

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus der Abteilung der Molekularen Medizin des
Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin
Prof. Dr. Rolf Horstmann

**Genetische Varianten von *CD14* und deren Einfluss auf die
Empfänglichkeit für Lungentuberkulose bei einer
Studienpopulation aus Ghana, Westafrika**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Elena Terhalle
aus Ostercappeln

Hamburg 2014

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
am: 3. Dezember 2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Christian G. Meyer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Holger Rohde

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Jan van Lunzen

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Tuberkulose	1
1.1.1 Epidemiologie der Tuberkulose.....	1
1.1.2 Mikrobiologie der Tuberkulose-Bakterien	2
1.1.3 Infektionsweg und Pathogenese	4
1.1.4 Klinik.....	5
1.1.5 Diagnostik	6
1.1.6 Therapie	8
1.1.7 Immunologie der Tuberkulose.....	8
1.1.8 Genetische Empfänglichkeit für Tuberkulose	12
1.2 CD14	15
1.2.1 <i>Monocyte Differentiation Antigen CD14</i>	15
1.2.2 CD14-Molekül	16
1.2.3 Funktion von CD14.....	18
1.2.4 CD14 und Immunität gegenüber <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
1.2.5 Genetische Varianten von <i>CD14</i> und deren Empfänglichkeit für Tuberkulose	22
1.3 Fragestellung	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Studienpopulation	25
2.1.2 Mykobakterielle Genotypen.....	27
2.1.3 Chemikalien, Biochemikalien und Reagenzien	28
2.1.4 Reagenziensysteme.....	29
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	30
2.1.6 Puffer und Lösungen.....	30
2.1.7 Geräte	31
2.1.8 Oligonukleotide	32

2.1.9 Elektronische Datenbanken und Datenverarbeitungsprogramme.....	33
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 DNA-Isolierung.....	34
2.2.2 Phi-Amplifizierung	35
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion	35
2.2.4 Sequenzierreaktion nach der Kettenabbruchmethode	36
2.2.5 Aufreinigung der Produkte der Sequenzierreaktion.....	37
2.2.6 Sequenzanalyse.....	37
2.2.7 Entwurf der Oligonukleotide für die Genotypisierung mittels <i>High-Resolution-Melting</i> (HRM)	38
2.2.8 Genotypisierung mittels <i>High-Resolution-Melting</i> (HRM) ..	39
2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.10 Auswahlkriterien für die Varianten im cd14-Gen, die in der gesamten Studienpopulation genotypisiert wurden.....	41
2.2.11 Entwurf der Oligonukleotide für die Genotypisierung mittels <i>fluorescence resonance energy transfer</i> (FRET) ...	41
2.2.12 Genotypisierung mittels <i>FRET</i>	42
2.3 Statistische Verfahren.....	44
2.3.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	44
2.3.2 Powerberechnung	45
2.3.3 Assoziationsanalyse.....	45
2.3.4 Haplotypenberechnung	46
2.3.5 Bonferroni-Korrektur.....	47
3 Ergebnisse.....	48
3.1 Allgemeine Beobachtung der Studienpopulation	48
3.2 Verteilung der Ethnien	49
3.3 Verteilung der mykobakteriellen Genotypen	50
3.4 Genotypisierung von <i>CD14</i> mit <i>High-Resolution-Melting</i> bei 368 Individuen.....	51
3.5 Auswahl der genetischen Varianten für die Genotypisierung.....	53

3.6 Genotypisierung der ausgewählten genetischen Varianten des <i>CD14</i> -Gens	55
3.6.1 Variante -618 Ins(A)	55
3.6.2 Variante -260C/T (rs2569190).....	57
3.6.3 Variante -135A/G (rs34424920)	59
3.6.4 Variante +337T/A	60
3.6.5 Variante +535A/G.....	60
3.6.6 Variante +872C/A.....	60
3.6.7 Variante +953G/T	61
3.6.8 Variante +1189C/G (rs4914)	61
3.7 Kopplungsungleichgewicht der genotypisierten Varianten.....	62
3.8 Haplotypen.....	63
4 Diskussion.....	65
4.1 Infektionskrankheiten und Selektion	65
4.2 Genetische Varianten von <i>CD14</i> in der ghanaischen Studienpopulation	68
4.2.1 Verteilung der genotypisierten Varianten	69
4.2.2 Assoziation von CD14-Varianten mit Empfänglichkeit für Lungentuberkulose.....	72
4.2.3 Assoziationen von Varianten im <i>cd14</i> -Gen mit der Reaktivität im <i>purified protein derivate</i> (PPD)-Test	77
4.2.4 Assoziation von CD14-Varianten mit radiologischen Befunden in der Fallgruppe	79
4.2.5 Assoziationen von CD14-Varianten mit Erkrankungen durch unterschiedliche mykobakteriellen Genotypen	80
4.3 Schlussfolgerung	81
5 Zusammenfassung	84
6 Abkürzungsverzeichnis	85
7 Literaturverzeichnis	88
8 Danksagung.....	99

9 Eidesstattliche Erklärung 100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geschätzte Neuerkrankungen von Tuberkulose 2011 (WHO, 2012)	1
Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der Mykobakterien modifiziert nach Gagneux et al. (Gagneux & Small, 2007)	3
Abbildung 3: Übersicht der Makrophagen-Lymphozyten-Interaktion modifiziert nach (Schluger & Rom, 1998).....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung des cd14-Gens mit bekannten Varianten.....	16
Abbildung 5: Agarose-Gelelektrophorese der Amplifikate der Oligonukleotidpaare CD14_T8 bis CD14_T13	40
Abbildung 6: Schmelzkurven einer Genotypisierung mittels der FRET-Methode im LightTyper 1.0	44
Abbildung 7: Verteilung der Fälle und Kontrollen zwischen den Geschlechtern und Gesamt.....	49
Abbildung 8: Ethnien der Studienteilnehmer	50
Abbildung 9: Schmelzkurve des "CA"-Genotyps der Variante +872	52
Abbildung 10: Schematische Darstellung des CD14-Gens mit den untersuchten Varianten	54
Abbildung 11: Verteilung der Genotypen der Variante -618 Ins(A) unter Fällen und Kontrollen.....	56
Abbildung 12: Verteilung der Genotypen der Variante -260 C/T unter Fällen und Kontrollen	57
Abbildung 13: Verteilung der Genotypen der Variante +1189 C/G unter Fällen und Kontrollen.....	62
Abbildung 14: Kopplungsungleichgewicht in r^2 der genotypisierten Varianten	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Biochemikalien und Reagenzien	28
Tabelle 2: Reagenziensysteme	29
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 4: Puffer und Lösungen	30
Tabelle 5: Geräte	31
Tabelle 6: Oligonukleotide zur Sequenzierung und Genotypisierung mittels HRM	32
Tabelle 7: Oligonukleotide zur Genotypisierung mittels FRET	32
Tabelle 8: Elektronische Datenbanken und Datenverarbeitungsprogramme ...	33
Tabelle 9: Reaktionsansatz der Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	36
Tabelle 10: Reaktionsbedingung der Sequenzierreaktion	36
Tabelle 11: Reaktionsansatz des HRM	39
Tabelle 12: Reaktionsbedingung des HRM	40
Tabelle 13: Reaktionsansatz für die Genotypisierung mittels FRET	43
Tabelle 14: Reaktionsbedingung für die Genotypisierung mittels FRET	43
Tabelle 15: Durchschnittsalter der Fälle, Kontrollen und Gesamt	49
Tabelle 16: Verteilung der Ethnien	50
Tabelle 17: Verteilung der mykobakteriellen Genotypen	50
Tabelle 18: Genetische Varianten	53
Tabelle 19: Genetische Varianten für die Genotypisierung	54
Tabelle 20: Variante -618: Assoziation der Genotypen	56
Tabelle 21: Variante -260 C/T: Assoziation der Genotypen	57
Tabelle 22: Variante -260 C/T: Logistische Regression für die Ethnie der Northerners	58
Tabelle 23: Variante -135 A/G: Assoziationen der Genotypen	59
Tabelle 24: Variante +872 C/A: Assoziationen der Genotypen	61
Tabelle 25: Variante +1189 C/G: Assoziationen der Genotypen	62
Tabelle 26: Haplotypen	64
Tabelle 27: Studien zu der Varianten -260 C/T im CD14-Gen und deren Empfänglichkeit von Tuberkulose	73

1 Einleitung

1.1 Tuberkulose

1.1.1 Epidemiologie der Tuberkulose

Tuberkulose (TB) ist eine weltweit vorkommende Infektionskrankheit. Laut Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) ist ein Drittel der Weltbevölkerung mit *Mycobacterium (M.) tuberculosis* infiziert. Aber nicht jeder, der mit *M. tuberculosis* infiziert ist, entwickelt eine aktive Tuberkulose. Ungefähr einer von zehn Infizierten erkrankt an einer klinisch relevanten TB (WHO, 2010).

Betrachtet man die Zahlen der WHO zur epidemiologischen Entwicklung von Tuberkulose, fällt auf, dass die Anzahl der Neuerkrankungen steigend ist. Im Jahr 2000 lag die Zahl bei acht Millionen Fällen, während sie 2008 bei neun Millionen lag. Betrachtet man jedoch die Inzidenz, d.h. Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner, zeigt sich eine fallende Tendenz. Die größte Anzahl von Neuerkrankungen findet man in Asien. 13 der 15 Länder mit der höchsten Inzidenz liegen jedoch in Afrika. Dieses Phänomen wird durch die hohe Zahl von Co-Infektionen mit HIV in diesen Regionen erklärt (WHO, 2009).

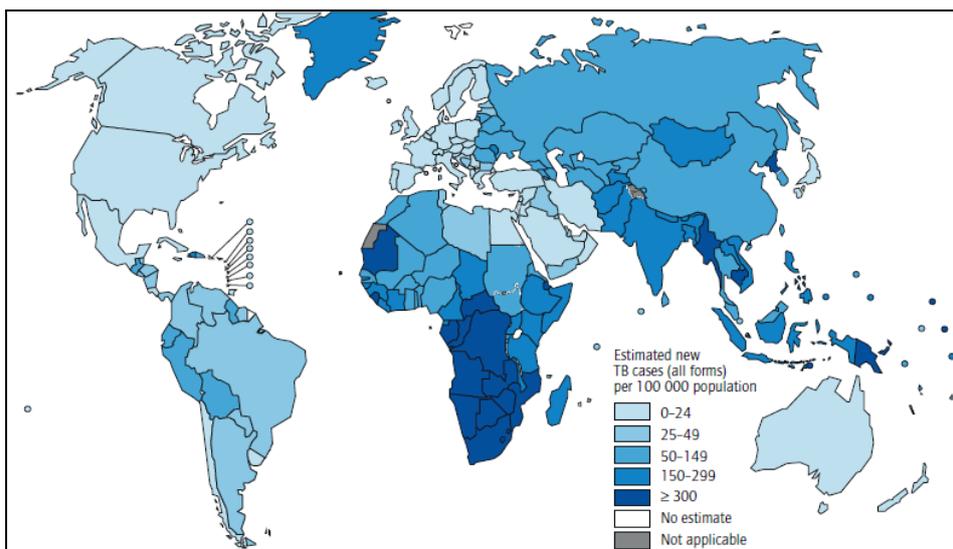


Abbildung 1: Geschätzte Neuerkrankungen von Tuberkulose 2011 (WHO, 2012)

Im Jahr 2011 starben ungefähr eine Million Menschen allein an Tuberkulose. zusätzlich starben 430 000 HIV-positive Menschen an TB (WHO, 2012).

1.1.2 Mikrobiologie der Tuberkulose-Bakterien

Die Erreger der Tuberkulose gehören zu den Mykobakterien. Mykobakterien sind aerobe, unbewegliche, langsam wachsende, stäbchenförmige und 1-10 µm lange Bakterien der Familie *Mycobacteriaceae*, Gattung *Mycobacterium* (*M.*) (Barrera, 2007).

Sie werden als säurefest bezeichnet, da sie die Eigenschaft besitzen, bestimmte Farbstoffe, die zur mikroskopischen Diagnostik eingesetzt werden, durch Säure- oder Alkoholbehandlung nicht wieder abzugeben. Diese Eigenschaft, wie auch das langsame Wachstum und die Widerstandsfähigkeit gegen Noxen, sind auf den Aufbau der mykobakteriellen Zellwand zurückzuführen. Die Zellwand besteht aus Mykolsäure und einem hohen Lipidanteil (Barrera, 2007).

Die Erreger der Tuberkulose werden zu dem *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTBK) zusammengefasst. Hierzu gehören die Spezies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* und *M. pinepedii* (RKI, 2009). Der häufigste Tuberkulose-Erreger beim Menschen ist *M. tuberculosis*.

Alle weiteren Mykobakterien (mehr als 80 verschiedene) werden als nicht-tuberkulöse Mykobakterien (*non-tuberculous mycobacteria*, *NTM*), MOTT (*mycobacteria other than tubercle bacilli*), atypische oder ubiquitäre Mykobakterien bezeichnet (z. B. *M. avium*, *M. marinum*) (RKI, 2009).

Innerhalb des MTBKs lassen sich die Spezies mit molekularbiologischer Diagnostik unterscheiden. Diese basiert auf mobilen (z. B. IS6110 RFLP) oder repetitiven (z.B. Spoligotyping, Miru-VNTR) DNA-Elementen (Gagneux & Small, 2007). Die Speziesdifferenzierung hat epidemiologische Relevanz. Mithilfe

genetischer Marker lassen sich die Bakterien des MTBKs in unterschiedliche phylogenetische Zweige einteilen.

Gagneux et al. haben die Ergebnisse von vier Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen (Baker et al., 2004; Filliol et al., 2006; Gagneux et al., 2006; Gutacker et al., 2006) ausgewertet und zusammengefasst. Bei dieser Analyse wurden die unterschiedlichen Mykobakterien des MTBKs aufgrund von Deletionen im mykobakteriellen Genom in sechs Genotypgruppen unterteilt. Für *M. tuberculosis* ergeben sich die vier phylogenetischen Gruppen *Indo-Oceanic*, *East-Asian*, *East-African-Indian* und *Euro-American* (EUAM). *M. africanum* unterteilt sich in die Gruppen *West-African 1* und *2* (Gagneux & Small, 2007).

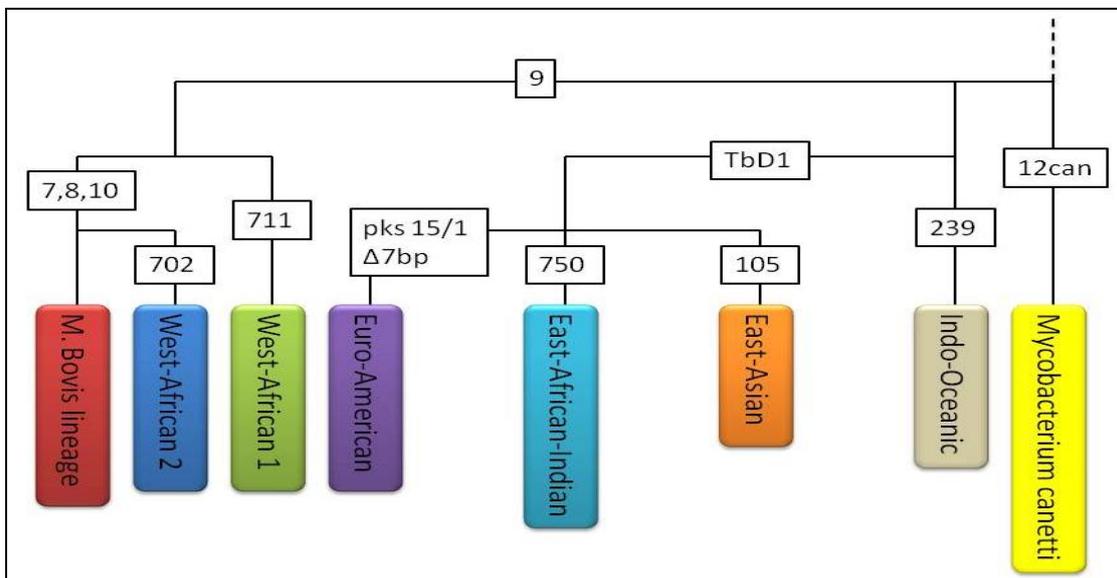


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der Mykobakterien modifiziert nach Gagneux et al. (Gagneux & Small, 2007)

In der Arbeit von Gagneux et al. wurde ebenfalls die geographische Verteilung der unterschiedlichen Genotypen ausgewertet. Hierbei zeigte sich eine charakteristische Verbreitung. In Europa und Amerika wie auch in Afrika kommen vor allem Mykobakterien der EUAM-Gruppe vor. In Asien findet man die Genotypen der *Indo-Oceanic*-, der *East-Asian*- und der *East-African-Indian*-Gruppe. *West-African 1* und *2* kommen nahezu ausschließlich in Afrika vor (Gagneux & Small, 2007).

1.1.3 Infektionsweg und Pathogenese

In der Regel werden Mykobakterien über Tröpfcheninfektionen übertragen. Selten kommt eine Übertragung durch Genuss von Kuhmilch (*M. bovis*), Organtransplantationen oder Kontakt mit infektiösem Material bei verletzter Haut vor.

Die infektiösen Aerosole werden über die Atmung aufgenommen. Die Mykobakterien erreichen nach erfolgreichem Passieren der Nasen- und Rachenschleimhaut die Alveolen der Lunge. Dort werden sie von Alveolarmakrophagen aufgenommen. Bei erfolgreicher Immunantwort wird die Vermehrung des Erregers gestoppt. Oft gelingt es dem Wirt nicht die Bakterien zu eliminieren. *M. tuberculosis* besitzt die Fähigkeit, der Immunabwehr zu entgehen, u. a. indem es die Bildung des Phagolysoms hemmt (Schluger & Rom, 1998). Daraufhin entsteht ein labiles Gleichgewicht zwischen Immunantwort und Vermehrung des Erregers.

Die aktivierten Makrophagen locken weitere Entzündungszellen der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr an. Es bildet sich nach zwei bis drei Wochen der sogenannte Primäraffekt und nach Einbezug der regionalen Lymphknoten der Primärkomplex bzw. Ghon'sche Komplex. Über die Lymphknoten können die Mykobakterien Blut- und Lymphwege erreichen und in weitere Anteile der Lunge sowie in unterschiedlichste Organe streuen. In der Lunge erreichen sie oft über diesen Weg die apikalen Anteile, wo sich die sogenannten Simon'schen Spitzenherde bilden. Diese sind oft Quellen für eine spätere Reaktivierung der Tuberkulose.

Eine Besonderheit der Mykobakterien ist die Ausbildung von Tuberkeln. Hierbei handelt es sich um infizierte Makrophagen, die von Epitheloidzellen (unbewegliche Abkömmlinge von Makrophagen), Lymphozyten, Plasmazellen, Fibroblasten und Makrophagen umhüllt werden. Im Zentrum dieses Granuloms bildet sich eine verkäsende Nekrose. In diesen Tuberkeln können Mykobakterien jahrelang bei eingeschränktem Stoffwechsel überleben.

Bei einem kleinen Anteil der Infizierten kann das Immunsystem die Erreger nicht kontrollieren. Es kommt zur disseminierten Verteilung in unterschiedlichste Organe. Durch Einschmelzung der Granulome und Anschluss an das Bronchialsystem kann unter Ausbildung von Kavernen eine offene Lungentuberkulose entstehen. Schmilzt ein Tuberkel, bricht in die Pulmonalvenen ein und streut Erreger in den Organismus, spricht man von einer Miliartuberkulose. Bei dieser finden sich hirsekorngroße Läsionen in den befallenen Organen. Bei starken Immundefekten (z. B. HIV, SCID) kann Tuberkulose sepsisartig verlaufen (Landouzy-Sepsis).

Die größte Ansteckungsgefahr geht von Erkrankten aus, die an einer offenen Lungentuberkulose leiden. Im Sputum können hier mikroskopisch Mykobakterien nachgewiesen werden. Durch Husten oder Niesen können Bakterien über die Atemluft in die Umgebung gelangen. Ob es zu einer Infektion kommt, hängt von der Menge und Virulenz des Erregers, der Häufigkeit und Dauer des Kontakts mit einer erkrankten Person sowie der Empfänglichkeit der exponierten Person ab (RKI, 2009).

Die Inkubationszeit, d. h. die Zeit nach einer Infektion bis eine messbare Immunantwort stattfindet, beträgt im Durchschnitt sechs bis acht Wochen. Etwa zehn Prozent der Infizierten erkranken an einer klinisch relevanten Tuberkulose. Insbesondere Kinder und immungeschwächte Personen unterliegen einem erhöhten Erkrankungsrisiko.

In den ersten zwei Jahren nach der Infektion mit *M. tuberculosis* ist das Erkrankungsrisiko am höchsten. Es kann jedoch auch erst nach Jahren im Rahmen der Infektion zu einer manifesten Erkrankung kommen, die so genannte Reaktivierung oder Postprimärtuberkulose.

1.1.4 Klinik

Ungefähr 80 Prozent der Patienten, die an einer Tuberkulose erkrankt sind, leiden an einer Lungentuberkulose. Die Symptome sind oft unspezifisch. Leitsymptom ist Husten mit oder ohne Auswurf. Der Auswurf kann blutig sein.

Hinzu kommen Allgemeinsymptome wie Gewichtsabnahme, Müdigkeit, Appetitmangel, leichtes Fieber, vermehrtes Schwitzen, allgemeine Schwäche und Einschränkungen des Allgemeinbefindens.

Durch hämatogene oder lymphogene Aussaat der Erreger kann sich in unterschiedlichsten Organen eine Tuberkulose entwickeln: Tuberkulöse Meningitis, Knochen-, Abdominal- oder Urogenitaltuberkulose mit entsprechender organspezifischer Symptomatik.

1.1.5 Diagnostik

1.1.5.1 Nachweis der Infektion

Eine schnelle und kostengünstige Methode zum Nachweis von Mykobakterien ist die Mikroskopie. Der lichtmikroskopische Nachweis von säurefesten Stäbchen wird mittels Ziehl-Neelsen- oder mittels Auramin-Färbung durchgeführt. Säurefest sind auch verwandte Bakterien (z. B. *Nocardia*, *Rhodococcus*), jedoch spricht der Nachweis von säurefesten Stäbchen in respiratorischem Material mit hoher Wahrscheinlichkeit für eine Infektion mit Mykobakterien. Der Nachweis besitzt eine geringe Sensitivität, da erst ab einer Keimdichte von 10^3 bis 10^4 /ml säurefeste Stäbchen nachgewiesen werden können.

Der „Goldstandard“ zur Diagnostik von Mykobakterien ist der kulturelle Nachweis (Rüsch-Gerdes & Hillemann, 2008). Tuberkuloseerreger besitzen eine lange Generationszeit von 14 bis 24 Stunden. Dementsprechend werden lange Anzuchszeiten benötigt.

Die Infektion mit *M. tuberculosis* bewirkt eine durch T-Zellen vermittelte Immunreaktion vom Typ IV. Diese Eigenschaft macht man sich bei dem Tuberkulin-Hauttest mittels der Mendel-Mantoux-Methode zunutze. Es wird eine gereinigte Suspension von hitzeinaktivierter Tuberkuloseerreger (*purified protein derivative RT 23, PPD-RT 23*) intrakutan an der Beugeseite des Unterarms injiziert. Nach stattgefundenem Kontakt mit Tuberkuloseerregern

entsteht eine inflammatorische Reaktion mit Rötung und Induration. Bei positivem Ergebnis wird jedoch keine manifeste Erkrankung sondern lediglich eine tuberkulöse Infektion nachgewiesen. Klinisch ist der Tuberkulin-Hauttest von dem Interferon-Gamma-Test (*Interferon- γ -Release-Assay, IGRA*) abgelöst worden, einem immunologischen Verfahren zum Nachweis einer Tuberkulose. Dieser Bluttest beruht auf der Tatsache, dass spezifische T-Zellen nach einem Kontakt mit *M. tuberculosis*-spezifischen Antigenen INF γ produzieren. Die INF γ -Produktion wird mit immunologischen Verfahren (ELISA, ELISPOT) gemessen. Die Möglichkeit zur Unterscheidung von latenter Infektion und aktiver Erkrankung besteht jedoch auch nicht.

Bei einer Lungentuberkulose spielt die Röntgendiagnostik bei der Erkennung und Verlaufsbeurteilung eine wichtige Rolle. Mit der radiologischen Diagnostik ist eine Tuberkulose nicht zu beweisen.

Bei gefährdeten Personen (z.B. HIV-Positive oder Kleinkinder) und schweren Verläufen wird die Nukleinsäureamplifikationstechnik (NAT) eingesetzt. Sie liefert im Gegensatz zum kulturellen Nachweis schneller ein Ergebnis, ist jedoch weniger sensitiv, und Resistenzbestimmungen sind nicht möglich (Rüsch-Gerdes & Hillemann, 2008). Die NAT beruht auf der Amplifikation spezifischer Nukleinsäuresequenzen der Mykobakterien und anschließender Detektion (RKI, 2009).

Für die bakteriologischen diagnostischen Methoden werden bei pulmonaler Manifestation Sputum, Bronchialsekret und Magensaft als Untersuchungsmaterial genutzt. Bei extrapulmonaler Tuberkulose werden Biopsiematerial, Punktate, Urin, Blut und Knochenmark untersucht.

1.1.5.2 Resistenztestung

Die Resistenztestung sollte bei jedem Erstisolat einer Mykobakterieninfektion durchgeführt werden. Zur Sensibilitäts- und Resistenzbestimmung von Mykobakterien können mit Antibiotika beimpfte Flüssig- oder Löwenstein-Jensen-Medien eingesetzt werden. Die sogenannte Proportionsmethode unter

Verwendung des Löwenstein-Jensen-Nährbodens dauert drei bis vier Wochen. Das Verfahren des Flüssignährbodens ist schneller und benötigt eine Woche. Es gibt auch Schnellresistenzverfahren, die mit Mykobakterien von bereits bewachsenen Kulturen oder mit mikroskopisch positivem Material durchgeführt werden. Diese benötigen zum Nachweis einer Resistenz bzw. Sensibilität nur einen Tag.

1.1.6 Therapie

Die Therapie der Tuberkulose erfolgt ausschließlich mit einer Kombination von Medikamenten. Gründe hierfür sind die biologisch unterschiedlichen Erregerpopulationen, die unterschiedlichen Wirkmechanismen und Wirkorte der Medikamente sowie die Vermeidung von Resistenzentwicklung.

