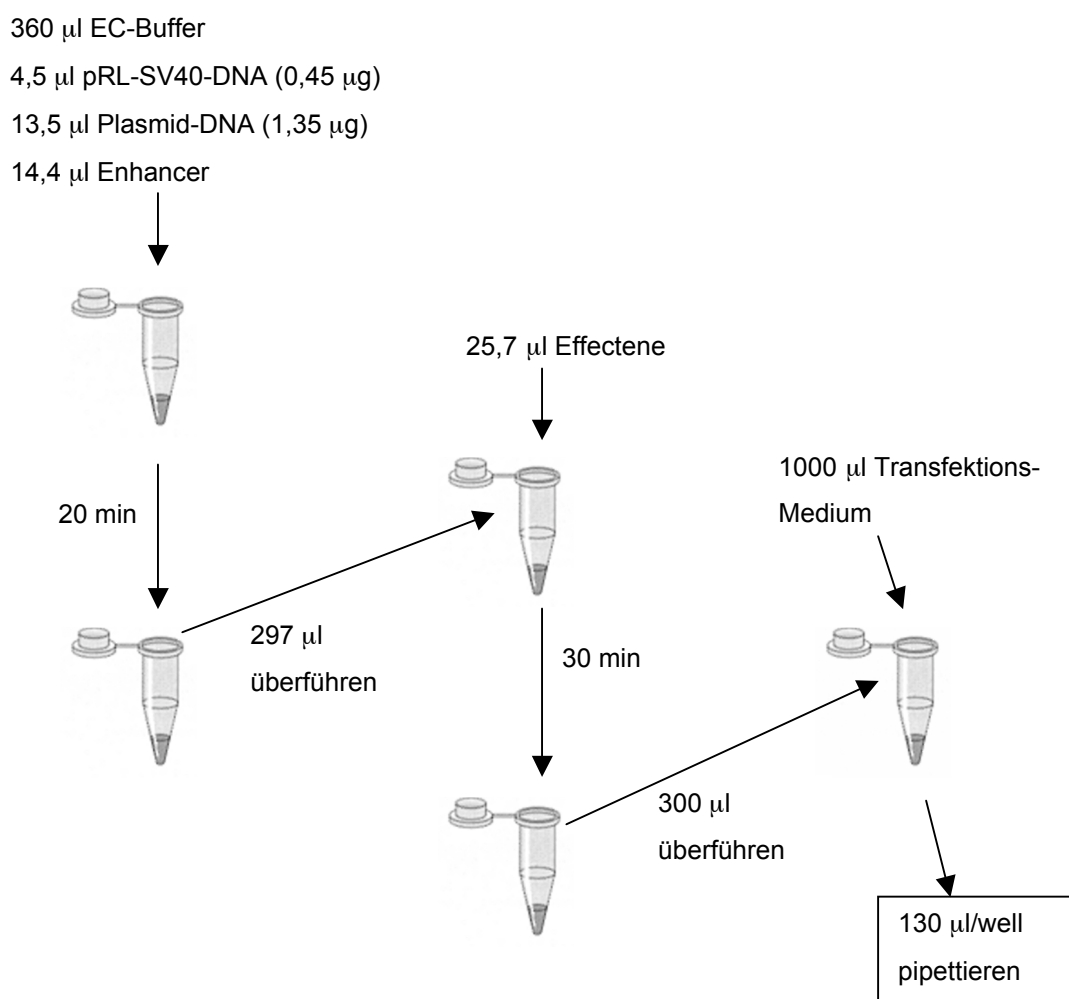


Abbildung 5: Transfektion

Tag 4 – Lyse

48 Stunden nach der Transfektion wird alle Flüssigkeit aus den Vertiefungen entfernt und in jede Vertiefung 25 µl 1× Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, USA) pipettiert. Dann folgt eine Inkubationszeit von 15 – 20 min, zu der die Platte auf einen Schüttler gestellt wird. Nachdem unter dem Mikroskop kontrolliert wurde, ob die Lyse erfolgreich war, wird die Platte bei –20 °C bis zum Luziferase-Assay (s. 2.16) eingefroren.

2.16 Luziferase-Assay

Der Luziferase-Assay wurde mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Madison, USA) durchgeführt. Dabei werden die Aktivitäten der Firefly-Luziferase und der Renilla-Luziferase getrennt gemessen. Alle Probenplasmide kodieren das Firefly-Luziferase-Gen, dessen Aktivität durch Messung von Lichteinheiten nach Zugabe von Luciferase Assay Reagent II (LAR II) bestimmt wird. Dieser Wert wird mit der Renilla-Luziferase-Aktivität verglichen. Das Gen für dieses Enzym findet sich auf pRL SV40, dem Kontrollvektor, der stets im Verhältnis 1:3 kotransfiziert wurde. Die Renilla-Reaktion wird durch das Reagenz Stop&Glo ausgelöst, das gleichzeitig die Firefly-Luziferase-Reaktion beendet.

Vor der Messung wurden Zellysate, LAR II und Stop&Glo im Wärmeschrank auf 37°C gebracht und anschließend das Injektionssystem des Luminometers (Lumat LB 9507, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) mit LAR II und Stop&Glo geladen.

Von jeder Zellysat-Probe wurden 10 µl in ein Röhrchen pipettiert und sofort in das Luminometer gestellt, das folgendermaßen programmiert war:

Injektion 1 (LAR II)	25 µl
Verzögerung Inj.1/Messung 1	0 Sekunden
Messung 1 (M1)	10 Sekunden
Injektion 2 (Stop&Glo)	25 µl
Verzögerung Inj.2/Messung 2	0 Sekunden
Messung 2 (M2)	10 Sekunden

Die Werte von Messung 1 und 2 und der Quotient M1/M2 wurden ausgedruckt.

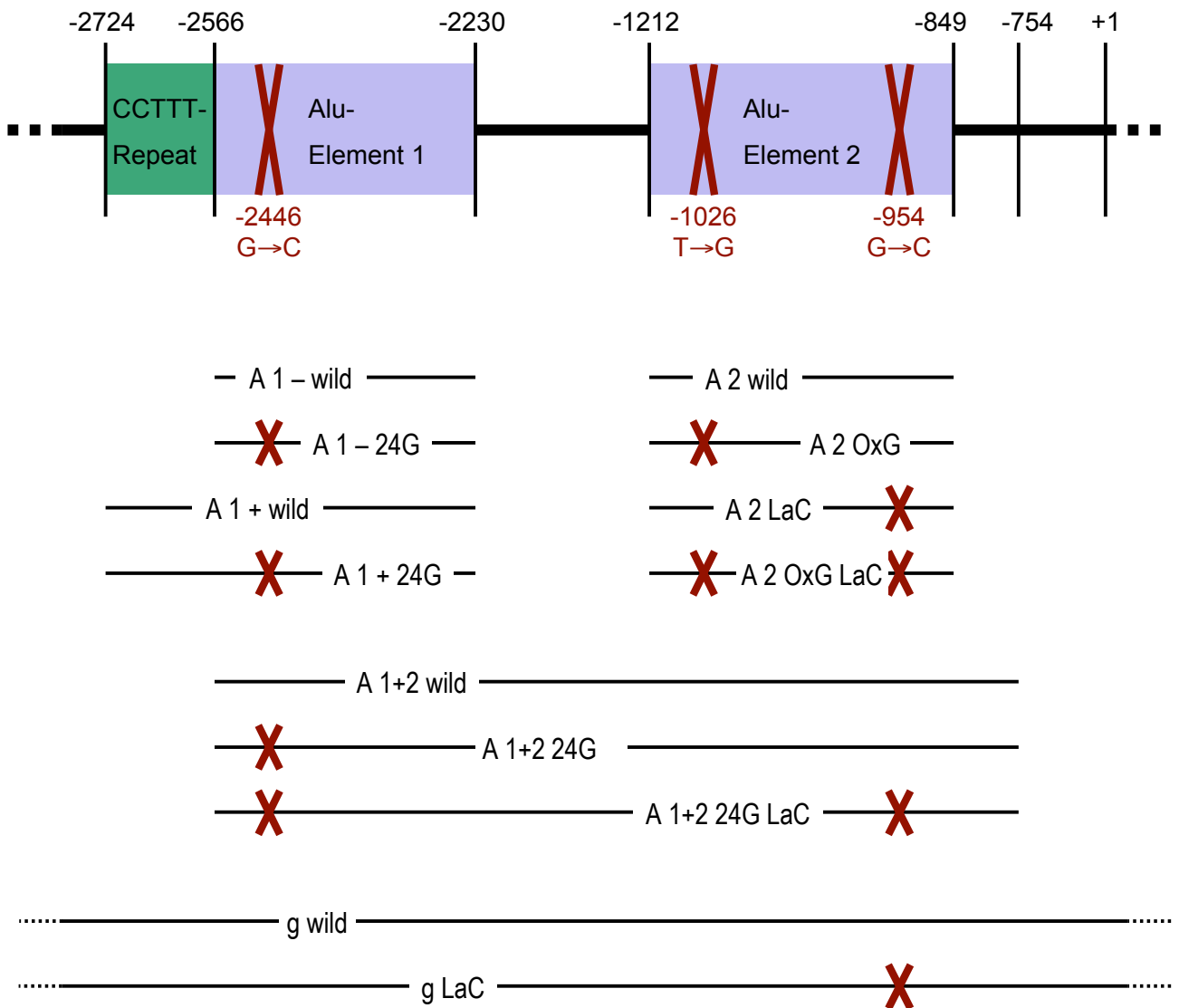
2.17 Statistische Analyse




Jede Transfektion mit den verschiedenen Konstrukten mit oder ohne Stimulation wurde in Triplikaten durchgeführt. Von diesen Triplets wurde das Ergebnis eines Ansatzes ausgeschlossen, falls sowohl dessen Quotient M1/M2 (relative Lichteinheiten (rel. LE) = LE des Probenplasmids / LE des Kontrollplasmids) als auch eine Messung M1 oder M2 (LE von Probenplasmid oder Kontrollplasmid) um mehr als 100% vom Mittelwert der jeweils anderen beiden Werte abwich. Wenn rechnerisch zwei verschiedene Werte ausgeschlossen werden konnten, wurde das ganze Triplet nicht gewertet.

Um die Stimulierbarkeit zu erfassen, wurde pro Versuch der Mittelwert der Aktivität von Stimulation 1 und 2 (in rel. LE) durch den Mittelwert der basalen Aktivität geteilt.

Die Promotoraktivität bzw. die Luziferase-Produktion der Plasmide wurde mit dem Wilcoxon-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Ein p-Wert von <0,05 wurde als signifikant definiert.

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Länge der Promotorfragmente für die Plasmidkonstrukte und der Position der Mutationen im iNOS-Gen



Legende:	 iNOS-Promotor	 Mutation
	 Inserts der Plasmide	

3 Ergebnisse

3.1 Aktivitätsmessung mit Wildtyp-Konstrukten

Es liegen Wildtyp-Konstrukte mit verschiedenen Promotor-Abschnitten vor. Das große Plasmid **g wild** enthält ein 6 kb-Insert (-5900/+100). Kleinere Abschnitte aus diesen 6 kb wurden in andere Plasmide eingefügt: das erste Alu-Element mit und ohne das auf der 5'-Seite angrenzende CCTTT-Repeat in **A1+ wild** (-2724/-2230) bzw. **A1- wild** (-2566/-2230), das zweite Alu-Element in **A2 wild** (-1212/-849) und beide Alu-Elemente zusammen in **A1+2 wild** (-2566/-754) (s. Abb. 6).

Die basale sowie die stimulierte Aktivität des Plasmids **g wild** ist signifikant (zwischen Faktor 4 und 80) geringer als die aller anderen Wildtyp-Plasmide ($p < 0,0001$, s. Abb. 7 und Tab. 5).

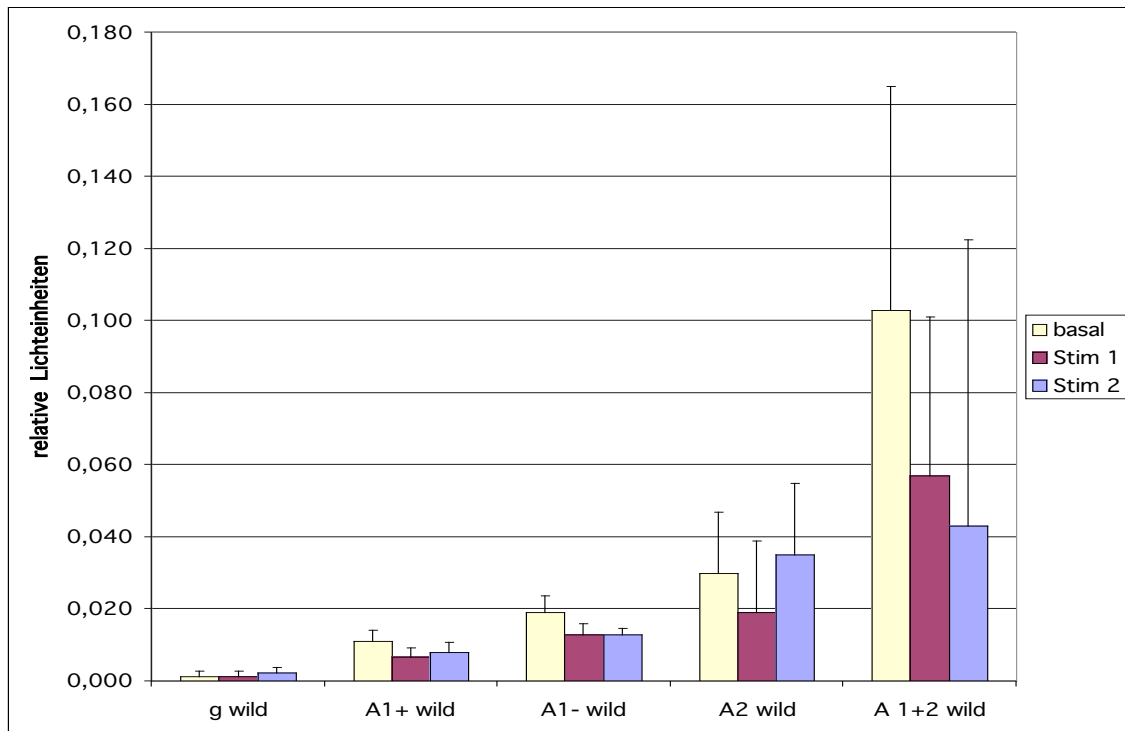
Allerdings ist **g wild** das einzige der Wildtyp-Plasmide, das sich durch die Zugabe von Zytokinen stimulieren lässt und nicht reprimiert wird (s. Tab. 12 und Abb. 8). Dieser Effekt ist jedoch statistisch nicht signifikant. Dagegen kann gezeigt werden, dass die Stimulierbarkeit von **g wild** um den Faktor 1,7 bzw. 1,5 größer ist als die von **A1+ wild** und **A1- wild** ($p < 0,01$). Zu **A2 wild** ist der Unterschied aufgrund der großen Streuung der Werte dieses Plasmids nicht signifikant.

