

Aus der Abteilung für tropenmedizinische Grundlagenforschung des  
Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin  
Prof. Dr. med. Rolf Horstmann

**Genetische Varianten von *SPP1* und deren Einfluss auf  
die Empfänglichkeit für Lungentuberkulose bei einer  
Studienpopulation in Ghana, Westafrika**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Hanna Matthews  
aus Hamburg

Hamburg 2011

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 26.04.2012

Veröffentlichung mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. C.G. Meyer

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. med. J. May

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. med. F. Haag

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Tuberkulose .....	1
1.1.1.	Epidemiologie .....	1
1.1.2.	Erreger.....	2
1.1.3.	Infektionsweg und Pathogenese .....	3
1.1.4.	Klinik.....	4
1.1.5.	Diagnostik .....	5
1.1.5.1.	Röntgendiagnostik .....	5
1.1.5.2.	Bakteriologische Diagnostik .....	5
1.1.5.3.	Immunologische Verfahren .....	7
1.1.6.	Therapie .....	8
1.1.7.	Immunantwort auf Mykobakterien .....	8
1.1.8.	Unterschiedliche Empfänglichkeit für Tuberkulose .....	10
1.2.	Osteopontin .....	12
1.2.1.	Vorkommen von OPN .....	12
1.2.2.	Genetische Grundlagen .....	13
1.2.3.	Proteinstruktur und biochemische Charakteristika.....	13
1.2.4.	Interaktionsdomänen .....	14
1.2.5.	Proteolytische Spaltung .....	15
1.2.6.	Rezeptorinteraktion.....	15
1.2.7.	Funktion von OPN und deren Regulation.....	16
1.2.8.	Assoziierte Erkrankungen .....	17
1.2.9.	Regulation der Genexpression.....	17
1.2.10.	OPN und zelluläre Immunantwort .....	18
1.2.11.	Rolle von OPN bei granulomatösen Erkrankungen und Tuberkulose .....	19
1.3.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	20
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
2.1.	Studienpopulation .....	21
2.2.	Materialien .....	22
2.2.1.	Chemikalien .....	22
2.2.2.	Puffer und Lösungen.....	23
2.2.3.	Reaktionssysteme.....	24
2.2.4.	Oligonukleotide .....	24
2.2.5.	Verbrauchsmaterialien .....	26
2.2.6.	Geräte.....	26
2.2.7.	Elektronische Datenbanken und Datenverarbeitungsprogramme.....	27
2.3.	Methoden.....	28

2.3.1.	DNA-Isolierung .....	28
2.3.2.	Phi-Amplifizierung .....	28
2.3.3.	Primerdesign für die Sequenzierung .....	29
2.3.4.	Polymerasekettenreaktion.....	30
2.3.5.	Agarose-Gelelektrophorese .....	31
2.3.6.	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	32
2.3.7.	Sequenzierreaktion mittels Kettenabbruchverfahren .....	32
2.3.8.	Aufreinigung der Produkte der Sequenzierreaktion .....	33
2.3.9.	Sequenzanalyse .....	33
2.3.10.	Primerdesign für die Genotypisierung .....	34
2.3.11.	Genotypisierung mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer.....	35
2.3.12.	Statistische Verfahren .....	38
2.3.12.1.	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht .....	39
2.3.12.2.	Powerberechnung .....	39
2.3.12.3.	Assoziationsanalyse .....	39
2.3.12.4.	Haplotypenberechnung.....	40
2.3.12.5.	Bonferroni-Korrektur .....	40
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
3.1.	Allgemeine Beobachtungen in der Studiengruppe .....	41
3.1.1.	Ethnische Zugehörigkeiten der Studienpopulation .....	43
3.1.2.	Verteilung der mykobakteriellen Genotypen.....	43
3.2.	Re-Sequenzierung relevanter Abschnitte von <i>SPP1</i> .....	45
3.2.1.	Auswahl der SNPs für die Genotypisierung .....	48
3.3.	Genotypisierung der ausgewählten <i>SPP1</i> -Varianten.....	49
3.3.1.	Variante rs2853744.....	51
3.3.2.	Variante rs11730582.....	52
3.3.3.	Variante rs17524488.....	53
3.3.4.	Variante rs28357094.....	54
3.3.5.	Variante rs41497449.....	54
3.3.6.	Variante rs6812524 .....	55
3.3.7.	Variante rs7435825.....	57
3.3.8.	Variante rs1126616.....	59
3.3.9.	Variante rs4660 .....	60
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>61</b>
4.1.	Osteopontin und Immunität gegenüber Mykobakterien .....	61
4.2.	Assoziation von Polymorphismen des <i>SPP1</i> -Gens mit der Empfänglichkeit für	