Zur Behandlung der Tuberkulose stehen die folgenden fünf Erstrang- oder Standardmedikamente zur Verfügung: Isoniazid (INH), Rifampicin (RMP), Ethambutol (EMB), Pyrazinamid (PZA) und Streptomycin (SM). Des Weiteren gibt es Zweitrang- oder Reservemedikamente (Chinolone, Aminoglykoside).

Für den Erfolg der Tuberkulosetherapie und das Verhindern einer Resistenzentwicklung ist eine regelmäßige Einnahme der Medikamente notwendig. Weltweit nehmen die Resistenzen gegen Erstrangmedikamente (*MDR, multi-drug-resistant*; Resistenz gegenüber INH und RMP) und auch gegen Zweitrangmedikamente (*XDR, extensively drug-resistant*; zusätzlich Resistenz gegenüber einem Fluorchinolon und gegen mindestens eines der injizierbaren Medikamente (Amikacin, Capreomycin)) zu. Die WHO empfiehlt deshalb eine überwachte Medikamenteneinnahme (*DOTS, directly observed treatment, short-course*).

1.1.7 Immunologie der Tuberkulose

1.1.7.1 Angeborene Immunität

M. tuberculosis wird über Tröpfcheninfektion übertragen. Nach der oralen Aufnahme werden im Nasopharynx und in den Bronchien größere Partikel aus

der Atemluft gefiltert und mithilfe des Flimmerepithels des oberen Respirationstrakts oralwärts transportiert. Die Mykobakterien, die die Alveolen erreichen, werden von Alveolarmakrophagen phagozytiert. Die Erkennung und Aufnahme der Mykobakterien durch die Makrophagen geschieht mithilfe von sogenannten *pattern recognition receptors* (PRR), die sich auf der Oberfläche der Makrophagen befinden. Typische Vertreter der PRR's sind Mannose-Rezeptor (MR), *toll-like-receptor 2* und 4 (TLR2, TLR4), Komplementrezeptoren CR1, CR3, CR4, *surfactant*-Protein Rezeptor, *scavenger*-Rezeptor und CD14 (Schluger & Rom, 1998).

Nach der Phagozytose können die Makrophagen die Mykobakterien durch Phagosomen-Lysosomen-Fusion, Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) und reaktiven Stickstoffoxiden (RNS) oder Apoptose eliminieren (Schluger & Rom, 1998). Durch die mykobakterielle Fähigkeit, die Phagosomen-Lysosomen-Fusion durch Ammoniakproduktion zu inhibieren, können die Mykobakterien in den Phagosomen überleben (Gordon et al., 1980). Dadurch ist die Fähigkeit der Makrophagen, Mykobakterien abzutöten eingeschränkt. Die Makrophagen schützen jedoch vor einer weiteren Ausbreitung der Erreger und aktivieren die Zellen der adaptiven Immunantwort, indem sie den T-Zellen mykobakterielles Antigen präsentieren und Zytokine (Interleukin 12 und 18 (IL12 und 18)) sezernieren, welche die T-Helfer-Zellen stimulieren (Schluger & Rom, 1998). Des Weiteren sind Neutrophile Granulozyten, Natürliche Killerzellen und Dendritische Zellen an der angeborenen Immunantwort beteiligt.

1.1.7.2 Adaptive Immunantwort

Die CD4-positiven-T-Zellen (CD4⁺ T-Zellen) stellen die wichtigste Komponente der zellulär vermittelten Immunabwehr der Tuberkulose dar (Schluger & Rom, 1998). Diese werden über Makrophagen, die mykobakterielle Antigene über MHC II Moleküle an der Oberfläche präsentieren, aktiviert. Die aktivierten T-Zellen produzieren Interferon γ (IFN γ) und andere Zytokinen, welche wiederum

Zellen produzieren INF γ . INF γ aktiviert durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus die Makrophagen zur Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNS) (Flynn & Chan, 2001) und hemmt die Ausbildung einer T-Helfer-2-Lymphozyten (Th2-Zellen) Immunantwort (Schluger & Rom, 1998) und somit eine Produktion von Interleukin 4 und 10 (IL4 und IL10). Die antiinflammatorischen IL4 und IL10 hemmen Makrophagen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Ein weiteres wichtiges Zytokin in der Immunantwort der Tuberkulose ist der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α). TNF α wird von Makrophagen, Dendritischen Zellen und T-Zellen sezerniert, unterstützt INF γ bei der Makrophagenaktivierung und hat eine wichtige Bedeutung für die Granulomentstehung und -aufrechterhaltung (Flynn & Chan, 2001).

1.1.7.2.2 Granulombildung

Da trotz einer Immunantwort häufig keine Eliminierung der Erreger erreicht werden kann, schützt die Granulombildung vor einer Disseminierung der Erreger.

Die infizierten Makrophagen locken durch Ausschüttung von Zytokinen weitere Immunzellen wie Neutrophile Granulozyten und Monozyten aus der Blutbahn an. Monozyten differenzieren zu Makrophagen. Aus infizierten Makrophagen bilden sich Gewebsmakrophagen, Epitheloidzellen und Langerhanszellen, die einen Schutzwall um die Erreger bilden. Um diesen Wall ordnen sich CD4⁺ T-Zellen an (Schluger & Rom, 1998), die Zytokine sezernieren. Makrophagen werden aktiviert, um die Erreger abzutöten, und zytotoxische T-Zellen greifen infizierte Zellen an. Es entsteht ein nekrotisches Zentrum innerhalb des Granuloms. Ein labiles Gleichgewicht zwischen Erregern und Immunantwort wird induziert. Die Erreger passen sich den Bedingungen des Granuloms an und können über Jahre persistieren. Durch eine Schwächung des Immunsystems kann es zu einer Vermehrung der Mykobakterien kommen und es ist möglich, dass eine endogene Reinfektion stattfindet.

1.1.8 Genetische Empfänglichkeit für Tuberkulose

Nicht jeder, der mit Mykobakterien des MTBKs infiziert ist, entwickelt eine klinisch relevante Tuberkulose. Aufgrund dieser Tatsache stellt sich die Frage, ob der Ausbruch der Erkrankung allein auf spezifischen Umweltfaktoren, wie Fehl- und Mangelernährung, sozial schwachen Verhältnissen, Stress und dichtbesiedelten Lebensräumen beruht oder ob es genetische Veranlagungen für eine erhöhte Empfänglichkeit für Tuberkulose gibt. Erste Hinweise für eine Veranlagung ergeben sich aus dem Lübecker Impfunglück von 1930. Im Zeitraum vom 10. Dezember 1929 bis zum 30. April 1930 wurde ein BCG-Impfstoff, der mit virulenten *M. tuberculosis* verunreinigt war, 251 Säuglingen injiziert. Von diesen 251 Kindern starben 77, 72 davon an autoptisch nachgewiesener Tuberkulose. Bei 126 der 174 überlebenden Kindern konnten durch radiologische Kontrolle Verkalkungen der Mesenteriallymphknoten nachgewiesen werden (Petroff, 1932; Rieder, 2003). Der unterschiedliche Verlauf bei den Säuglingen ist wahrscheinlich auf genetische Veranlagung zurückzuführen, da die Kinder zu jung waren, um eine signifikante vorausgegangene Exposition von Mykobakterien zu haben und alle Kinder die gleiche Dosis des gleichen *M. tuberculosis*-Stamms erhielten (Bellamy, 2005). Verstärkt wird diese These durch Zwillingsstudien, bei denen festgestellt wurde, dass bei monozygoten Zwillingen eine erhöhte Konkordanz im Vergleich zu dizygoten Zwillingen besteht (Bellamy, 2005).

Haldane formulierte 1949 die These, dass Infektionskrankheiten die größte Auswirkung auf die Selektion in der Evolution des Menschen in den letzten 5000 Jahren hatten. Durch die geographische Verteilung der Prävalenz von Malaria konnten verschiedene Gene, die eine Resistenz gegenüber Malaria aufweisen, identifiziert werden. Diese genetischen Mutationen sind in endemischen Gebieten von Malaria verbreitet und kommen nur selten in Populationen vor, die in nicht-endemischen Gebieten leben (Bellamy, 2005). Das bekannteste Beispiel sind Malaria und Sichelzellanämie. Ein Austausch an der sechsten Aminosäureposition des Hämoglobin β (HBB) von Glutamat zu

Valin ist die Ursache für die Sichelzellanämie (Ashley-Koch et al., 2000) und ein relativer Schutz vor Malaria. Während die homozygote Variante (HbSS) ein schweres Krankheitsbild auslöst, ist die heterozygote Variante (HbS) meist klinisch unauffällig.

Da Tuberkulose keine historisch geographische Verteilung aufweist, ist die Identifikation von genetischen Varianten schwieriger (Bellamy, 2005). Erkenntnisse konnten durch Untersuchungen von Menschen, die eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber Mykobakterien aufwiesen, gewonnen werden. Die erhöhte Empfänglichkeit wurde meist nicht durch eine Infektion mit *M. tuberculosis*, sondern durch Impfungen mit BCG oder durch Infektionen mit atypischen Mykobakterien festgestellt (Takiff, 2007).

Die zurzeit aussagekräftigsten Methoden genetische Varianten zu identifizieren, die eine erhöhte Empfänglichkeit für Tuberkulose aufweisen, sind Assoziationsanalysen und genomweite Assoziationsanalysen in Fall-Kontrollstudien.

Während bei der Assoziationsanalyse zu Beginn der Studie eine Hypothese formuliert wird und ausgewählte Kandidatengene untersucht werden, werden bei einer genomweiten Assoziationsanalyse neue genetische Marker identifiziert, die mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Tuberkulose assoziiert sind. Dadurch können neue Hypothesen aufgestellt werden. Voraussetzungen für aussagekräftige Ergebnisse sind eine ausreichende statistische Power, die nur durch eine große Studienpopulation gewährleistet ist, sowie exakt definierte Phänotypen, Qualitätskontrollen der Studiendurchführung und genaue statistische Auswertung.

Das erste Kandidatengen, das man in Mäusen aufgrund von erhöhter Empfänglichkeit gegenüber BCG, *Salmonella* und *Leishmania* fand, war das *natural resistance-associated macrophage protein1* (NRAMP1) (Skamene, 1994). Es entspricht dem humanen Gen *solute carrier family 11 member 1* (*Slc11a1*) (Bellamy, 2005). In einer Meta-Analyse von Li et al. im Jahr 2006

wurden 17 Fall-Kontroll-Studien über genetische Varianten von *Slc11a1* analysiert. Es zeigte sich für drei Varianten eine erhöhte Assoziation mit pulmonaler Tuberkulose in der asiatischen Bevölkerung, die bei der europäischen Population jedoch nicht zu beobachten war (Li et al., 2006).

In Assoziationsanalysen werden Kandidatengene ausgewählt, bei denen die Funktion des Produkts bekannt ist und das Produkt z. B. eine Rolle in der angeborenen oder erworbenen Immunantwort gegenüber dem Pathogen spielt oder in anderer Form in Zusammenhang mit der Infektion steht. Die Ergebnisse in den Assoziationsstudien sind jedoch oft widersprüchlich. Das *human leukocyte antigens* (HLA) war das erste Gen, das auf eine Assoziation mit Tuberkulose untersucht wurde (Takiff, 2007). *HLA-DR2* zeigte eine Assoziation mit Lepra in asiatischen, afrikanischen und amerikanischen Populationen (Geluk & Ottenhoff, 2006). Positive Assoziationen zeigten sich auch für Lungentuberkulose (zusammengefasst in (Meyer et al., 1998). Jedoch konnte auch hier in einer anderen Studie keine Assoziation gefunden werden (Ghosal et al., 1996). In einer Studienpopulation aus Hongkong fand man eine Assoziation von zwei Polymorphismen im Gen für IL12B, einer Untereinheit von IL12, mit Tuberkulose (Tso et al., 2004). Diese Assoziation wurde in einer Studie in Texas nicht gefunden (Ma et al., 2003). Auch Studien zu IFN γ (Cooke et al., 2006; Tso et al., 2005) und zum IFN γ -Rezeptor (Awomoyi et al., 2004; Cooke et al., 2006) zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Dass auch das Zusammenspiel von Wirts- und Erregergenetik eine Rolle spielt, zeigte sich bei einer Studie zu *ALOX5*, das für die 5-Lipoxygenase kodiert, in der vorliegenden Studienpopulation. Eine genetische Variante in dem Gen *ALOX5* kam signifikant häufiger in der Fallgruppe vor, vor allem zeigte sich das bei den Fällen, die mit *M. africanum* West-Africanum 2 infiziert waren (Herb et al., 2008).

1.2 CD14

1.2.1 *Monocyte Differentiation Antigen CD14*

Das humane *CD14*-Gen (*Online Mendelian Inheritance in Man*; OMIM 158120) liegt auf dem Minus-Strang-DNA des Chromosoms 5. Drei verschiedene Transkriptvarianten, die sich in der 5'UTR unterscheiden, codieren für ein Produkt, das aus zwei Exonen und einem Intron besteht. Es codieren 1128 Nukleotide für 376 Aminosäuren (Schütt & Schumann, 1993). Auf das erste Exon, das nur aus einem Start-Codon besteht, folgt das Intron von 88bp, an dieses schließt sich das zweite Exon an (Ferrero & Goyert, 1988; Goyert et al., 1988). Die Lokalisation des *CD14*-Gens konnte auf die Position 5q23-q31 des Chromosoms 5 festgelegt werden (Goyert et al., 1988). Es liegt zwischen Wachstumsfaktoren (IL3, CSF2) und Rezeptoren (CSF-1-R, PDGF-R) (Goyert et al., 1988; Schütt & Schumann, 1993). Die Deletion dieser Region spielt eine Rolle bei der Entstehung von malignen myeloischen Neoplasien (Le Beau et al., 1993).

Die Primärsequenz des humanen *CD14*-Gens ist mit einer Übereinstimmung von ungefähr 65 Prozent partiell homolog zu der Primärstruktur desselben Gens in Maus, Ratte, Kaninchen und Rind (Stelzer, 2000).

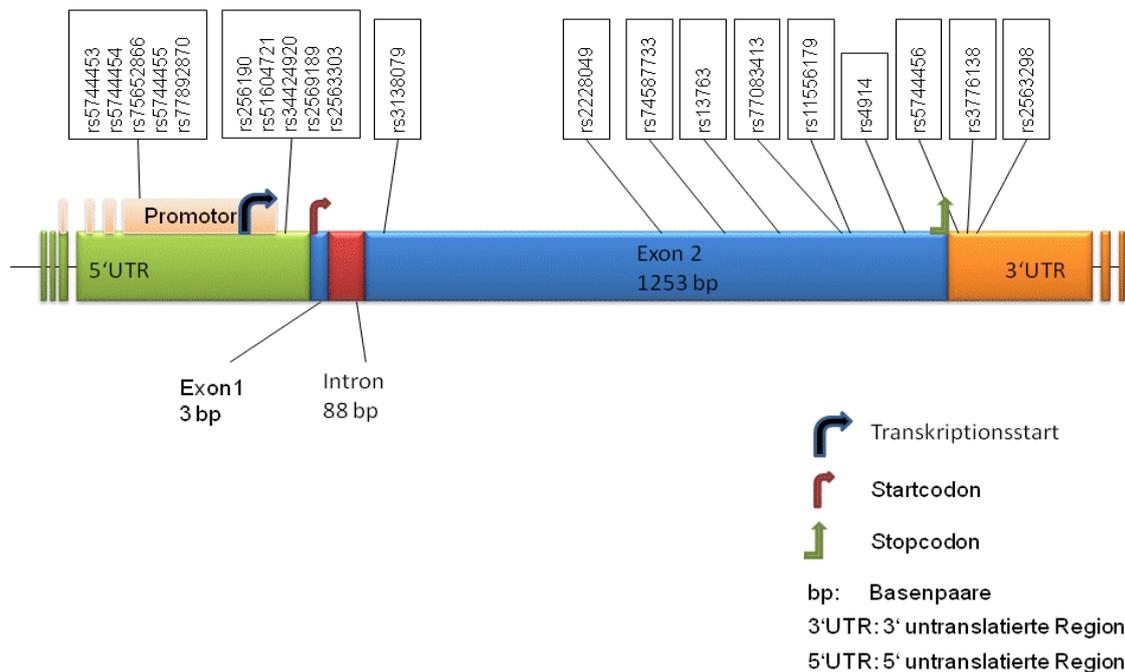


Abbildung 4: Schematische Darstellung des *CD14*-Gens mit bekannten Varianten

1.2.2 CD14-Molekül

CD14 ist ein 48-56 kD großes Glycoprotein. Es gibt eine membrangebundene Form (*membranCD14*, mCD14), die über einen Phosphatidylinositolglycan-Anker an der Oberflächenmembran von Monoblasten, Monozyten, Gewebsmakrophagen und aktivierten Granulozyten verankert ist. Es besitzt leucinreiche Abschnitte (Haziot et al., 1988).

Das mCD14 wird von einer mRNA translatiert und im Endoplasmatischen Retikulum mit einem Phosphatidylinositolglycan-Anker versehen. Über den Golgi-Komplex wird es zur Plasmamembran befördert (Landmann et al., 2000). Durch die fehlende Transmembrandomäne ist es dem CD14-Rezeptor nicht möglich, direkt Signale in das Innere der Zelle weiterzuleiten. Hierzu benötigt es einen zusätzlichen Signalvermittler.

Neben der membrangebundenen Form existiert eine lösliche Form von CD14 (*solubleCD14*, sCD14). Lösliches CD14 wird von Monozyten (Bazil &

Strominger, 1991), von Hepatozyten (Su et al., 1999) und auch von Endothelzellen (Jersmann et al., 2001) sezerniert.

Es werden verschiedene Mechanismen zur Freisetzung und Entstehung des löslichen CD14 angenommen. Es kann u. a. durch die Abspaltung von mCD14 von der Oberflächenmembran entstehen. Dies geschieht mithilfe einer Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C oder mit einer Protease (Haziot et al., 1988; Schütt & Schumann, 1993). Ein weiterer Mechanismus ist die Sekretion von sCD14 ohne posttranslationale Modifikation mit einem Phosphatidylinositolglycan-Anker (Bufler et al., 1995; Stelter et al., 1996). Eine andere Möglichkeit besteht in der Endozytose von mCD14, Prozessierung und folgende Exozytose als sCD14 (Durieux et al., 1994).

Von der löslichen Form sCD14 existieren Isoformen. Je nach Methode wird eine unterschiedliche Anzahl von Isoformen nachgewiesen: Mit der sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können zwei, mit isoelektrischer Fokussierung (IEF) sechs und mit 2D-Gelelektrophorese sieben Isoformen detektiert werden (Stelter, 2000).

Lösliche CD14-Moleküle befinden sich im Serum, im Liquor cerebrospinalis und im Urin von Patienten mit Proteinurie (Landmann et al., 2000).

Die Expression von mCD14 und sCD14 wird über Zytokine und durch bakterielle Bestandteile reguliert. Eine vermehrte Expression wird durch TNF α , IFN γ und durch bakterielle Stimuli von *Escheria coli*, *Staphylococcus aureus*, Lipopolysaccharid (LPS), Lipoteichoic acid (LTA) und Formylpeptide ausgelöst. Eine verminderte Expression findet man bei einer T-Helfer-2-Immunantwort, bei der IL4 und IL10 vermehrt exprimiert werden. Ebenfalls fällt eine verminderte Expression im Rahmen einer Dexamethason-Therapie auf (Landmann et al., 2000).

Erhöhte Spiegel von sCD14 im Serum (Normwert im Serum 2-6 μ g/ml) finden sich u. a. bei Verbrennungspatienten, Polytraumatisierten, AIDS- oder Psoriasis-Patienten. Die sCD14-Konzentration wird analog zu Akute-Phase-

Proteinen hochreguliert (Schütt & Schumann, 1993). Bei Sepsis-Patienten sind mCD14-negative Monozyten im Blut aufgefallen. Ursachen könnten Ablösung oder Internalisierung der Rezeptoren sein (Schütt & Schumann, 1993).

1.2.3 Funktion von CD14

Im Jahr 1990 wurde CD14 erstmals als Rezeptor für das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) beschrieben (Wright et al., 1990).

LPS ist ein Bestandteil der Außenmembran von gram-negativen Bakterien (Schütt, 1999). Die Bindung von LPS an CD14 resultiert in einer Immunzellaktivierung: Die Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL1, IL6, IL8 wird erhöht, Sauerstoffradikale und NO werden freigesetzt, und auch antiinflammatorische Zytokine wie IL10 und TGF β werden ausgeschüttet (Schütt, 1999). Immunzellen können innerhalb kürzester Zeit auf kleinste Mengen LPS antworten. Diese Abwehrreaktion kann über eine überschießende Freisetzung von Zytokinen in einen septischen Schock münden.

1.2.3.1 mCD14

Die Bindung von LPS an den mCD14-Rezeptor wird durch das Lipopolysaccharid-bindende-Protein (LBP) verstärkt. Das LBP ist ein 60kD Serumglykoprotein, das als Katalysator für die Bindung von LPS an CD14 dient. Es ist jedoch nicht notwendig, weder um LPS an CD14 zu binden, noch um eine zelluläre Signalkaskade nach Bindung auszulösen (Wright, 1995). LBP ist ein Akute-Phase-Protein, und die Konzentration steigt während einer Inflammation im Serum an (Tobias & Ulevitch, 1994).

Der LPS-LBP-Komplex wird von mCD14 gebunden. Da mCD14 keine Transmembrandomäne besitzt, benötigt es einen zusätzlichen Signalvermittler, um Signale in das Innere der Zelle weiterzuleiten. Diese Weiterleitung findet mithilfe des TLR4 statt (Chow et al., 1999).

CD14 gehört zu den *pattern recognition receptors* (PRRs) (Pugin et al., 1994). PRRs dienen der Erkennung von *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). Diese sind Moleküle, die auf der Oberfläche von Krankheitserregern (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten etc.) vorkommen und es dem Immunsystem des Körpers ermöglichen, diese Erreger zu erkennen. Neben LPS erkennt CD14 Zellwandstrukturen von gram-positiven Bakterien, virale Bestandteile und das mykobakterielle Lipoarabinomannan (LAM) (Pugin et al., 1994).

CD14 ist nicht nur als Rezeptor für das angeborene Immunsystem relevant, sondern auch als Rezeptor auf Makrophagen für apoptotische Zellen (Devitt et al., 1998). Apoptotische Zellen werden nach Bindung an CD14 phagozytiert ohne eine inflammatorische Reaktion auszulösen (Devitt et al., 1998).

1.2.3.2 sCD 14

Die lösliche Form von CD14 ist für die Aktivierung von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Bronchial- und Trachealepithelzellen und Dendritischen Zellen durch LPS verantwortlich (Landmann et al., 2000; Tapping & Tobias, 2000). Diese setzen durch Aktivierung Il-1, Il-6, Gewebefaktor und Oberflächenadhäsionsmoleküle wie ELAM-1, ICAM-1 und VCAM frei (Tapping & Tobias, 2000).

Lösliches CD14 kann ebenfalls die Zellen aktivieren, die mCD14 tragen. Dies wurde bei Patienten mit einer Paroxysmalen Nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) festgestellt. Hier liegt ein Gendefekt vor und durch den resultierenden Enzymdefekt kann keine GPI-Verankerung von Proteinen stattfinden (Tapping & Tobias, 2000). Bei der PNH findet dennoch eine Aktivierung der Monozytischen Zellen durch LPS statt, die von der Anwesenheit von sCD14 abhängig ist (Tapping & Tobias, 2000). Die Aktivierung der mononukleären Zellen durch sCD14 benötigt höhere Konzentrationen von LPS und ist weniger stabil als der Signalweg über mCD14 (Tapping & Tobias, 2000). Für die Bildung des LPS-sCD14-Komplexes ist ebenfalls die Anwesenheit von LBP von Bedeutung. LBP bindet LPS und liefert dieses an sCD14 (Pugin et al., 1993).

Des Weiteren dient sCD14 als Carrier-Molekül für Phospholipide und LPS. Gebundenes LPS kann an *high-density-lipoproteins* (HDL) abgegeben und dadurch neutralisiert werden (Landmann et al., 2000). Phospholipide können zu Lipoproteinen, Phospholipidvesikeln und zu Plasmamembranen von Zellen transportiert werden (Yu et al., 1997). Bei hohen Konzentrationen von LPS konkurrieren sCD14 und mCD14 um diese. Dadurch aktiviert sCD14 nicht nur oben genannte Zellen, sondern schützt den Organismus durch „Abfangen von LPS“ vor einer überschießenden Immunreaktion durch Freisetzung von Zytokinen und Sauerstoffradikalen über den mCD14-abhängigen Weg (Landmann et al., 2000).

Das lösliche CD14 bindet, wie auch das mCD14, neben LPS andere Erregerbestandteile wie Peptidoglykan von gram-positiven Bakterien, LAM, fungale Proteine und Bestandteile von Spirochäten (Tapping & Tobias, 2000).

1.2.4 CD14 und Immunität gegenüber *Mycobacterium tuberculosis*

CD14 ist an der Erkennung von Mykobakterien beteiligt (Zhang et al., 1993). Dies wurde mithilfe einer Studie gezeigt, in der mononukleäre Phagozyten mit Lipoarabinomannan (LAM) stimuliert wurden (Zhang et al., 1993). Dies führte zu einer Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und Interleukin 1 β (IL1 β). Diese Sekretion konnte mithilfe von monoklonalen CD14-Antikörpern inhibiert werden und somit nachgewiesen werden, dass CD14 eine Rolle in der initialen Immunantwort gegen *M. tuberculosis* spielt (Zhang et al., 1993). Bei hoher Konzentration von LAM findet jedoch trotz Anwesenheit von monoklonalen CD14-Antikörpern eine Zytokinproduktion statt (Zhang et al., 1993).

Ebenfalls spielt eine Rolle, welche Art von LAM an den CD14-Rezeptor bindet. Die Bindung von *non-mannose-capped Lipoarabinomannan* (araLAM) an den CD14-Rezeptor ruft eine Immunreaktion hervor (Bernardo et al., 1998). AraLam ist eine Zellwandstruktur apathogener Mykobakterien (Wieland et al., 2008). Die Präsenz von *mannose-capped Lipoarabinomannan* (manLAM), einer

Zellwandkomponente von *M. tuberculosis*, zeigt hingegen kaum Effekte auf Zellen, die CD14 exprimieren (Bernardo et al., 1998). CD14-Antikörper nehmen jedoch auf einige durch manLAM-induzierte Reaktionen Einfluss, so dass davon ausgegangen wird, dass CD14 dennoch eine Rolle in manLAM-induzierten Reaktionen spielt (Wieland et al., 2008).