A1+2 wild, das Konstrukt mit beiden Alu-Elementen, erreicht die höchsten basalen und stimulierten Aktivitäts-Werte, die jedoch stark streuen (s. Abb. 7 und Tab. 5). Basale und stimulierte Aktivität sind um den Faktor 80 bzw. 40 (Stim. 1) und 20 (Stim. 2) größer als die von **g wild** ($p < 0,001$).

Der Unterschied zu den kleinen Plasmiden ist nicht so groß: die Aktivität von **A1+2 wild** ist basal um den Faktor 9 und stimuliert um den Faktor 8 (Stim. 1) bzw. 5 (Stim. 2) signifikant höher als die von **A1+ wild**. Zwischen **A1+2 wild** und **A1- wild** ist nur noch der Unterschied bei Stimulation 2 signifikant – die Aktivität von **A1+2 wild** ist um den Faktor 3 höher. Obwohl die Mediane von basaler Aktivität und Stimulation 1 sich um Faktor 5,5 bzw. 4 unterscheiden, lässt sich dieser Unterschied aufgrund der großen Streuung der Werte nicht

belegen. Ebenso verhält es sich beim Vergleich von **A1+2 wild** und **A2 wild**: die Mediane der Aktivität von **A1+2 wild** sind zwar 3,4mal (basal), 3mal (Stim. 1) und 1,2mal (Stim. 2) größer als die von **A2 wild**, ein signifikanter Unterschied ergibt sich jedoch nicht.

Abbildung 7: Aktivität der Wildtyp-Konstrukte basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2)



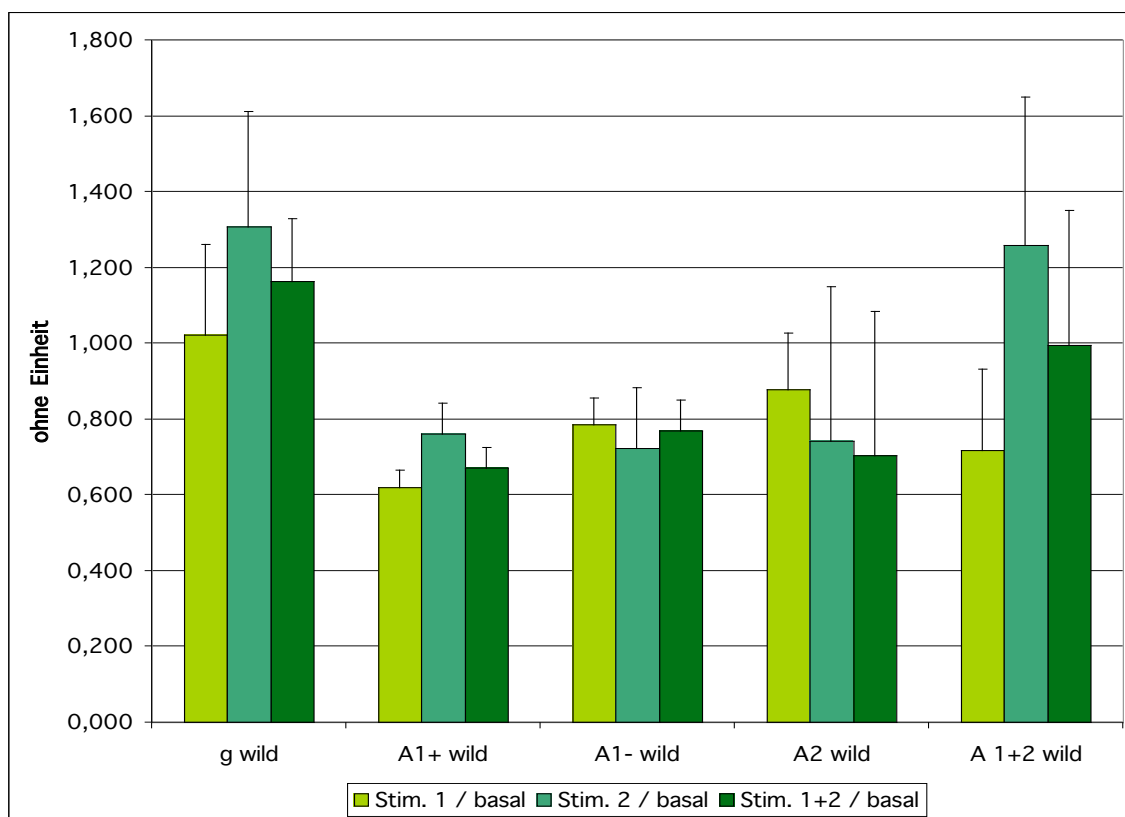
gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide:	g wild	-5900/+100 iNOS-Promotor-Insert
	A1+ wild	-2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert
	A1- wild	-2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert
	A2 wild	-1212/-849 iNOS-Promotor-Insert
	A1+2 wild	-2566/-754 iNOS-Promotor-Insert

Die Stimulierbarkeit von **A1+2 wild** zeigt eine große Streuung (s. Tab. 12 und Abb. 8). Auffällig ist, dass Abbildung 7 eine Unterdrückung der Aktivität durch die Zugabe von Zytokinen nahe legt, dies sich jedoch bei den pro einzelner Versuch errechneten Quotienten Stim 1/basal, Stim 2/basal und Stim1+2/basal nicht bestätigt (s. Abb. 8). Es ist nicht möglich zu sagen, ob **A1+2 wild** durch die Stimulation stimuliert oder reprimiert wird. Die Stimulierbarkeit von **A1+2 wild** unterscheidet sich von der der anderen Plasmide nicht signifikant.

Das Konstrukt mit dem zweiten Alu-Element **A2 wild** hat eine um den Faktor 2,7 bzw. 1,6 signifikant höhere basale Aktivität als die Plasmide mit dem ersten Alu-Element **A1+ wild** bzw. **A1- wild** ($p < 0,0001$). Die stimulierte Aktivität von **A2 wild** ist ebenfalls höher als die von **A1+ wild** und **A1- wild**, der Unterschied ist jedoch nur im Vergleich zu **A1+ wild** signifikant – die Aktivität von **A2 wild** ist nach Stimulation 1 um den Faktor 2,8 und nach Stimulation 2 um den Faktor 4,4 größer.

Abbildung 8: Stimulierbarkeit der Wildtyp-Konstrukte (als Quotient Stim./basal)



gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide:	g wild	-5900/+100 iNOS-Promotor-Insert
	A1+ wild	-2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert
	A1- wild	-2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert
	A2 wild	-1212/-849 iNOS-Promotor-Insert
	A1+2 wild	-2566/-754 iNOS-Promotor-Insert

Die Stimulierbarkeit von **A2 wild** ist den Medianen nach deutlich kleiner als eins, jedoch nicht statistisch signifikant. Von der der anderen Plasmide unterscheidet sich die Stimulierbarkeit von **A2 wild** nicht.

A1+ wild und **A1- wild** sind von allen Wildtyp-Plasmiden am wenigsten stimulierbar – die stimulierte Aktivität fällt auf 62-79% der basalen Werte – und nur bei ihnen lässt sich bei Stim 1/basal und Stim 1+2/basal signifikant zeigen, dass sie durch die Zugabe von Zytokinen reprimiert werden ($p < 0,05$, s. Tab. 12 und Abb. 8).

A1+ wild und **A1- wild** werden in Kapitel 3.3 miteinander verglichen.

Tabelle 5: Vergleich der Stimulierbarkeit der Wildtyp-Konstrukte mit Eins

		n	Median	Vergleichs-Wert	p
g wild	Stim 1/bas.	6	1,02 (0,48)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	5	1,31 (0,61)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	6	1,16 (0,33)	1	n. s.
A1+ wild	Stim 1/bas.	6	0,62 (0,09)	1	<0,05
	Stim 2/bas.	6	0,76 (0,17)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	6	0,67 (0,10)	1	<0,05
A1- wild	Stim 1/bas.	6	0,79 (0,14)	1	<0,05
	Stim 2/bas.	5	0,72 (0,32)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	6	0,77 (0,16)	1	<0,05
A2 wild	Stim 1/bas.	4	0,88 (0,30)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	5	0,74 (0,82)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	5	0,70 (0,76)	1	n. s.
A 1+2 wild	Stim 1/bas.	5	0,72 (0,43)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	5	1,26 (0,78)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	6	1,00 (0,71)	1	n. s.

Die Quotienten Stim 1/basal, Stim 2/ basal und Stim 1+2/basal sind ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand.
p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet

Plasmide:	g wild	-5900/+100 iNOS-Promotor-Insert
	A1+ wild	-2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert
	A1- wild	-2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert
	A2 wild	-1212/-849 iNOS-Promotor-Insert
	A1+2 wild	-2566/-754 iNOS-Promotor-Insert

Tabelle 6: Wildtyp-Konstrukte: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2), Stimulierbarkeit als Quotient Stimulation/basal

	n	g wild	A1+ wild	p
basal	35	1,3 (3,3)	11 (6,4)	<0,0001
Stimulation 1	35	1,4 (2,9)	6,8 (5,0)	<0,0001
Stimulation 2	33	2,2 (3,2)	8,0 (5,5)	<0,0001
Stim1+2 / basal	12	1,16 (0,33)	0,67 (0,12)	<0,01

	n	g wild	A1- wild	p
basal	35	1,3 (3,3)	19 (9,3)	<0,0001
Stimulation 1	35	1,4 (2,9)	13 (6,1)	<0,0001
Stimulation 2	30	2,2 (3,2)	13 (3,5)	<0,0001
Stim1+2 / basal	12	1,16 (0,33)	0,77 (0,16)	<0,01

	n	g wild	A2 wild	p
basal	32	1,3 (3,3)	30(34)	<0,0001
Stimulation 1	29	1,4 (2,9)	19(40)	<0,0001
Stimulation 2	28	2,2 (3,2)	35(40)	<0,0001
Stim1+2 / basal	11	1,16 (0,33)	0,70 (0,87)	n. s.

	n	g wild	A 1+2	p
basal	31	1,3 (3,3)	103 (124)	<0,0001
Stimulation 1	30	1,4 (2,9)	57 (88)	<0,0001
Stimulation 2	27	2,2 (3,2)	43 (159)	<0,0001
Stim1+2 / basal	12	1,16 (0,33)	1,00 (0,71)	n. s.

	n	A1+ wild	A 1+2	p
basal	32	11 (6,4)	103 (124)	<0,01
Stimulation 1	31	6,8 (5,0)	57 (88)	<0,002
Stimulation 2	30	8,0 (5,5)	43 (159)	0,0002
Stim1+2 / basal	12	0,67 (0,12)	1,00 (0,71)	n. s.

	n	A1- wild	A 1+2	p
basal	32	19 (9,3)	103 (124)	n. s.
Stimulation 1	32	13 (6,1)	57 (88)	n. s.
Stimulation 2	27	13 (3,5)	43 (159)	<0,05
Stim1+2 / basal	12	0,77 (0,16)	1,00 (0,71)	n. s.

	n	A2 wild	A 1+2	p
basal	29	30(34)	103 (124)	n. s.
Stimulation 1	15	19 (40)	57 (88)	n. s.
Stimulation 2	15	35 (40)	43 (159)	n. s.
Stim1+2 / basal	11	0,70 (0,87)	1,00 (0,71)	n. s.

	n	A1+ wild	A2 wild	p
basal	33	11 (6,4)	30(34)	<0,0001
Stimulation 1	30	6,8 (5,0)	19(40)	<0,005
Stimulation 2	31	8,0 (5,5)	35(40)	<0,005
Stim1+2 / basal	11	0,67 (0,12)	0,70(0,87)	n. s.

	n	A1- wild	A2 wild	p
basal	33	19 (9,3)	30(34)	<0,02
Stimulation 1	30	13 (6,1)	19 (40)	n. s.
Stimulation 2	28	13 (3,5)	35 (40)	n. s.
Stim1+2 / basal	11	0,77 (0,16)	0,70 (0,87)	n. s.

Für basal, Stimulation 1 und Stimulation 2 ist der Median der Aktivität in relativen Lichteinheiten $\times 10^{-3}$, in Klammern der Interquartilabstand $\times 10^{-3}$ angegeben.

Der Quotient Stim1+2/basal ist ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand.

p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

Stimulation 1: 10 ng/ml LPS, 500 U/ml IFN γ

Stimulation 2: 250 U/ml IFN γ , 1000 U/ml TNF α , 100 U/ml IL1 β

Plasmide:

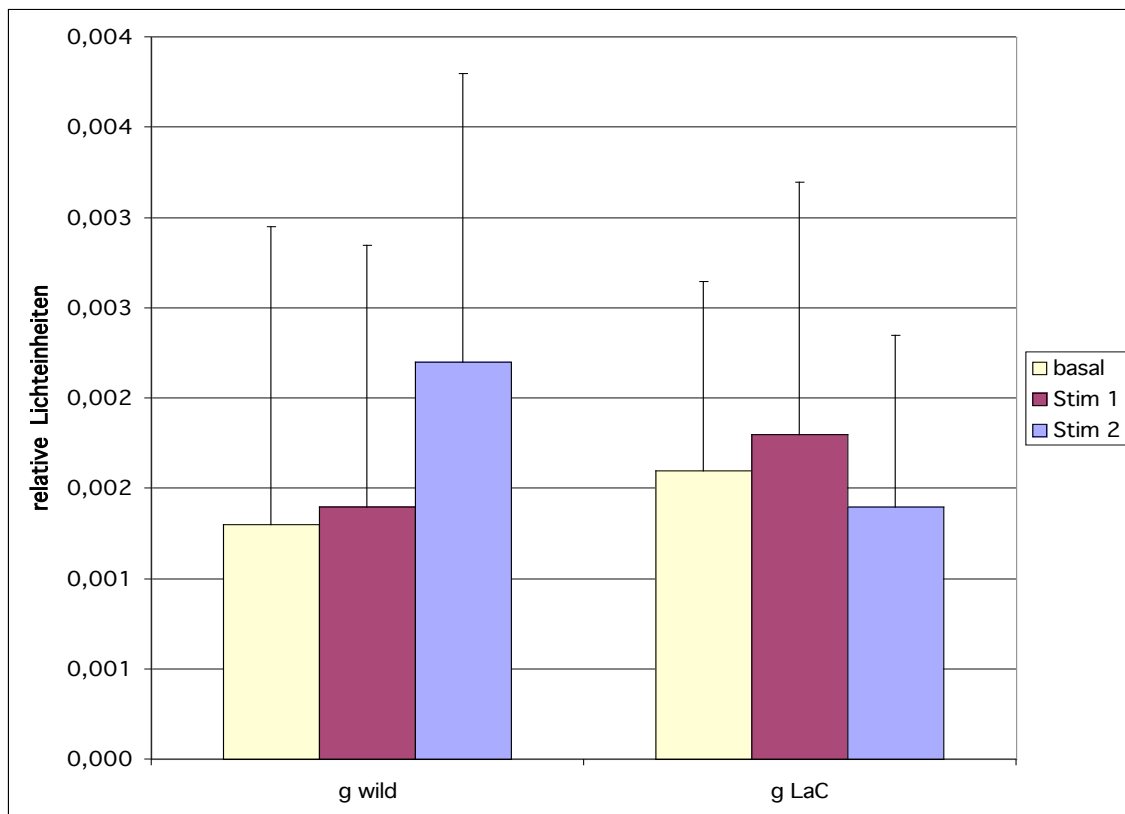
g wild	-5900/+100 iNOS-Promotor-Insert
A1+ wild	-2724/-2230 iNOS -Promotor-Insert
A1- wild	-2566/-2230 iNOS -Promotor-Insert
A2 wild	-1212/-849 iNOS -Promotor-Insert
A1+2 wild	-2566/-754 iNOS -Promotor-Insert

3.2 6kb-Konstrukte

Es wurden zwei 6kb-Konstrukte mit dem (-5900/+100) Promotor-Insert untersucht. Das Konstrukt **g LaC** unterscheidet sich vom Wildtyp **g wild** nur durch die Lambaréné-Mutation bei -954 (G→C).

Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen basal und nach Stimulation sind in Abbildung 9 und Tabelle 6 dargestellt. Danach sind zwischen **g wild** und **g LaC** keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Die basale Aktivität von **g LaC** ist 1,2mal, die Aktivität nach Stimulation 1 1,3mal größer als die von **g wild**, wohingegen die Aktivität nach Stimulation 2 von **g wild** höher ist als die von **g LaC** – um den Faktor 1,6.

Abbildung 9: Aktivität der Plasmide mit 6 kb-Insert basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2)

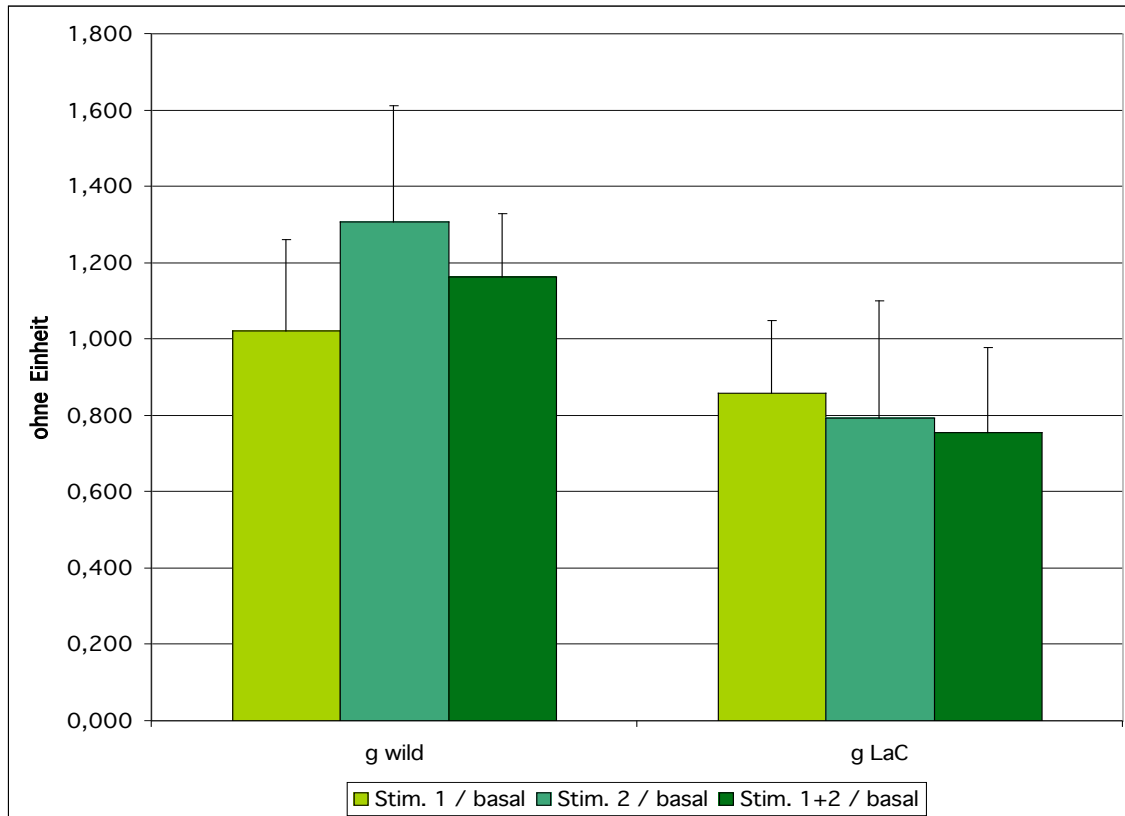


gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide: g wild -5900/+100 iNOS-Promotor-Insert
g LaC -5900/+100 iNOS-Promotor-Insert und -954 C

Ein signifikanter Unterschied findet sich dagegen bei der Stimulierbarkeit: **g wild** ist 1,5mal besser zu stimulieren als **g LaC** ($p < 0,05$). **g LaC** lässt sich durch die Zugabe von Zytokinen nicht induzieren (s. Abb. 10 und Tab. 12).

Abbildung 10: Stimulierbarkeit der Plasmide mit 6kb-Insert



gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide: g wild –5900/+100 iNOS-Promotor-Insert
 g LaC –5900/+100 iNOS-Promotor-Insert und –954 C

Tabelle 7: 6kb-Konstrukte: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2), Stimulierbarkeit als Quotient Stimulation/basal

	n	g wild	g LaC	p
basal	31	1,3 (3,3)	1,6 (2,1)	n. s.
Stimulation 1	35	1,4 (2,9)	1,8 (2,8)	n. s.
Stimulation 2	31	2,2 (3,2)	1,4 (1,9)	n. s.
Stim1+2 / basal	11	1,16 (0,33)	0,76 (0,44)	< 0,05

Für basal, Stimulation 1 und Stimulation 2 ist der Median der Aktivität in relativen Lichteinheiten $\times 10^{-3}$, in Klammern der Interquartilabstand $\times 10^{-3}$ angegeben.

Der Quotient Stim1+2/basal ist ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand.

p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

Stimulation 1: 10 ng/ml LPS, 500 U/ml IFN γ

Stimulation 2: 250 U/ml IFN γ , 1000 U/ml TNF α , 100 U/ml IL1 β

Plasmide: g wild -5900/+100 iNOS-Promotor-Insert
g LaC -5900/+100 iNOS-Promotor-Insert und -954 C

Tabelle 8: Vergleich der Stimulierbarkeit der Plasmide g wild und g LaC mit Eins

		n	Median	Vergleichs- Wert	p
g wild	Stim 1/bas.	6	1,02 (0,48)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	5	1,31 (0,61)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	6	1,16 (0,33)	1	n. s.
g LaC	Stim 1/bas.	5	0,86 (0,38)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	5	0,80 (0,61)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	5	0,76 (0,44)	1	n. s.

Die Quotienten Stim 1/basal, Stim 2/ basal und Stim 1+2/basal sind ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand.

p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet

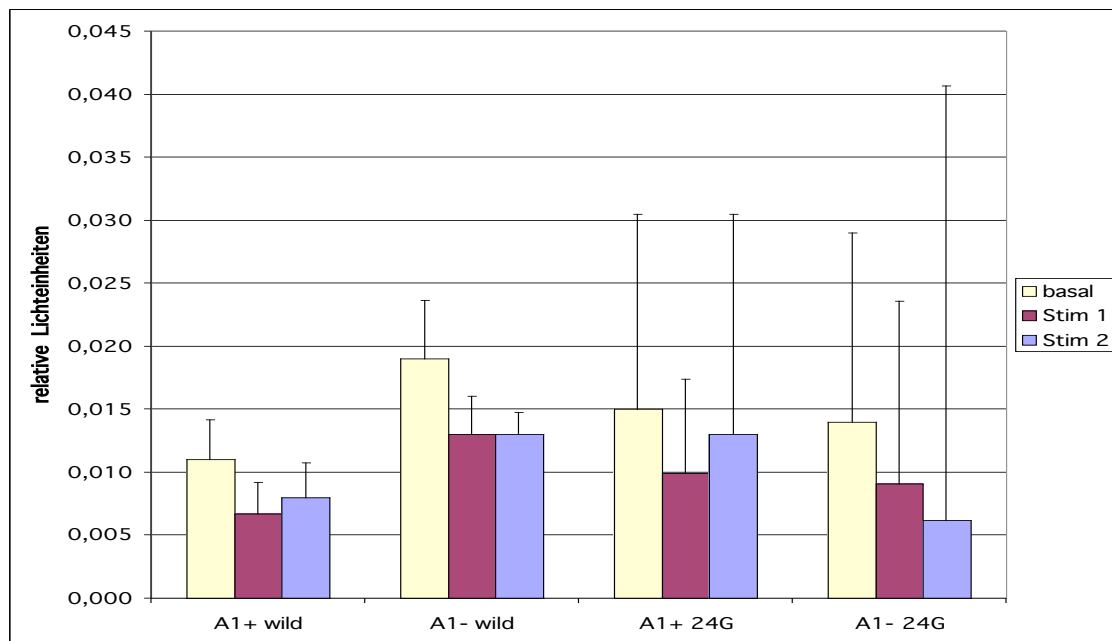
3.3 Plasmide mit Alu-Element 1

Die Gruppe der Plasmide mit Alu-Element 1 enthält zwei Wildtyp-Konstrukte: **A1+ wild** hat ein (-2724/-2230) Promotor-Insert, das das CCTTT-Repeat upstream vom Alu-Element enthält, **A1- wild** ist das Wildtyp-Konstrukt ohne das Repeat. **A1+ 24G** und **A1- 24G** unterscheiden sich von den Wildtypen jeweils durch eine Mutation bei -2446 (G→C).

A1- wild zeigt im Vergleich zum Wildtyp mit CCTTT-Repeat **A1+ wild** eine signifikant erhöhte basale und stimulierte Aktivität ($p < 0,005$). Das Fehlen des Repeats verursacht basal einen 1,7fachen und stimuliert einen 1,9fachen (Stim. 1) bzw. 1,6fachen (Stim. 2) Aktivitätsanstieg (s. Abb. 11 und Tab. 7)

Keine Auswirkung hat die Anwesenheit des Repeats jedoch auf die mutierten Plasmide: **A1+ 24G** und **A1- 24G** unterscheiden sich weder bei basaler noch bei stimulierter Aktivität.

Abbildung 11: Aktivität Plasmide mit Alu-Element 1 basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2)



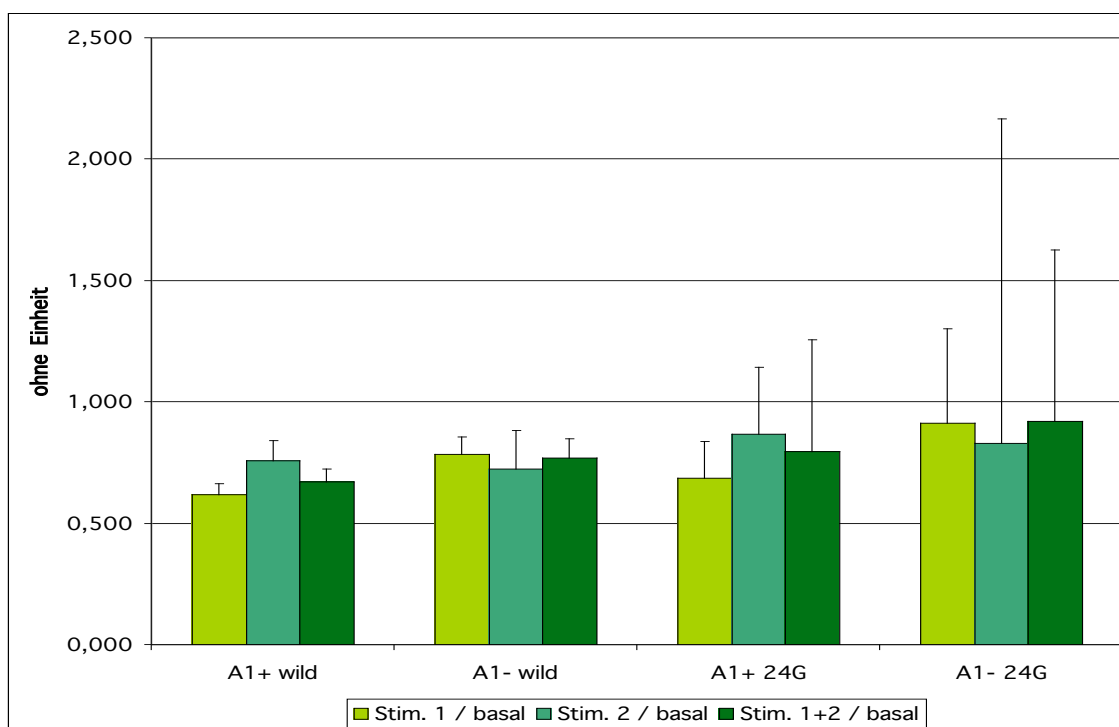
gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide:	A1+ wild	-2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert
	A1- wild	-2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert
	A1+ 24G	-2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G
	A1- 24G	-2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G

Beim Vergleich von **A1+ wild** mit seiner mutierten Variante **A1+ 24G** fallen die etwa um den Faktor 1,5 höheren basalen und stimulierten Aktivitäten von **A1+ 24G** auf, während die Mutation in **A1- 24G** verglichen mit **A1- wild** die Aktivitäten ungefähr um den Faktor 1,4 senkt. Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Die Stimulierbarkeit aller Plasmide mit Alu-Element 1 ist kleiner eins; alle Plasmide werden also reprimiert, was sich allerdings nur für **A1+ wild** und **A1- wild** bei der Stimulation mit IFN γ und LPS belegen lässt. Die Aktivität der Konstrukte mit Mutation **A1+ 24G** und **A1- 24G** scheint nach Zugabe von Zytokinen weniger zu fallen als die der Wildtypen, es lässt sich jedoch kein signifikanter Unterschied feststellen (s. Abb. 12 und Tab. 12).