Lungentuberkulose .....	62
4.2.1. Verteilung der genotypisierten <i>SPP1</i> -Varianten .....	64
4.2.2. Assoziation von <i>SPP1</i> -Varianten mit Empfänglichkeit für Lungentuberkulose ....	67
4.2.3. Assoziation von <i>SPP1</i> -Varianten mit Reaktivität im PPD-Test .....	70
4.2.4. Assoziation von <i>SPP1</i> -Varianten mit radiologischen Befunden in der Fallgruppe.....	71
4.3. Differenzierung der mykobakteriellen Genotypen.....	73
4.3.1. Assoziation von <i>SPP1</i> -Varianten mit Erkrankung durch unterschiedliche mykobakterielle Genotypen.....	75
4.4. Schlussfolgerung .....	79
5. ZUSAMMENFASSUNG .....	81
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	82
7. LITERATURVERZEICHNIS .....	84
8. DANKSAGUNG.....	103
9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....	104

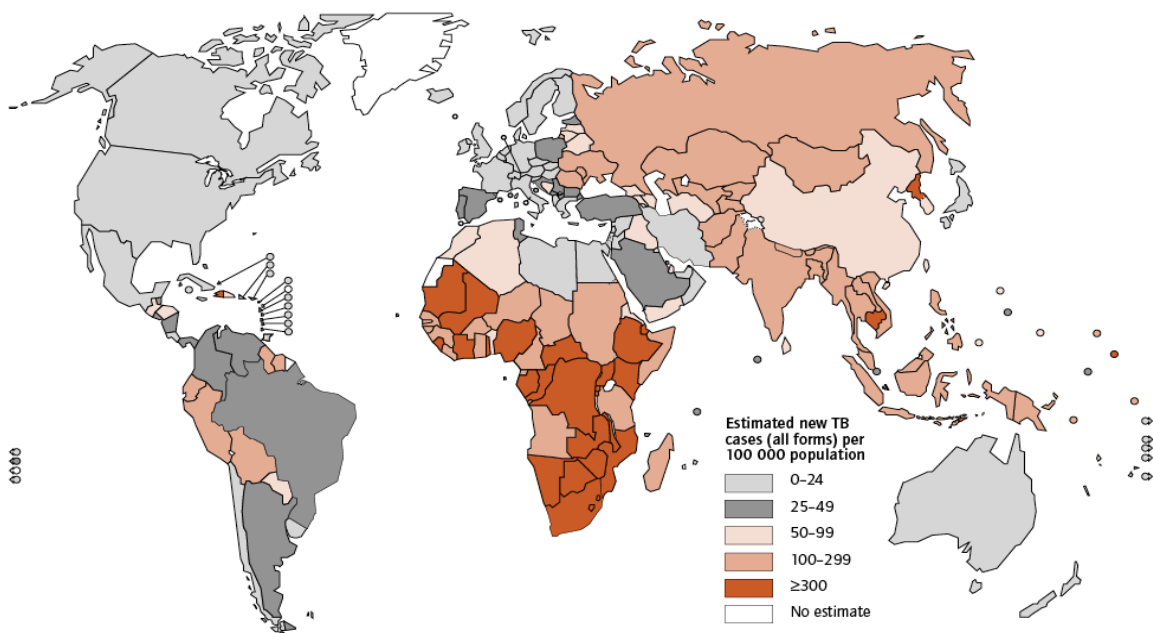
# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Tuberkulose

### 1.1.1. Epidemiologie

Tuberkulose ist nach der HIV-Infektion die weltweit häufigste Infektionskrankheit. Nach Schätzungen der WHO (*World Health Organisation*) ist ein Drittel der Weltbevölkerung mit Erregern der Tuberkulose infiziert (WHO, 2008). Im Jahr 2007 gab es etwa 9,27 Millionen (Mio.) Neuerkrankungen und 1,3 Mio. Todesfälle. Von der Gesamtzahl der Neuerkrankungen waren ca. 4,1 Mio. Fälle (44%) Sputum-positiv (WHO, 2009). Die globale Prävalenz betrug 2007 ca. 13,7 Mio. Erkrankte. Die Inzidenz von Tuberkulose beläuft sich global auf etwa 137 neue Fälle jährlich pro 100 000 Personen. Dabei bestehen erhebliche regionale Unterschiede. 22 Länder werden von der WHO als *high-burden countries* benannt. In diesen Ländern treten ca. 80% aller Fälle auf. Auf Kontinente bezogen finden sich in Asien 55% und in Afrika 31% aller Fälle. Afrika hatte im Jahr 2007 die höchsten Inzidenzen mit durchschnittlich 363/100 000 pro Jahr. Von besonderer Bedeutung sind Südafrika und Simbabwe mit 948/100 000 bzw. 782/100 000 Fällen pro Jahr.

Obwohl die absolute Zahl von Neuerkrankungen an Tuberkulose aufgrund des Bevölkerungswachstums weiterhin ansteigt, nimmt die weltweite Inzidenz mit etwa 1% pro Jahr langsam ab (WHO, 2009).