Aufgrund von Untersuchungen in einem Mausmodell wird vermutet, dass nicht ein Defekt eines *pattern recognition receptor* (PRR), sondern ein Zusammenspiel von Defekten unterschiedlicher PRRs (TLR2, TLR4 oder CD14) die initiale Immunantwort beeinträchtigt (Reiling et al., 2002). In diesem Mausmodell hat sich die Immunreaktion von CD14-*knockout* (KO)-Mäusen nach Infektion über die Luftwege mit *M. tuberculosis* nicht von der Immunreaktion von Wildtyp-Mäusen unterschieden (Reiling et al., 2002). In einem weiteren Mausmodell wurde jedoch demonstriert, dass CD14-KO-Mäuse vor der Letalität durch *M. tuberculosis* geschützt waren (Wieland et al., 2008). Unter den CD14 KO-Mäusen zeigte sich eine verminderte pulmonale Inflammation mit unveränderter Bakterienlast (Wieland et al., 2008). In diesem Modell wurde die Infektion der Mäuse über einen Zeitraum von 32 Wochen beobachtet, während die Beobachtungsperiode der infizierten Mäuse in der vorher genannten Studie nur 14 Wochen betrug.

Kontrovers bleibt die Frage, ob CD14 an der Aufnahme von *M. tuberculosis* in Zellen beteiligt ist. CD14-Antikörper verminderten die Phagozytose von *M. tuberculosis* durch humane Mikrogliazellen (Peterson et al., 1995) und die Aufnahme von *M. bovis* in Alveolarmakrophagen von Schweinen (Khanna et al., 1996). Kein Effekt wurde bei der Blockierung mit CD14-Antikörpern und der Aufnahme von *M. tuberculosis* durch humane Monozyten und Alveolarmakrophagen gesehen, jedoch zeigte sich hier eine erhöhte Anzahl von internalisierten Bakterien in CD14-positiven Monozyten (Shams et al., 2003). Mithilfe weiterer Untersuchungen wurde geschlossen, dass die Infektion mit *M. tuberculosis* zu einer erhöhten Expression von CD14 auf mononukleären Phagozyten führt (Shams et al., 2003).

Erhöhte *soluble* CD14 (sCD14) Werte wurden in Proben nachgewiesen, die durch eine bronchoalveoläre Lavage von Patienten mit Lungentuberkulose entnommen wurden (Hoheisel et al., 1995). Auch im Serum von Patienten mit aktiver Tuberkulose wurden signifikant erhöhte sCD14-Werte gefunden (Juffermans et al., 1998; Lawn et al., 2000; Pacheco et al., 2004). Nach der Therapie der Tuberkulose fielen die sCD14-Werte im Serum auf die Werte der Kontrollgruppen ab (Lawn et al., 2000; Pacheco et al., 2004). Aus diesem Grund ist es sinnvoll, sCD14 als Verlaufsparemeter in der Therapie der Tuberkulose zu bestimmen (Pacheco et al., 2004).

1.2.5 Genetische Varianten von *CD14* und deren Empfänglichkeit für Tuberkulose

Im Jahr 1999 wurde ein Polymorphismus in der 5'UTR Region des *CD14*-Gens an der Position -159 ausgehend vom Transkriptionsstart identifiziert. Dies ist ein Einzelnukleotidaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) (Baldini et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit werden Positionen im *CD14*-Gen vom Translationsstart ausgehend angegeben. Demnach entspricht der von Baldini et al. beschriebene Polymorphismus der Position -260.

Baldini et al. fanden signifikant höhere sCD14 Level und signifikant erniedrigte IgE Level bei dem Genotyp -260TT (Baldini et al., 1999). Für den genannten Polymorphismus ist eine Assoziation zwischen älteren normotensiven, nichtrauchenden Individuen, die das T Allel tragen, und einem Myokardinfarkt gesehen worden (Unkelbach et al., 1999).

Es wurden weitere Assoziationsstudien zu diesem Polymorphismus und *CD14* durchgeführt, u. a. zum Kawasaki-Syndrom (Nishimura et al., 2003), zur IgA-Nephropathie (Yoon et al., 2003), zu Morbus Crohn (Klein et al., 2002), zu Multipler Sklerosis (Brettschneider et al., 2002) und zur Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren wie SP1, SP2 und SP3 (LeVan et al., 2001). Diese Studien zeigen Assoziationen mit einigen, aber nicht allen Krankheiten.

Es gab zum Zeitpunkt der Recherche drei veröffentlichte Studien zu der Assoziation zwischen dem Polymorphismus -260 C/T und Tuberkulose.

Pacheco et al. fanden in einer Studienpopulation von 379 Personen keine Assoziation zwischen der Allel- oder Genotypfrequenz und der Präsenz von Tuberkulose oder den verschiedenen Erscheinungsformen der Erkrankung. Auch zeigte sich keine Assoziation mit erhöhten sCD14-Konzentrationen im Serum (Pacheco et al., 2004). In der mexikanischen Bevölkerung wurde eine Studienpopulation von 285 Personen untersucht. Hier fand sich eine Assoziation zwischen dem Genotyp -260TT und erhöhter Wahrscheinlichkeit an pulmonaler Tuberkulose zu erkranken (Rosas-Taraco et al., 2007). Auch die Arbeitsgruppe um Kang fand in der koreanischen Bevölkerung eine Assoziation zwischen dem Genotyp -260TT und der Entwicklung von Tuberkulose (Kang et al., 2009).

1.3 Fragestellung

Nach einer initialen Literaturrecherche erfolgte die Auswahl des Kandidatengens *CD14* aufgrund der beschriebenen Assoziationen zwischen der Variante -260C/T und der Empfänglichkeit für Tuberkulose. Es sollte untersucht werden, ob sich diese Assoziation in dem vorliegenden Studienkollektiv aus Ghana bestätigen lässt.

Des Weiteren interessierte uns, ob auch andere bekannte oder unbekannte Varianten in dem *CD14*-Gen mit pulmonaler Tuberkulose, Empfänglichkeit für einen bestimmten mykobakteriellen Genotyp oder Krankheitsverlauf der Tuberkulose assoziiert sind. Daher erfolgte zunächst eine Genotypisierung ausgewählter Studienteilnehmer zur Identifizierung bekannter und unbekannter Varianten des *CD14*-Gens. Es folgte eine Auswahl der detektierten Varianten, die im gesamten Studienkollektiv genotypisiert wurden.

Die Genotypverteilung der ausgewählten Varianten sollte zwischen Fällen und Kontrollen der Studienpopulation unter Einbeziehung von potenziell wichtigen

Kovariablen wie Alter, Ethnie, Geschlecht, mykobakterielle Genotypen, radiologische Befunde, PPD-Testergebnis und klinischer Symptome einer Tuberkulose statistisch ausgewertet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Studienpopulation

Die in dieser Studie untersuchten Teilnehmer wurden im Rahmen eines Projekts des Nationalen Genomforschungsnetzes (NFGN) „*Association and linkage approaches to identify human genetic variants contributing to natural protection against pulmonary tuberculosis*“ in Ghana, Westafrika rekrutiert. Das Projekt wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert. Genehmigt worden war es von folgenden Einrichtungen: „*Committee on Human Research, Publications and Ethics, School of Medical Sciences, Kwame Nkrumah University of Science and Technology*“, Kumasi, und „*Ethics Committee of the Ghana Health Services*“, Accra, Ghana.

Die Rekrutierung der Patienten mit Lungentuberkulose und der Kontrollgruppe erfolgte im Zeitraum von September 2001 bis Juli 2004. Die Teilnehmer bestätigten nach umfassender Aufklärung über den Studienablauf ihre Teilnahme mit Unterschrift oder mit Abdruck eines Daumens. Die Aufklärungen, klinische Untersuchungen, Probenentnahmen und Protokollierung der Daten wurden von ghanaischen Studienärzten und Krankenschwestern nach ausführlicher Einweisung durch die Studienleiter durchgeführt.

Die Rekrutierung der Patienten fand am Korle Bu Teaching Hospital, Accra, am Komfo Anokye Teaching Hospital, Kumasi, an den Distrikt-Krankenhäusern in Obuasi, Agona, Mampong, Agogo, Konongo, Nkawie (*Ashanti Region*), Nkawkaw, Atibie (*Eastern Region*), Assin Fosu und Dunkwa (*Central Region*) sowie an 15 weiteren Polikliniken in Accra und Kumasi statt.

Die Diagnose einer Lungentuberkulose wurde durch den Nachweis von Mykobakterien in zwei unabhängigen Sputumproben, einer posterior-anterioren Röntgenaufnahme der Lunge und durch Kultivierung der Erreger auf Löwenstein-Jensen-Medium gesichert. Es wurden klinische Untersuchungen

sowie ein Test auf Humanes Immundefizienz Virus (HIV) durchgeführt. Zudem wurden demographische Daten erhoben. Die Tuberkulose-typischen Kardinalsymptome wurden mit standardisierten Fragebögen dokumentiert. Einschlusskriterien waren eine neu und erstmalig diagnostizierte Tuberkulose (TB), keine vorhergegangene Tuberkulose-therapie und ein Alter zwischen 9 und 60 Jahren. Ausschlusskriterien waren ein positiver HIV-Status, Alkohol- oder Drogenmissbrauch, eine mit Immunsuppression einhergehende Erkrankung und die Rücknahme der Einverständniserklärung. Alle Patienten wurden im Rahmen des vom Ghanaischen Nationalen Tuberkuloseprogramm (NTP) organisierten DOTS-Programms (*Directly Observed Treatment, Short-course*) behandelt. Die endgültige Fallgruppe wurde aus 2000 Patienten gebildet.

Die Kontrollgruppe bestand aus Individuen, die in engem Kontakt mit den Tuberkulosepatienten standen, jedoch nicht mit ihnen verwandt waren. Die Kontrollgruppe wurde in eine Kontaktgruppe und eine Nachbarschaftsgruppe unterteilt. Die Kontaktgruppe bestand aus Individuen, die mit Tuberkulosepatienten gemeinsam in einem Haushalt leben. Die Nachbarschaftsgruppe wurde aus Individuen gebildet, die in der Nachbarschaft der Tuberkulosepatienten leben. Anamnese und demographische Daten wie Geschlecht, Alter und Ethnie wurden dokumentiert. Es wurden körperliche Untersuchungen, Röntgenaufnahmen der Lunge und *Purified-Protein-Derivative* (PPD)-Tests (Tuberculin Test PPD Mérieux) durchgeführt. Gemäß den Herstellerangaben wurde der PPD-Test ab einer Hautinduration mit einem Durchmesser von mindestens 2 mm nach drei bis sieben Tagen als positiv bewertet. Ausschlusskriterien waren radiologische Anzeichen einer akuten oder zurückliegenden Tuberkulose, eine Abweichung von den definierten Altersgrenzen (6 bis 72 Jahre), Rücknahme der Einverständniserklärung und unvollständige Dokumentation. Die endgültige Kontrollgruppe bestand aus 2546 Individuen, wovon bei 2360 Kontrollpersonen der PPD-Test positiv war.

Die gesamte Studienpopulation setzte sich somit aus 4546 Personen zusammen. 1788 Studienteilnehmer waren Frauen (642 Fälle, 1146 Kontrollen), 2758 waren Männer (1358 Fälle, 1400 Kontrollen). Der Altersdurchschnitt der gesamten Gruppe betrug 33,1 Jahre. Die Studienteilnehmer gehörten den Ethnien Akan (Ashanti, Fante, Akuapem) (61,1 %), Ga-Adangbe (17,2 %), Ewe (8,2 %) und einer ethnisch heterogenen Gruppe aus dem Norden Ghanas (10,9 %) an. Diese wird im Folgenden *Northerners* genannt. Bei 2,6 % der Studienpopulation war keine ethnische Zuordnung möglich.

Den Studienteilnehmern wurden 15 ml Blut abgenommen. Hiervon wurden 10 ml in ein mit Citrat versetztes Röhrchen und 5 ml Blut in ein mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) versetztes Röhrchen gefüllt. Aus dem mit Citrat versetzten Blut wurden in Ghana B-Lymphozyten isoliert und der restliche Blutanteil zur Stabilisierung der DNA mit einem äquivalenten Volumen einer 8M Harnstoff-Lösung versetzt. Mit den Proben in den EDTA-Röhrchen wurde ein HIV-Test durchgeführt, der die Typen HIV-1 und HIV-2 nachweist.

2.1.2 Mykobakterielle Genotypen

Für die Klassifizierung der mykobakteriellen Genotypen wurden die Sputumproben der Patienten aufbereitet, auf Löwenstein-Jensen-Medium kultiviert und an das Nationale Referenzzentrum für Mykobakterien des Forschungszentrums Borstel versandt. Die Differenzierung der Mykobakterien wurde mit biochemischen und molekulargenetischen (*IS6110*-DNA-Fingerprinting, Spoligotyping) Methoden durchgeführt. Die Mykobakterien wurden nach phylogenetischen Gesichtspunkten unterteilt. Die Einteilung erfolgte nach der Nomenklatur der MIRU-VNTRplus Datenbank (www.miru-vntrplus.org). Die "modernen" *M. tuberculosis*-Stämme unterscheiden sich von den *M. africanum*-Stämmen durch die vorhandene RD9 (*region of difference 9*) und von der *Indo-Oceanic*-Gruppe durch die Deletion von Tb D1 (Gagneux et al., 2006). Die *M. africanum*-Stämme werden weiter in den *M. africanum*-Stamm *West-African-1* und den *M. africanum*-Stamm *West-African-2* unterteilt. Der *M.*

africanum-Stamm *West-African-1* weist die Deletion von RD711 auf. Der *M. africanum*-Stamm *West-African-2* ist durch die Deletion von RD702 aus der *M. bovis*-Abstammung gekennzeichnet. Die *M. tuberculosis* der *Euro-American*-Gruppe werden durch die Deletion von pks15/1, die *M. tuberculosis* der *East-Asian*-Gruppe durch Deletion von RD105 und die *M. tuberculosis* der *East-African-Indian*-Gruppe durch Deletion von RD750 definiert. Die graphische Darstellung der phylogenetischen Einteilung ist in Abbildung 2 dargestellt.

Es wurden insgesamt 1555 Isolate genotypisiert. Bei 319 Isolaten konnte keine eindeutige Zuordnung einer mykobakteriellen Spezies stattfinden.

2.1.3 Chemikalien, Biochemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Biochemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
10x Reaction Buffer BD	Solis BioDyne, Estland
10x Solution S	Solis BioDyne, Estland
Aqua ad injectabilia	Delta Select, Dreieich, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Osterode, Deutschland
HiDi™Formamid	Applied Biosystems, Foster City, USA
LiChrosolv®; HPLC-Wasser	Merck-Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂ (25mM)	Solis BioDyne, Estland
Sephadex™G-50 Superfine	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Ampuwa-Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HOT FIREPol DNA-Polymerase	Solis BioDyne, Estland
FIREPol DNA-Polymerase	Solis BioDyne, Estland
20 mM dNTP Mix	Solis BioDyne, Estland
Bromphenolblau	Sigma, Osterode, Deutschland
Mineralöl	Sigma, Osterode, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Ethidiumbromid	
EvaGreen	Biotrend, GmbH, Köln, Deutschland
100bp DNA-Längenstandard	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Xylencyanol	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tris-Base	Biomol, Hamburg, Deutschland
Tris-HCL	Biomol, Hamburg, Deutschland
EDTA	Biomol, Hamburg, Deutschland
Borsäure	Biomol, Hamburg, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Reagenziensysteme

Für die DNA-Isolation, die DNA-Amplifizierung und die Sequenzierreaktion wurden kommerziell hergestellte Reaktionssysteme (Kits) angewendet. Die Anwendung der Kits wird im entsprechenden Methodenteil erläutert.

Tabelle 2: Reagenziensysteme

Kitbezeichnung	Hersteller	Anwendung
<i>AGOWA® mag Maxi DNA Isolations Kit</i>	<i>AGOWA mag Maxi DNA Isolations Kit</i>	DNA-Isolation
<i>GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit</i>	<i>GE Healthcare, Uppsala, Schweden</i>	DNA-Amplifizierung
<i>BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i>	<i>Applied Biosystems, Foster City, USA</i>	Sequenzierreaktion

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Hersteller
Filterpipettenspitzen	Bioclean, 10-1000µl	<i>RAININ, Oakland, USA</i>
PCR-Platten	96- und 384-Well	Thermo Scientific, Hamburg, Deutschland
96er Mikrotiterplatten	Micropore	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße	0,5, 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plastikgefäße	0,2 µl bis 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Plastikgefäße	12 ml	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Sephadexplatte	Muliscreen HTS	<i>Millipore, Billerica, USA</i>

2.1.6 Puffer und Lösungen

Im Folgenden sind Puffer und Lösungen aufgelistet, die im Labor der Abteilung Molekulare Medizin des Bernhard-Nocht-Instituts hergestellt wurden.

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Reagenzien	Inhaltsstoffe	Konzentration
1xTE-PCR	Tris-HCL EDTA	10 mM 0,2 mM
1xTBE-Puffer	Tris-Base EDTA Borsäure Aqua destillata	108 g 7,4g 55 g ad 1 l
1xTE-Puffer	Tris-HCL EDTA Aqua destillata	10 mM 1mM
Ethidiumbromid-Lösung	Ethidiumbromid Aqua destillata	5 mg/ml
PCR-Farbladepuffer	Bromphenolblau Xylencyanol Glycerol	2,5 mg/ml 2,5 mg/ml 60%

Reagenzien	Inhaltsstoffe	Konzentration
Agarosegel	Agarose 1xTBE-Puffer	1,50%

2.1.7 Geräte

Tabelle 5: Geräte

Gerätetyp	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge	5414 Centrifuge D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	4 K 10	Sigma, Osterode, Deutschland
Zentrifuge	3 E – 1	Sigma, Osterode, Deutschland
<i>Thermocycler</i> , 96er Platten	Primus 96 plus	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
<i>Thermocycler</i> , 384er Platten	Primus 96 advanced	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Gradientencycler	T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Pipettierroboter	Genesis Workstation 200	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Pipettierroboter	Freedom Evo	Tecan, Crailsheim, Deutschland
<i>LightTyper</i>	<i>LightTyper 1.0</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
<i>LightCycler</i>	<i>LightCycler®480</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Volumenvariable Pipetten (2-1000µl)		<i>RAININ, Oakland, USA</i>
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank	LamininAir HB 2448	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Sequenziergerät	3100 Genetic Analyzer	<i>Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
Fluoreszenzkamera	-	Bio-Rad, Hercules, USA
Transilluminator	-	Bio-Rad, Hercules, USA
Elektrophoresekammer klein	Agagel Mini	Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer groß	BIO PAD	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland

2.1.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Biomers (Ulm, Deutschland) synthetisiert und in gefriergetrocknetem Zustand geliefert. Sie wurden mit TE-PCR-Puffer in Lösung mit einer Konzentration von 100 pmol/μl gebracht.

2.1.8.1 Oligonukleotide zur Sequenzierung und Genotypisierung mittels *High-Resolution-Melting* (HRM)

Tabelle 6: Oligonukleotide zur Sequenzierung und Genotypisierung mittels HRM

Bereich	Name	Sequenz (5'-3')
Promotor	CD14_T1_F	CCAATGTGTCTCTGTAAATACAT
	CD14_T1_R	GTGAACCTCATCTGTTGGCAC
Promotor	CD14_T2_F	GGAAGGGGAATTTTTCTTTAGAC
	CD14_T2_R	CCAGTACCATACTCTGCACTATC
Promotor	CD14_T3_F	TCCTTTTCTTGAACCTAATTCTACTAC
	CD14_T3_R	CATCTAGGGTTCTGTGTCTCCT
Promotor	CD14_T4_F	GGTTGGATAGTGCAGAGTATGG
	CD14_T4_R	GATGTCATTTCAGTTCCCTCCT
Promotor	CD14_T5_F	GCAGAATCCTTCCTGTTACG
	CD14_T5_R	TGGTCGATAAGTCTTCCGAAC
Exon 1, Intron 1	CD14_T6_F	CAGCCGAAGAGTTCACAAGT
	CD14_T6_R	GAAATCTTCATCGTCCAGCTC
Intron 1, Exon 2	CD14_T7_F	GCCTCCTAGACCTCTGCTC
	CD14_T7_R	GAGAGCCTTGACCGTGTC
Exon 2	CD14_T8_F	GGCGGTCTCAACCTAGAGC
	CD14_T8_R	CACGACACGTTGCGTAGG
Exon 2	CD14_T9_F	CCTAAAGATAACCGGCACCA
	CD14_T9_R	AACTTGTGGGGACAGAGAGC

F: Vorwärtsoligonukleotide; R: Rückwärtsoligonukleotide

2.1.8.2 Oligonukleotide zur Genotypisierung mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

Tabelle 7: Oligonukleotide zur Genotypisierung mittels FRET

SNP Position	Name	Sequenz (5'-3')	Modifikation
-618	CD14_-618-F	TTATGTTGATCTCCTGCCAC	

SNP Position	Name	Sequenz (5'-3')	Modifikation
	CD14_-618-R	GTTATTACTTAATCAAAGGAGCAAGG	
	CD14_-618-S	TCTACCCCCCTTGGTGCCAA	3' 6-Fam
	CD14_-618-A	AGATGAGGTTACAATCTCTTCCACAAAACATGCA	5' Cy5 3' Phosphat
-260	CD14_-260-F	TTCCTGGAAATATTGCAATGAAG	
	CD14_-260-R	GTAGATTCTCTGGGATATAAGGTA	
	CD14_-260-S	TACGGCCCCCTCCC	5' Cy5 3' Phosphat
	CD14_-260-A	CCCTAGATGCCCTGCAGAATCCTTCCT	3' 6-Fam
-135	CD14_-135-F	GATAAGTCTTCCGAACCTCTG	
	CD14_-135-R	GAATCCTTCTGTTACGGTC	
	CD14_-135-S	ACAGTTTATGCAATCCTGGGATG	5' Cy5 3' Phosphat
	CD14_-135-A	ACTTGTGAACTCTTCGGCTGCCTCT	3' 6-Fam
535	CD14_535-F	TCGAGGACCTAAAGATAACCG	
	CD14_535-R	TAAGGGCCGGGAAGG	
	CD14_535-S	GACACGTTGCGCAGG	3' 6-Fam
	CD14_535-A	GCAAGCTGGAAAGTGCAAGTCCTG	5' Cy5 3' Spacer C3
1189	CD14_1189_F	AGTTTGAGTCCATTATTCTG	
	CD14_1189_R	GGAACAGGTGCCTAAAGGAC	
	CD14_1189_S	GGCCCCTTGGAGCAGCA	3' 6-Fam
	CD14_1189_A	AGGGTTCCCGACACCCCCAC	5' Cy5 3' Phosphat

F: Vorwärtsoligonukleotid; R: Rückwärtsoligonukleotid; S: *Sensor*; A: *Anchor*; 6-Fam: 6-Famphosphoramidit; Cy5: Cyanin; SNP: Einzelnukleotidaustausch

2.1.9 Elektronische Datenbanken und Datenverarbeitungsprogramme

Tabelle 8: Elektronische Datenbanken und Datenverarbeitungsprogramme

Anwendung	Programm/Datenbank	Quelle
Genetische Informationen	<i>National Center for Biotechnology Information (NCBI)</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Anwendung	Programm/Datenbank	Quelle
Datenbank (Publikationen)	<i>PubMed</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Datenbank (SNPs)	<i>Chip Bioinformatics</i>	http://snpper.chip.org/
Sequenzanalyse	<i>SeqScape Software v2.1.1.</i>	<i>Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
Sequenzanalyse	<i>Sequencing Analysis Software</i>	<i>Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
Primerdesign	<i>Primer3</i>	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm
Primerdesign	<i>LightCycler Probe Design Software 2.0</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Primerabgleich am humanen Genom	<i>Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=9606
Statistische Auswertung	<i>STATA 9.0</i>	<i>StataCorp, College Station, USA</i>
Textverarbeitung	<i>Microsoft Word X für MA</i>	<i>Microsoft Cooperation</i>
	<i>Microsoft Word 2007 für Windows</i>	
Literaturverwaltung	<i>Endnote X</i>	<i>Thompson IST Research Group</i>
Powerberechnung	<i>CaTS</i>	http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/
Haplotypenanalyse	<i>Haploview</i>	www.broadinstitute.org/haploview/haploview
Haplotypenberechnung	<i>UNPHASED 3.0.13</i>	

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung aus dem Vollblut der ghanaischen Studienpopulation erfolgte mit dem AGOWA[®] *mag Maxi DNA Isolation Kit*. Bei dieser Methode wird die DNA durch Bindung an Magnetpartikel aus dem Vollblut extrahiert.

Durch Hinzufügen einer Protease werden die Zellen zunächst lysiert. Die DNA wird freigesetzt und bindet an magnetische Partikel. Durch magnetische Trennung bildet sich am Boden des Reaktionsgefäßes ein Niederschlag mit den DNA-gebundenen Partikeln. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen. Es

folgen drei Waschvorgänge und anschließende Elution der DNA. Die isolierte DNA wird bei 4°C gelagert.

2.2.2 Phi-Amplifizierung

Die Phi-Amplifizierung erfolgte mit dem *GenomiPhi V2 Amplification Kit*. Diese Methode wird zur Vervielfältigung der gesamten genomischen DNA (*whole genome amplification, WGA*) eingesetzt. Bei diesem auf Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) basierten Verfahren werden unspezifische hexamere Oligonukleotide (*random primer*) eingesetzt. Durch die unspezifische Bindung wird die Replikation der genomischen DNA gleichzeitig an unterschiedlichen DNA-Abschnitten begonnen. Es entstehen Amplifikate mit einer Länge von über 10 kb. Mit der Phi-Amplifizierung können aus 10 ng genomischer DNA 4 bis 7 µg amplifizierte DNA hergestellt werden. Die amplifizierte DNA wurde mithilfe eines Pipettierroboters in 384-Loch-Platten verteilt und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction; PCR*) wurde bei der Sequenzierung (2.2.4), dem *High-Resolution-Melting* (2.2.8) und der Genotypisierung mittels FRET (2.2.12) eingesetzt.