Abbildung 12: Stimulierbarkeit der Plasmide mit Alu-Element 1



gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide:	A1+ wild	-2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert
	A1- wild	-2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert
	A1+ 24G	-2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G
	A1- 24G	-2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G

Tabelle 9: Plasmide mit Alu-Element 1: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2), Stimulierbarkeit als Quotient Stimulation/basal

	n	A1+ wild	A1- wild	p
basal	36	11 (6,4)	19 (9,3)	0,0002
Stimulation 1	36	6,7 (5,0)	13 (6,1)	<0,0001
Stimulation 2	33	8,0 (5,5)	13 (3,5)	<0,005
Stim1+2 / basal	12	0,67 (0,12)	0,77 (0,16)	n. s.

	n	A1+ wild	A1+ 24G	p
basal	34	11 (6,4)	15 (31)	n. s.
Stimulation 1	36	6,8 (5,0)	9,9 (15)	n. s.
Stimulation 2	32	8,0 (5,5)	13 (35)	n. s.
Stim1+2 / basal	12	0,67 (0,12)	0,77 (0,51)	n. s.

	n	A1- wild	A1- 24G	p
basal	38	19 (9,3)	14 (30)	n. s.
Stimulation 1	39	13 (6,1)	9,1 (29)	n. s.
Stimulation 2	30	13 (3,5)	6,2 (69)	n. s.
Stim1+2 / basal	13	0,77 (0,16)	0,92 (1,41)	n. s.

	n	A1+ 24G	A1- 24G	p
basal	36	15 (31)	14 (30)	n. s.
Stimulation 1	39	9,9 (15)	9,1 (29)	n. s.
Stimulation 2	29	13 (35)	6,2 (69)	n. s.
Stim. / basal	13	0,77 (0,51)	0,92 (1,41)	n. s.

Für basal, Stimulation 1 und Stimulation 2 ist der Median der Aktivität in relativen Lichteinheiten $\times 10^{-3}$, in Klammern der Interquartilabstand $\times 10^{-3}$ angegeben.

Der Quotient Stim.1+2 /basal ist ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand.

p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

Stimulation 1: 10 ng/ml LPS, 500 U/ml IFN γ

Stimulation 2: 250 U/ml IFN γ , 1000 U/ml TNF α , 100 U/ml IL1 β

Plasmide: A1+ wild -2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert
 A1- wild -2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert
 A1+ 24G -2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G
 A1- 24G -2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G

Tabelle 10: Vergleich der Stimulierbarkeit der Plasmide mit Alu-Element 1 mit Eins

		n	Median	Vergleichs- Wert	p
A1+ wild	Stim 1/bas.	6	0,62 (0,09)	1	<0,05
	Stim 2/bas.	6	0,76 (0,17)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	6	0,67 (0,10)	1	<0,05
A1- wild	Stim 1/bas.	6	0,79 (0,14)	1	<0,05
	Stim 2/bas.	5	0,72 (0,32)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	6	0,77 (0,16)	1	<0,05
A1+ 24G	Stim 1/bas.	6	0,69 (0,30)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	5	0,87 (0,55)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	6	0,80 (0,92)	1	n. s.
A1- 24G	Stim 1/bas.	7	0,91 (0,78)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	6	0,83 (2,68)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	7	0,92 (1,41)	1	n. s.

Die Quotienten Stim 1/basal, Stim 2/ basal und Stim 1+2/basal sind ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand.

p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet

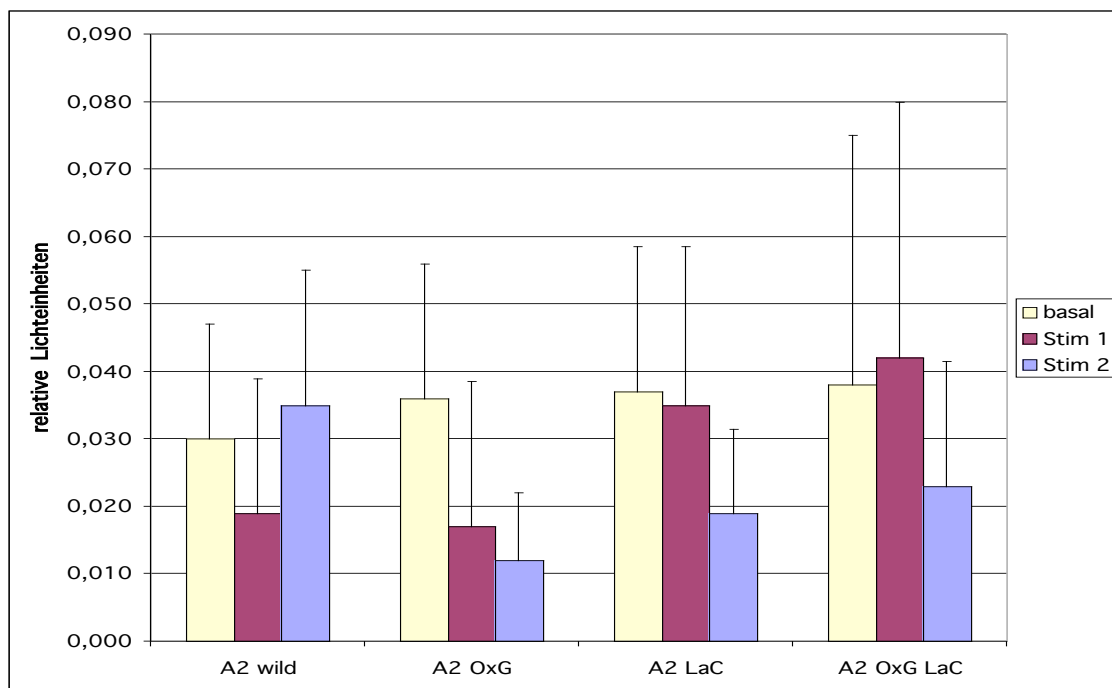
Plasmide: A1+ wild -2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert
 A1- wild -2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert
 A1+ 24G -2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G
 A1- 24G -2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G

3.4 Plasmide mit Alu-Element 2

Mit dem zweiten Alu-Element wurden vier verschiedene Plasmide konstruiert, die jeweils eine andere Mutation bzw. Mutationen enthalten. Vom Wildtyp **A2 wild** unterscheidet sich das Plasmid **A2 OxG** durch eine Mutation bei -1026 (T→G). Das Plasmid **A2 LaC** hat die Lambaréné-Mutation bei -954 (G→C) und **A2 OxG LaC** ist an beiden genannten Stellen mutiert.

Wie in Tabelle 8 dargestellt, finden sich in dieser Gruppe keine signifikanten Unterschiede, was sicher auch durch die große Streuung der Messwerte begründet ist.

Abbildung 13: Aktivität der Plasmide mit Alu-Element 2 basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2)



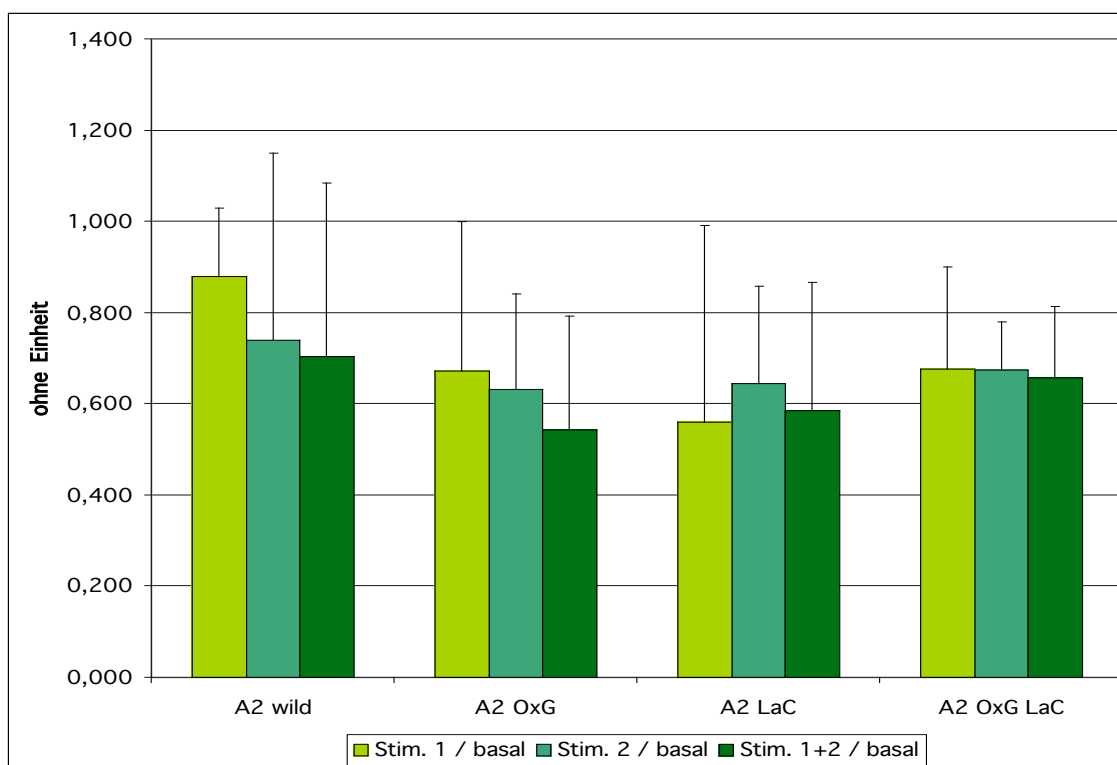
gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide: A2 wild -1212/-849 iNOS-Promotor-Insert
 A2 LaC -1212/-849 iNOS-Promotor-Insert und -954 C
 A2 OxG -1212/-849 iNOS-Promotor-Insert und -1026 G
 A2 OxG LaC -1212/-849 iNOS-Promotor-Insert, -1026 G und -954 C

Auffällig und in Abbildung 13 zu sehen ist jedoch, dass die Aktivität nach Stimulation 1 bei den Konstrukten mit Lambaréné-Mutation **A2 LaC** und

A2 OxG LaC ungefähr 2mal höher ist als die von **A2 wild** und **A2 OxG**. Dagegen ist die Aktivität nach Stimulation 2 beim Wildtyp 1,5-3mal größer als bei allen mutierten Plasmiden. Nicht so deutlich sind die Unterschiede bei den basalen Aktivitäten – die der mutierten Konstrukte **A2 OxG**, **A2 LaC** und **A2 OxG LaC** ist um den Faktor 1,2 größer als die des Wildtyps **A2 wild**. Die Stimulierbarkeit aller Plasmide mit Alu-Element 2 ist kleiner als eins, sie scheinen also reprimiert zu werden – allerdings nicht statistisch signifikant (s. Abb. 14 und Tab. 12).

Abbildung 14: Stimulierbarkeit der Plasmide mit Alu-Element 2



gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide: A2 wild –1212/-849 iNOS-Promotor-Insert
A2 LaC –1212/-849 iNOS-Promotor-Insert und –954 C
A2 OxG –1212/-849 iNOS-Promotor-Insert und –1026 G
A2 OxG LaC –1212/-849 iNOS-Promotor-Insert, –1026 G und –954 C

Tabelle 11: Plasmide mit Alu-Element 2: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2), Stimulierbarkeit als Quotient Stimulation/basal

	n	A2 wild	A2 LaC	A2 OxG	A2 OxG LaC	p
basal	54	30 (34)	37 (43)	36 (40)	38 (74)	n. s.
Stim. 1	53	19 (40)	35 (47)	17 (43)	42 (76)	n. s.
Stim. 2	50	35 (40)	19 (25)	12 (20)	23 (37)	n. s.
Stim1+2/bas.	18	0,70 (0,87)	0,57 (0,56)	0,54 (0,50)	0,66 (0,31)	n. s.

Für basal, Stimulation 1 und Stimulation 2 ist der Median der Aktivität in relativen Lichteinheiten $\times 10^{-3}$, in Klammern der Interquartilabstand $\times 10^{-3}$ angegeben.

Der Quotient Stim.1+2/basal ist ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand.

p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

Stimulation 1: 10 ng/ml LPS, 500 U/ml IFN γ

Stimulation 2: 250 U/ml IFN γ , 1000 U/ml TNF α , 100 U/ml IL1 β

Plasmide: A2 wild -1212/-849 iNOS-Promotor-Insert
A2 LaC -1212/-849 iNOS-Promotor-Insert und -954 C
A2 OxG -1212/-849 iNOS-Promotor-Insert und -1026 G
A2 OxG LaC -1212/-849 iNOS-Promotor-Insert, -1026 G und -954 C

Tabelle 12: Vergleich der Stimulierbarkeit der Plasmide mit Alu-Element 2 mit Eins

		n	Median	Vergleichs- Wert	p
A2 wild	Stim 1/bas.	4	0,88 (0,30)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	5	0,74 (0,82)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	5	0,70 (0,76)	1	n. s.
A2 OxG	Stim 1/bas.	5	0,67 (0,65)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	4	0,63 (0,42)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	5	0,54 (0,50)	1	n. s.
A2 LaC	Stim 1/bas.	5	0,56 (0,87)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	5	0,64 (0,43)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	5	0,59 (0,56)	1	n. s.
A2 OxG	Stim 1/bas.	3	0,68 (0,45)	1	n. s.
LaC	Stim 2/bas.	3	0,67 (0,21)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	3	0,66 (0,31)	1	n. s.

Die Quotienten Stim 1/basal, Stim 2/ basal und Stim 1+2/basal sind ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand.

p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet

Plasmide: A2 wild –1212/-849 iNOS-Promotor-Insert
 A2 LaC –1212/-849 iNOS-Promotor-Insert und –954 C
 A2 OxG –1212/-849 iNOS-Promotor-Insert und –1026 G
 A2 OxG LaC –1212/-849 iNOS-Promotor-Insert, –1026 G und –954 C

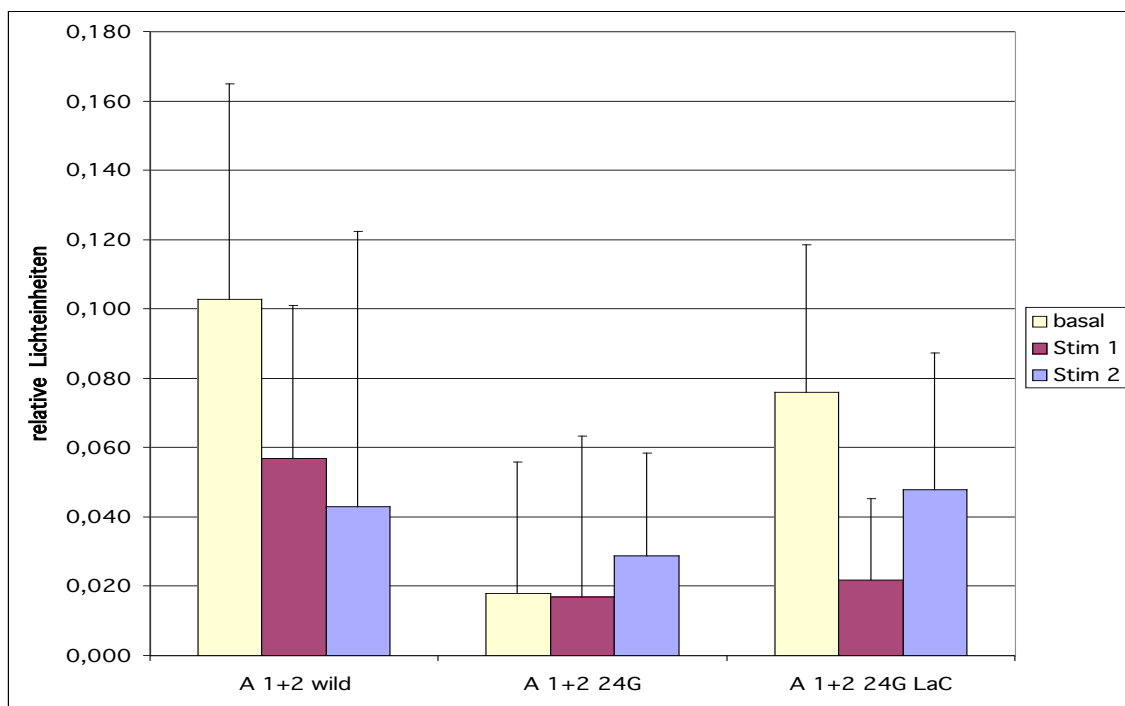
3.5 Plasmide mit beiden Alu-Elementen

Es wurden drei Konstrukte untersucht, die beide Alu-Elemente im Promotorabschnitt von –2566 bis –754 enthalten (s. Abb. 6). Vom Wildtyp **A1+2 wild** unterscheidet sich **A1+2 24G** durch eine Mutation bei –2446 (C→G), **A1+2 24G LaC** hat zusätzlich die Lambaréné-Mutation bei –954 (G→C).