**Abbildung 1.1. Geschätzte Inzidenz der Tuberkulose pro Land, 2007 (WHO, 2009)**

Inzidenz der Tuberkulose (alle Formen) bezogen auf 100 000 Personen im Jahr 2007.

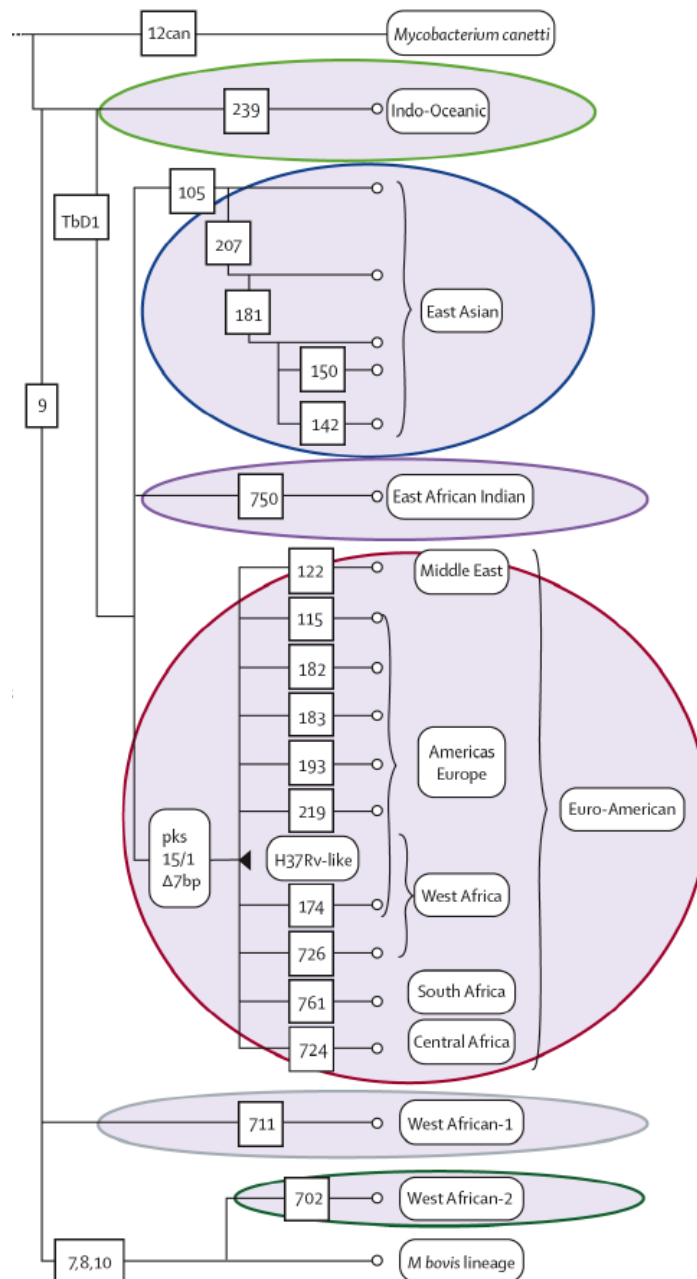
### 1.1.2. Erreger

Die Erreger der Tuberkulose sind Bakterien der Ordnung Actinomycetales, Familie *Mycobacteriaceae*, Gattung *Mycobacterium* (Barrera, 2007). Es handelt sich um aerobe, unbewegliche, langsam wachsende und obligat intrazelluläre Stäbchenbakterien mit einer Länge von 1-10 µm.

Innerhalb der Gattung *Mycobacterium* (*M.*) sind nur wenige Bakterien für den Menschen als Pathogene von Bedeutung. Die Erreger der Tuberkulose werden im *M. tuberculosis*-Komplex (MTBK) zusammengefasst. Es handelt sich dabei einerseits um die typischen Erreger *M. tuberculosis* und *M. africanum*, andererseits um die hauptsächlich tierpathogenen *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii* und *M. pinipedii* (RKI, 2009). Daneben gibt es weitere Mykobakterien, die unter dem Begriff „nicht-tuberkulöse Mykobakterien“ (NTM) oder auch *mycobacteria other than tuberculosis* (MOTT) zusammengefasst werden (z.B. *M. ulcerans*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. marinum*, *M. fortuitum*).

Mykobakterien lassen sich nur schlecht durch Gramfärbung anfärben, obwohl der Zellwandaufbau demjenigen grampositiver Bakterien ähnelt. Ursache ist der hohe Lipidanteil der Zellwand. Mykobakterien nehmen nur durch spezielle Verfahren Farbe auf, die sie auch durch Behandlung mit Salzsäure nicht wieder abgeben. Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie als „säurefest“ bezeichnet.