Mithilfe dieser Methode werden definierte DNA-Abschnitte in mehreren Temperaturzyklen exponentiell vervielfältigt. In einem PCR-Reaktionsansatz befinden sich grundsätzlich neben der zu vervielfältigenden DNA spezifische Oligonukleotide (*Primer, forward primer* und *reverse primer*), die Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) (Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP)), hitzebeständige Taq-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird, und magnesium-haltiger Reaktionspuffer. Die Reaktion beginnt mit der Denaturierung der DNA bei 95°C. Danach werden sich wiederholende Zyklen mit folgenden Schritten durchlaufen: Die Oligonukleotide lagern sich am 3'-Ende der Einzelstrang-Matrizen bei einer

spezifischen Temperatur an (*annealing*-Temperatur). Bei 72°C verlängert die Taq-Polymerase ausgehend von den Oligonukleotiden den neuen DNA-Strang in 5'-Richtung. Dabei werden die dNTPs komplementär an die DNA Einzelstrang-Matrize angelagert. Danach erfolgt eine erneute Denaturierung bei 95°C. Das definierte DNA-Fragment wird durch diese Reaktion exponentiell vervielfältigt. In der Tabelle 11 ist der Reaktionsansatz exemplarisch für die Methode des *High Resolution Melting* (2.2.8) dargestellt.

2.2.4 Sequenzierreaktion nach der Kettenabbruchmethode

Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem *BigDye® Terminator v3.1* durchgeführt. Die Reaktion beruht auf dem gleichen Prinzip wie die PCR. In dem Reaktionsansatz befinden sich jedoch neben den Standardreagenzien fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs). Die ddNTPs besitzen keine Hydroxylgruppe am 3' Ende. Diese wird von der DNA-Polymerase benötigt, um die entstehende Oligonukleotidkette zu verlängern. Wird also anstelle eines dNTPs ein ddNTP eingebaut, kommt es zu einem Kettenabbruch. Durch die sich wiederholenden Zyklen entstehen unterschiedliche lange DNA-Fragmente, die je nach ddNTP mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (Sanger et al., 1977). Die Sequenzierreaktionen werden nur mit einem Oligonukleotid durchgeführt. Um ein optimales Ergebnis zu erlangen, wird jede Reaktion mit Vorwärts- und Rückwärtsoligonukleotiden durchgeführt. In den folgenden Tabellen sind Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen dargestellt.

Tabelle 9: Reaktionsansatz der Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode

Substanz	Konzentration	Volumen/Ansatz in µl
Puffer ABI		3
Vorwärts-/Rückwärts-oligonukleotid	5 pmol/µl	1
BigDye-Mix		1
PCR-Produkt		1
Aqua destillata		4

Gesamt-Volumen	10
----------------	----

Tabelle 10: Reaktionsbedingung der Sequenzierreaktion

Schritte	Temperatur in °C	Dauer	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	96	5 min	1
2. Denaturierung	96	30 s	Schritt 2-4: 24
3. Annealing	50	15 s	
4. Elongation	60	4 min	

2.2.5 Aufreinigung der Produkte der Sequenzierreaktion

Die Produkte der Sequenzierreaktion werden mithilfe des Sephadex/Micropore-System für die folgende Sequenzanalyse gereinigt. Es werden spezielle 96-Loch-Platten, die am Boden einen eingelassenen Filter besitzen, mit Sephadex-Pulver gefüllt. Durch Hinzufügen von HPLC-Wasser quillt das Pulver auf und bildet einen Filter. Die Produkte der Sequenzierreaktion werden hinzugefügt. Durch Zentrifugation werden sie durch den Filter gepresst und mithilfe einer 96-Loch-Mikrotiterplatte aufgefangen. Nebenprodukte wie überschüssige Oligonukleotide und dNTPs werden im Pulver zurückgehalten. Nach der Reinigung werden die Produkte mit HiDi-Formamid gemischt (4µl Produkt auf 12µl HiDi-Formamid). Durch das Formamid werden die Produkte denaturiert, so dass für die Sequenzanalyse DNA-Einzelstränge vorliegen.

2.2.6 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse erfolgt automatisch mit dem *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer*. Hierbei werden die Produkte der Sequenzierreaktion mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Nach Anregung durch Laserstrahlen wird die entstehende Fluoreszenz der unterschiedlich langen Kettenabbruchprodukte vom Gerät detektiert. Die Abfolge der detektierten Fluoreszenzfarbstoffe stellt die Sequenz der Basen des sequenzierten Produkts dar.

2.2.7 Entwurf der Oligonukleotide für die Genotypisierung mittels *High-Resolution-Melting* (HRM)

Die Oligonukleotide für das HRM (Erläuterung der HRM-Methode unter 2.2.8) und für die Sequenzierung wurden mit den Programmen *Primer3* und *LightCycler®Probe Design Software 2.0* entworfen.

Auf der bekannten genomischen Sequenz *NCBI Reference Sequence* NG_023178.1 (http://www.NCBI.nlm.nih.gov/nuccore/NG_023178.1) wurde der Abschnitt festgelegt, der von Interesse war. Dieser beinhaltet die Promotorregion (bis 1000kb in 5' Richtung vom Startcodon), die zwei Exone, das Intron und die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) des *CD14*-Gens.

Verschiedene Aspekte wurden für die Auswahl der Oligonukleotide beachtet. Für die HRM-Methode sollten die Amplifikate eine Länge von ca. 300 Basenpaare (bp) haben und 500 bp nicht überschreiten. Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, wurde der zu untersuchende Abschnitt mit einer Länge von ca. 2500 bp in mehrere Segmente geteilt und die Primer so gewählt, dass sich die Amplifikate überlappen.

Für jeden zu amplifizierenden Abschnitt wurden jeweils ein komplementäres Oligonukleotid für das 3'-Ende (*forward primer*) und einer für das 5'-Ende (*reverse primer*) hergestellt. Die Oligonukleotide sollten eine Länge zwischen 18 und 25 Nukleotiden nicht überschreiten und die Basen Adenin (A) und Thymin (T) ungefähr in gleicher Verteilung wie die Basen Guanin (G) und Cytosin (C) aufweisen. Des Weiteren sollten die *annealing*-Temperaturen der Oligonukleotide bei etwa 60°C liegen. Mithilfe der *LightCycler®Probe Design Software 2.0* wurde der Ausschluss von Oligonukleotid-Dimeren garantiert. Die Oligonukleotidsequenzen wurden mittels des Programms *basic local alignment search tool* (BLAST) mit der humanen Gensequenz abgeglichen und somit die Spezifität der Oligonukleotide ermittelt.

2.2.8 Genotypisierung mittels *High-Resolution-Melting* (HRM)

Das HRM wurde zur Detektion von Einzelnukleotidaustauschen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) eingesetzt. Das Prinzip des HRM beruht auf dem unterschiedlichen Schmelzverhalten von Homo- und Heteroduplexen.

Initial wird eine PCR durchgeführt. Dem PCR-Reaktionsansatz wird zusätzlich zu den Standard-Reagenzien ein DNA-interkalierender Farbstoff (*EvaGreen*) hinzugefügt. Dieser Farbstoff fluoresziert, wenn er an doppelsträngiger DNA (dsDNA) gebunden hat. Nach der PCR werden die Amplifikate durch Temperaturerhöhung denaturiert. Durch folgende schnelle Temperatursenkung lagern sich die DNA-Einzelstränge zu DNA-Duplexen zusammen. Ist die DNA-Probe heterozygot, entstehen Homo- und Heteroduplexe. Danach wird die Temperatur langsam bis 95°C erhöht, die Duplexe schmelzen, wobei die Heteroduplexe aufgrund der nicht komplementären Basenpaare bei einer anderen Temperatur dissoziieren als die Homoduplexe. Der interkalierende Farbstoff löst sich bei dem Schmelzvorgang von der dsDNA und fluoresziert nicht mehr. Die Fluoreszenzabnahme wird mit einer hochauflösenden Kamera detektiert. Der PCR-HRM-Reaktionsansatz ist beispielsweise für das Oligonukleotidpaar CD14_T8_F/CD14_T8_R in Tabelle 11 aufgeführt. Die Reaktionsbedingung desselben Oligonukleotidpaares werden in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11: Reaktionsansatz des HRM

Substanz	Konzentration	Volumen/Ansatz in μl	Finale Konzentration
Puffer BD	10x	1	1x
MgCl ₂	25 mM	1,2	3 mM
Vorwärtsoligonukleotid	100 pmol/ μ l	0,05	0,50 μ M
Rückwärtsoligonukleotid	100 pmol/ μ l	0,05	0,50 μ M
EvaGreen 20x		0,5	
dNTPs	10 mM each	0,2	200 μ M
DMSO		0,5	
HotFirePol	5 U/ μ l	0,4	2,00 U/rxn
DNA	5 ng/ μ l	2	10,00 ng/rxn

Substanz	Konzentration	Volumen/Ansatz in μl	Finale Konzentration
Aqua destillata		4,1	
Gesamt-Volumen		10	

Tabelle 12: Reaktionsbedingung des HRM

Schritte	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Dauer	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	95	15 min	1
2. Denaturierung	95	15 sec	Schritte 2-4: 45
3. Annealing	58	30 sec	
4. Elongation	72	30 sec	

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die amplifizierte DNA-Produkte wurden zur Kontrolle und Größenbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die PCR-Produkte werden mit einem Ladebuffer, der Glycerol und die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol enthält, gemischt (1 μl PCR Produkt und 3 μl Ladebuffer) und auf ein 1,5% Agarosegel, das mit Ethidiumbromid versetzt ist, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 110V für 25 min.

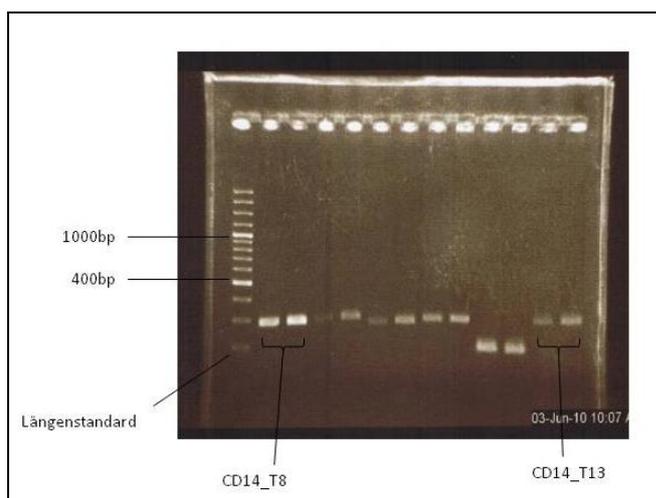


Abbildung 5: Agarose-Gelelektrophorese der Amplifikate der Oligonukleotidpaare CD14_T8 bis CD14_T13

2.2.10 Auswahlkriterien für die Varianten im *cd14*-Gen, die in der gesamten Studienpopulation genotypisiert wurden.

Die zu untersuchende Sequenz des *CD14*-Gens für die Genotypisierung wurde auf -650 bp ausgehend vom Startkodon in 5'-Richtung, die beiden Exone und das Intron festgelegt. Zunächst wurden 364 Personen auf bekannte und unbekannte Varianten im *CD14*-Gen untersucht. Um eine ausreichende statistische Power zu gewährleisten, wurden aus den 16 detektierten Varianten die SNPs ausgewählt, bei denen die Häufigkeit des selteneren Allels (MAF) mindestens 0,01 betrug, um sie in der gesamten Studienpopulation zu genotypisieren. Des Weiteren wurden Varianten ausgewählt, die einen Aminosäureaustausch bedingen, da diese zu einer funktionellen Änderung des CD14 Proteins führen können. Ebenfalls wurden die exonischen Varianten mit synonymen Aminosäureaustauschen genotypisiert.

Eine genaue Auflistung und Darstellung der Varianten ist im Ergebnisteil unter 3.5 dargestellt.

2.2.11 Entwurf der Oligonukleotide für die Genotypisierung mittels *fluorescence resonance energy transfer (FRET)*

Aus den mittels HRM detektierten *SNPs* wurden vier ausgewählt, um sie mit der *fluorescence resonance energy transfer (FRET)* Methode (2.2.12) in der gesamten Studienpopulation zu analysieren. Für diese Genotypisierung wurden für jeden SNP mithilfe der *LightCycler Probe Design Software 2.0* ein Vorwärts- und ein Rückwärtsoligonukleotid entworfen. Diese Oligonukleotide sollten ebenfalls die in 2.2.7 genannten Bedingungen erfüllen. Die Amplifikate sollten eine Länge von 300 bp nicht überschreiten.

Zusätzlich wurden für jeden SNP zwei fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide entworfen. Diese Oligonukleotide wurden komplementär zu der Mutation (Sensor) und zu dem direkt angrenzenden Bereich (Anker) gewählt. Der Abstand zwischen diesen Oligonukleotiden sollte fünf Basen nicht überschreiten. Die Schmelztemperatur des Sensors sollte bei 65°C liegen. Um einen sicheren Energietransfer während der Schmelzanalyse gewährleisten zu

können, sollte die Schmelztemperatur des Ankers um etwa 5°C höher liegen. Die Oligonukleotide sind an ihrer zugewandten Seite mit fluoreszierenden Molekülen (6-FAM-phosphoramid und 5-Cyanin) markiert. Das an dem 5'-Ende mit einem Fluorophor markierte Oligonukleotid muss am 3'-Ende phosphoryliert werden, um eine Elongation während der PCR zu verhindern.

2.2.12 Genotypisierung mittels *FRET*

Diese Methode wurde eingesetzt, um fünf der ausgewählten Varianten (-618 Insertion(A), -260C/T, -135A/G, 535A/G, 1189G/C) im gesamten Studienkollektiv zu bestimmen. Die Methode beruht auf der strahlungsfreien Übertragung von Energie von einem angeregten Farbstoff (Donor) auf einen zweiten Farbstoff (Akzeptor). Die Übertragung der Energie ist abhängig von der Entfernung zwischen Donor und Akzeptor (bzw. Sensor und Anker). Diese beträgt normalerweise 10 nm. Das Absorptionsspektrum des Akzeptors muss mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappen. In dissoziiertem Zustand emittiert der Donor die Energie. Liegen Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe, wird die Energie von Donor auf Akzeptor übertragen, und der Akzeptor emittiert die Energie.

Für die Genotypisierung wird zunächst eine spezielle PCR (Reaktionsansatz in Tabelle 13, Reaktionsbedingungen in

Tabelle 14) durchgeführt, bei der Sensor und Anker mit dem zu untersuchenden DNA-Abschnitt hybridisieren. In dem *LightTyper* werden die hybridisierten Proben mit Licht im Absorptionsspektrum des Donors bestrahlt. Durch die räumliche Nähe von Donor und Akzeptor wird die Energie durch den Akzeptor emittiert. Durch eine kontinuierliche Temperaturerhöhung (0,1°C/s, 40°C-80°C) und den damit hervorgerufenen Schmelzvorgang löst sich der Sensor aufgrund seiner niedrigeren Schmelztemperatur früher von der DNA als der Anker. Durch die räumliche Trennung wird die Energie von dem Anker emittiert. Bei höheren Temperaturen löst sich ebenfalls der Anker von der DNA ab. In der Regel wird der Sensor komplementär zum Wildtyp entworfen. Bei einer Mutation

dissoziierte der Sensor durch die nicht-komplementäre und somit instabilere Bindung eher von der DNA als beim Wildtyp. Durch die entstehenden Schmelzkurven lassen sich Wildtyp, heterozygote und homozygote Mutante voneinander unterscheiden (s. Abbildung 6).

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die Genotypisierung mittels FRET

Substanz	Konzentration	Volumen/Ansatz in μl	Finale Konzentration
Puffer BD	10x	1	1x
Solution S	10x	1	1x
MgCl ₂	25 mM	1,2	3mM
Vorwärtsoligonukleotid	100 pmol/ μl	0,05	0,500 μM
Rückwärtsoligonukleotid	100 pmol/ μl	0,01	0,100 μM
Anchor	100 pmol/ μl	0,02	0,200 μM
Sensor	100 pmol/ μl	0,02	0,200 μM
dNTPs	10 mM each	0,2	200 μM
Taq-Polymerase	5 U/ μl	0,2	1,00U/rxn
DNA	5 ng/ μl	2	10,00ng/rxn
Aqua destillata		4,3	
Gesamt-Volumen		10	
Öl		6	

Tabelle 14: Reaktionsbedingung für die Genotypisierung mittels FRET

Schritte	Temperatur in °C	Dauer	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	94	3 min	1
2. Denaturierung	94	20 s	Schritt 2-4: 45
3. Annealing	58	30 sec	
4. Elongation	72	30 sec	
5. Finale Elongation	72	5 min	1

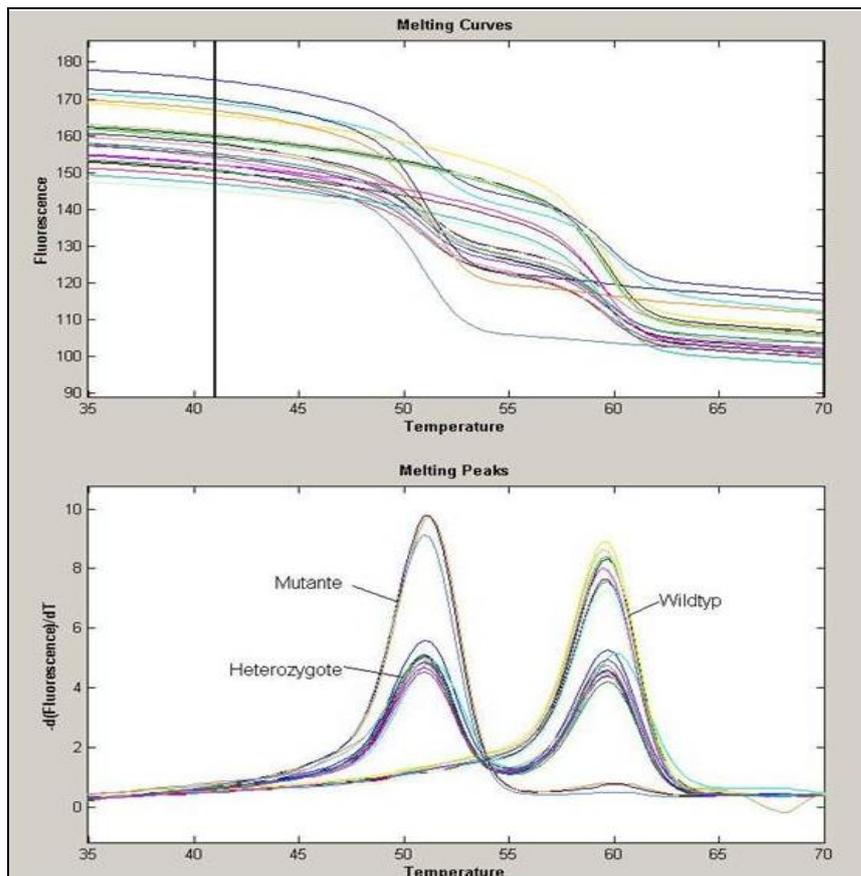


Abbildung 6: Schmelzkurven einer Genotypisierung mittels der FRET-Methode im *LightTyper 1.0*

2.3 Statistische Verfahren

2.3.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gesetz wird zur Berechnung der Verteilung von Genotypen für biallelische Mutationen eingesetzt. Man geht bei dem Hardy-Weinberg-Gesetz (HWG) von einer idealen Population aus: große Anzahl von Individuen, Panmixie, keine Selektion und Mutation (konstante Genfrequenz) und keine Migration. In der natürlichen Population sind diese Bedingungen nicht gegeben, jedoch wird das HWG als Modell zur populationsgenetischen Betrachtung eingesetzt. Betrachtet man einen Genlocus mit den Allelen A und a und geht davon aus, dass A die Häufigkeit p und a die Häufigkeit q hat, dann gilt $p+q=1$. Die Genotypen sind AA mit einer Häufigkeit von p^2 , Aa mit einer

Häufigkeit von $2pq$ und aa mit einer Häufigkeit von q^2 . Es gilt $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$.

Abweichungen vom HWG können auf Genotypisierungsfehler, selektive Paarung (Inzucht) oder Existenz von Subpopulationen (verschiedene Ethnien) hinweisen. Bei einer signifikanten Abweichung des HWGs in der Studienpopulation kann auch eine Assoziation mit Erkrankung an TB in Betracht gezogen werden.

2.3.2 Powerberechnung

Die statistische Power oder Teststärke gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein statistischer Test eine richtige Alternativhypothese als solche entdeckt. Die statistische Power hängt von verschiedenen Faktoren ab. Fallgröße, Signifikanzniveau und die anzunehmende Größe des nachzuweisenden Effekts gehen in die Berechnung der Power mit ein. Die Effektstärke ist in diesem Fall die Tuberkulose-Inzidenz in Ghana und wird auf 0,003 geschätzt. Beim multiplikativen Modell liegt die Wahrscheinlichkeit bei dieser Studienpopulation ein relatives Risiko von 1,3 mit einer Frequenz des Risikoallels von 0,1 mit einer Signifikanz von $<0,05$ nachzuweisen bei über 90%.

2.3.3 Assoziationsanalyse

In dieser genetischen Assoziationsstudie sollen statistische Zusammenhänge zwischen den gefundenen genetischen Varianten und dem Phänotyp (krank/gesund) untersucht werden. Zur Analyse von dichotomen abhängigen und mindestens einer unabhängigen Variablen wird die logistische Regression eingesetzt. Die abhängige Variable ist in diesem Fall der Phänotyp. Als unabhängige Variable wird eine der genetischen Variationen eingesetzt. Dieses Modell wird durch Einsetzen von mehreren unabhängigen Variablen auf ein multiples logistisches Regressions-Modell erweitert. Hier kann bei der Betrachtung zwischen der abhängigen und einer der eingesetzten unabhängigen Variablen vom adjustierten *Odds Ratio* gesprochen werden. Für

die Berechnung von abhängigen Variablen, die mehr als zwei Merkmale aufweisen, wird die ordinal logistische Regression eingesetzt.

Als Nullhypothese wird angenommen, dass keine Assoziation zwischen Phänotyp und den genetischen Varianten besteht. Liegt der p-Wert unter dem festgelegten Signifikanzniveau α , so kann die Nullhypothese abgelehnt und die Alternativhypothese („Es besteht eine Assoziation zwischen Phänotyp und genetischer Variante“) angenommen werden. Der p-Wert ist das Ergebnis eines statistischen Signifikanztests. Das Signifikanzniveau α bezeichnet die maximale Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie richtig ist (Fehler 1. Art). Das Signifikanzniveau α wird vor der Datenerhebung festgelegt und liegt in dieser Untersuchung bei 5%. Das Konfidenzintervall liegt bei 95%.

Da bei Fall-Kontroll-Studien keine Aussage zum Relativen Risiko gemacht werden können, werden die Wahrscheinlichkeitsverhältnisse als *Odds Ratios* (ORs) angegeben. Die *Odds* (Chance) wird errechnet, indem man die Wahrscheinlichkeit (*probability*, P) krank zu sein durch die Wahrscheinlichkeit gesund zu sein dividiert ($P(\text{krank})/P(\text{gesund})$). Die *Odds Ratio* vergleicht die Quotienten zweier Gruppen miteinander.

Um den unterschiedlichen Vererbungsmodi gerecht zu werden, werden additive, rezessive und dominante Modelle berechnet. Die Assoziationsanalyse wird mit dem Programm STATA 9.0 gerechnet.

2.3.4 Haplotypenberechnung

Haplotypen bezeichnen genetische Varianten, die gemeinsam vererbt werden. Um das Maß des Vorkommens einer Allelkombination zweier Loci auf einem Haplotypen in einer Population zu bestimmen, nutzt man das Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*; LD). Je größer das LD, desto größer ist die gemeinsame Vererbung. Die Haplotypenanalyse erfolgt mit dem Programm *Haploview*. Die Haplotypenberechnung mit dem Programm *UNPHASED* 3.10.13.

2.3.5 Bonferroni-Korrektur

In der vorliegenden Untersuchung werden mit einer Stichprobe mehrere Hypothesen getestet. Durch dieses multiple Testen steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Ergebnis fälschlicherweise signifikant ist. Eine Möglichkeit den Anstieg der Fehlerwahrscheinlichkeit zu kontrollieren ist die Bonferroni-Korrektur. Hierbei wird das Signifikanzniveau α durch die Anzahl der angewendeten Teste dividiert. In dieser Studie werden acht SNPs untersucht, so dass der generelle Korrekturdivisor bei 8 liegt. Bei Stratifikation nach Geschlecht oder Ethnie wurde ein zusätzlicher entsprechender Korrekturfaktor angewendet.

3 Ergebnisse

In diesem Teil der Arbeit werden zunächst allgemeine Beobachtungen zu der Studienpopulation (Alter, Geschlecht, Ethnien) und die Verteilung der mykobakteriellen Genotypen dargestellt. Darauf folgend werden die Resultate der Genotypisierung von 368 Studienteilnehmern mit *High Resolution Melting* (HRM) erläutert. Anschließend werden die Ergebnisse der Genotypisierung der ausgewählten Varianten im gesamten Studienkollektiv dargestellt.

3.1 Allgemeine Beobachtung der Studienpopulation

Die Studienpopulation besteht aus 4546 Individuen. Von diesen sind 1788 Personen Frauen und 2758 Männer. Die Unterteilung nach Fällen und Kontrollen sowie Geschlecht ist in Abbildung 7 dargestellt. Das Alter der Studienpopulation ist in Tabelle 15 angegeben.

Auffallend ist, dass die Anzahl der Männer bei Fällen und Kontrollen annähernd gleich ist, während sich die weiblichen Studienteilnehmer wesentlich häufiger in der Kontrollgruppe (64,09%) als in der Fallgruppe (35,91%) befinden (OR=0,5725, p=0,000).