Wie in Abbildung 15 gezeigt, haben die Konstrukte sehr unterschiedliche basale und stimulierte Aktivitäten. Trotzdem ergeben sich aufgrund der sehr hohen Streuung keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 9).

Es fällt der hohe basale Wert des Wildtyps auf, die basale Aktivität von **A1+2 24G** ist etwa 6mal, die von **A1+2 24G LaC** 1,4mal kleiner. Die Aktivität nach Stimulation 1 beim Wildtyp ist etwa 3mal so groß wie die der mutierten Plasmide.

Abbildung 15: Aktivität der Plasmide mit beiden Alu-Elementen basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2)

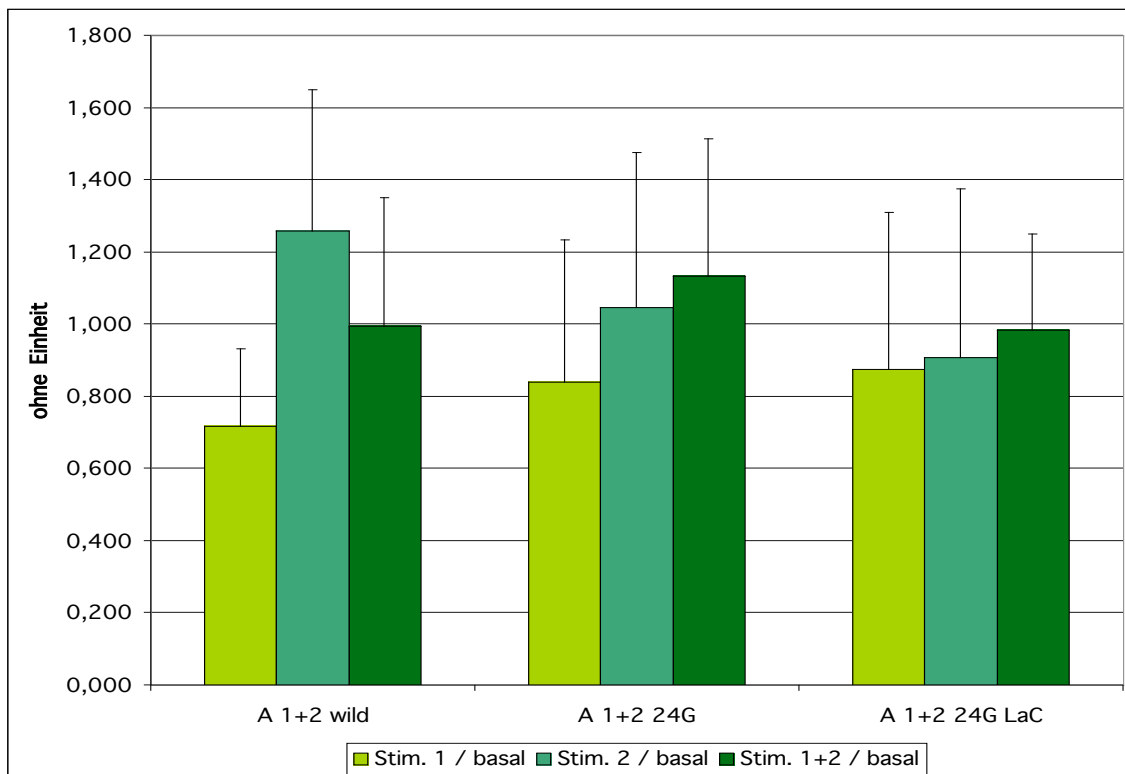


gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide: A1+2 wild -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert und –2446 C
 A1+2 24G -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert und –2446 G
 A1+2 24GLaC -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert, -2446 G und –954 C

Abbildung 15 lässt erwarten, für **A1+2 wild** und **A1+2 24G LaC** Stimulierbarkeits-Quotienten deutlich kleiner eins zu erhalten, da die basale Aktivität jeweils merklich höher ist als die stimulierte. Das bestätigt sich nicht: für alle drei Konstrukte errechnen sich Stimulierbarkeits-Werte um eins, die jedoch zu sehr streuen, um eindeutige Schlüsse zuzulassen (s. Abb. 16 und Tab. 12).

Abbildung 16: Stimulierbarkeit der Plasmide mit beiden Alu-Elementen



gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide: A1+2 wild -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert und -2446 C
 A1+2 24G -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G
 A1+2 24GLaC -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert, -2446 G und -954 C

Tabelle 13: Plasmide mit beiden Alu-Elementen: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2), Stimulierbarkeit als Quotient Stim./basal

	n	A 1+2	A 1+2 24G	A 1+2 24G LaC	p
basal	47	103 (124)	18 (77)	76 (85)	n. s.
Stim. 1	34	57 (88)	17 (93)	22 (47)	n. s.
Stim. 2	38	43 (159)	29 (59)	48 (79)	n. s.
Stim1+2/bas.	16	0,97 (0,71)	1,01 (0,76)	0,98 (0,53)	n. s.

Für basal, Stimulation 1 und Stimulation 2 ist der Median der Aktivität in relativen Lichteinheiten $\times 10^{-3}$, in Klammern der Interquartilabstand $\times 10^{-3}$ angegeben. Der Quotient Stim.1+2 /basal ist ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand. p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

Stimulation 1: 10 ng/ml LPS, 500 U/ml IFN γ

Stimulation 2: 250 U/ml IFN γ , 1000 U/ml TNF α , 100 U/ml IL1 β

Plasmide: A1+2 wild -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert und -2446 C
A1+2 24G -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G
A1+2 24GLaC -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert, -2446 G und -954 C

Tabelle 14: Vergleich der Stimulierbarkeit der Plasmide mit beiden Alu-Elementen mit Eins

		n	Median	Vergleichs-Wert	p
A 1+2 wild	Stim 1/bas.	5	0,72 (0,43)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	5	1,26 (0,78)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	6	1,00 (0,71)	1	n. s.
A 1+2 24G	Stim 1/bas.	3	0,84 (0,78)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	5	1,05 (0,86)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	5	1,14 (0,76)	1	n. s.
A 1+2 24G LaC	Stim 1/bas.	4	0,88 (0,87)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	5	0,91 (0,94)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	5	0,98 (0,53)	1	n. s.

Die Quotienten Stim 1/basal, Stim 2/ basal und Stim 1+2/basal sind ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand. p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet

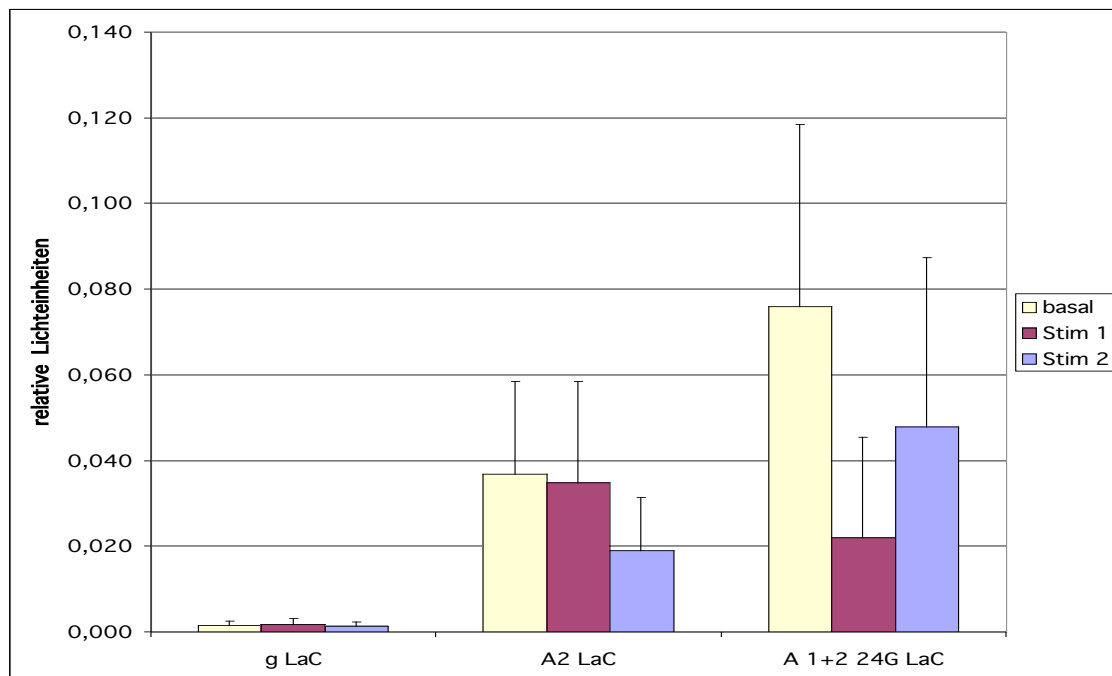
3.6 Plasmide mit der Lambaréné-Mutation

Die Lambaréné-Mutation (-954 G→C) ist in drei Konstrukten unterschiedlicher Länge enthalten: das große Plasmid **g LaC** hat ein (-5900/+100) Promotor-Insert, **A2 LaC** beinhaltet nur das zweite Alu-Element (-1212/-849), **A1+2 24G LaC** umfasst beide Alu-Elemente (-2566/-754) und ist zusätzlich bei -2446 mutiert (C→G).

Das große Plasmid **g LaC** hat eine wesentlich geringere basale und stimulierte Aktivität als beide kleineren Plasmide (s. Abb. 17 und Tab. 10).

Die basale Aktivität von **A1+2 24G LaC** ist 48mal, die von **A2 LaC** 23mal größer als die Aktivität von **g LaC** ($p < 0,0001$). Der Unterschied bei den stimulierten Aktivitäten hat den Faktor 19 (Stim 1) und 14 (Stim. 2) für **A2 LaC** und 12 (Stim 1) und 34 (Stim 2) für **A1+2 24G LaC**. Auch diese Unterschiede sind hochsignifikant ($p < 0,0001$).

Abbildung 17: Aktivität der Plasmide mit Lambaréné-Mutation basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2)

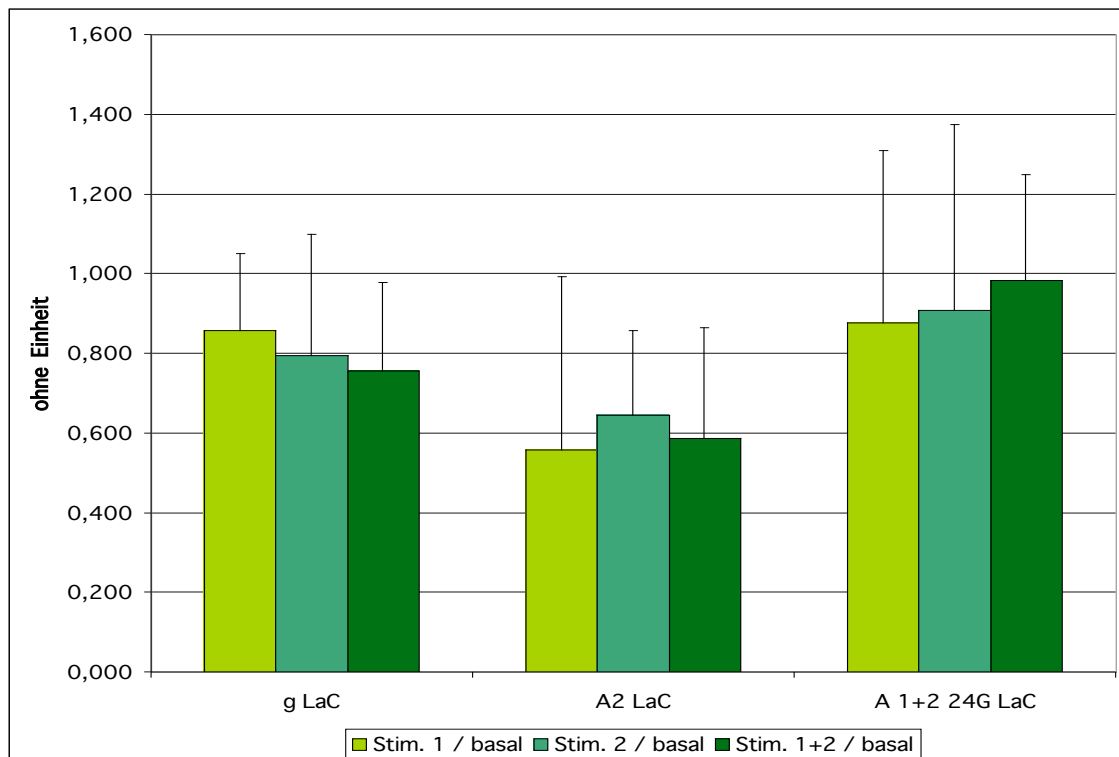


gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide: g LaC -5900/+100 iNOS-Promotor-Insert und -954 C
 A2 LaC -1212/-849 iNOS-Promotor-Insert und -954 C
 A1+2 24GLaC -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert, -2446 G und -954 C

Basale und stimulierte Aktivitäten der beiden kleineren Plasmide **A2 LaC** und **A1+2 24G LaC** unterscheiden sich statistisch nicht (s. Abb. 17 und Tab. 10). So ist die basale Aktivität von **A1+2 24G LaC** doppelt so hoch, die Aktivitäten nach Stimulation 1,6mal (Stim. 1) bzw. 2,5mal (Stim. 2) so hoch wie die von **A2 LaC**. Die Stimulierbarkeit aller drei Plasmide ist kleiner eins. Die Aktivität von **A2 LaC** fällt nach Stimulation am meisten (auf etwa 59%), während die von **A1+2 24G LaC** praktisch unverändert bleibt (98%). Dieser Unterschied ist jedoch, genauso wie die Unterschiede in der Stimulierbarkeit zwischen den kleineren Plasmiden und **g LaC**, statistisch nicht signifikant (s. Abb. 18 und Tab. 12).