Innerhalb des MTBK lassen sich Mykobakterienisolate mittels genetischer Marker differenzieren und so phylogenetischen Zweigen zuordnen. Genotypen können sowohl hinsichtlich ihrer Virulenz als auch bezüglich ihres geographischen Vorkommens variieren. Mehrere Arbeitsgruppen haben phylogenetische Einteilungen der Tuberkuloseerreger auf Grundlage verschiedener genetischer Marker entwickelt. Die Arbeitsgruppe um S. Gagneux (2007) fasste nach Analyse von vier aktuellen Studien (Baker *et al.*, 2004; Filliol *et al.*, 2006; Gagneux *et al.*, 2006; Gutacker *et al.*, 2006) sechs Hauptgruppen zusammen. Dabei unterscheiden sich die als *M. tuberculosis* summierten Stämme von *M. africanum* durch die DNA-Deletionen RD (*region of difference*) 9 und TbD1 (Brosch *et al.*, 2002). Die inhomogene Gruppe von *M. tuberculosis* lässt sich je nach regionalem Auftreten der Erreger weiter in die Euro-American (EUAM)-Gruppe und die Gruppen East African-Indian, East Asian und Indo-Oceanic unterteilen. *M. africanum* wird weiter in die Gruppen West African 1 und West African 2 unterteilt.



**Abbildung 1.2. Phylogenetischer Stammbaum des MTBK (Gagneux *et al.*, 2008)**

Differenzierung der Genotypen nach genetischen Markern. Die Bezeichnung der Genotypen in unserer Auswertung legt die Nomenklatur von Gagneux *et al.* (2006) zugrunde. Die eckigen Kästen bezeichnen die *regions of difference* (RD), nach denen die Unterscheidung vorgenommen wurde.

### 1.1.3. Infektionsweg und Pathogenese

Für *M. tuberculosis* und *M. africanum* ist der Mensch alleiniges Reservoir. Für *M. bovis* und *M. canettii* können auch Rinder und einige Wildtierarten Reservoir darstellen (Barrera, 2007; RKI, 2009).

Die Infektion erfolgt in der Regel durch Inhalation von Aerosolen. Um die Infektion übertragen zu können, muss ein Patient daher einen infektiösen Tuberkuloseherd mit Anschluss an das Bronchialsystem aufweisen (offene Lungentuberkulose). Die Infektiosität



der Erreger ist im Vergleich zu anderen Tröpfcheninfektionen gering. Ob es zu einer Ansteckung kommt hängt einerseits von quantitativen Faktoren wie Infektionsdosis, Häufigkeit und Intensität des Kontakts, andererseits von qualitativen Faktoren wie Virulenz der Erreger und persönlicher Disposition (z.B. Immunstatus, Ernährungszustand) exponierter Personen ab (RKI, 2009).

Nur etwa 5-10% immunkompetenter Infizierter entwickeln im Laufe ihres Lebens eine klinisch manifeste Tuberkulose (RKI, 2009). Durch immunologische Mechanismen können die Erreger meist in ihrer Ausbreitung gehindert oder sogar eliminiert werden. Die Inkubationszeit der Tuberkulose ist variabel und ebenfalls von individuellen Faktoren abhängig. Sie beträgt einige Wochen bis viele Monate. Durchschnittlich manifestiert sich eine Lungentuberkulose nach etwa sechs Monaten. Bei fulminanten Verläufen ist eine wesentlich frühere Krankheitsmanifestation möglich.

Entsprechend dem Verlauf der Erkrankung unterscheidet man Primär- und Sekundärtuberkulose. Die Primärinfektion mit Mykobakterien betrifft nahezu ausschließlich die Lunge. Es kommt zu einer lokalen Immunreaktion mit Bildung epitheloidzellreicher, verkäsender Granulome. Auch zugehörige Lymphknoten, zumeist im Hilusbereich, sind betroffen. Die Primärinfektion erfolgt in Ländern mit hoher Durchseuchung in der Regel im Kindesalter.

Die Reaktivierung der Erkrankung bezeichnet man als Sekundärtuberkulose oder postprimäre Tuberkulose (RKI, 2009). Eine Reaktivierung der Erkrankung tritt meist bei Patienten mit Immunschwäche auf. Eine Sekundärtuberkulose kann Jahrzehnte nach einer Primärinfektion auftreten. In 80 % der Fälle findet sich die Infektion in der Lunge, aber auch eine hämatogene oder lymphogene Absiedlung in andere Organe kommt vor. So ist ein Befall von Urogenitaltrakt, Haut, Wirbeln, Hirnhäuten, Lymphknoten und anderen Organen möglich. In seltenen Fällen, und häufiger bei Kindern als bei Erwachsenen (Detjen *et al.*, 2009), kann es auch zu einer primär disseminierten Aussaat der Erreger kommen, die sich als Sepsis (Landouzy-Sepsis), Meningitis oder Miliartuberkulose manifestiert. Unter Miliartuberkulose versteht man das verstreute Auftreten multipler hirsekorngroßer Granulome im ganzen Körper (RKI, 2009).