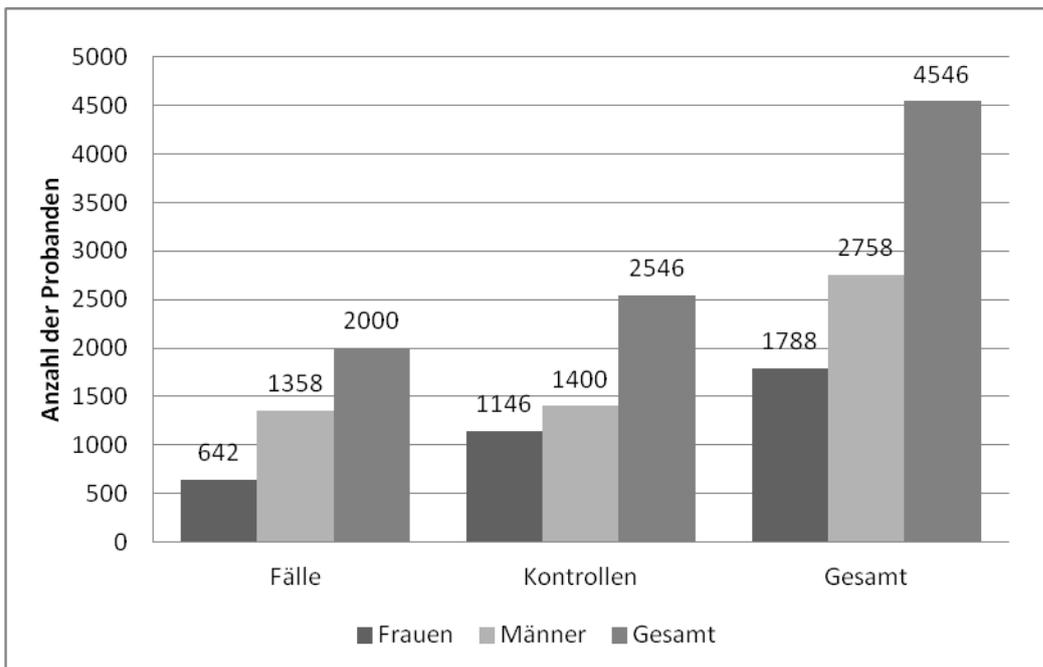


Abbildung 7: Verteilung der Fälle und Kontrollen zwischen den Geschlechtern und Gesamt

Tabelle 15: Durchschnittsalter der Fälle, Kontrollen und Gesamt

	Alter in Jahre (min-max)
Fälle	34,1 (9-60)
Kontrollen	32,3 (6-72)
Gesamt	33,1 (6-72)

3.2 Verteilung der Ethnien

Die Studienteilnehmer gehören unterschiedlichen in Ghana ansässigen Ethnien an. Bei 116 Individuen konnte keine eindeutige Zuordnung zu einer Ethnie geleistet werden. Eine signifikante Assoziation zwischen Ethnie und Erkrankung an Lungentuberkulose konnte nicht festgestellt werden. In Abbildung 8 ist die Verteilung der Ethnien unter den Studienteilnehmern dargestellt. In Tabelle 16 ist die Verteilung zwischen Fällen und Kontrollen der Ethnien dargestellt.

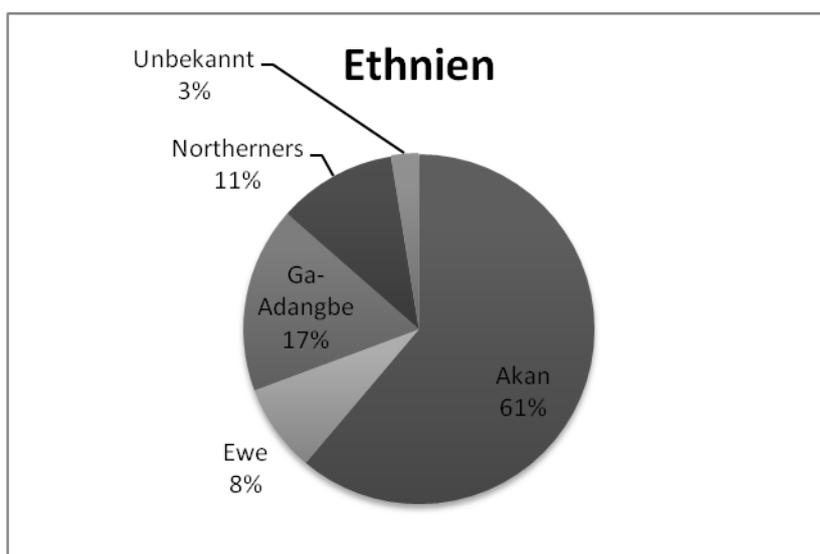


Abbildung 8: Ethnien der Studienteilnehmer

Tabelle 16: Verteilung der Ethnien

Ethnie	Fälle (%)	Kontrollen (%)	Total
Akan	1288 (64,4)	1491 (58,56)	2779
Ewe	139 (6,95)	232 (9,11)	371
Ga-Adangbe	290 (14,5)	493 (19,36)	783
Northerners	244 (12,2)	253 (9,94)	497
Unbekannt	39 (1,95)	77 (3,02)	116
Total	2000	2546	4546

3.3 Verteilung der mykobakteriellen Genotypen

Die Genotypisierung der Mykobakterien im Forschungszentrum Borstel erfolgte bei 1555 Isolaten. Bei 319 Isolaten konnte keine eindeutige Zuordnung einer mykobakteriellen Spezies erfolgen. Tabelle 17 zeigt die Verteilung der typisierten Mykobakterien des MTBKs.

Tabelle 17: Verteilung der mykobakteriellen Genotypen

Gruppe	Genotyp	Fälle	Fälle in %
M. tuberculosis	TB 1	137	8,8

Gruppe	Genotyp	Fälle	Fälle in %
	TB 2	472	30,4
	Haarlem	103	6,6
	Dehli	13	0,8
	Beijing	10	0,6
	EAI	20	1,3
M.africanum	West-African-1	335	21,5
	West-African-2	136	8,7
M. bovis	Bov	10	0,6
Nicht klassifizierbar		319	20,5

TB: Tuberculosis, EAI: East-African-Indian-Gruppe, Bov: Bovis

3.4 Genotypisierung von *CD14* mit *High-Resolution-Melting* bei 368 Individuen

Die genetische Sequenz des *CD14*-Gens wurde bei 368 Personen der Studienpopulation mithilfe des *High-resolution-Melting* (HRM) untersucht. Es ergab sich eine Anzahl von 368 Personen, da zu Beginn dieser Studie die Identifizierung von bekannten und unbekanntem Varianten im *CD14*-Gen in einem repräsentativen Studienkollektiv der gesamten Studienpopulation erfolgen sollte. Die DNA der Studienpopulation lag zum Zeitpunkt des Beginns dieser Studie in 384-Loch-Platten vor. Es wurde eine 384-Loch-Platte ausgewählt, auf der Fälle und Kontrollen sowie Frauen und Männer gleichermaßen verteilt sind. Unter den 368 Personen sind 214 Fälle und 154 Kontrollen.

Als Referenzsequenz wird in der vorliegenden Arbeit die *NCBI Reference Sequence* NG_023178.1 (http://www.NCBI.nlm.nih.gov/nuccore/NG_023178.1) genutzt. Diese Referenz ist der Referenz-Standard des *RefSeqGene* Projekts (<http://www.NCBI.nlm.nih.gov/RefSeq/>).

Es wurde der folgende Bereich des *CD14*-Gens mit 13 Oligonukleotidpaaren genotypisiert: der Promotor (bis 1000 bp in 5'-Richtung vom Startkodon ausgehend), die zwei Exone, das Intron und die 3'UTR (zur schematischen

Darstellung s. Abbildung 10). Die Schmelzkurven wurden analysiert und die Proben mit unterschiedlichen Schmelzverhalten sequenziert. Dadurch konnten den Schmelzkurven spezifische *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) zugeordnet werden.

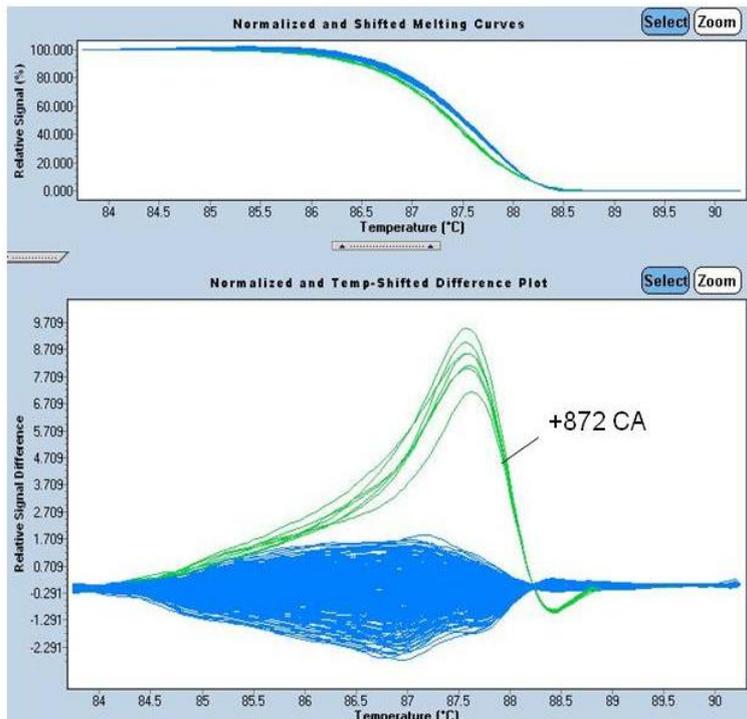


Abbildung 9: Schmelzkurve des "CA"-Genotyps der Variante +872

In dem untersuchten Bereich fanden sich insgesamt 16 Polymorphismen. Fünf SNPs waren exonisch (Exon 2) lokalisiert. Zwei davon kodieren für einen nicht-synonymen Aminosäureaustausch und drei für einen synonymen Austausch. Im Promotorbereich fanden sich neun Polymorphismen - acht Einzelnukleotidaustausche und eine Insertion eines Nukleotids. Zwei SNPs fanden sich in der 3'UTR. Sechs der gefundenen Polymorphismen waren bekannt, die weiteren zehn waren weder in der Datenbank für Polymorphismen (dbSNP) des *National Center for Biotechnology* (NCBI) noch in der Datenbank *Chip Bioinformatics* aufgeführt.

Die folgende Tabelle 18 gibt eine Übersicht zu Lokalisation und Art der Mutation; sofern eine rs-Nummer (rs: *reference SNP*) bekannt war, wurde sie

mit aufgeführt. Für jede untersuchte Variante wird die Häufigkeit des selteneren Allels (*minor allele frequency*, MAF) angegeben. Die MAF wurde für die 364 untersuchten Proben mit dem Programm *HaploView* berechnet. Im Weiteren werden die gefundenen SNPs nach ihrer Position ausgehend vom Startkodon benannt.

Tabelle 18: Genetische Varianten

Region	Position	Rs-Nummer	N-Austausch	AS-Austausch	MAF
Promotor	-999		A/C		0,1818
	-974		G/A		0,0909
	-911	rs5744454	A/C		0,384
	-722		A/G		0,1818
	-713		A/G		0,0909
	-691		A/G		0,3636
	-618		Ins (A)		0,1847
	-260	rs2569190	C/T		0,284
Exon2	-135	rs34424920	A/G		0,021
	337		T/A	Ala83Ala	0,0014
	535		A/G	Leu149Leu	0,00272
	872		C/A	Arg262Ser	0,0054
	953		G/T	Glu289STOP	0,00137
3'UTR	1189	rs4914	G/C	Leu367Leu	0,056
	1362	rs5744456	G/T		0,00408
	1332	rs2563298	T/A		0,357

N: Nukleotid, AS: Aminosäure, MAF: Minor allele frequency, Ala: Alanin, L: Leucin, Arg: Arginin, Ser: Serin, Glu: Glutamat

3.5 Auswahl der genetischen Varianten für die Genotypisierung

Die zu untersuchende Sequenz des *CD14*-Gens für die Genotypisierung wurde auf -650 bp ausgehend vom Startkodon in 5'-Richtung, die beiden Exone und das Intron festgelegt. Um eine ausreichende statistische Power zu gewährleisten, wurden SNPs ausgewählt, bei denen die Häufigkeit des

selteneren Allels (MAF) mindestens 0,01 betrug. Unter diese Auswahl fiel auch die Variante -260C/T, die bereits in verschiedenen Studien zu genetischen Assoziationen von *CD14* mit Erkrankungen untersucht wurde und daher als relevant für die vorliegende Untersuchung eingeschätzt wurde.

Da Varianten, die einen Aminosäureaustausch bedingen, zu einer funktionellen Änderung des Proteins führen können, wurden die zwei exonischen Varianten, die zu einem nicht-synonymen Aminosäureaustausch führen, in die Auswahl aufgenommen. Ebenfalls wurden die exonischen Varianten mit synonymen Aminosäureaustauschen aufgenommen. In Tabelle 19 sind die insgesamt acht genetischen Varianten aufgeführt, die zur Genotypisierung ausgewählt wurden.

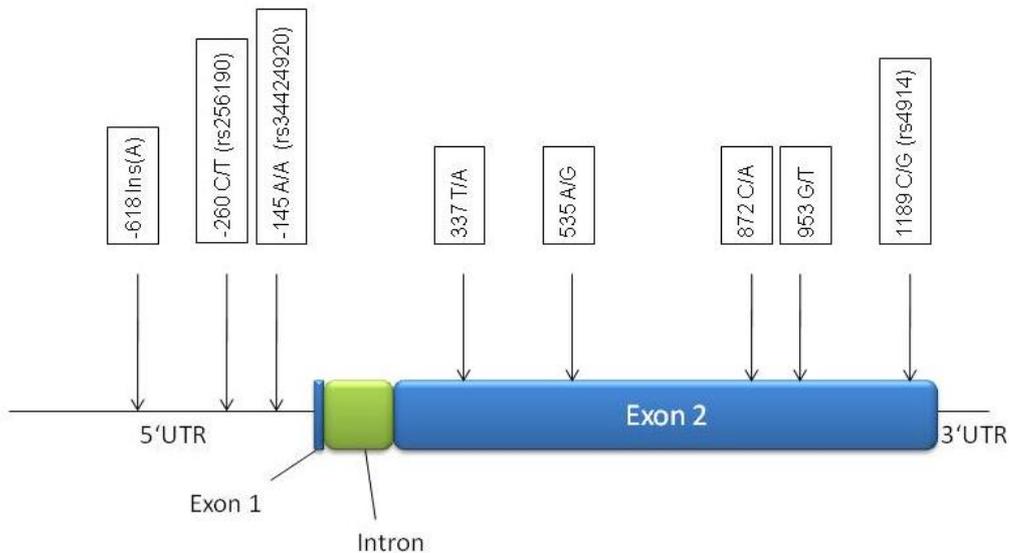


Abbildung 10: Schematische Darstellung des CD14-Gens mit den untersuchten Varianten

5'UTR: 5'untranslatierte Region; 3'UTR: 3'untranslatierte Region; Ins(A): Insertion von Adenin; A: Adenin; G: Guanin; T; Thymin; C; Cytosin

Tabelle 19: Genetische Varianten für die Genotypisierung

Region	Position	Rs-Nummer	N-Austausch	AS-Austausch
	-618		Ins (A)	
Promotor	-260	rs2569190	C/T	
	-135	rs34424920	A/G	

Region	Position	Rs-Nummer	N-Austausch	AS-Austausch
	337		T/A	Ala83Ala
	535		A/G	Leu149Leu
Exon 2	872		C/A	Arg262Ser
	953		G/T	Glu289STOP
	1189	rs4914	G/C	Leu367Leu

N: Nukleotid, AS: Aminosäure, MAF: Minor allele frequency, ALA: Alanin, L: Leucin, Arg: Arginin, Ser: Serin, Glu: Glutamat, Ins: Insertion; N: Nukleotid

3.6 Genotypisierung der ausgewählten genetischen Varianten des CD14-Gens

Fünf der ausgewählten genetischen Varianten wurden in der Studiengruppe von 4546 Individuen mit der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode (FRET-Methode) im *LightTyper*-Gerät analysiert. Die weiteren drei Varianten wurden mit dem *High-Resolution-Melting* im *LightCycler*-Gerät untersucht.

Nach abgeschlossener Genotypisierung wurden Assoziationsanalysen mit dem Programm STATA 9.0 gerechnet. Es wurden logistische Regressionen nach Alter, Ethnie und Geschlecht berechnet. Stratifizierungen nach Ethnien, nach mykobakteriellen Genotypen, nach Geschlecht und nach röntgenologischen Auffälligkeiten wurden durchgeführt. Die Verteilung der Tuberkulin-Hauttestung (Tuberculin Test PPD *Mérieux*) wurde betrachtet sowie die röntgenologischen Auffälligkeiten unter den Patienten. Ebenfalls wurden rezessive, dominante und additive Vererbungsmodelle berücksichtigt. Die Haplotypen der Varianten wurden berechnet.

Im Folgenden wird auf die Ergebnisse der einzelnen Varianten eingegangen. Angegeben sind nur Ergebnisse, die signifikante oder annähernd signifikante Assoziationen aufweisen.

3.6.1 Variante -618 Ins(A)

Die Variante -618 liegt im Promotorbereich (618 bp in 5'Richtung vom Startkodon ausgehend). In der Datenbank des *National Center for*

Biotechnology Information (NCBI) ist für diese Position ein Einzelnukleotidaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) mit der Nummer rs5744455 bekannt. In der hier untersuchten Studienpopulation fand sich durch Sequenzierung kein Einzelnukleotidaustausch, sondern eine Insertion von Adenin an dieser Position. Diese genetische Variante wurde mit dem *LightTyper* in der gesamten Studienpopulation untersucht. Es konnten für 1988 Fälle und 2528 Kontrollen die Genotypen bestimmt werden. Für insgesamt 60 Individuen konnten die Schmelzkurven keinem Genotyp zugeordnet werden. In Tabelle 20 wird die Assoziation der Genotypen angegeben.

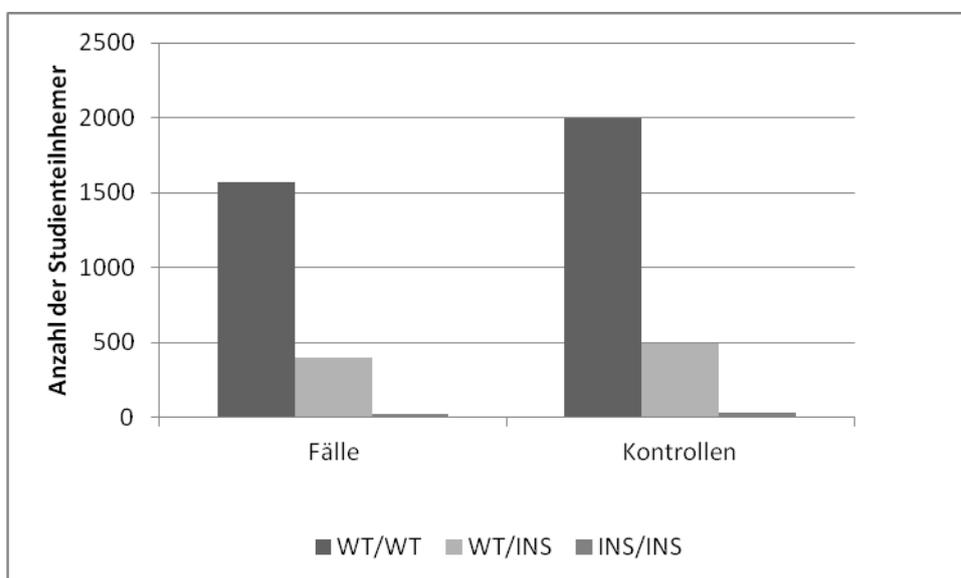


Abbildung 11: Verteilung der Genotypen der Variante -618 Ins(A) unter Fällen und Kontrollen

WT: Wildtyp; INS: Insertion

Tabelle 20: Variante -618: Assoziation der Genotypen

SNP	Genotyp	Fälle (%)	Kontrollen (%)	OR	95 % KI	P _{nom}
-618	WT/WT	1567 (78,8)	1998 (79,0)	1		
	WT/INS	399 (20,1)	495 (19,6)	1,03	[0,89-1,2]	0,66
	INS/INS	22 (1,1)	35 (1,4)	0,78	[0,45-1,34]	0,36

SNP	Genotyp	Fälle (%)	Kontrollen (%)	OR	95 % KI	P _{nom}
	N	1988	2528			

OR: Odds Ratio; KI: 95 % Konfidenzintervall; WT: Wildtyp, keine Insertion; INS: Insertion von Adenin, P_{nom}: nomineller p-Wert

3.6.2 Variante -260C/T (rs2569190)

Die Variante -260 ist ein Einzelnukleotidaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T). Sie liegt im Promotorbereich des *CD14*-Gens und ist in der Datenbank des NCBI unter der Nummer rs2569190 bekannt. In unserem Studienkollektiv konnten 2538 Kontrollen und 1994 Fällen mit der FRET-Methode Genotypen zugeordnet werden.

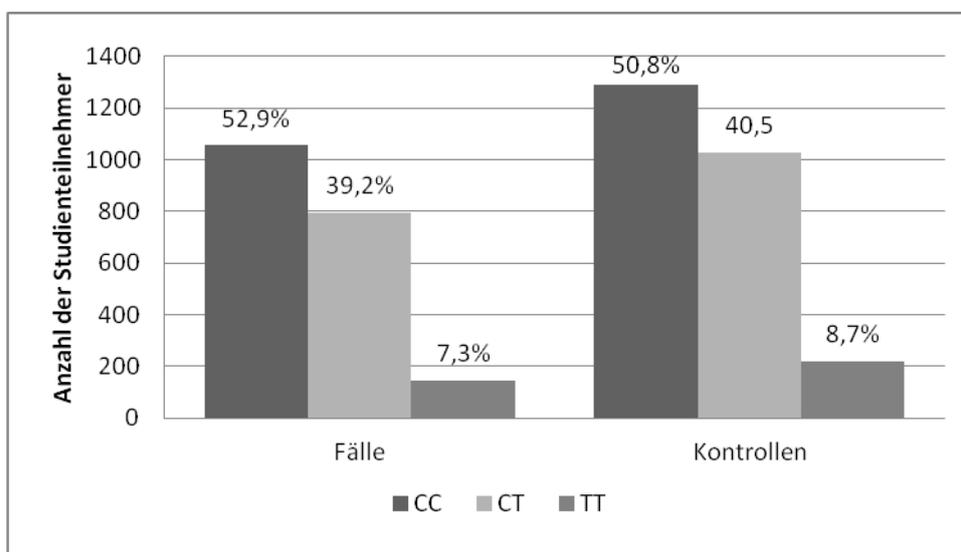


Abbildung 12: Verteilung der Genotypen der Variante -260C/T unter Fällen und Kontrollen

C: Cytosin; T: Thymin

Tabelle 21: Variante -260C/T: Assoziation der Genotypen

SNP	Genotyp	Fälle (%)	Kontrollen (%)	OR	95 % KI	P _{nom}	P _{korr}
-260	CC	1055 (52,9)	1289 (50,8)	1			
	CT	794 (39,2)	1029 (40,5)	0,93	[0,82-1,5]	0,227	
	TT	145 (7,3)	220 (8,7)	0,79	[0,63-0,99]	0,041	n.s.

N	1994	2538
---	------	------

C: Cytosin; T: Thymin; OR: Odds Ratio; KI: 95 % Konfidenzintervall; P_{nom}: nomineller p-Wert, P_{korr}: p-Wert korrigiert auf acht Varianten, n.s.: nicht signifikant

Nach der logistischen Regression nach Ethnie, Geschlecht und Alter zeigte sich bei dem Genotyp -260TT der Studiengruppe eine Assoziation mit einer erniedrigten Erkrankungswahrscheinlichkeit (OR 0,79, p=0,041), welche jedoch nach der Bonferroni-Korrektur nicht signifikant bleibt. Dieses Ergebnis zeigt dennoch einen Trend, dass der Genotyp -260TT möglicherweise mit einer erniedrigten Erkrankungswahrscheinlichkeit an Lungentuberkulose einhergeht. Dies widerspricht den bereits publizierten Studien zu *CD14* und -260 C/T, bei denen der Genotyp -260TT mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit an Lungentuberkulose assoziiert ist (Kang et al., 2009; Pacheco et al., 2004; Rosas-Taraco et al., 2007).

Die Stratifizierung nach Ethnien zeigte für die Gruppe „*Northerners*“ einen signifikanten p-Wert (p=0,017, OR 0,40) für eine erniedrigte Erkrankungswahrscheinlichkeit bei homozygoten Mutanten. Die Signifikanz hält der Bonferroni-Korrektur nicht stand.

Tabelle 22: Variante -260C/T: Logistische Regression für die Ethnie der Northerners

Genotyp	Fälle (%)	Kontrollen (%)	OR	95 % KI	P _{nom}	P _{korr}
CC	133 (54,7)	126 (49,8)	1			
CT	99 (40,7)	100 (39,5)	0,95	[0,65-1,38]	0,79	
TT	11 (4,5)	27 (10,3)	0,4	[0,19--0,85]	0,017	n.s.
N	243	253				

C: Cytosin; T: Thymin; OR: Odds Ratio, KI: 95% Konfidenzintervall, P_{nom}: p-Wert unkorrigiert, P_{korr}: p-Wert korrigiert auf acht Varianten und vier Ethnien, n.s.: nicht signifikant

Bei der Berechnung für eine rezessive Vererbung ergab sich für die Variante -260TT ein annähernd signifikanter p-Wert von 0,071. Diese Signifikanz bleibt nach der Bonferroni-Korrektur nicht bestehen.

3.6.3 Variante -135A/G (rs34424920)

Die Variante -135 ist ein Einzelnukleotidaustausch von Adenin (A) zu Guanin (G). Sie liegt im Promotorbereich des *CD14*-Gens und ist in der Datenbank NCBI unter der Nummer rs34424920 bekannt. Es konnten die Genotypen für 1991 Fälle und 2535 Kontrollen mit HRM bestimmt werden.

Tabelle 23: Variante -135A/G: Assoziationen der Genotypen

SNP	Genotyp	Fälle (%)	Kontrollen (%)	OR	95 % KI	P _{nom}	P _{korr}
	AA	1897 (95,3)	2447 (96,5)	1			
-135	AG	94 (4,79)	87 (3,4)	1,43	[1,06-1,94]	0,021	n.s.
	GG	0	1 (0,04)				
	N	1991	2535				

A: Adenin; G:Guanin; OR: Odds Ratio; KI: 95 % Konfidenzintervall; P_{nom}: nomineller p-Wert, P_{korr}: p-Wert korrigiert auf acht Varianten, n.s.: nicht signifikant

Bei der logistischen Regression nach Ethnie, Geschlecht und Alter ergab sich für den Genotyp -135AG eine leichte Assoziation mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit an Lungentuberkulose (OR 1,43, p=0,021). Der signifikante p-Wert hält der Bonferroni-Korrektur nicht stand.