Abbildung 18: Stimulierbarkeit der Plasmide mit Lambaréné-Mutation



gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide: g LaC -5900/+100 iNOS-Promotor-Insert und -954 C
A2 LaC -1212/-849 iNOS-Promotor-Insert und -954 C
A1+2 24GLaC -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert, -2446 G und -954 C

Tabelle 15: Vergleich der Stimulierbarkeit der Plasmide mit der Lambaréné-Mutation mit Eins

		n	Median	Vergleichs-Wert	p
A2 LaC	Stim 1/bas.	5	0,56 (0,87)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	5	0,64 (0,43)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	5	0,59 (0,56)	1	n. s.
A 1+2	Stim 1/bas.	4	0,88 (0,87)	1	n. s.
24G LaC	Stim 2/bas.	5	0,91 (0,94)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	5	0,98 (0,53)	1	n. s.
g LaC	Stim 1/bas.	5	0,86 (0,38)	1	n. s.
	Stim 2/bas.	5	0,80 (0,61)	1	n. s.
	Stim 1+2 /bas.	5	0,76 (0,44)	1	n. s.

Die Quotienten Stim 1/basal, Stim 2/ basal und Stim 1+2/basal sind ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand.

p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet

Plasmide: g LaC -5900/+100 iNOS-Promotor-Insert und -954 C
A2 LaC -1212/-849 iNOS-Promotor-Insert und -954 C
A1+2 24GLaC -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert, -2446 G und -954 C

Tabelle 16: Plasmide mit der Lambaréné-Mutation: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2), Stimulierbarkeit als Quotient Stimulation/basal

	n	g LaC	A2 LaC	p
basal	29	1,6 (2,1)	37(43)	<0,0001
Stimulation 1	31	1,8 (2,8)	35(47)	<0,0001
Stimulation 2	31	1,4 (1,9)	19(25)	<0,0001
Stim1+2 / basal	10	0,76 (0,44)	0,59 (0,56)	n. s.

	n	g LaC	A 1+2 24G LaC	p
basal	31	1,6 (2,1)	76 (85)	<0,0001
Stimulation 1	30	1,8 (2,8)	22 (47)	<0,0001
Stimulation 2	29	1,4 (1,9)	48 (79)	<0,0001
Stim1+2 / basal	10	0,76 (0,44)	0,98 (0,53)	n. s.

	n	A 1+2 24G LaC	A2 LaC	p
basal	33	76 (85)	37(43)	n. s.
Stimulation 1	25	22 (47)	35(47)	n. s.
Stimulation 2	28	48 (79)	19(25)	n. s.
Stim1+2 / basal	10	0,98 (0,53)	0,59(0,56)	n. s.

Für basal, Stimulation 1 und Stimulation 2 ist der Median der Aktivität in relativen Lichteinheiten $\times 10^{-3}$, in Klammern der Interquartilabstand $\times 10^{-3}$ angegeben.

Der Quotient Stim.1+2 /basal ist ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand.

p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

Stimulation 1: 10 ng/ml LPS, 500 U/ml IFN γ

Stimulation 2: 250 U/ml IFN γ , 1000 U/ml TNF α , 100 U/ml IL1 β

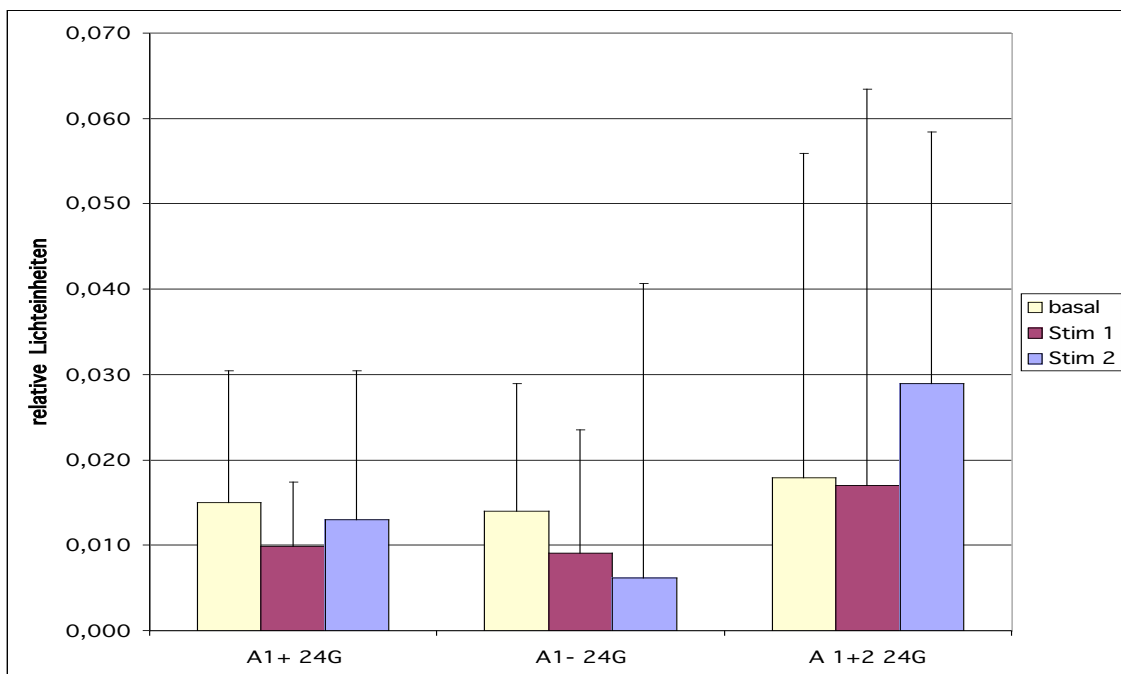
Plasmide: g LaC -5900/+100 iNOS-Promotor-Insert und -954 C
A2 LaC -1212/-849 iNOS-Promotor-Insert und -954 C
A1+2 24GLaC -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert, -2446 G und -954 C

3.7 Plasmide mit -2446 G

Drei Konstrukte unterschiedlicher Länge sind bei -2446 mutiert (C→G). Davon enthält **A1+2 24G** beide Alu-Elemente (-2566/-754), **A1- 24G** hat ein (-2566/-2230) Promotor-Insert, das das Alu-Element 1 umfasst, und **A1+ 24G** enthält zusätzlich zum ersten Alu-Element das daran anschließende CCTTT-Repeat (-2724/-2230).

Wie in Abbildung 19 zu sehen, haben alle drei Konstrukte ähnliche basale Aktivitäten. Nach Stimulation 1 ist die Aktivität von **A1+2 24G** im Vergleich zu beiden Alu-Element-1-Konstrukten um etwa den Faktor 1,8 erhöht. **A1+2 24G** hat auch die höchste Stimulation-2-Aktivität: sie ist 2,2mal höher als die von **A1+ 24G** und 4,7mal höher als die von **A1- 24G**, welches als einziges Plasmid nach Stimulation 2 eine kleinere Aktivität hat als nach Stimulation 1. Alle diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant (s. Tab. 11).

Abbildung 19: Aktivität der Plasmide mit -2446 G basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2)

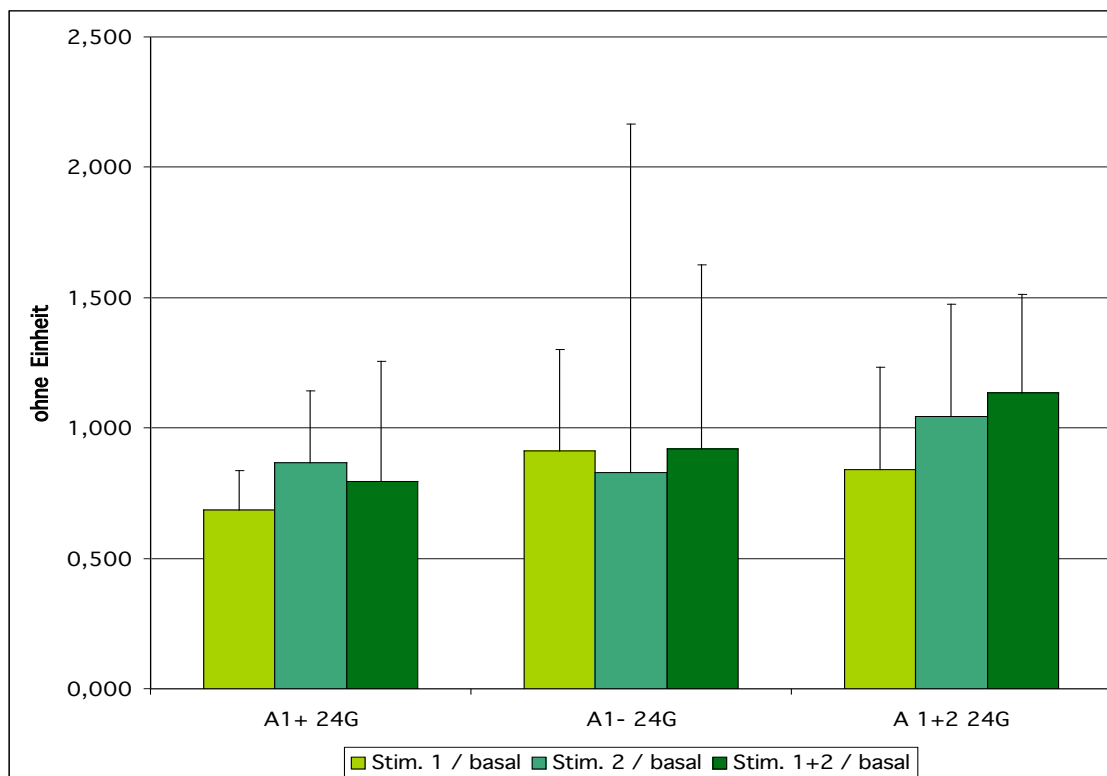


gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide:	A1+ 24G	-2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G
	A1- 24G	-2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G
	A1+2 24G	-2566/-754 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G

Die Stimulierbarkeit der drei Konstrukte unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant. Auch kann nicht sicher festgestellt werden, ob die Aktivität durch Stimulation stimuliert oder reprimiert wird (s. Abb. 20 und Tab. 12).

Abbildung 20: Stimulierbarkeit der Plasmide mit -2446 G



gezeigt sind Mediane und Interquartilabstände

Plasmide: A1+ 24G -2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G
A1- 24G -2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G
A1+2 24G -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G

Tabelle 17: Plasmide mit -2446 G: Aktivität basal und nach Stimulation mit LPS und IFN γ (Stim. 1) bzw. IFN γ , TNF α und IL1 β (Stim. 2), Stimulierbarkeit als Quotient Stimulation/basal

	n	A1+ 24G	A1- 24G	A 1+2 24G	p
basal	51	15 (31)	14 (30)	18 (77)	n. s.
Stimulation 1	48	9,9 (15)	9,1 (29)	17 (93)	n. s.
Stimulation 2	42	13 (35)	6,2 (69)	29 (59)	n. s.
Stim1+2 / basal	18	0,77 (0,51)	0,92 (1,41)	1,01 (0,76)	n. s.

Für basal, Stimulation 1 und Stimulation 2 ist der Median der Aktivität in relativen Lichteinheiten $\times 10^{-3}$, in Klammern der Interquartilabstand $\times 10^{-3}$ angegeben. Der Quotient Stim.1+2 /basal ist ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand. p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

Stimulation 1: 10 ng/ml LPS, 500 U/ml IFN γ

Stimulation 2: 250 U/ml IFN γ , 1000 U/ml TNF α , 100 U/ml IL1 β

Plasmide: A1+ 24G -2724/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G
A1- 24G -2566/-2230 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G
A1+2 24G -2566/-754 iNOS-Promotor-Insert und -2446 G

Tabelle 18: Vergleich der Stimulierbarkeit der Plasmide mit -2446 G mit Eins

	n	Median	Vergleichs-Wert	p
A1+ 24G Stim 1/bas.	6	0,69 (0,30)	1	n. s.
Stim 2/bas.	5	0,87 (0,55)	1	n. s.
Stim 1+2 /bas.	6	0,80 (0,92)	1	n. s.
A1- 24G Stim 1/bas.	7	0,91 (0,78)	1	n. s.
Stim 2/bas.	6	0,83 (2,68)	1	n. s.
Stim 1+2 /bas.	7	0,92 (1,41)	1	n. s.
A 1+2 24G Stim 1/bas.	3	0,84 (0,78)	1	n. s.
Stim 2/bas.	5	1,05 (0,86)	1	n. s.
Stim 1+2 /bas.	5	1,14 (0,76)	1	n. s.

Die Quotienten Stim 1/basal, Stim 2/ basal und Stim 1+2/basal sind ohne Einheit, angegeben sind Median und in Klammern der Interquartilabstand. p wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet

4 Diskussion

4.1 Einfluss der Promotor-Abschnitte auf die Promotor-Aktivität

Die Transkription des iNOS-Gens wird durch vielfältige Mechanismen und viele verschiedene Kontrollregionen des 16 kb-Promotors reguliert.

Mehrere Studien zeigten, dass die Region oberhalb von -4 kb die Zytokin-Induzierbarkeit vermittelt, wobei vor allem verschiedene NF- κ B-Bindungsstellen beteiligt zu sein scheinen, während der proximale Promotor nur basale Aktivität hat und durch Zytokine nicht stimuliert wird (Taylor et al., 1998; de Vera et al., 1996). Dagegen identifizierten Nunokawa et al. eine NF- κ B-Bindungsstelle bei $-0,1$ kb, die nach Stimulation die Promotoraktivität verdoppelt. Zu diesem Effekt reichten die proximalen 400 bp des Promotors aus (Nunokawa et al., 1996).