### 1.1.4. Klinik

Eine Primärtuberkulose bleibt klinisch meist symptomlos. Leitsymptom einer manifesten Lungentuberkulose ist Husten mit oder ohne Auswurf. Auch Hämoptysen sind möglich. Weitere häufige Symptome sind Thoraxschmerzen und Atemnot. Typische Allgemeinsymptome wie Gewichtsverlust, Fieber, Nachtschweiß, allgemeine Abgeschlagenheit, Leistungsknick und Müdigkeit treten auf. Aufgrund dieser Begleitsymptomatik ist bei chro-

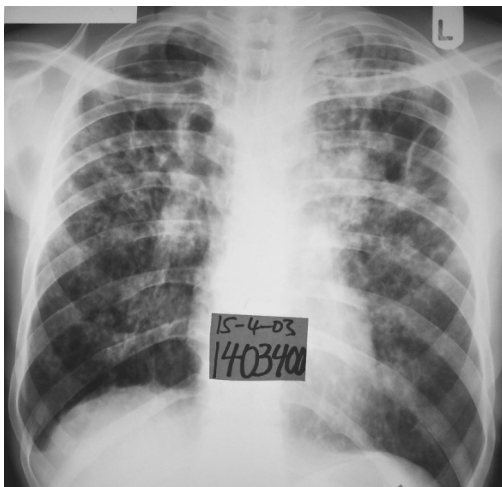
nischem Geschehen immer auch die Abgrenzung gegen maligne Erkrankungen von Bedeutung (RKI, 2009).

### 1.1.5. Diagnostik

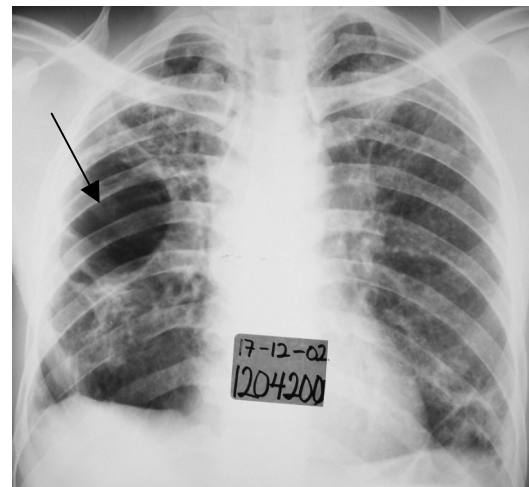
Die Diagnose der Tuberkulose wird normalerweise auf Grundlage mehrerer diagnostischer Verfahren gestellt, da erst die Kombination von Befunden eine ausreichend hohe Sensitivität und Spezifität der Diagnose gewährleistet.

#### 1.1.5.1. Röntgendiagnostik

Bei entsprechender klinischer Symptomatik gehört eine Röntgenaufnahme des Thorax zum Standard der Tuberkulose-Diagnostik. Sowohl zur Differentialdiagnose als auch zur Verlaufsbeurteilung spielt sie eine wichtige Rolle. Die Primärinfektion wird durch den Ghonschen Primärkomplex radiologisch sichtbar, der von Granulom und zugehörigem hilären Lymphknoten gebildet wird. Eine manifeste Lungentuberkulose zeigt sich meist durch Infiltrate, die sich häufiger als bei der Pneumonie in Ober- oder Mittellappen finden. Weitere tuberkulose typische Befunde sind Kalzifizierungen, Pleuraverdickungen, Lungenfibrosierungen und in ausgeprägten Fällen die Bildung von Kavernen, die im Röntgenbild durch Spiegelbildung sichtbar werden können.



**Abbildung 1.3. Infiltrate**



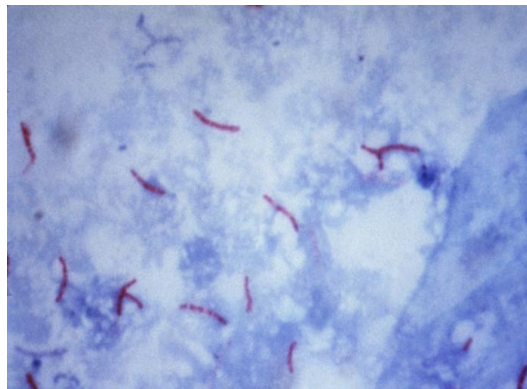
**Abbildung 1.4. Kaverne (←), Infiltrate**

Typische radiologische Befunde bei Patienten mit Lungentuberkulose. Die Bilder stammen von ghanaischen Patienten, die im Rahmen der hier beschriebenen Studie untersucht wurden.

#### 1.1.5.2. Bakteriologische Diagnostik

Der Nachweis der Tuberkuloseerreger erfolgt in der Regel aus Sputum. Bei negativem Sputum-Befund kann die Diagnose einer Lungentuberkulose auch durch Gewinnung von Magensaft oder bronchoalveoläre Lavage ermöglicht werden. Je nach Lokalisation der Infektion ist der Nachweis auch aus Liquor, Urin oder Biopsiematerial möglich.