Für den Genotyp -135AG zeigte die Stratifizierung nach Ethnie für die Gruppe der „*Northerners*“ einen annähernd signifikanten p-Wert (p=0,057). Die Stratifizierung nach Geschlecht zeigte für Frauen einen p-Wert von 0,072.

Die Stratifizierung nach mykobakteriellem Genotyp ergab für den Genotyp -135AG signifikante Werte für den *M. africanum*-Stamm *West-African 1*

($p=0,0299$). Diese Signifikanz bleibt nach der Korrektur auf Multiples Testen nicht bestehen.

Für die logistische Regression im Falle einer dominanten Vererbung ergab sich ein p-Wert von 0,024 für den Genotyp -135AG. Die signifikanten p-Werte hielten der Bonferroni-Korrektur nicht stand.

3.6.4 Variante +337T/A

Die Variante +337 ist ein Einzelnukleotidaustausch von Thymin (T) zu Adenin (A) und liegt im Exon 2 des *CD14*-Gens. Der Austausch führt zu einem synonymen Aminosäureaustausch (Ala83Ala). In den Datenbanken *NCBI* und *Chip Bioinformatics* ist diese Variante nicht gelistet.

Es konnten die Genotypen für 2546 Kontrollen und 2000 Fälle mit HRM bestimmt werden.

Die Variante mit dem heterozygoten Genotyp +337TA konnte in dem Studienkollektiv sieben Mal nachgewiesen werden, hiervon waren sechs Studienteilnehmer gesund und einer an Lungentuberkulose erkrankt.

3.6.5 Variante +535A/G

Die Variante +535 ist ein Einzelnukleotidaustausch von Adenin (A) zu Guanin (G). Sie liegt im Exon 2 und führt zu einem synonymen Aminosäureaustausch (Leu149Leu). Diese Variante ist in den Datenbanken *NCBI* und *Chip Bioinformatics* ebenfalls nicht bekannt.

Mithilfe des *LightTypers* konnten 2546 Kontrollen und 2000 Fälle genotypisiert werden. Die Variante +535AG fand sich im Studienkollektiv einmal. Dieser Studienteilnehmer war an Lungentuberkulose erkrankt.

3.6.6 Variante +872C/A

Die Variante +872 liegt im Exon 2 des *CD14*-Gens. Der Einzelnukleotidaustausch von Cytosin (C) zu Adenin (A) führt zu einem nicht-

synonymen Aminosäureaustausch von Arginin zu Serin (Arg262Ser). In den Datenbanken *NCBI* und *Chip Bioinformatics* ist diese Variante nicht aufgeführt.

In dem Studienkollektiv konnten mithilfe des HRM 1998 Fälle und 2542 Kontrollen genotypisiert werden.

Tabelle 24: Variante +872C/A: Assoziationen der Genotypen

SNP	Genotyp	Fälle (%)	Kontrollen (%)	OR	95 % KI	P _{nom}	P _{korr}
	CC	1976 (98,9)	2514 (98,9)	1			
872	CA	22 (1,1)	28 (1,1)	1,06	[0,6-1,88]	0,83	n.s.
	AA	0	0				
	N	1998	2544				

C: Cytosin; A: Adenin; OR: Odds Ratio; KI: 95 % Konfidenzintervall; P_{nom}: nomineller p-Wert, P_{korr}: p-Wert korrigiert auf acht Varianten, n.s.: nicht signifikant

3.6.7 Variante +953G/T

Diese Variante liegt im Exon 2 und führt durch einen Einzelnukleotidaustausch von Guanin (G) zu Thymin (T) zu einer *nonsense*-Mutation. Es wird Glutamat durch ein STOP-Kodon ersetzt (Glu289STOP). In den Datenbanken *NCBI* und *Chip Bioinformatics* ist diese Variante nicht aufgeführt.

Es konnten 2544 Kontrollen und 1998 Fälle mithilfe des HRM genotypisiert werden. Unter diesen 4542 Studienteilnehmern fand sich fünfmal der Genotyp +953GT, hiervon waren vier Teilnehmer gesund und ein Teilnehmer an Lungentuberkulose erkrankt.

3.6.8 Variante +1189C/G (rs4914)

Die Variante +1189 liegt im Exon 2. Der Einzelnukleotidaustausch von Cytosin (C) zu Guanin (G) führt zu einem synonymen Aminosäureaustausch (Leu367Leu). In der Datenbank des *NCBI*s ist die Variante unter der Nummer rs4914 aufgeführt.

Mittels FRET konnten 1981 Fälle und 2527 Kontrollen genotypisiert werden.

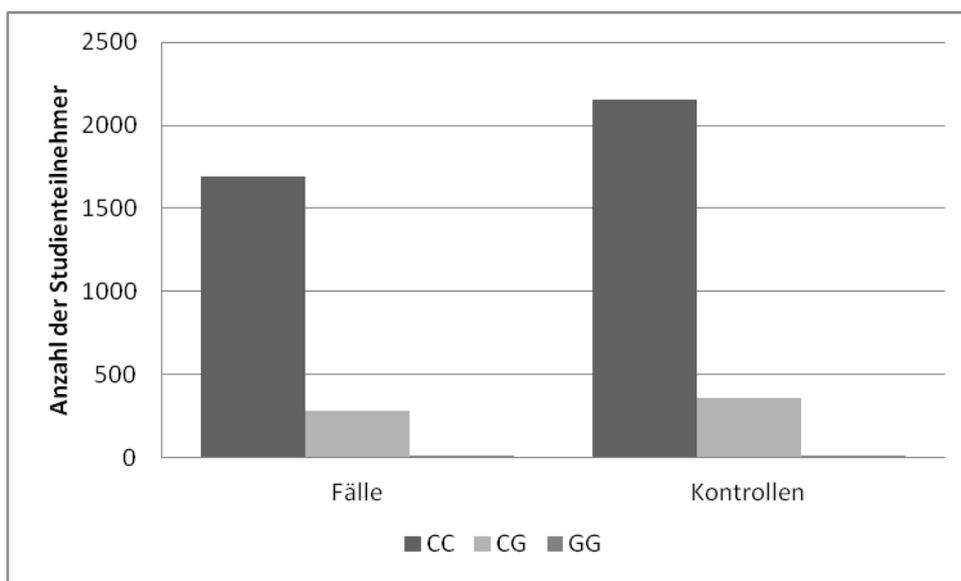


Abbildung 13: Verteilung der Genotypen der Variante +1189C/G unter Fällen und Kontrollen, C: Cytosin; G: Guanin

Tabelle 25: Variante +1189C/G: Assoziationen der Genotypen

SNP	Genotyp	Fälle (%)	Kontrollen (%)	OR	95 % KI	P _{nom}	P _{korr}
	CC	1690 (85,3)	2157 (85,4)	1			
1189	GC	279 (14,1)	357 (14,1)	0,999	[0,84-1,19]	0,99	n.s.
	GG	12 (0,6)	13 (0,5)	1,1	[0,5-2,46]	0,808	n.s.
	N	1981	2527				

C: Cytosin; G: Guanin; OR: Odds Ratio; KI: 95 % Konfidenzintervall; P_{nom}: nomineller p-Wert, P_{korr}: p-Wert korrigiert auf acht Varianten, n.s.: nicht signifikant

3.7 Kopplungsungleichgewicht der genotypisierten Varianten

Um eine mögliche gemeinsame Vererbung herauszufinden, wurden mithilfe der Software *Haploview* die paarweisen Kopplungsungleichgewichte (*linkage disequilibria*, LDs) von sieben Polymorphismen errechnet. Die Variante +535A/G wurde in die Berechnung nicht mit einbezogen, da diese nur einmal in dem Studienkollektiv vorkam. Das LD von zwei Polymorphismen wird hier als Quadrat des Korrelationskoeffizienten r^2 angegeben. Wenn der Wert r^2 sich 100

nähert ist davon auszugehen, dass die Varianten nah zusammenliegen und gemeinsam vererbt werden. Die folgende Abbildung 14 zeigt die errechneten LDs.

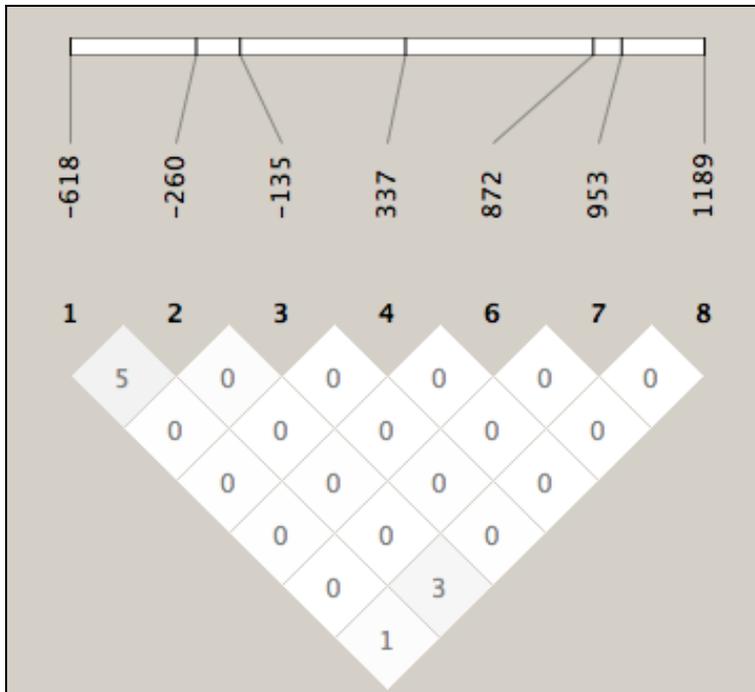


Abbildung 14: Kopplungsungleichgewicht in r^2 der genotypisierten Varianten

Die Berechnungen zeigten, dass davon auszugehen ist, dass die gefundenen Varianten nicht gemeinsam vererbt werden.

3.8 Haplotypen

Das Kopplungsungleichgewicht nutzt man, um das Maß des Vorkommens einer Allelkombination zweier Loci auf einem Haplotypen in einer Population zu bestimmen. Die Haplotypen von sechs Varianten wurden berechnet. Die Varianten +337T/A und +535A/G wurden aufgrund der niedrigen MAF in der Gesamtstudienpopulation nicht in die Berechnung mit einbezogen. Die Berechnung der Haplotypen ist in Tabelle 26 dargestellt. Es zeigte sich keine signifikante gemeinsame Vererbung der Varianten, so dass alle Varianten typisiert wurden.

Tabelle 26: Haplotypen

Haplotypen	-618	-260	-135	872	953	1189	Fälle	Kontrollen	OR	P _{nom}	P _{korrr}
	G	C	A	C	G	G	299	377	1	0,91	
	G	C	A	C	G	C	1954	2469	1,013	0,31	
	G	C	G	C	G	C	93	87	1,348	0,037	n.s.
	G	T	A	C	G	C	1068	1442	0,934	0,078	
	T	C	A	C	G	C	434	555	0,986	0,92	

OR: Odds Ratio, P_{nom}: nomineller p-Wert, P_{korrr}: p-Wert korrigiert auf acht Varianten, n.s.: nicht signifikant; A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T; Thymin

4 Diskussion

Im Folgenden soll zunächst auf Infektionserkrankungen und Wirtsgenetik eingegangen werden, anschließend werden die Gründe für die Auswahl von *monocyte differentiation antigen (CD14)* als Kandidatengen für eine Assoziationsstudie zur Lungentuberkulose dargelegt. Weiterhin sollen die Ergebnisse der durchgeführten Studie diskutiert und in die aktuelle wissenschaftliche Debatte eingeordnet werden.

4.1 Infektionskrankheiten und Selektion

Haldane formulierte 1949 die These, dass Mikroorganismen die wichtigste Auswirkung auf die Selektion in der Evolution des Menschen in den letzten 5000 Jahren hatten (Bellamy, 2003). Mutationen humaner Gene, die spontan entstanden sind, können den Phänotyp von Infektionskrankheiten beeinflussen. Solche Mutationen können einen protektiven Einfluss haben. Diese genetischen Polymorphismen werden bevorzugt weitervererbt und können damit das Überleben von Populationen sichern. Jedoch können schützende genetische Varianten möglicherweise wiederum Krankheiten auslösen. Dieses Phänomen lässt sich bei der Sichelzellanämie beobachten. Sichelzellanämie kommt vor allem in Gebieten vor, in denen Malaria endemisch ist oder war. Hierbei führt eine Punktmutation in dem Gen für die Betakette des Hämoglobins (*HBB*) zu einer Expression eines veränderten Produkts, dem sogenannten Sichelzellhämoglobin (Ashley-Koch et al., 2000; Timmann et al., 2012). Dieses bietet einen relativen Schutz gegenüber Malaria. Während die Expression der heterozygoten Variante meist keine klinischen Symptome der Sichelzellkrankheit aufweist, löst die Expression der homozygoten Variante ein schweres Krankheitsbild mit hämolytischer Anämie oder Sichelzellkrisen mit akuter Gefäßokklusion und daraus resultierenden multiplen Infarkten aus.

Die Sichelzellanämie ist eine monogene Erkrankung. Bei Tuberkulose hingegen ist, wie auch bei Malaria, von einer Erkrankung auszugehen, die von vielen Genen beeinflusst wird. Für die Entstehung von Genvarianten, die einen

relativen Schutz vor einer Infektionserkrankung bieten, müssen Populationen unter einer dauerhaften Exposition des Erregers stehen und die Erkrankung muss vor allem vor oder während des reproduktiven Alters mit einer hohen Mortalität behaftet sein (Stead, 1997a). Schützende Varianten finden sich erst nach mehreren Generationen mit einer erhöhten Frequenz in einer Population (Dean et al., 2002).

Die geographische Verteilung von Malaria könnte es möglicherweise vereinfachen, verschiedene genetische Varianten zu identifizieren, deren Expressionen zu relativem Schutz vor Malaria führen. Hierzu gehören Sichelzellanämie, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel und α - und β -Thalässämie (Bellamy, 2005). Da die Verteilung von Tuberkulose nicht auf bestimmte geographische Regionen beschränkt ist, ist es schwieriger, mögliche protektive genetische Varianten aufzudecken.

Der Einfluss der genetischen Prädisposition auf die Empfänglichkeit von Lungentuberkulose konnte beim Lübecker Impfunglück von 1930 beobachtet werden (Petroff, 1932). Hinweise für einen Einfluss von genetischen Faktoren auf die Empfänglichkeit von Tuberkulose zeigen sich auch in Zwillingsstudien. Hier wurde eine erhöhte Konkordanz einer klinischen Tuberkulose bei eineiigen Zwillingen gegenüber zweieiigen Zwillingen beobachtet (Comstock, 1978; Simonds, 1957).

Basierend auf der Verfügbarkeit humaner Gene versucht man in Fall-Kontroll-Studien, Kandidatengen-Studien, Familien-basierten und genomweiten Assoziationsstudien mögliche Varianten zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Assoziationsstudie als Fall-Kontroll-Studie mit einem Kandidatengen durchgeführt. In Assoziationsstudien ist der Effekt einzelner Gene meist schwer zu identifizieren. Voraussetzungen für hohe Validität einer Assoziationsstudie sind ein optimales Studiendesign, kontrollierte Phänotypen der Erkrankung, Qualitätskontrollen in der Durchführung einer

Studie und solide statistische Auswertung. Oft finden sich in Studien über einzelne Gene widersprüchliche Ergebnisse.

In dieser Studie wurde *CD14* als Kandidatengen ausgewählt. Zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit war das *CD14*-Gen bereits in drei Assoziationsstudien zur Tuberkulose untersucht worden. Diese Studien ergaben kontroverse Ergebnisse (Kang et al., 2009; Pacheco et al., 2004; Rosas-Taraco et al., 2007).

In der ersten Assoziationsstudie, die zu der Variante -260C/T im *CD14*-Gen und Tuberkulose durchgeführt worden ist, wurde eine kolumbianische Studienpopulation von 379 Personen (267 Fälle und 112 Kontrollen) genotypisiert. Es wurde keine Assoziation zwischen Allel- oder Genotypfrequenz und Tuberkulose, jedoch erhöhte sCD14-Serumwerte bei Tuberkulosepatienten gefunden (Pacheco et al., 2004). Zwei weitere Assoziationsstudien zu Tuberkulose und der Variante -260C/T im *CD14*-Gen wurden durchgeführt. In beiden wurde eine Assoziation zwischen dem Genotyp -260TT und erhöhter Empfänglichkeit von Tuberkulose nachgewiesen. Es wurden Proben von 285 Mexikanern (104 Fälle, 67 Haushaltskontakte und 114 Kontrollen) (Rosas-Taraco et al., 2007) und 696 Koreanern (274 Fälle und 422 Kontrollen) (Kang et al., 2009) genotypisiert.

Während der Entstehung dieser Arbeit wurden vier weitere Studien über Varianten im *CD14*-Gen und deren Empfänglichkeit von Tuberkulose publiziert (Alavi-Naini et al., 2012; Ayaslioglu et al., 2012; Xue et al., 2012; Zhao et al., 2012). In drei dieser Studien konnten Assoziationen zwischen dem Genotyp -260TT und erhöhter Empfänglichkeit gegenüber Tuberkulose nachgewiesen werden (Alavi-Naini et al., 2012; Xue et al., 2012; Zhao et al., 2012). Es wurden zwei Studiengruppen aus China ((432 Fälle und 404 Kontrollen) (Zhao et al., 2012) und (318 Fälle und 380 Kontrollen) (Xue et al., 2012)) und eine Population aus dem Iran (120 Fälle und 131 Kontrollen) (Alavi-Naini et al., 2012) untersucht. In einer Studiengruppe aus der Türkei (88 Fälle und 116

Kontrollen) zeigte der Genotyp -260TT keine Assoziation mit erhöhter Empfänglichkeit von Lungentuberkulose oder extrapulmonaler Tuberkulose (Ayaslioglu et al., 2012).

In der vorliegenden Studie zeigt sich die Tendenz, dass der Genotyp -260TT mit einer erniedrigten Erkrankungswahrscheinlichkeit an Lungentuberkulose einhergeht. Dieses Ergebnis widerspricht den bereits vorliegenden Publikationen. Die Power einer Studie erhöht sich bei zunehmender Studienpopulation, da der Standardfehler kleiner wird. In der vorliegenden Studie besteht die Studienpopulation aus 4546 Ghanaern und liegt deutlich über der Anzahl der Studienteilnehmer der vorhergenannten Studien. Somit weist sie eine deutlich stärkere Power als die der anderen Studien auf.

Die aufgeführten Studien, die zur Zeit der Fragestellung publiziert waren, beschränkten sich im Gegensatz zu der hier durchgeführten Studie auf die Variante -260C/T im *CD14*-Gen. In der vorliegenden Studie wurde nach weiteren bekannten und unbekanntem Varianten gesucht, um mögliche Assoziationen mit Tuberkulose aufzudecken. Es wurde eine Studienpopulation von 4546 Individuen untersucht. Hierunter fanden sich 2000 Patienten, die an Lungentuberkulose erkrankt waren, und 2546 Kontrollen, davon 2360 mit einem positiven PPD-Test.

4.2 Genetische Varianten von *CD14* in der ghanaischen Studienpopulation

Zum Zeitpunkt der Recherche war in den Datenbanken NCBI und SNPper eine Anzahl von 44 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in dem Gen *CD14* gelistet, diese finden sich in einem Bereich von 1000 bp vor dem Translationsstart mit Promotor und 5'UTR, beider Exone, Intron und der 3'UTR. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass in dieser Region befindliche SNPs bislang nicht identifiziert wurden. Aufgrund dieser Tatsache und der möglichen hohen genetischen Heterogenität in afrikanischen Populationen wurden in der ghanaischen Studienpopulation 364 Studienteilnehmer nicht nur auf bekannte,

sondern auch auf unbekannte genetische Varianten untersucht. Diese Untersuchung wurde mit dem Verfahren des „*High Resolution Melting*“ (HRM) durchgeführt. Es wurden von den 44 vorbeschriebenen Varianten lediglich sechs identifiziert. Zusätzlich wurden zehn neue Varianten identifiziert. Es folgte die Auswahl von SNPs mit folgenden Charakteristika, die in der gesamten Studienpopulation genotypisiert wurden.

Um eine ausreichende statistische Power zu gewährleisten, wurden SNPs ausgewählt, bei denen die Häufigkeit des selteneren Allels (*Minor Allele Frequency*, MAF) mindestens 0,01 beträgt.

Des Weiteren wurden Varianten in die Analyse aufgenommen, die zu einem nicht-synonymen Aminosäureaustausch führen, da ein solcher Austausch eine strukturelle Änderung des Proteins zur Folge haben könnte. Ebenfalls wurden exonische Varianten mit synonymen Aminosäureaustausch in die Auswahl aufgenommen.

Mithilfe dieser Kriterien wurden von den 16 SNPs acht ausgewählt, um sie in der gesamten Studienpopulation zu genotypisieren.

4.2.1 Verteilung der genotypisierten Varianten

Da demographische Faktoren wie Geschlecht, Alter und Ethnie mit der Empfänglichkeit von Lungentuberkulose korrelieren (Stead, 2001; Stead et al., 1990), wurden diese Faktoren in die Auswertung einbezogen. In der Assoziationsanalyse mit logistischer Regression wurden sie als Stratifikationsvariablen eingesetzt.

Das Verhältnis von Frauen zu Männern in der Fallgruppe betrug 1:2. Da die Rekrutierung der Patienten in den ghanaischen Krankenhäusern und Polikliniken konsekutiv stattfand, war davon auszugehen, dass die Geschlechterverteilung in der vorliegenden Studienpopulation repräsentativ für eine Verteilung der Lungentuberkulose in der ghanaischen Bevölkerung war.

Bekanntermaßen haben Männer eine erhöhte Empfänglichkeit für Tuberkulose (Jimenez-Corona et al., 2006).

Über die Verteilung der Lungentuberkulose auf das Lebensalter der Patienten konnte aufgrund des Studiendesigns keine Aussage gemacht werden. Es wurden Patienten von neun bis 60 Jahren bzw. Kontrollpersonen von sechs bis 72 Jahren rekrutiert. Das Durchschnittsalter lag in der Fallgruppe bei 34,1 und in der Kontrollgruppe bei 32,3 Jahren. Kinder unter sechs Jahren wurden nicht in die Studie aufgenommen, da sie nach der primären Infektion der Lunge mit *M. tuberculosis* häufig einen disseminierten Verlauf mit hämatogener Ausbreitung der Erreger entwickeln können (Alcais et al., 2005). Diese klinische Ausprägung der Tuberkulose wurde in dem vorliegenden Studiendesign nicht berücksichtigt.

Die Kovariable „Ethnien“ umfasste vier verschiedene Ethnien (Ewe, Akan, Ga-Adangbe, Northerners) und einer kleinen Gruppe von Individuen, die keiner Ethnie zugeordnet werden konnten. In dieser Studie fand sich keine Assoziation von Ethnie mit erhöhter Empfänglichkeit für Lungentuberkulose. Auch bei der Betrachtung der untersuchten genetischen Varianten im *CD14*-Gen fanden sich nur leicht abweichende Verteilungen der Genotypen zwischen den Ethnien. So waren bei der Variante -618 Insertion(A) 78,8% der Studienpopulation homozygot für den Wildtyp, in der Ethnie Northerners waren es nur 74,3%. Für die Variante -260C/T (rs2569190) waren in der Ethnie Ga-Adangbe 57,1% homozygot für den Wildtyp TT, während sich der Genotyp -260TT mit 51,8% in der gesamten Studienpopulation fand.

Das Vorkommen der untersuchten Polymorphismen wurde auch mit den Daten anderer ethnischer Gruppen verglichen. Diese Daten sind im Rahmen des internationalen HapMap-Projektes verfügbar (<http://www.hapmap.org>). Für die bekannte Variante -260C/T (rs2569190) zeigte sich in der ghanaischen Studienpopulation eine Allelfrequenz von 0,72 für das Allel C und 0,28 für das Allel T. In einer westafrikanischen Studiengruppe aus der Ethnie Yoruba

(Nigeria), die im Rahmen des HapMap-Projektes untersucht worden war, zeigte sich eine fast identische Allelfrequenz mit 0,71 für das Allel C und 0,29 für das Allel T. Der homozygote Genotyp -260TT kam deutlich häufiger in der ghanaischen (8,05%) als in der nigerianischen Studienpopulation (0,4%) vor. In der europäischen und der asiatischen Population, die im Rahmen des HapMap-Projektes untersucht worden waren, lagen die Allelfrequenzen für beide Allele bei 0,5.

Für die Variante +1189C/G (rs4914) fand sich in der ghanaischen Studienpopulation eine Allelfrequenz, wie sie sich auch in der Ethnie der Yoruba zeigte (Allel C: 0,92, Allel G: 0,08). Auch zeigte sich bei diesem SNP eine fast identische Verteilung der Genotypen in den beiden westafrikanischen Populationen.

Der SNP rs34424920 wurde im Rahmen des HapMap-Projektes nicht genotypisiert, so dass für ihn weder Allelfrequenz noch Genotypverteilung vorlagen. Auch ließen sich die Allelfrequenzen und Genotypverteilungen der weiteren fünf untersuchten SNPs -618 Insertion(A), 337T/A, 535A/G, 872C/A, 953G/T nicht mit denen anderer Populationen vergleichen, da sie bisher in keiner Datenbank beschrieben wurden.

Die unterschiedliche Verteilung von genetischen Varianten in verschiedenen Populationen, wie sie bei der Variante rs2569190 zwischen westafrikanischen und europäischen Populationen zu finden ist, könnte einen möglichen Hinweis auf die Adaptation der Gene an eine lokal bedingte Selektion geben. Dies könnte hier für Varianten im *CD14*-Gen und Tuberkulose gelten. Betrachtet man die Entwicklung und Geschichte der Tuberkulose in Afrika, so ging man lange davon aus, dass Tuberkulose sich erst im 20. Jahrhundert in Afrika ausgebreitet hat (Bates & Stead, 1993; Stead, 1997a). Dagegen sprechen jedoch aus ägyptischen Mumien isolierte DNA des Erregers *M. africanum* (Zink et al., 2003) und der Nachweis von phylogenetisch besonders alten mykobakteriellen Genotypen in Isolaten von afrikanischen Patienten (Gutierrez et al., 2005). Es

gibt somit wenig Anhalte für eine hohe Prävalenz von Tuberkulose in Afrika in den letzten Jahrhunderten, jedoch klare Beweise für das Vorkommen des Erregers (Supply et al., 2013). Man darf jedoch andere Gründe, die einen Einfluss auf die Reproduktion und andere Infektionskrankheiten wie z.B. Malaria als Ursache für eine Selektion und Veränderung des genetischen Materials nicht außer Acht lassen.