Die in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte enthalten alle ausschließlich Fragmente des proximalen Promotors. Aufgrund der oben genannten Ergebnisse ließ sich nun erwarten, dass die Stimulierbarkeit der Plasmide klein ist. Dies wurde bestätigt. Vor allem die kleinen Plasmide, die Promotorabschnitte zwischen $-2,7$ kb und $-0,8$ kb enthalten, wurden durch Zytokine nicht stimuliert, sondern zum Teil reprimiert. Einzig das Wildtyp-Plasmid mit den proximalen -6 kb des Promotors, das als einziges Wildtyp-Konstrukt die NF- κ B-Bindungsstelle bei $-0,1$ kb enthält, zeigte nach Stimulation eine leichte Induktion. Das Konstrukt ist signifikant 1,5mal besser stimulierbar als die Wildtyp-Plasmide mit Alu-Element 1 (A1+ wild und A1- wild), und dass zur Stimulierbarkeit von A2 wild, dem Alu-Element 2-Konstrukt, kein Unterschied belegt werden kann, liegt der Tendenz nach eher an einer zu großen Streuung der Messwerte als am fehlenden Unterschied. Leider lässt sich nicht signifikant zeigen, dass das 6 kb-Konstrukt g wild tatsächlich induziert wird, und nicht nur nicht reprimiert. Im Hinblick auf die bisher publizierten Ergebnisse anderer Gruppen liegt diese Auffassung jedoch nahe.

Die kleineren Plasmide, die in dieser Arbeit untersucht wurden, enthalten, wie schon erwähnt, Promotorabschnitte zwischen $-2,7$ kb und $-0,8$ kb. Es

liegen vier kleine Wildtyp-Konstrukte vor: A1+2 trägt ein Promotor-Insert von -2,5 bis -0,8 kb, das zwei Alu-Elemente enthält. A2 wild beinhaltet nur das Alu-Element 2 von -1,2 bis -0,8 kb, während A1+ wild und A1- wild beide das Alu-Element 1 von -2,5 bis -2,2 kb umfassen. A1+ wild trägt zusätzlich und als einziges Plasmid das CCTTT-Repeat, das upstream an das Alu-Element 1 anschließt.

Beim Vergleich dieser kleinen Plasmide zeigte sich, dass sich die Stimulierbarkeit aller genannten Konstrukte nicht unterscheidet. Alle Konstrukte werden von Zytokinen reprimiert. Die Repression durch IFN γ und LPS bei den Konstrukten mit Alu-Element 1 ist signifikant. Einzig A1+2 wild fällt aus der Reihe: allerdings lassen die großen Schwankungen in den Messwerten Zweifel an der Zuverlässigkeit der Ergebnisse bei diesem Plasmid aufkommen – die Streuung der Werte ist auffällig größer als bei allen anderen untersuchten Konstrukten. Soweit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Abschnitt zwischen -2,7 und -0,8 kb nicht nur keine Zytokin-Induzierbarkeit vermittelt, was den bisherigen Forschungsstand bestätigen würde, sondern im Gegenteil einen Repressor trägt. Dieser Repressor müsste zwischen -2,5 und -2,2 kb liegen, im Bereich von Alu-Element 1. In diesem Zusammenhang verwundert allerdings, dass das Konstrukt mit dem Alu-Element 2 ähnlich niedrige Stimulierbarkeits-Werte hat wie A1+ wild und A1- wild, die allerdings nicht signifikant kleiner sind. Hier könnte ein weiterer Repressor vermutet werden, der aufgrund zu kleiner Versuchszahlen nicht belegt werden konnte. Auf jeden Fall aber sind weitere Untersuchungen notwendig, bevor definitive Aussagen zur Funktion dieses Promotorabschnitts in der Regulation der iNOS durch Zytokine gemacht werden können.

Betrachtet man die basalen und stimulierten Werte der kleinen Plasmide, fällt vor allem das Plasmid A1+ wild auf, das signifikant niedrigere Aktivitätslevel hat als die drei anderen Konstrukte. Das könnte auf das in diesem Plasmid enthaltene CCTTT-Repeat zurückzuführen sein, welches im Kapitel 4.2 ausführlicher diskutiert wird.

Beim Vergleich der kleinen Wildtyp-Plasmide mit dem 6 kb-Plasmid g wild zeigt sich nun, dass, obwohl g wild sich besser stimulieren lässt, die basalen und

stimulierten Aktivitätslevel dieses Plasmids hochsignifikant und wesentlich (Faktor 3,6 bis 80) unter dem der kleineren Plasmide liegt. Um diese Tatsache zu erklären, muss entweder von Zytokin-unabhängigen Aktivatoren in beiden Alu-Elementen ausgegangen werden, oder das 6 kb-Plasmid enthält außerhalb der Region von $-2,7$ bis $-0,8$ kb einen Zytokin-unabhängigen Repressor.

Als Repressor in diesem Promotorabschnitt wurden bisher eine Aktivatorprotein-1-Sequenz zwischen -351 und -632 identifiziert (Pance et al., 2002), deren Deletion jedoch die Zytokin-induzierte Aktivität erhöht und die deshalb nicht zu den Ergebnissen dieser Arbeit passt.

Des Weiteren fanden Morris et al. einen Polymorphismus bei $-0,7$ kb: die Deletion von 4 bp vermindert die Promotoraktivität um den Faktor 25 und verhindert die Zytokin-Induktion in einem ($-1090/+105$) Promotor-Konstrukt (Morris et al., 2002). Allerdings sind im Konstrukt g wild diese 4 bp nicht deletiert – mit diesem Polymorphismus kann die niedrige Promotoraktivität nicht erklärt werden.

4.2 Einfluss des CCTTT-Repeats und der Mutation bei -2446 C \rightarrow G auf die Promotor-Aktivität

Die Rolle des CCTTT-Repeats bei Malaria wird diskutiert: Ohashi et al. fanden in einer thailändischen Population eine Assoziation von langen CCTTT-Repeats mit schwerer Malaria; als individueller Risikofaktor für schwere Malaria wurde eine hohe Anzahl der Repeat-Wiederholungen auf beiden Chromosomen identifiziert (Ohashi et al., 2002). Im Gegensatz dazu zeigten Burgner et al., dass Individuen mit kurzen Repeat-Wiederholungen auf beiden Chromosomen ein höheres Risiko für fatale zerebrale Malaria haben (Burgner et al., 1998), während bei einer Studie in Tansania und Kenia kein Zusammenhang des Repeats mit Malariaverläufen gefunden wurde (Hobbs et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Wildtyp-Konstrukte verglichen, von denen eines ein Insert mit dem CCTTT-Repeat mit 14 Wiederholungen und die daran downstream anschließenden 340 Basenpaare (Alu-Element 1) enthält (A1+ wild), das andere umfasst nur den 340 bp-Promotorabschnitt ohne das Repeat (A1- wild). Dabei zeigte sich, dass die Anwesenheit des Repeats die

Promotoraktivität signifikant erniedrigt, und dass diese Erniedrigung unabhängig von der Stimulation ist. Beide Konstrukte werden durch die Stimulation in gleichem Maße signifikant reprimiert. Der Einfluss des CCTTT-Repeats stellt sich hier als der eines Zytokin-unabhängigen Repressors dar.

Dem widersprechen die Ergebnisse von Warpeha et al., die in einem Luziferase-Konstrukt eine durch das CCTTT-Repeat vermittelte Aktivitätserhöhung auf das bis zu 4fache und eine erhöhte Stimulierbarkeit dieser Konstrukte durch IL1 β fanden (Warpeha et al., 1999).

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit zwei Plasmide verglichen, die den oben erwähnten bis auf eine Mutation bei -2446 (C→G) entsprechen (A1- 24G und A1+ 24G). Überraschenderweise verschwindet der Effekt des CCTTT-Repeats unter dem Einfluss dieser Mutation: die Promotor-Aktivität der beiden Konstrukte unterscheidet sich nicht. Vom Aktivitätsniveau her liegen die mutierten Konstrukte zwischen dem Wildtyp mit und dem Wildtyp ohne Repeat, ohne sich vom einen oder vom anderen statistisch zu unterscheiden. So kann nicht beurteilt werden, ob die Mutation eine Stimulation oder eine Unterdrückung aufhebt oder induziert. Allerdings streuen die Messwerte der mutierten Plasmide auffällig weiter als die der Wildtypen, was die Zuverlässigkeit dieser Aussagen in Frage stellt.

Vergleicht man Konstrukte, die bei -2446 mutiert sind, mit den Wildtyp-Konstrukten mit jeweils gleichem Promotorabschnitt, erhält man keine signifikanten Unterschiede – die Mutation hat nur im Zusammenhang mit dem CCTTT-Repeat Einfluss auf die Promotor-Aktivität.

4.3 Einfluss der Lambaréné-Mutation (-954 G→C) auf die Promotor-Aktivität

Ob die Lambaréné-Mutation bei ihren Trägern eine Auswirkung auf den Verlauf von Malaria hat, ist nicht endgültig geklärt: während Levesque et al. keinen Zusammenhang zwischen der Mutation und NO-Produktion oder Krankheitsschwere fanden (Levesque et al., 1999), war sie Gabun mit leichten Malaria-Verläufen assoziiert (Kun et al., 1998). Ex vivo-Experimente zeigten,

dass Träger von iNOS^{Lambaréné} eine erhöhte NO-Basalaktivität haben, die sich durch Zytokine nicht mehr weiter erhöhen lässt (Kun et al., 2001).

Dieses letzte Ergebnis konnte in dieser Arbeit so nicht bestätigt werden. Versuche mit zwei Plasmiden mit (-5900/+100)-Promotor-Inserts, von denen eines die Lambaréné-Mutation trägt, zeigten, dass die basale Aktivität durch die Mutation nicht verändert wurde. Beim Vergleich der stimulierten Werte für sich fand sich ebenfalls kein Unterschied.

Vergleicht man jedoch die Stimulierbarkeit der beiden Plasmide als Quotient der stimulierten Messergebnisse durch die basalen, lässt sich feststellen, dass die Stimulierbarkeit des Wildtyp-Konstrukts 1,5mal höher ist als die des Plasmids mit Lambaréné-Mutation – die Mutation verhindert die Aktivitätssteigerung als Reaktion auf Zytokine, was soweit mit den Ergebnissen von Kun et al. übereinstimmt (Kun et al., 2001). Ob die Lambaréné-Mutation dabei die in Kapitel 4.1 genannte NF- κ B-Bindungsstelle bei -0,1 kb beeinflusst, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

Die Lambaréné-Mutation wurde außer in den bereits genannten großen Plasmiden in Konstrukten mit einem kleineren (-1212/-849) Promotor-Insert untersucht. Diese Plasmide umfassen das Alu-Element 2, eines davon als Wildtyp. Zwei weitere tragen je eine Mutation – die Lambaréné-Mutation bzw. die Mutation bei -1026 (T→G). Schließlich hat ein Plasmid beide Mutationen. Diese vier Plasmide unterscheiden sich statistisch nicht – weder in der basalen oder stimulierten Aktivität noch in der Stimulierbarkeit. Es lassen sich jedoch interessante Tendenzen beobachten: alle vier Plasmide haben ähnliche basale Aktivitäten, und während sich diese bei den Konstrukten mit Lambaréné-Mutation nach Stimulation mit IFN γ und LPS (Stimulation 1) praktisch nicht verändern, wurde die Aktivität vom Wildtyp und dem Konstrukt mit -1026 T→G allein vermindert. Dazu muss gesagt werden, dass die Messwerte dieser vier Plasmide stark streuten, so dass durch umfangreichere Versuche eventuell ein eindeutigeres Ergebnis erhalten werden kann.

4.4 Einfluss der Mutation bei -1026 T→G auf die Promotor-Aktivität

Die Mutation bei -1026 T→G wurde in den bereits in Kapitel 4.3 erwähnten kleinen Plasmiden mit (-1212/-849) Promotor-Insert untersucht. Es liegen zwei an dieser Stelle mutierte Konstrukte vor, eines davon trägt zusätzlich die Lambaréné-Mutation. Beim Vergleich dieser Plasmide untereinander oder mit dem gleich langen Wildtyp konnten keine signifikanten Aktivitäts-Unterschiede festgestellt werden. Die Mutation bei -1026 scheint keinen Einfluss auf die Promotor-Aktivität zu haben, zumindest nicht in dem untersuchten 360 bp-Fragment. Allerdings könnte auch hier die für die Streuung zu kleine Versuchszahl verhindert haben, dass Unterschiede manifest werden.

4.5 Schlussfolgerung

Diese Arbeit stützt die Annahme, dass die Lambaréné-Mutation die Stimulierbarkeit des iNOS-Promotors herabsetzt. Die von Kun et al. gefundene Erhöhung der Basalaktivität durch die Lambaréné-Mutation konnte jedoch nicht bestätigt werden (Kun et al., 2001).

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Wildtyp-Konstrukte mit Alu-Element 1 durch IFN γ und LPS reprimiert werden und dass das CCTTT-Repeat als Zytokin-unabhängiger Repressor wirkt.

Einige der untersuchten Plasmide brachten keine signifikanten Ergebnisse. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die betroffenen Promotorabschnitte nicht zur Regulation der iNOS beitragen. Andererseits fällt bei den Plasmiden mit Alu-Element 2 bzw. mit beiden Alu-Elementen eine sehr hohe Schwankung der Messwerte auf. Hier könnten eventuell größere Versuchsreihen zu eindeutigen Ergebnissen führen.

5 Zusammenfassung

Malaria ist eine parasitäre Infektionskrankheit, die durch verschiedene Arten von Plasmodien ausgelöst wird. Dabei hat *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, den größten Stellenwert: er verursacht die meisten Krankheitsfälle und die schwersten Verlaufsformen

Die Immunreaktion bei Malaria stützt sich auf zelluläre und humorale, spezifische und unspezifische Mechanismen. In verschiedenen klinischen Studien und in vitro konnte gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid bei der Abwehr von Malaria eine wichtige Rolle spielt und zur Pathologie der Erkrankung beiträgt. Stickstoffmonoxid wird von der induzierbaren NO-Synthase gebildet.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss mehrerer Polymorphismen im Promotor der iNOS auf die Promotoraktivität untersucht werden. Dazu wurden mehrere Plasmide konstruiert, die Abschnitte verschiedener Länge und mit verschiedenen Mutationen aus den proximalen 6 kb des iNOS-Promotors enthalten, darunter die Lambaréné-Mutation (-954 G→C) und das CCTTT-Repeat bei -2,5 kb. Diese Plasmide wurden in eine menschliche Lungenzelllinie transfiziert und mit $\text{IFN}\gamma$, LPS, $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL1}\beta$ stimuliert. Mittels eines Luziferase-Assays wurde die Aktivität der Promotorabschnitte gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp eines 6 kb-Promotorkonstruktes 1,5mal besser stimuliert werden kann als der gleiche Abschnitt mit Lambaréné-Mutation. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Studien. Eine erhöhte Basalaktivität durch die Lambaréné-Mutation konnte nicht gefunden werden.

Die Konstrukte mit einem 6 kb-Promotorinsert zeigten eine wesentlich geringere basale und stimulierte Aktivität als alle anderen Plasmide mit kleineren Promotorfragmenten.

6 Literatur

Änggård, E. (1994)

Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine.

Lancet, 343, 1199-1206

Anstey, N. M., Weinberg, J. B., Hassanali, M. Y., Mwaikambo, E. D., Manyenga, D., Misukonis, M. A., Arnelle, D. R., Hollis, D., McDonald, M. I., Granger, D. L. (1996)

Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression.