Der lichtmikroskopische Nachweis säurefester Stäbchen ist aufgrund der Kombination von Schnelligkeit und Aussagekraft das grundlegende Verfahren der Tuberkulosedagnostik. Standardmäßig wird die Ziehl-Neelsen-Färbung eingesetzt, aber auch die Kinyoun-Färbung oder die Fluoreszenzfärbung mit Auramin-Rhodamin ermöglichen die Diagnose. Ein positiver Sputum-Befund entspricht potentieller Infektiosität und damit der Isolierungsbedürftigkeit eines Patienten. Voraussetzung für ein positives Ergebnis ist eine Bakterienlast von mindestens  $10^4$  Keimen/ml Probenmaterial; ein negativer Befund bei der mikroskopischen Untersuchung schließt daher eine Tuberkulose nicht zwangsläufig aus (Rüsch-Gerdes *et al.*, 2008).



**Abbildung 1.5. Säurefeste Stäbchen in Ziehl-Neelsen-Färbung**

Die Ziehl-Neelsen-Färbung färbt Mykobakterien rötlich-violett, während das umgebende Gewebe bläulich erscheint. Bild aus der *Public Health Image Library*, <http://phil.cdc.gov/phil>.

Zur Speziesbestimmung und Resistenztestung ist erforderlich, die Probenmaterialien zu kultivieren. Da Mykobakterien des MTBK eine Generationszeit von 16-20 Stunden haben, ist es notwendig, das Probenmaterial durch Abtöten der schnellwachsenden Begleitflora, meist mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH, vorzubereiten. Für die Kultur sollten mindestens drei Medien beimpft werden, idealerweise eine Kombination aus Flüssig- und Festmedien (Rüsch-Gerdes *et al.*, 2008). In Flüssigmedien kann das Wachstum durch Indikatorsysteme (z.B. Bildung von  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid) bereits nach ein bis zwei Wochen nachgewiesen werden. Festmedien wie der Löwenstein-Jensen-Agar benötigen dagegen Anzuchtzeiten von drei bis vier Wochen oder länger. Die Kontaminationsrate von Festmedien ist jedoch geringer als die von Flüssigmedien. Resistenztestungen erfolgen aufgrund der Notwendigkeit schneller Befunde in der Regel auf Flüssigkulturen.

Auch ein Nachweis durch *in vitro*-Amplifizierung bekannter Nukleinsäuresequenzen des Erregers aus Untersuchungsmaterial mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ist möglich. Der Vorteil von PCR-Verfahren im Vergleich zu Kulturverfahren liegt darin, dass Ergebnisse nach etwa 3-4 Stunden vorliegen. Allerdings sind PCR-Verfahren meist weniger sensitiv als Kulturen und können nur eingeschränkt Aussagen zu Resistenzen liefern

(Rüsch-Gerdes *et al.*, 2008). Mit den kommerziell erhältlichen PCR-Kits werden nur Erreger des MTBK detektiert.

Da neben den humanpathogenen Keimen des MTBK viele weitere, meist apathogene Mykobakterien existieren, ist eine Speziesbestimmung für die genaue Diagnose und Therapieplanung notwendig. Eine Differenzierung der Erreger aus dem MTBK und einiger wichtiger Arten der NTM ist morphologisch durch spezifische Wachstumsformen sowie den biochemischen Nachweis von Niacin- und Nitratreduktase-Aktivität in der Kultur möglich. Eine Identifizierung dauert zwei bis sechs Wochen.

Spezies- und Genotypdifferenzierung erfolgen durch molekulargenetische Verfahren. Das DNA-Fingerprinting erfolgt durch Analyse von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP). Dazu wird ein Abschnitt der mykobakteriellen DNA untersucht, der sich in charakteristischer Weise bei den verschiedenen Genotypen unterscheidet. Für die Erreger des MTBK ist die Insertion IS6110 spezifisch (van Embden *et al.*, 1993). Ein weniger aufwendiges, aber auch weniger sensitives Verfahren ist das Spoligotyping (*spacer oligonucleotide typing*). Diese PCR-basierte Methode detektiert das Vorhandensein bestimmter repetitiver DNA-Sequenzen im mykobakteriellen Genom (Kamerbeek *et al.*, 1997). Eine neue Methode ist die MIRU-VNTR (*mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats*)-Analyse (Supply *et al.*, 2000).