Um mögliche beeinflussende Effekte von Geschlecht und Alter zu berücksichtigen, wurden diese als Kovariablen in die logistische Regression einbezogen. Da die Studienpopulation aus unterschiedlichen Subpopulationen besteht und dies möglicherweise eine Assoziation verdeckt, wurde nach Ethnien stratifiziert. Des Weiteren wurde nach mykobakteriellen Genotypen, Ergebnis des Mendel-Mantoux-Tests (PPD-Test) und radiologischen Befunden stratifiziert.

4.2.2 Assoziation von CD14-Varianten mit Empfänglichkeit für Lungentuberkulose

In der vorliegenden Studienpopulation fanden sich bei den acht genotypisierten Varianten im *CD14*-Gen keine signifikanten Verteilungsunterschiede zwischen den Tuberkulosefällen und den Kontrollpersonen.

Für den Polymorphismus -260C/T (rs2569190) zeigte sich eine Tendenz, dass der Genotyp -260TT mit einer verminderten Empfänglichkeit für Lungentuberkulose einhergeht (p_{nom} : 0,041, p_{kor} : n. s., OR:0,79, 95%KI: 0,63-0,99). Diese Tendenz widerspricht jedoch den Ergebnissen der bereits unter 4.1 genannten Studien zu diesem Polymorphismus und der Empfänglichkeit für Tuberkulose (Alavi-Naini et al., 2012; Kang et al., 2009; Rosas-Taraco et al., 2007; Xue et al., 2012; Zhao et al., 2012). Hier wurden Assoziationen des Genotyps -260TT mit erhöhter Empfänglichkeit für Lungentuberkulose gefunden. Diese Assoziation bleibt jedoch nach der Bonferroni-Korrektur nicht signifikant und die Ergebnisse der vorliegenden Studie reihen sich in die

Resultate der Studien in türkischer und kolumbianischer Populationen ein (Ayaslioglu et al., 2012; Pacheco et al., 2004).

Tabelle 27: Studien zu der Variante -260 C/T im CD14-Gen und deren Empfänglichkeit von Tuberkulose

SNP	Assoziation des Genotyps TT mit erhöhter Empfänglichkeit von TB	Studienpopulation (n)		Population	Referenz
		Fälle	Kontrollen		
rs2569190	Nein	267	112	Kolumbien	(Pacheco et al., 2004)
	Ja	104	181	Mexiko	(Rosas-Taraco et al., 2007)
	Ja	274	422	Korea	(Kang et al., 2009)
	Ja	120	131	Iran	(Alavi-Naini et al., 2012)
	Nein	88	116	Türkei	(Ayaslioglu et al., 2012)
	Ja	318	380	China	(Xue et al., 2012)
	Ja	432	404	China	(Zhao et al., 2012)
	Nein	2000	2546	Ghana	Vorliegende Studie

SNP: single nucleotide polymorphism; T: Thymin; TB: Tuberkulose

Die vorliegende Studie weist aufgrund der größeren Studienpopulation jedoch eine stärkere Power auf als die anderen durchgeführten Studien und ist somit eher als valide anzusehen als die anderen Studien. Des Weiteren besteht in afrikanischen Populationen eine höhere genetische Heterogenität als in Populationen aus China, Europa und den USA. Diese geht mit einer erhöhten Anzahl von Haplotypen und mit einem niedrigem Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) zwischen SNPs einher (Consortium, 2005; Teo et al., 2010). Möglich ist, dass in den Studien, in denen eine signifikante Assoziation von dem Genotyp -260TT mit Lungentuberkulose gezeigt wurde, -260C/T nicht die kausale Variante ist, sondern mit dieser in einem starken LD steht.

So zeigten sich in einer chinesischen Population hohe LDs von drei SNPs im *CD14*-Gen mit der Variante -260C/T. Außerdem wies der Haplotyp GGGT der Varianten -1720G/A, -1460T/G, -1246A/G und -260C/T eine signifikante Assoziation mit Lungentuberkulose und erhöhten sCD14-Serumwerten auf (Xue et al., 2012). In der vorliegenden Studie zeigten sich keine LDs zwischen den untersuchten SNPs.

In sechs der oben genannten Studien zu der Variante -260C/T wurden zusätzlich die sCD14-Werte im Serum der Studienteilnehmer bestimmt. In diesen sechs Studien zeigten die Tuberkulosepatienten höhere sCD14-Serumwerte als die Kontrollpersonen (Alavi-Naini et al., 2012; Ayaslioglu et al., 2012; Kang et al., 2009; Pacheco et al., 2004; Rosas-Taraco et al., 2007; Xue et al., 2012). Signifikante Unterschiede zwischen den sCD14-Serumwerten bei Patienten mit Lungentuberkulose und Kontrollen konnten in einer iranischen Population nachgewiesen werden (Alavi-Naini et al., 2012). Dieses Resultat bestätigten die Ergebnisse einer anderen Studie, in der ebenfalls erhöhte sCD14-Serumwerte bei Patienten mit aktiver Tuberkulose nachgewiesen wurden (Juffermans et al., 1998). In einer weiteren Studie zeigte der Genotyp -260TT eine signifikante Assoziation mit erhöhten sCD14-Serumwerten. Die hohen sCD14-Level korrelierten mit niedrigen Immunglobulin E (IgE)- und Interleukin 4 (IL4)-Serumwerten (Baldini et al., 1999). Signifikante erhöhte sCD14- und erniedrigte Interleukin 6 (IL6)-Serumwerte zeigten sich auch bei *in vitro* Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Kontrollen bei dem Genotyp -260TT (Yoon et al., 2003). Erhöhte sCD14-Werte konnten auch in Proben, die durch eine bronchoalveoläre Lavage bei Tuberkulosepatienten gewonnen wurden, nachgewiesen werden (Hoheisel et al., 1995).

Zellbiologische Untersuchungen zeigten, dass der Genotyp -260TT mit einer erhöhten transkriptionellen Aktivität einhergeht (LeVan et al., 2001). Dies wird auf die mit diesem Genotyp einhergehende erniedrigte Affinität des Transkriptionsfaktors *specificity protein 3* (SP3) an seine Bindungsstelle im

Promotor von *CD14* zurückgeführt (LeVan et al., 2001). Für SP3 konnte ein inhibitorischer Einfluss auf die Promotoraktivität gezeigt werden (Hagen et al., 1994).

In der vorliegenden Untersuchung wurden die sCD14-Serumwerte der Tuberkulosepatienten nicht bestimmt, und somit kann hierzu keine Aussage getroffen werden. Wird jedoch davon ausgegangen, dass der Genotyp -260TT zu einer erhöhten Produktion von sCD14 führt und dies mit einer erhöhten Empfänglichkeit von Tuberkulose einhergeht, kann diese Annahme in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

Die Bindung von Lipopolysaccharid (LPS) an den CD14-Rezeptor führt zu einer Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), IL1, IL6, IL8, IL12 und NO sowie zu einer Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL10 und *transforming growth factor* β (TGF β) (Schütt, 1999). TNF α ist ein zentrales Zytokin in der Abwehr von *M. tuberculosis*, das vor allem in der Kontrolle des akuten Infektionsstadiums eine Rolle spielt (Flynn & Chan, 2001). In einem *in vivo* Experiment an Mäusen, die mit *M. tuberculosis* infiziert waren, wurde TNF α mithilfe von monoklonaren Antikörpern neutralisiert. In diesem Versuch lag die Letalität und die Mykobakterienlast in Lunge, Leber und Milz der mit monoklonalen Antikörper therapierten Mäuse deutlich über denen der Wildtyp-Mäuse (Flynn et al., 1995). Lipoarabinomannan, ein mykobakterieller Zellwandbestandteil, induziert die TNF α -Produktion von peripheren Blutmonozyten (Moreno et al., 1989). Diese Produktion kann durch Antikörper gegen CD14 gehemmt (Zhang et al., 1993) und somit ein Signalweg über CD14 zur Produktion von TNF α angenommen werden. Es zeigten sich jedoch zu dem Einfluss von CD14 auf die Produktion von TNF α widersprüchliche Ergebnisse. In einem *in vitro* Versuch an humanen CD14-defizienten Makrophagen zeigte sich nach Infektion mit *Mycobacterium (M.) avium* ebenfalls eine erniedrigte TNF α -Produktion. In Mäusen mit einer *M. avium*-Infektion konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der TNF α -Produktion zwischen CD14-defizienten und -kompetenten Mäusen gefunden

werden (Ehlers et al., 2001). Dies lässt auf mögliche weitere Signalwege schließen, die *in vivo* neben CD14 bei der Produktion von TNF α eine Rolle spielen.

CD14 wird neben der Rolle als Stimulator der Zytokinproduktion auch eine Rolle als negativer Modulator im Immunsystem zugeschrieben. Diese Funktion wird von zwei Studien unterstützt, in denen gezeigt werden konnte, dass sCD14 *in vitro* die Zellproliferation und Produktion der Zytokine Interferon γ (IFN γ), IL2 und IL4 von T-Zellen hemmt (Arias et al., 2000; Rey Nores et al., 1999). IFN γ ist neben TNF α ein weiteres zentrales Zytokin in der Abwehr von *M. tuberculosis* (vgl. 1.1.7.2.1)(Schluger & Rom, 1998). Eine verminderte Produktion dieses Zytokins kann zu einer erhöhten Empfänglichkeit für Tuberkulose führen. Auch IL4 ist ein wichtiges Zytokin in der Immunantwort gegenüber Mykobakterien, jedoch hat es einen inhibitorischen Einfluss auf Makrophagen und die Produktion von IFN γ (van Crevel et al., 2002). Im Gegensatz zu TNF α ist die Rolle von IL4 in der Immunabwehr gegenüber Tuberkulose jedoch unklar (van Crevel et al., 2002). In Mäusen, die mit *M. tuberculosis* infiziert wurden, konnte bei einer fortgeschrittenen Infektion mit Tuberkelbakterien und bei einer Reaktivierung einer latenten Infektion eine erhöhte Produktion von IL4 nachgewiesen werden (Hernandez-Pando et al., 1996; Howard & Zwilling, 1999). In IL4 defizienten Mäusen, die mit Mykobakterien infiziert wurden, zeigte sich jedoch, anstatt einer erhöhten, eine normale Empfänglichkeit von Tuberkulose, so dass man davon ausgeht, dass die erhöhte IL4-Produktion eine Folge und weniger die Ursache der Infektion ist (Erb et al., 1998; North, 1998). Des Weiteren zeigte sich jedoch in mit Mykobakterien infizierten IL4-defizienten Mäusen eine höhere Wachstumsrate des Erregers und eine größere Ausbreitung von Granulomen als in immunkompetenten Mäusen (Sugawara et al., 2000). Dies legt nahe, dass IL4 neben IFN γ eine protektive Rolle in der Immunantwort gegenüber *M. tuberculosis* einnimmt (Sugawara et al., 2000).

In der vorliegenden Studie wurde für den Genotyp -260TT eine Tendenz für eine erniedrigte Empfänglichkeit für Tuberkulose gefunden. Wird angenommen,

dass der Genotyp TT mit erhöhten sCD14-Serumwerten einhergeht (Baldini et al., 1999) und die erhöhten sCD14-Werte zu einer vermehrten Produktion von TNF α führen, könnte dies zu einer gesteigerten Immunantwort gegenüber *M. tuberculosis* führen. Durch diese Hypothese könnte sich der mögliche protektive Einfluss des Genotypen -260TT in der vorliegenden Studienpopulation erklären lassen.

In der Studie von Xue et al. wurden weitere SNPs im *CD14*-Gen und deren Empfänglichkeit für Lungentuberkulose untersucht (Xue et al., 2012). Hier fanden sich Assoziationen für die Genotypen -1720GG, -1460GG, -1246GG und -260TT mit erhöhter Empfänglichkeit für pulmonale Tuberkulose. In der vorliegenden Arbeit wurde von diesen SNPs lediglich -260C/T untersucht. Die anderen SNPs wurden in der Vorauswahl der Varianten in der ghanaischen Studienpopulation nicht nachgewiesen.

Die in der vorliegenden Studie untersuchte Variante +1189C/G zeigte keine Assoziation mit einer erhöhten oder verminderten Empfänglichkeit für Lungentuberkulose. Dieser SNP wurde bereits in einer Studie zu Serumwerten von CD14 bei Kindern untersucht, in der keine signifikante Assoziation der Genotypen mit erhöhten CD14-Serumwerten gefunden werden konnte (Munthe-Kaas et al., 2010).

Die Nullhypothese, die vor der Studiendurchführung aufgestellt wurde und besagt, dass keine Assoziation zwischen Phänotyp und einer genetischen Variante besteht, kann somit angenommen und die Alternativhypothese abgelehnt werden.

4.2.3 Assoziationen von Varianten im *cd14*-Gen mit der Reaktivität im *purified protein derivate* (PPD)-Test

In der vorliegenden Studienpopulation wurden die Kontrollpersonen mittels der Mendel-Mantoux-Methode auf eine Hautreaktion getestet.

Zur Zeit der Rekrutierung der Studienteilnehmer 2001 bis 2004 betrug die Tuberkuloseinzidenz in Ghana 281/100.000 (*National Tuberculosis Control*

Program, 2003). Ghana gilt somit als Hyperendemiegebiet für Tuberkulose. Der Kontakt mit *M. tuberculosis* in der gesamten Bevölkerung gilt als sehr wahrscheinlich. Unter den 2546 Kontrollpersonen waren 127 Personen mit einem negativen PPD-Test. Interessanterweise kam der Großteil der Kontrollpersonen, die einen negativen PPD-Test aufwiesen, aus Haushalten mit Tuberkulosefällen (Thye et al., 2009). Es scheint also Individuen zu geben, die trotz einer Exposition mit *M. tuberculosis* keine Sensibilisierung gegenüber Mykobakterien entwickeln. William W. Stead beschrieb 1997 eine Krankenschwester, die über 30 Jahre täglich mit infektiösen Tuberkulosepatienten arbeitete, die eine Thorakoplastik oder Lungenteilresektion bekamen. Diese Krankenschwester hatte zum Zeitpunkt ihrer Berentung trotz der täglichen Exposition einen negativen Tuberkulin-Hauttest (Stead, 1997b). Neben anderen exogenen Faktoren können genetische Ursachen für die interindividuelle Sensibilisierung gegenüber Mykobakterien angenommen werden.

In einer Untersuchung zu der Variante -260C/T und der Assoziation mit Lungentuberkulose zeigten sich in der Kontrollgruppe keine Unterschiede bei dem Ergebnis des PPD-Testes und CD14-Rezeptorexpression oder sCD14-Serumwerten (Rosas-Taraco et al., 2007).

In der vorliegenden Studie konnte zwischen den acht *CD14*-Varianten und den Ergebnissen des PPD-Testes keine signifikante Assoziation nachgewiesen werden.

Der PPD-Test weist weder eine vollständige Sensitivität noch Spezifität auf. Durch angeborene oder erworbene Immunschwächen, nach Virusinfekten oder in einem gewissen Zeitraum nach Lebendimpfungen kann das Ergebnis des Tests falsch negativ ausfallen (RKI, 2009). Kontakt mit nichttuberkulösen Mykobakterien können zu einem positiven PPD-Test führen (Larson et al., 2011). Da für die untersuchte Studienpopulation bereits eine signifikante Assoziation für einen Haplotypen im *il10*-Gen gezeigt werden konnte, kann

davon ausgegangen werden, dass der PPD-Test in dieser Studie eine ausreichende Sensitivität aufweist (Thye et al., 2009).

Der PPD-Test ist nicht mehr Mittel der Wahl, um eine latente oder aktive Tuberkulose nachzuweisen. Er wurde durch die *interferon- γ release assays* (IGRA) ersetzt, da diese einen höheren positiven und einen höheren negativen prädiktiven Wert aufweisen (Diel et al., 2012).

4.2.4 Assoziation von CD14-Varianten mit radiologischen Befunden in der Fallgruppe

Zusätzlich zu den Untersuchungen zur Empfänglichkeit von Lungentuberkulose, wurden die genetischen Varianten hinsichtlich ihres Einflusses auf den radiologischen Verlauf einer Lungentuberkulose untersucht.

Radiologische Merkmale einer Lungentuberkulose können einseitige Infiltrate in den Lungenoberlappen oder apikalen Segmenten der Lungenunterlappen, kavernöse Strukturen oder ein miliäres Verteilungsmuster sein. Die radiologische Bildgebung spiegelt das Entzündungsgeschehen in der Lunge wider.

Dass CD14 den Verlauf einer Lungentuberkulose *in vivo* beeinflussen kann, zeigte sich in den Mausmodellen, die unter der Überschrift 1.2.4 beschrieben wurde. In diesen Modellen wurde die Infektion mit *M. tuberculosis* von CD14-defizienten und CD14-kompetenten Mäusen beobachtet (Reiling et al., 2002; Wieland et al., 2008). Hierbei wurden bei CD14-defizienten Mäusen eine verminderte Letalität und ein vermindertes Entzündungsgeschehen in der Lunge nachgewiesen (Wieland et al., 2008). Das unterschiedlich ausgeprägte Entzündungsgeschehen in der Lunge könnte möglicherweise radiologisch dargestellt werden.

In einem weiteren Mausmodell, in dem CD14-defiziente und CD14-kompetente Mäuse mit *M. avium* infiziert wurden, beobachtet und untersucht wurden, zeigte sich über einen 8-wöchigen Beobachtungszeitraum kein Unterschied im

Hinblick auf die Granulomentwicklung in der Lunge und koloniebildende Einheiten von *M. avium* in Leber, Milz und Lunge (Ehlers et al., 2001).

Die Annahme, dass Varianten im CD14-Gen zwar nicht vor der Erkrankung an Lungentuberkulose schützen, jedoch Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben könnten, kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

4.2.5 Assoziationen von CD14-Varianten mit Erkrankungen durch unterschiedliche mykobakteriellen Genotypen

In der vorliegenden Studie wurde erstmalig in einer Assoziationsstudie zu Tuberkulose und genetischen Varianten im *CD14*-Gen eine Differenzierung der mykobakteriellen Genotypen und entsprechende statistische Stratifizierung vorgenommen. Im Folgenden sollen die Relevanz dieser Differenzierung und die Ergebnisse dieser Studie erläutert werden.

Bis zur Entwicklung der Methode des *IS6110* Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) in den frühen 1990er Jahren glaubte man, dass die genetischen Unterschiede zwischen den Spezies innerhalb des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTBK) sehr gering wären und nicht zu unterschiedlichen Phänotypen der Tuberkulose führen könnten (Coscolla & Gagneux, 2010). Man glaubte vielmehr, dass die unterschiedlichen Verlaufsformen einer Mykobakterieninfektion primär von Wirts- und Umweltfaktoren abhängen würden (Comas & Gagneux, 2009). Mittlerweile ist durch die Entwicklung von molekulargenetischen Methoden bekannt, dass im mykobakteriellen Genotyp eine Vielzahl an Mutationen vorkommen, durch die sich die Mykobakterien des MTBKs in unterschiedliche Stämme einteilen lassen (Gagneux & Small, 2007). Ebenfalls ist beschrieben worden, dass Infektionen mit verschiedenen Stämmen des MTBKs zu unterschiedlichen Ausprägungen in den phänotypischen Merkmalen der Erkrankung führen (Gagneux et al., 2006). So zeigten Isolate aus Südindien eine geringere Virulenz als Isolate aus Großbritannien (Coscolla & Gagneux, 2010). Mit der Einführung der

diagnostischen Methoden zur Differenzierung der Stämme konnten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Der Vergleich von zwölf Genotypen des MTKBs im Verlauf der Erkrankung an Tuberkulose bei Mäusen zeigte Unterschiede in Virulenz, Zytokinproduktion und Immunpathologie (Lopez et al., 2003). Der Beijing Genotyp, der vor allem in Asien und in der ehemaligen Sowjetunion vorkommt, war im Vergleich zu den Genotypen Somali, Haarlem und Canetti der virulenteste (Lopez et al., 2003). Auch im Vergleich zu dem Stamm CDC1551 und den Laborstämmen H37Rv, H37Ra und Erdmann, die zur *Euro-American-Lineage* gehören, war der Stamm HN878, der der *East-Asian/Beijing-Lineage* zugehörig ist, mit einer niedrigen inflammatorischen Immunantwort und höherer Virulenz in Makrophagen und Tiermodellen assoziiert (Manca et al., 1999; Manca et al., 2001; Manca et al., 2005).

In der vorliegenden Studie wurden 1555 Isolate genotypisiert. Bei 318 (20,5%) Isolaten konnten keine Zuordnungen zu bestimmten Genotypen stattfinden. Die am häufigsten vorkommenden Genotypen in der Studienpopulation waren *M. tuberculosis TB2* (30,4%) und *M. africanum West-African 1* (21,5%).

In den Assoziationsanalysen zu genetischen Varianten des *CD14*-Gens und Lungentuberkulose, die nach mykobakteriellen Genotypen stratifiziert wurden, zeigten sich keine signifikanten Assoziationen mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Lungentuberkulose. In dieser Studie wurden jedoch nur die pulmonale Tuberkulose und nicht die extrapulmonalen Manifestationen der Erkrankung betrachtet. Für den *M. tuberculosis Beijing* Stamm, der in der Studienpopulation mit 0,6% vertreten war, konnte beispielsweise in anderen Studien eine Assoziation mit extrapulmonaler Tuberkulose nachgewiesen werden (Kong et al., 2005; Kong et al., 2007).

4.3 Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie reiht sich in Studien über Kandidatengene und eine genomweite Studie ein, die in der ghanaischen Studienpopulation durchgeführt wurden und zu negativen und positiven Ergebnissen geführt haben.

Für Haplotypen im *monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1)*-Gen konnten Assoziationen mit einer erniedrigten Erkrankungswahrscheinlichkeit für Lungentuberkulose nachgewiesen werden, während genetische Varianten im Gen für *arachidonate 5-lipoxygenase (ALOX5)* mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit für Lungentuberkulose einhergehen (Herb et al., 2008; Intemann et al., 2011). Die Variante -261T im *immunity-related GTPase family M Protein (IRGM)*-Gen zeigte einen Schutz vor der Infektion mit *M. tuberculosis*, jedoch nicht vor der Infektion mit *M. africanum* (Intemann et al., 2009), die Variante G57E im Gen des *mannose binding protein* zeigte einen entgegengesetzten Effekt (Thye et al., 2011). Aber auch negative Ergebnisse konnten bereits publiziert werden. Varianten im *secreted phosphoprotein 1 (SPP1)*-Gen zeigten trotz Hinweisen, die in Mausmodellen gezeigt werden konnten, keine Assoziationen mit Phänotypen der Infektion mit *M. tuberculosis* (Thye et al., 2006).

Für das Gen *CD14* wurden bereits Assoziationen einer genetischen Variante mit erhöhter Empfänglichkeit von Tuberkulose beschrieben. Der Genotyp -260TT zeigte eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit mit Tuberkulose (Alavi-Naini et al., 2012; Kang et al., 2009; Rosas-Taraco et al., 2007; Xue et al., 2012; Zhao et al., 2012). In der vorliegenden Untersuchung wurde jedoch eine entgegengesetzte Tendenz gesehen. Es zeigte sich bei dem Genotyp -260TT eine Assoziation mit erniedrigter Empfänglichkeit für Tuberkulose. Diese Assoziation war jedoch nach der Bonferroni-Korrektur nicht signifikant.

Assoziationen werden in der Regel erst in großen Studienpopulationen sichtbar, da sich mit der steigenden Anzahl der Studienteilnehmer die Power erhöht. In der vorliegenden Studie wurde eine Population von 4546 Individuen untersucht. Sie ist somit als valide anzusehen.

In zwei genomweiten Assoziationsstudien, bei der die vorliegende Studienpopulation mit Studienpopulationen aus Gambia bzw. mit Studienpopulationen

aus Gambia, Indonesien und Russland zusammengeführt wurde, womit die endgültigen Studiengruppen aus über 11 000 bzw. 22 000 Individuen bestanden, konnte bestätigt werden, dass Assoziationen auch erst in noch größeren Studienpopulationen sichtbar werden (Thye et al., 2012; Thye et al., 2010).

Es ist somit nicht auszuschließen, dass die Assoziation des Genotyps -260TT in dem *CD14*-Gen mit einer erniedrigten Empfänglichkeit von Tuberkulose erst in einer noch größeren Studienpopulation signifikant sichtbar werden würde.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an einer ghanaischen Studienpopulation von 2000 Patienten mit einer Lungentuberkulose und 2546 Kontrollindividuen den Einfluss von Varianten des für CD14 kodierenden Gens *CD14* auf die Empfänglichkeit für Lungentuberkulose zu untersuchen. CD14 gehört zu den *pattern recognition receptors* (PRRs) und spielt in der Bindung von *M. tuberculosis* und somit in der frühen Immunantwort gegenüber Mykobakterien eine Rolle.

Zunächst wurden Proben von 214 Fällen und 154 Kontrollen der ghanaischen Studienpopulation mittels *High Resolution Melting* auf vorkommende Varianten im *CD14*-Gen untersucht. In der analysierten Sequenz des Gens, die den Bereich von 1000 bp vor dem Translationsstart mit Promotor und 5'UTR, die beiden Exone, das Intron und die 3'UTR umfasste, fanden sich 16 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Aus den 16 SNPs wurden die Varianten ausgewählt, bei denen die Häufigkeit des selteneren Allels (*Minor Allele Frequency*, MAF) mindestens 0,01 beträgt. Des Weiteren wurden Varianten, die zu einem nicht-synonymen Aminosäureaustausch führen, sowie exonische Varianten mit synonymen Aminosäureaustauschen in die Auswahl aufgenommen. Mithilfe dieser Kriterien wurden acht SNPs ausgewählt, um sie in der gesamten Studienpopulation zu untersuchen. Bei dem Vergleich der untersuchten Varianten zwischen Patienten und Kontrollen fand sich bei der Variante -260C/T eine Tendenz, dass der Genotyp -260TT mit einer erniedrigten Wahrscheinlichkeit für eine Erkrankung an Lungentuberkulose einhergeht. Diese Tendenz blieb jedoch nach der Bonferroni-Korrektur nicht signifikant.