J. Exp. Med., 184, 557-67

Anstey, N. M., Weinberg, J. B., Wang, Z., Mwaikambo, E. D., Duffy, P. E., Granger, D. L. (1999)

Effects of age and parasitemia on nitric oxide production/leukocyte nitric oxide synthase type 2 expression in asymptomatic, malaria-exposed children.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 61, 253-8

Balmer, P., Phillips, H. M., Maestre, A. E., McMonagle, F. A., Phillips, R. S. (2000)

The effect of nitric oxide on the growth of Plasmodium falciparum, P. chabaudi and P. berghei in vitro.

Parasite Immunol., 22, 97-106

Beck, K. F., Eberhardt, W., Frank, S., Huwiler, A., Meßmer, U. K., Mühl, H., Pfeilschifter, J. (1999)

Inducible NO Synthase: Role in Cellular Signalling.

J. Exp. Biol., 202, 645-652

Brown, G. C. (1999)

Nitric oxide and mitochondrial respiration.

Biochim. Biophys. Acta, 1411, 351-69

Burgner, D., Xu, W., Rockett, K., Gravenor, M., Charles, I. G., Hill, A. V., Kwiatkowski, D. (1998)

Inducible nitric oxide synthase polymorphism and fatal cerebral malaria

Lancet, 352, 1193-1194

- Chiwakata, C. B., Hemmer, C. J., Dietrich, M. (2000)
High levels of inducible nitric oxide synthase mRNA are associated with increased monocyte counts in blood and have a beneficial role in *Plasmodium falciparum* malaria.
Infect. Immun., 68, 394-9
- Clark, I. A., al Yaman, F. M., Jacobson, L. S. (1997)
The biological basis of malarial disease.
Int. J. Parasitol., 27, 1237-49
- de Vera, M. E., Shapiro, R. A., Nussler, A. K., Mudgett, J. S., Simmons, R. L., Morris, S. M. Jr., Billiar, T. R., Geller, D. A. (1996)
Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1054-9
- Dodoo, D., Omer, F. M., Todd, J., Akanmori, B. D., Koram, K. A., Riley, E. M. (2002)
Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria.
J. Infect. Dis., 185, 971-9
- Dondorp, A. M., Planche, T., de Bel, E. E., Angus, B. J., Chotivanich, K. T., Silamut, K., Romijn, J. A., Ruangveerayuth, R., Hoek, F. J., Kager, P. A., Vreeken, J., White, N. J. (1998)
Nitric oxides in plasma, urine, and cerebrospinal fluid in patients with severe *falciparum* malaria.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 59, 497-502
- Feng, X., Guo, Z., Nourbakhsh, M., Hauser, H., Ganster, R., Shao, L., Geller, D. A. (2002)
Identification of a negative response element in the human inducible nitric-oxide synthase (iNOS) promoter: The role of NF-kappa B-repressing factor (NRF) in basal repression of the iNOS gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 99, 14212-7
- Foo, L. C., Rekhraj, V., Chiang, G. L., Mak, J. W. (1992)
Ovalocytosis protects against severe malaria parasitemia in the Malayan aborigines.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 47, 271-5
- Ganster, R. W., Taylor, B. S., Shao, L., Geller, D. A. (2001)
Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 638-43
- Good, M. F., Doolan, D. L. (1999)
Immune effector mechanisms in malaria.
Curr. Opin. Immunol., 11, 412-9

Greenwood, B., Mutabingwa, T. (2002)
Malaria in 2002.
Nature, 415, 670-672

Hobbs, M. R., Udhayakumar, V., Levesque, M. C., Booth, J., Roberts, J. M., Tkachuk, A. N., Pole, A., Coon, H., Kariuki, S., Nahlen, B. L., Mwaikambo, E. D., Lal, A. L., Granger, D. L., Anstey, N. M., Weinberg, J. B. (2002)
A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children.
Lancet, 360, 1468-75

Hviid, L., Kurtzhals, J. A., Goka, B. Q., Oliver-Commey, J. O., Nkrumah, F. K., Theander, T. G. (1997)
Rapid reemergence of T cells into peripheral circulation following treatment of severe and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria.
Infect. Immun., 65, 4090-3

Kremsner, P. G., Winkler, S., Wildling, E., Prada, J., Bienzle, U., Graninger, W., Nussler, A. K. (1996)
High plasma levels of nitrogen oxides are associated with severe disease and correlate with rapid parasitological and clinical cure in Plasmodium falciparum malaria.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 90, 44-7

Kumaratilake, L. M., Ferrante, A., Rzepczyk, C. M. (1990)
Tumor necrosis factor enhances neutrophil-mediated killing of Plasmodium falciparum.
Infect. Immun., 58, 788-93

Kun, J. F., Mordmüller, B., Lell, B., Lehman, L. G., Luckner, D., Kremsner, P. G. (1998)
Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria.
Lancet, 351, 265-6

Kun, J. F., Mordmüller, B., Perkins, D. J., May, J., Mercereau-Puijalon, O., Alpers, M., Weinberg, J. B., Kremsner, P. G. (2001)
Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria.
J. Infect. Dis., 184, 330-6

Lell, B., May, J., Schmidt-Ott, R. J., Lehman, L. G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Schmid, D., Herbich, K., Mockenhaupt, F. P., Meyer, C. G., Bienzle, U., Kremsner, P. G. (1999)
The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria.
Clin. Infect. Dis., 28, 794-9

Levesque, M. C., Hobbs, M. R., Anstey, N. M., Vaughn, T. N., Chancellor, J. A., Pole, A., Perkins, D. J., Misukonis, M. A., Chanock, S. J., Granger, D. L., Weinberg, J. B. (1999)

Nitric oxide synthase type 2 promoter polymorphisms, nitric oxide production, and disease severity in Tanzanian children with malaria.

J. Infect. Dis., 180, 1994-2002

Liaudet, L., Soriano, F. G., Szabó, C. (2000)

Biology of nitric oxide signaling.

Crit. Care Med., 28, N37-N52

Luty, A. J., Lell, B., Schmidt-Ott, R., Lehman, L. G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Herbich, K., Schmid, D., Ulbert, S., Migot-Nabias, F., Dubois, B., Deloron, P., Kremsner, P. G. (1998)

Parasite antigen-specific interleukin-10 and antibody responses predict accelerated parasite clearance in Plasmodium falciparum malaria.

Eur. Cytokine Netw., 9, 639-46

Luty, A. J., Lell, B., Schmidt-Ott, R., Lehman, L. G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Herbich, K., Schmid, D., Migot-Nabias, F., Deloron, P., Nussenzweig, R. S., Kremsner, P. G. (1999)

Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with Plasmodium falciparum in young African children.

J. Infect. Dis., 179, 980-8

Luty, A. J., Perkins, D. J., Lell, B., Schmidt-Ott, R., Lehman, L. G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Herbich, K., Schmid, D., Weinberg, J. B., Kremsner, P. G. (2000)

Low interleukin-12 activity in severe Plasmodium falciparum malaria.

Infect. Immun., 68, 3909-15

Maneerat, Y., Viriyavejakul, P., Punpoowong, B., Jones, M., Wilairatana, P., Pongponratn, E., Turner, G. D., Udomsangpetch, R. (2000)

Inducible nitric oxide synthase expression is increased in the brain in fatal cerebral malaria.

Histopathology, 37, 269-77

Marks-Konczalik, J., Chu, S. C., Moss, J. (1998)

Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites.

J. Biol. Chem., 273, 22201-8

Marsh, K., Forster, D., Waruiru, C., Mwangi, I., Winstanley, M., Marsh, V., Newton, C., Winstanley, P., Warn, P., Peshu, N., Pasvol, G., Snow, R. W. (1995)

Indicators of life-threatening malaria in African children.

N. Engl. J. Med., 332, 1399-404

Matsumura, M., Kakishita, H., Suzuki, M., Banba, N., Hattori, Y. (2001)
Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by inhibiting NF-kappaB in
vascular smooth muscle cells.
Life. Sci., 69, 1067-77

Moncada, S., Higgs, A., Furchgott, R. (1997)
XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide
Research.
Pharmacological Reviews, 49, 137-142

Morris, B. J., Markus, A., Glenn, C. L., Adams, D. J., Colagiuri, S., Wang, L.
(2002)
Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with
complications in type 2 diabetes.
J. Mol. Med., 80, 96-104

Mullis, K., Falcoona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986)
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaktion.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 51, 263-273

Nathan, C. (1992)
Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.
FASEB J., 6, 3051-3064

Nunokawa, Y., Oikawa, S., Tanaka, S. (1996)
Human inducible nitric oxide synthase gene is transcriptionally regulated by
nuclear factor-kappaB dependent mechanism.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 223, 347-52

Nunokawa, Y., Oikawa, S., Tanaka, S. (1997)
Expression of Human Inducible Nitric Oxide Synthase Is Regulated by both
Promoter and 3'-Regions.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 233, 523-526

Ofori, M. F., Doodoo, D., Staalsoe, T., Kurtzhals, J. A., Koram, K., Theander, T.
G., Akanmori, B. D., Hviid, L. (2002)
Malaria-induced acquisition of antibodies to Plasmodium falciparum variant
surface antigens.
Infect. Immun., 70, 2982-8

Ohashi, J., Naka, I., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Looareesuwan, S.,
Tokunaga, K. (2002)
Significant association of longer forms of CCTTT Microsatellite repeat in the
inducible nitric oxide synthase promoter with severe malaria in Thailand.
J. Infect. Dis., 186, 578-81

- Pance, A., Chantome, A., Reveneau, S., Bentrari, F., Jeannin, J. F. (2002)
A repressor in the proximal human inducible nitric oxide synthase promoter modulates transcriptional activation.
FASEB J., 16, 631-3
- Perkins, D. J., Kremsner, P. G., Schmid, D., Misukonis, M. A., Kelly, M. A., Weinberg, J. B. (1999)
Blood mononuclear cell nitric oxide production and plasma cytokine levels in healthy gabonese children with prior mild or severe malaria.
Infect. Immun., 67, 4977-81
- Persidis, A. (2000)
Malaria.
Nature Biotechnology, 18, 111-112
- Rockett, K. A., Awburn, M. M., Cowden, W. B., Clark, I. A. (1991)
Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives.
Infect. Immun., 59, 3280-3
- Sabchareon, A., Burnouf, T., Ouattara, D., Attanath, P., Bouharoun-Tayoun, H., Chantavanich, P., Foucault, C., Chongsuphajaisiddhi, T., Druilhe, P. (1991)
Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 45, 297-308
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467
- Snow, R. W., Omumbo, J. A., Lowe, B., Molyneux, C. S., Obiero, J. O., Palmer, A., Weber, M. W., Pinder, M., Nahlen, B., Obonyo, C., Newbold, C., Gupta, S., Marsh, K. (1997)
Relation between severe malaria morbidity in children and level of Plasmodium falciparum transmission in Africa.
Lancet, 349, 1650-4
- Stamler, J. S., Singel, D. J., Loscalzo, J. (1992)
Biochemistry of Nitric Oxide and Its Redox-Activated Forms.
Science, 258, 1898-1902
- Suschek, C. V., Bruch-Gerharz, D., Kleinert, H., Forstermann, U., Kolb-Bachofen, V. (2001)
Ultraviolet A1 radiation induces nitric oxide synthase-2 expression in human skin endothelial cells in the absence of proinflammatory cytokines.
J. Invest. Dermatol., 117, 1200-5

Taylor, A. M., Day, N. P., Sinh, D. X., Loc, P. P., Mai, T. T., Chau, T. T., Phu, N. H., Hien, T. T., White, N. J. (1998)
Reactive nitrogen intermediates and outcome in severe adult malaria.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 92, 170-5

Taylor, B. S., de Vera, M. E., Ganster, R. W., Wang, Q., Shapiro, R. A., Morris, S. M. Jr., Billiar, T. R., Geller, D. A. (1998)
Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene.
J. Biol. Chem., 273, 15148-56

Taylor-Robinson, A. W. (1995)
Regulation of Immunity to Malaria: Valuable Lessons Learned from Murine Models.
Parasitol. Today. 11, 334-342

Torre, D., Speranza, F., Giola, M., Matteelli, A., Tambini, R., Biondi, G. (2002)
Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated Plasmodium falciparum malaria.
Clin. Diagn. Lab. Immunol., 9, 348-51

Waller, D., Krishna, S., Crawley, J., Miller, K., Nosten, F., Chapman, D., ter Kuile, F. O., Craddock, C., Berry, C., Holloway, P. A., Brewster, D., Greenwood, B. M., White, N. J. (1995)
Clinical features and outcome of severe malaria in Gambian children.
Clin. Infect. Dis., 21, 577-87

Wang, Y., Marsden, P. A. (1995)
Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation.
Curr. Opin.Nephrol. Hypertens., 4, 12-22

Warpeha, K. M., Xu, W., Liu, L., Charles, I. G., Patterson, C. C., Ah-Fat, F., Harding, S., Hart, P. M., Chakravarthy, U., Hughes, A. E. (1999)
Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT)(n) repeat of NOS2A in diabetic retinopathy.
FASEB J., 13, 1825-32

Weiss, G., Werner-Felmayer, G., Werner, E. R., Grunewald, K., Wachter, H., Hentze, M. W. (1994)
Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription.
J. Exp. Med., 180, 969-76

Winkler, S., Willheim, M., Baier, K., Schmid, D., Aichelburg, A., Graninger, W., Kreamsner, P. G. (1998)
Reciprocal regulation of Th1- and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in Plasmodium falciparum malaria.
Infect. Immun., 66, 6040-4

Winstanley, P. (2001)
Modern chemotherapeutic options for malaria.
Lancet Infect. Dis., 1, 242-50

World Health Organisation (1997)
World malaria situation in 1994, Part I.
Weekly Epidemiological Record, 72, 269-276

Danksagung

Ich danke

Herrn Professor Dr. Peter G. Kremsner für die freundliche Überlassung des Themas und für motivierende Anstöße,

Jürgen Kun für die hervorragende Mitbetreuung und seine ständige Bereitschaft Fragen zu beantworten, Probleme zu diskutieren und mir aus Sackgassen zu helfen,

allen Laborkolleginnen und –kollegen für ihre Hilfsbereitschaft und für den Spaß an der Zusammenarbeit,

Simone Jüliger für alle Tricks bei der Arbeit mit Zellkulturen und für bereitwilliges Zell-sitting,

Steffen Borrmann für den Statistik-Unterricht,

Andrea Weierich und Maik Mörmann für die gute Bench-Nachbarschaft und für den einen oder anderen Tipp,

Ann-Catrin Uhlemann für die Einführung in die PCR und den Luziferase-Assay,

Andrea Weierich und Silvelia Grummes für das Sequenzieren,

dem Institut für Humangenetik für die Mitbenutzung des Luminometers und

Kirk Rockett von der University of Oxford für die Überlassung von 3 Plasmiden.