### 1.1.5.3. Immunologische Verfahren

Eine Infektion mit Mykobakterien induziert in der Regel die Ausbildung einer zellulären Immunität im Sinne einer Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV). Dies wird im PPD-Test zur Diagnostik genutzt. PPD (*purified protein derivate*) bezeichnet die gereinigte Suspension hitzeinaktivierter Tuberkuloseerreger. Nach intrakutaner Applikation von PPD kommt es bei erfolgtem Kontakt mit den Erregern zu einer sichtbaren lokalen inflammatorischen Reaktion mit Rötung und Induration, welche die Etablierung einer zellulären Immunität gegen Mykobakterien anzeigt. Allerdings erzeugen auch die Impfung mit BCG (Bacille-Calmette-Guérin), einem attenuierten *M. bovis*-Stamm sowie eine Infektion mit NTM eine positive Reaktion. Andererseits kann bei Patienten mit stark eingeschränkter zellulärer Immunität, wie bei fortgeschrittener HIV-Infektion, immunsuppressiver Therapie, einigen akuten Virusinfektionen oder Tuberkulose im Endstadium der Hauttest trotz einer bestehenden Infektion negativ ausfallen (Rüsch-Gerdes *et al.*, 2008).

Der IGRA (*Interferon-Gamma-Release-Assay*) ist ein immunologischer Bluttest (Hauer, 2008; Pai *et al.*, 2008a). Er beruht auf der Tatsache, dass spezifische T-Lymphozyten durch Gabe von entsprechenden spezifischen Antigenen aktiviert werden und Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und andere proinflammatorische Zytokine freisetzen. Die Freisetzung kann durch

immunologische Verfahren gemessen werden (ELISA, ELISPOT). Als spezifische Antigene werden ESAT6 (*early secreted antigenic target 6kD protein*) oder CFP10 (*culture filtrate protein 10*) verwendet. Die für diese Proteine kodierenden Gene liegen in der RD1-Region des mykobakteriellen Genoms. Diese fehlt sowohl *M. bovis* BCG als auch den meisten NTM, die das Testergebnis somit nicht beeinflussen (Ausnahmen: *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*) (Diel *et al.*, 2006; Detjen *et al.*, 2007; Hauer, 2008; Pai *et al.*, 2008b). Eine Unterscheidung zwischen latenter und aktiver Tuberkulose ist bei beiden Varianten nicht möglich (Hauer, 2008; Pai *et al.*, 2008a).

### 1.1.6. Therapie

Die Therapie der Tuberkulose erfolgt grundsätzlich mit einer Kombination von Medikamenten, um ein sicheres Erfassen der unterschiedlichen Mykobakterienisolate zu gewährleisten und das Entstehen von Resistenzen zu vermeiden. Medikamente der ersten Wahl sind Isoniazid (INH), Rifampizin (RMP), Ethambutol (EMB), Pyrazinamid (PZA) und Streptomycin (SM). Die von der WHO empfohlene Kurzzeit-Therapie (*short course*) besteht aus einer initialen zweimonatigen Vierfach-Kombination von INH, RMP, EMB und PZA. Danach folgt eine Zweifach-Therapie für mindestens weitere 4 Monate mit INH und RMP. Kann das Vorliegen von Resistenzen bereits zu Beginn sicher ausgeschlossen werden, ist auch eine Initialtherapie mit nur drei Medikamenten möglich (INH, RMP, PZA).

Die langfristige, kontinuierliche Medikamenteneinnahme ist für eine erfolgreiche Therapie unabdingbar. Aufgrund von Nebenwirkungen und Therapiedauer ist gelegentlich die mangelnde Therapieadhärenz der Patienten ein Problem. Die WHO empfiehlt daher als Therapiekonzept die überwachte Medikamenteneinnahme (*directly observed treatment-short course*, DOTS). Eine besondere Herausforderung in der Therapie der Tuberkulose sind die weltweit zunehmenden Medikamentenresistenzen bei einigen Stämmen (MDR und XDR-Stämme).

### 1.1.7. Immunantwort auf Mykobakterien

Die Tuberkulose ist durch eine zellvermittelte Immunantwort vom Th1-Typ gekennzeichnet. Diese ist durch die Interaktion von Makrophagen, dendritischen und CD4-positiven T-Helfer-Zellen charakterisiert und führt zur Bildung von Granulomen. Die spezifische zelluläre Immunantwort kann das Wachstum der Erreger verhindern, sie häufig aber nicht definitiv eliminieren (North *et al.*, 2004).

Die meisten Erreger werden nach Übertragung bereits in den Bronchien abgefangen und durch Zilien mechanisch entfernt. In den Alveolen bilden Makrophagen und dendritische Zellen (DC) die erste Abwehrlinie der angeborenen, unspezifischen Immunität. Als antigenpräsentierende Zellen (APC) sind sie in der Lage, die Erreger zu phagozytieren. Die

Erkennung der Pathogene erfolgt über sogenannte *pattern recognition receptors*. Durch ihre Fähigkeit, die Reifung von erregerhaltigen Phagosomen zu Phagolysosomen zu inhibieren, können Mykobakterien in APCs überleben (Gatfield *et al.*, 2000). Dadurch wird die Fähigkeit der Makrophagen, Mykobakterien abzutöten, stark eingeschränkt.