6 Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
A	Adenin
ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase
BCG	Bacille-Calmette-Guérin
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CD	Cluster of differentiation
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOTS	directly observed treatment, short course
EDTA	Ethlendiamintetraessigsäure
EUAM	European-American
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
HCL	Wasserstoffchlorid
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	human leukocyte antigens
HPLC	high pressure liquid chromatography
HRM	hich resolution melting
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

IFN	Interferon
IL	Interleukin
KI	Konfidenzintervall
L	Liter
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LD	linkage disequilibrium
LPS	Lipopolysaccharid
M.	Mycobacterium
MAF	minor allele frequency
MCP1	monocyte chemoattractant protein 1
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimol
MSMD	mendelian susceptibility to mycobacterial diseases
MTBK	<i>M. tuberculosis</i> -Komplex
N	Nano
NO	Stickstoffmonoxid
NRAMP1	natural resistance-associated macrophage protein 1
NTM	nicht tuberkulöse Mykobakterien
OR	odds ratio
PCR	polymerase chain reaction

PPD	purified protein derivate
RD	region of difference
RFLP	Restriktionsfragmentlängen- polymorphismus
RKI	Robert Koch-Institut
SNP	single nucleotid polymorphism
SPP1	secreted phosphoprotein 1
STAT	signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
TbD1	M. tuberculosis Deletion 1
TH	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Units
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organisation

7 Literaturverzeichnis

- Alavi-Naini, R., Salimi, S., Sharifi-Mood, B., Davoodikia, A. A., Moody, B., & Naghavi, A. (2012). Association between the CD14 gene C-159T polymorphism and serum soluble CD14 with pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 16(10), 1383-1387.
- Alcaïs, A., Fieschi, C., Abel, L., & Casanova, J. L. (2005). Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J Exp Med*, 202(12), 1617-1621.
- Arias, M. A., Rey Nores, J. E., Vita, N., Stelter, F., Borysiewicz, L. K., Ferrara, P., et al. (2000). Cutting edge: human B cell function is regulated by interaction with soluble CD14: opposite effects on IgG1 and IgE production. *J Immunol*, 164(7), 3480-3486.
- Ashley-Koch, A., Yang, Q., & Olney, R. S. (2000). Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 151(9), 839-845.
- Awomoyi, A. A., Nejentsev, S., Richardson, A., Hull, J., Koch, O., Podinovskaia, M., et al. (2004). No association between interferon-gamma receptor-1 gene polymorphism and pulmonary tuberculosis in a Gambian population sample. *Thorax*, 59(4), 291-294.
- Ayaslioglu, E., Kalpaklioglu, F., Kavut, A. B., Erturk, A., Capan, N., & Birben, E. (2012). The role of CD14 gene promoter polymorphism in tuberculosis susceptibility. *J Microbiol Immunol Infect*.
- Baker, L., Brown, T., Maiden, M. C., & Drobniowski, F. (2004). Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for Mycobacterium tuberculosis. *Emerg Infect Dis*, 10(9), 1568-1577.
- Baldini, M., Lohman, I. C., Halonen, M., Erickson, R. P., Holt, P. G., & Martinez, F. D. (1999). A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20(5), 976-983.
- Barrera, L. (2007). The Basics of Clinical Bacteriology. In J. C. Palomino, S. C. Leão & V. Ritacco (Eds.), *Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care*. (1 ed.).
- Bates, J. H., & Stead, W. W. (1993). The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med Clin North Am*, 77(6), 1205-1217.
- Bazil, V., & Strominger, J. L. (1991). Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol*, 147(5), 1567-1574.
- Bellamy, R. (2003). Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. *Genes Immun*, 4(1), 4-11.

- Bellamy, R. (2005). Genetic susceptibility to tuberculosis. *Clin Chest Med*, 26(2), 233-246, vi.
- Bernardo, J., Billingslea, A. M., Blumenthal, R. L., Seetoo, K. F., Simons, E. R., & Fenton, M. J. (1998). Differential responses of human mononuclear phagocytes to mycobacterial lipoarabinomannans: role of CD14 and the mannose receptor. *Infect Immun*, 66(1), 28-35.
- Brettschneider, J., Ecker, D., Bitsch, A., Bahner, D., Bogumil, T., Dressel, A., et al. (2002). The macrophage activity marker sCD14 is increased in patients with multiple sclerosis and upregulated by interferon beta-1b. *J Neuroimmunol*, 133(1-2), 193-197.
- Bufler, P., Stiegler, G., Schuchmann, M., Hess, S., Kruger, C., Stelter, F., et al. (1995). Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants. *Eur J Immunol*, 25(2), 604-610.
- Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J., & Gusovsky, F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*, 274(16), 10689-10692.
- Comas, I., & Gagneux, S. (2009). The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathog*, 5(10), e1000600.
- Comstock, G. W. (1978). Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am Rev Respir Dis*, 117(4), 621-624.
- Consortium, T. I. H. (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437(7063), 1299-1320.
- Cooke, G. S., Campbell, S. J., Sillah, J., Gustafson, P., Bah, B., Sirugo, G., et al. (2006). Polymorphism within the interferon-gamma/receptor complex is associated with pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 174(3), 339-343.
- Coscolla, M., & Gagneux, S. (2010). Does M. tuberculosis genomic diversity explain disease diversity? *Drug Discov Today Dis Mech*, 7(1), e43-e59.
- Dean, M., Carrington, M., & O'Brien, S. J. (2002). Balanced polymorphism selected by genetic versus infectious human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 3, 263-292.
- Devitt, A., Moffatt, O. D., Raykundalia, C., Capra, J. D., Simmons, D. L., & Gregory, C. D. (1998). Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*, 392(6675), 505-509.
- Diel, R., Loddenkemper, R., & Nienhaus, A. (2012). Predictive value of interferon- γ release assays and tuberculin skin testing for progression from latent TB infection to disease state: a meta-analysis. *Chest*, 142(1), 63-75.

- Durieux, J. J., Vita, N., Popescu, O., Guette, F., Calzada-Wack, J., Munker, R., et al. (1994). The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes. *Eur J Immunol*, 24(9), 2006-2012.
- Ehlers, S., Reiling, N., Gangloff, S., Woltmann, A., & Goyert, S. (2001). Mycobacterium avium infection in CD14-deficient mice fails to substantiate a significant role for CD14 in antimycobacterial protection or granulomatous inflammation. *Immunology*, 103(1), 113-121.
- Erb, K. J., Kirman, J., Delahunt, B., Chen, W., & Le Gros, G. (1998). IL-4, IL-5 and IL-10 are not required for the control of M. bovis-BCG infection in mice. *Immunol Cell Biol*, 76(1), 41-46.
- Ferrero, E., & Goyert, S. M. (1988). Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14. *Nucleic Acids Res*, 16(9), 4173.
- Filliol, I., Motiwala, A. S., Cavatore, M., Qi, W., Hazbon, M. H., Bobadilla del Valle, M., et al. (2006). Global phylogeny of Mycobacterium tuberculosis based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol*, 188(2), 759-772.
- Flynn, J. L., & Chan, J. (2001). Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, 19, 93-129.
- Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Chan, J., Triebold, K. J., Pfeffer, K., Lowenstein, C. J., et al. (1995). Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity*, 2(6), 561-572.
- Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., de Jong, B. C., Narayanan, S., et al. (2006). Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(8), 2869-2873.
- Gagneux, S., & Small, P. M. (2007). Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis*, 7(5), 328-337.
- Geluk, A., & Ottenhoff, T. H. (2006). HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras. *Hum Immunol*, 67(6), 439-445.
- Ghosal, A. G., Mandal, T. K., Chowdhury, T. K., Mukherjee, K., & Mukherjee, D. (1996). HLA phenotype frequencies in pulmonary tuberculosis. *J Indian Med Assoc*, 94(9), 328-330.
- Gordon, A. H., Hart, P. D., & Young, M. R. (1980). Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature*, 286(5768), 79-80.

- Goyert, S. M., Ferrero, E., Rettig, W. J., Yenamandra, A. K., Obata, F., & Le Beau, M. M. (1988). The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science*, 239(4839), 497-500.
- Gutacker, M. M., Mathema, B., Soini, H., Shashkina, E., Kreiswirth, B. N., Graviss, E. A., et al. (2006). Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *J Infect Dis*, 193(1), 121-128.
- Gutierrez, M. C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., et al. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*, 1(1), e5.
- Hagen, G., Muller, S., Beato, M., & Suske, G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J*, 13(16), 3843-3851.
- Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M. G., Silber, R., & Goyert, S. M. (1988). The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol*, 141(2), 547-552.
- Herb, F., Thye, T., Niemann, S., Browne, E. N., Chinbuah, M. A., Gyapong, J., et al. (2008). ALOX5 variants associated with susceptibility to human pulmonary tuberculosis. *Hum Mol Genet*, 17(7), 1052-1060.
- Hernandez-Pando, R., Orozco, H., Sampieri, A., Pavon, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., et al. (1996). Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 89(1), 26-33.
- Hoheisel, G., Zheng, L., Teschler, H., Striz, I., & Costabel, U. (1995). Increased soluble CD14 levels in BAL fluid in pulmonary tuberculosis. *Chest*, 108(6), 1614-1616.
- Howard, A. D., & Zwillig, B. S. (1999). Reactivation of tuberculosis is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines. *Clin Exp Immunol*, 115(3), 428-434.
- Intemann, C., Thye, T., Förster, B., Owusu-Dabo, E., Gyapong, J., Horstmann, R., et al. (2011). MCP1 haplotypes associated with protection from pulmonary tuberculosis. *BMC Genet.*, 12, 34.
- Intemann, C. D., Thye, T., Niemann, S., Browne, E. N., Amanua Chinbuah, M., Enimil, A., et al. (2009). Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS Pathog*, 5(9), e1000577.

- Jersmann, H. P., Hii, C. S., Hodge, G. L., & Ferrante, A. (2001). Synthesis and surface expression of CD14 by human endothelial cells. *Infect Immun*, 69(1), 479-485.
- Jimenez-Corona, M. E., Garcia-Garcia, L., DeRiemer, K., Ferreyra-Reyes, L., Bobadilla-del-Valle, M., Cano-Arellano, B., et al. (2006). Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area. *Thorax*, 61(4), 348-353.
- Juffermans, N. P., Verbon, A., van Deventer, S. J., Buurman, W. A., van Deutekom, H., Speelman, P., et al. (1998). Serum concentrations of lipopolysaccharide activity-modulating proteins during tuberculosis. *J Infect Dis*, 178(6), 1839-1842.
- Kang, Y. A., Lee, H. W., Kim, Y. W., Han, S. K., Shim, Y. S., & Yim, J. J. (2009). Association between the -159C/T CD14 gene polymorphism and tuberculosis in a Korean population. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 57(3), 229-235.
- Khanna, K. V., Choi, C. S., Gekker, G., Peterson, P. K., & Molitor, T. W. (1996). Differential infection of porcine alveolar macrophage subpopulations by nonopsonized Mycobacterium bovis involves CD14 receptors. *J Leukoc Biol*, 60(2), 214-220.
- Klein, W., Tromm, A., Griga, T., Fricke, H., Folwaczny, C., Hocke, M., et al. (2002). A polymorphism in the CD14 gene is associated with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol*, 37(2), 189-191.
- Kong, Y., Cave, M. D., Yang, D., Zhang, L., Marrs, C. F., Foxman, B., et al. (2005). Distribution of insertion- and deletion-associated genetic polymorphisms among four Mycobacterium tuberculosis phospholipase C genes and associations with extrathoracic tuberculosis: a population-based study. *J Clin Microbiol*, 43(12), 6048-6053.
- Kong, Y., Cave, M. D., Zhang, L., Foxman, B., Marrs, C. F., Bates, J. H., et al. (2007). Association between Mycobacterium tuberculosis Beijing/W lineage strain infection and extrathoracic tuberculosis: Insights from epidemiologic and clinical characterization of the three principal genetic groups of M. tuberculosis clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 45(2), 409-414.
- Landmann, R., Muller, B., & Zimmerli, W. (2000). CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes Infect*, 2(3), 295-304.
- Larson, E. M., O'Donnell, M., Chamblee, S., Horsburgh, C. R., Jr., Marsh, B. J., Moreland, J. D., et al. (2011). Dual skin tests with Mycobacterium avium sensitin and PPD to detect misdiagnosis of latent tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis*, 15(11), 1504-1509, i.
- Lawn, S. D., Labeta, M. O., Arias, M., Acheampong, J. W., & Griffin, G. E. (2000). Elevated serum concentrations of soluble CD14 in HIV- and HIV+

- patients with tuberculosis in Africa: prolonged elevation during anti-tuberculosis treatment. *Clin Exp Immunol*, 120(3), 483-487.
- Le Beau, M. M., Espinosa, R., 3rd, Neuman, W. L., Stock, W., Roulston, D., Larson, R. A., et al. (1993). Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(12), 5484-5488.
- LeVan, T. D., Bloom, J. W., Bailey, T. J., Karp, C. L., Halonen, M., Martinez, F. D., et al. (2001). A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol*, 167(10), 5838-5844.
- Li, H. T., Zhang, T. T., Zhou, Y. Q., Huang, Q. H., & Huang, J. (2006). SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 10(1), 3-12.
- Lopez, B., Aguilar, D., Orozco, H., Burger, M., Espitia, C., Ritacco, V., et al. (2003). A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes. *Clin Exp Immunol*, 133(1), 30-37.
- Ma, X., Reich, R. A., Gonzalez, O., Pan, X., Fothergill, A. K., Starke, J. R., et al. (2003). No evidence for association between the polymorphism in the 3' untranslated region of interleukin-12B and human susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis*, 188(8), 1116-1118.
- Manca, C., Tsenova, L., Barry, C. E., 3rd, Bergtold, A., Freeman, S., Haslett, P. A., et al. (1999). Mycobacterium tuberculosis CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol*, 162(11), 6740-6746.
- Manca, C., Tsenova, L., Bergtold, A., Freeman, S., Tovey, M., Musser, J. M., et al. (2001). Virulence of a Mycobacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(10), 5752-5757.
- Manca, C., Tsenova, L., Freeman, S., Barczak, A. K., Tovey, M., Murray, P. J., et al. (2005). Hypervirulent M. tuberculosis W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res*, 25(11), 694-701.
- Meyer, C. G., May, J., & Stark, K. (1998). Human leukocyte antigens in tuberculosis and leprosy. *Trends Microbiol*, 6(4), 148-154.
- Moreno, C., Taverne, J., Mehlert, A., Bate, C. A., Brealey, R. J., Meager, A., et al. (1989). Lipoarabinomannan from Mycobacterium tuberculosis induces the production of tumour necrosis factor from human and murine macrophages. *Clin Exp Immunol*, 76(2), 240-245.

- Munthe-Kaas, M. C., Torjussen, T. M., Gervin, K., Lodrup Carlsen, K. C., Carlsen, K. H., Granum, B., et al. CD14 polymorphisms and serum CD14 levels through childhood: a role for gene methylation? *J Allergy Clin Immunol*, 125(6), 1361-1368.
- Nishimura, S., Zaitzu, M., Hara, M., Yokota, G., Watanabe, M., Ueda, Y., et al. (2003). A polymorphism in the promoter of the CD14 gene (CD14/-159) is associated with the development of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease. *J Pediatr*, 143(3), 357-362.
- North, R. J. (1998). Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis. *Clin Exp Immunol*, 113(1), 55-58.
- Pacheco, E., Fonseca, C., Montes, C., Zabaleta, J., Garcia, L. F., & Arias, M. A. (2004). CD14 gene promoter polymorphism in different clinical forms of tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 40(3), 207-213.
- Peterson, P. K., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W. S., Anderson, W. R., Ulevitch, R. J., et al. (1995). CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized Mycobacterium tuberculosis by human microglia. *Infect Immun*, 63(4), 1598-1602.
- Petroff, S. (1932). The Present Status of BCG Vaccination. *N Engl J Med*, 206, 436-439.
- Pugin, J., Heumann, I. D., Tomasz, A., Kravchenko, V. V., Akamatsu, Y., Nishijima, M., et al. (1994). CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*, 1(6), 509-516.
- Pugin, J., Schurer-Maly, C. C., Leturcq, D., Moriarty, A., Ulevitch, R. J., & Tobias, P. S. (1993). Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(7), 2744-2748.
- Reiling, N., Holscher, C., Fehrenbach, A., Kroger, S., Kirschning, C. J., Goyert, S., et al. (2002). Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*, 169(7), 3480-3484.
- Rey Nores, J. E., Bensussan, A., Vita, N., Stelter, F., Arias, M. A., Jones, M., et al. (1999). Soluble CD14 acts as a negative regulator of human T cell activation and function. *Eur J Immunol*, 29(1), 265-276.
- Rieder, H. L. (2003). [Clarification of the Luebeck infant tuberculosis]. *Pneumologie*, 57(7), 402-405.
- RKI. (2009). Tuberkulose. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten- Merkblätter für Ärzte.
- Rosas-Taraco, A. G., Revol, A., Salinas-Carmona, M. C., Rendon, A., Caballero-Olin, G., & Arce-Mendoza, A. Y. (2007). CD14 C(-159)T

- polymorphism is a risk factor for development of pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*, 196(11), 1698-1706.
- Rüsch-Gerdes, S., & Hillemann, D. (2008). [Modern laboratory diagnostics for mycobacteria]. *Pneumologie*, 62(9), 533-540.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467.
- Schluger, N. W., & Rom, W. N. (1998). The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 157(3 Pt 1), 679-691.
- Schütt, C. (1999). Cd14. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(5), 545-549.
- Schütt, C., & Schumann, R. (1993). [The endotoxin receptor CD14]. *Immun Infekt*, 21(2), 36-40.
- Shams, H., Wizel, B., Lakey, D. L., Samten, B., Vankayalapati, R., Valdivia, R. H., et al. (2003). The CD14 receptor does not mediate entry of Mycobacterium tuberculosis into human mononuclear phagocytes. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 36(1-2), 63-69.
- Simonds, B. (1957). The collection of 300 twin index cases for a study of tuberculosis in twins and their families. *Acta Genet Stat Med*, 7(1), 42-47.
- Skamene, E. (1994). The Bcg gene story. *Immunobiology*, 191(4-5), 451-460.
- Stead, W. W. (1997a). The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future. *Clin Chest Med*, 18(1), 65-77.
- Stead, W. W. (1997b). Perspective: a molecular approach to tuberculosis control-- an idea that might work. *J Infect Dis*, 176(3), 547-548.
- Stead, W. W. (2001). Variation in vulnerability to tuberculosis in America today: random, or legacies of different ancestral epidemics? *Int J Tuberc Lung Dis*, 5(9), 807-814.
- Stead, W. W., Senner, J. W., Reddick, W. T., & Lofgren, J. P. (1990). Racial differences in susceptibility to infection by Mycobacterium tuberculosis. *N Engl J Med*, 322(7), 422-427.
- Stelter, F. (2000). Structure/function relationships of CD14. *Chem Immunol*, 74, 25-41.
- Stelter, F., Pfister, M., Bernheiden, M., Jack, R. S., Bufler, P., Engelmann, H., et al. (1996). The myeloid differentiation antigen CD14 is N- and O-glycosylated. Contribution of N-linked glycosylation to different soluble CD14 isoforms. *Eur J Biochem*, 236(2), 457-464.
- Su, G. L., Dorko, K., Strom, S. C., Nussler, A. K., & Wang, S. C. (1999). CD14 expression and production by human hepatocytes. *J Hepatol*, 31(3), 435-442.

- Sugawara, I., Yamada, H., Mizuno, S., & Iwakura, Y. (2000). IL-4 is required for defense against mycobacterial infection. *Microbiol Immunol*, 44(12), 971-979.
- Supply, P., Marceau, M., Mangenot, S., Roche, D., Rouanet, C., Khanna, V., et al. (2013). Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Genet*.
- Takiff, H. E. (2007). Host Genetics and Susceptibility. In J. C. Palomino, S. C. Leão & V. Ritacco (Eds.), *Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care*.
- Tapping, R. I., & Tobias, P. S. (2000). Soluble CD14-mediated cellular responses to lipopolysaccharide. *Chem Immunol*, 74, 108-121.
- Teo, Y. Y., Small, K. S., & Kwiatkowski, D. P. (2010). Methodological challenges of genome-wide association analysis in Africa. *Nat Rev Genet*, 11(2), 149-160.
- Thye, T., Browne, E., Chinbuah, M., Gyapong, J., Osei, I., Owusu-Dabo, E., et al. (2006). No associations of human pulmonary tuberculosis with Sp110 variants. *J Med Genet*, 43(7), e32.
- Thye, T., Browne, E. N., Chinbuah, M. A., Gyapong, J., Osei, I., Owusu-Dabo, E., et al. (2009). IL10 haplotype associated with tuberculin skin test response but not with pulmonary TB. *PLoS One*, 4(5), e5420.
- Thye, T., Niemann, S., Walter, K., Homolka, S., Intemann, C., Chinbuah, M., et al. (2011). Variant G57E of mannose binding lectin associated with protection against tuberculosis caused by *Mycobacterium africanum* but not by *M. tuberculosis*. *PloS One*, 6(6).
- Thye, T., Owusu-Dabo, E., Vannberg, F. O., van Crevel, R., Curtis, J., Sahiratmadja, E., et al. (2012). Common variants at 11p13 are associated with susceptibility to tuberculosis. *Nat Genet*, 44(3), 257-259.
- Thye, T., Vannberg, F. O., Wong, S. H., Owusu-Dabo, E., Osei, I., Gyapong, J., et al. (2010). Genome-wide association analyses identifies a susceptibility locus for tuberculosis on chromosome 18q11.2. *Nat Genet*, 42(9), 739-741.
- Timmann, C., Thye, T., Vens, M., Evans, J., May, J., Ehmen, C., et al. (2012). Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. *Nature*, 489(7416), 443-446.
- Tobias, P. S., & Ulevitch, R. J. (1994). Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in the lipopolysaccharide-dependent activation of cells. *Chest*, 105(3 Suppl), 48S-50S.

- Tso, H. W., Ip, W. K., Chong, W. P., Tam, C. M., Chiang, A. K., & Lau, Y. L. (2005). Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. *Genes Immun*, 6(4), 358-363.
- Tso, H. W., Lau, Y. L., Tam, C. M., Wong, H. S., & Chiang, A. K. (2004). Associations between IL12B polymorphisms and tuberculosis in the Hong Kong Chinese population. *J Infect Dis*, 190(5), 913-919.
- Unkelbach, K., Gardemann, A., Kostrzewa, M., Philipp, M., Tillmanns, H., & Haberbosch, W. (1999). A new promoter polymorphism in the gene of lipopolysaccharide receptor CD14 is associated with expired myocardial infarction in patients with low atherosclerotic risk profile. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(4), 932-938.
- van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. M., & van der Meer, J. W. M. (2002). Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev*, 15(2), 294-309.
- WHO. (2009). WHO Report 2009, Global Tuberculosis Control.
- WHO. (2010). Fact Sheet N° 104.
- WHO. (2012). Global Tuberculosis Report 2012.
- Wieland, C. W., van der Windt, G. J., Wiersinga, W. J., Florquin, S., & van der Poll, T. (2008). CD14 contributes to pulmonary inflammation and mortality during murine tuberculosis. *Immunology*, 125(2), 272-279.
- Wright, S. D. (1995). CD14 and innate recognition of bacteria. *J Immunol*, 155(1), 6-8.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., & Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249(4975), 1431-1433.
- Xue, Y., Zhao, Z. Q., Chen, F., Zhang, L., Li, G. D., Ma, K. W., et al. (2012). Polymorphisms in the promoter of the CD14 gene and their associations with susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Tissue Antigens*, 80(5), 437-443.
- Yoon, H. J., Shin, J. H., Yang, S. H., Chae, D. W., Kim, H., Lee, D. S., et al. (2003). Association of the CD14 gene -159C polymorphism with progression of IgA nephropathy. *J Med Genet*, 40(2), 104-108.
- Yu, B., Hailman, E., & Wright, S. D. (1997). Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids. *J Clin Invest*, 99(2), 315-324.
- Zhang, Y., Doerfler, M., Lee, T. C., Guillemin, B., & Rom, W. N. (1993). Mechanisms of stimulation of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha by Mycobacterium tuberculosis components. *J Clin Invest*, 91(5), 2076-2083.

- Zhao, M. Y., Xue, Y., Zhao, Z. Q., Li, F. J., Fan, D. P., Wei, L. L., et al. (2012). Association of CD14 G(-1145)A and C(-159)T polymorphisms with reduced risk for tuberculosis in a Chinese Han population. *Genet Mol Res*, 11(3), 3425-3431.
- Zink, A. R., Sola, C., Reischl, U., Grabner, W., Rastogi, N., Wolf, H., et al. (2003). Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol*, 41(1), 359-367.

8 Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med Christian G. Meyer, der mir das Thema zur Verfügung stellte und mich die Art und Weise des wissenschaftlichen Schreibens lehrte.

Als nächstes möchte ich Dr. med Thorsten Thye danken, der jederzeit ein offenes Ohr für statistische Fragestellungen und für Fragen hinsichtlich der Durchführung der Arbeit im Labor hatte.

Prof. Dr. med. Rolf Horstmann und der Arbeitsgruppe für Molekulare Medizin danke ich für die warmherzige Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für die Einarbeitung in die Labortechniken. Mein besonderer Dank gilt Frau Christa Ehmen, die sich immer Zeit genommen hat, um mir die Techniken genau zu erklären, um mich in den Versuchsabläufen zu unterstützen und Probleme in Durchführungen zu diskutieren und zu lösen. Herr Jürgen Sievertsen, Herr Gerd Ruge, Frau Birgit Muntau, Frau Birgit Förster, Frau Britta Liedigk und Frau Dr. Claudia Esser danke ich für die immer offenen Ohren für Fragen und Hilfestellungen.

Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Frau Dr. Ulrike Herzog, die ich während der Zeit in der Arbeitsgruppe kennenlernen durfte und, die zu einer sehr guten und wichtigen Freundin für mich geworden ist. Vielen Dank, Ulli, für das viele Zuhören, Diskutieren und Korrekturlesen!

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, Heike und Günter Terhalle, und meinen Geschwistern, Janis und Aisha, die mich immer unterstützt haben. Großer Dank gilt meinem Vater für das geduldige und genaue Korrekturlesen!

Und nicht zuletzt danke ich meinen Hamburger Mädels, Miriam Leitz, Caroline Fenner, Helen Bichmann, Katrin Johanniemann und Momo Haag, für den starken Rückhalt und die Unterstützung in jeder Lebenslage.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Elena Terhalle