Ihre Aufgabe besteht daher zum einen darin, eine weitere Ausbreitung der Bakterien zu verhindern, zum anderen, spezifische T-Zellen zu aktivieren und so eine adaptive Immunantwort zu initiieren. Mit Mykobakterien infizierte APC gelangen in lokale Lymphknoten und präsentieren dort über HLA (humane Leukozyten-Antigene)-Moleküle die aufgenommenen Antigene (Flynn *et al.*, 2001). Da sich die Erreger in den Phagosomen der APC befinden, werden sie über HLA-Moleküle der Klasse II präsentiert und aktivieren spezifische CD4-positive T-Lymphozyten. Auch HLA-I-spezifische CD8-positive T-Lymphozyten werden aktiviert (van Pinxteren *et al.*, 2000). Neben konventionellen T-Zellen, die einen  $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor ( $\alpha\beta$ -TCR) tragen, werden auch unkonventionelle CD4- und CD8-positive T-Lymphozyten mit  $\gamma\delta$ -TCR aktiviert. Dies geschieht durch CD1-Moleküle, die besonders auf dendritischen Zellen exprimiert werden und mykobakterielle Glykolipide präsentieren (Porcelli *et al.*, 1999; Ulrichs *et al.*, 2000).

Weiterhin produzieren die infizierten Makrophagen Interleukin (IL)-12 (Henderson *et al.*, 1997; Ladel *et al.*, 1997). Dies führt initial zur Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  durch natürliche Killerzellen (NKT) (Trinchieri *et al.*, 2003). T-Lymphozyten akkumulieren am Ort der IL-12-Produktion und proliferieren zu Antigen-spezifischen Th1-Zellen. Sie sind Hauptproduzenten von  $\text{IFN}\gamma$  im Verlauf der erworbenen Immunantwort und von grundlegender Bedeutung für die Kontrolle der chronischen Infektion mit Tuberkuloseerregern (Barnes *et al.*, 1993; Lalvani *et al.*, 1998).  $\text{IFN}\gamma$  fördert die antimikrobielle Aktivität infizierter APC, so dass phagozytierte Erreger effektiver abgetötet werden können, unter anderem durch die Produktion von freien Radikalen (MacMicking *et al.*, 1997; Shiloh *et al.*, 2000).

Die initiale IL-12-Produktion führt zur Ausbildung einer spezifischen Th1-Antwort (Abbas *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997). Die Produktion der Th2-spezifischen antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-4 wird durch IL-12 supprimiert (Lin *et al.*, 1996). Bei der Etablierung der Immunantwort auf Mykobakterien spielen weitere proinflammatorische Zytokine eine Rolle. APC produzieren IL-23 (Oppmann *et al.*, 2000), IL-18 (Nakanishi *et al.*, 2001), IL-27 (Pflanz *et al.*, 2002) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ).  $\text{TNF}\alpha$  unterstützt  $\text{IFN}\gamma$  in der Makrophagenaktivierung und hat eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung von Struktur und Integrität der Granulome, die sich im Verlauf der Erkrankung bilden (Flynn *et al.*, 1995; Roach *et al.*, 2001).

Durch die Bildung von Granulomen kann eine Eindämmung der Tuberkuloseerreger ermöglicht werden. Die sezernierten Zytokine führen zur Akkumulation von Zellen im Be-

reich der Infektion. Aktivierte Makrophagen differenzieren zu Epitheloidzellen und mehrkernigen Riesenzellen und bilden einen Schutzwall um die Erreger. Auch T-Lymphozyten tragen entscheidend zur Organisation der Granulome bei. CD8-positive zytotoxische T-Zellen können infizierte Makrophagen direkt abtöten (Kaufmann, 1999), so dass im Granulominneren ein nekrotisches Zentrum entsteht (Stenger *et al.*, 1997; Flynn *et al.*, 2001).

Durch die Formation von Granulomen werden Erreger zwar abgekapselt, können jedoch jahrelang persistieren. Sie sind in der Lage, sich dem speziellen Milieu im Granulom anzupassen und ihre Replikationsrate und ihren Stoffwechsel zu reduzieren (McKinney *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2000). Durch Schwächung des Immunsystems kann das spezifische Gleichgewicht, dessen es zur Aufrechterhaltung des Granuloms bedarf, zerstört werden, die Erreger können sich wieder vermehren und eine endogene Re-Infektionen bedingen.

### **1.1.8. Unterschiedliche Empfänglichkeit für Tuberkulose**

Etwa ein Drittel aller Menschen ist laut Analysen der WHO mit Mykobakterien infiziert (WHO, 2009). Allerdings erkranken nur 5-10% der infizierten Erwachsenen im Laufe ihres Lebens an Tuberkulose (RKI, 2009). Der Verlauf einer manifesten Tuberkulose ist interindividuell sehr unterschiedlich (Horstmann, 2003; Kritski *et al.*, 2007). Bekannte Risikofaktoren, die Einfluss auf die Ausprägung der Erkrankung nehmen, sind Unterernährung, Armut, hohes oder sehr junges Alter, männliches Geschlecht, angeborene oder erworbene Immunschwäche, Diabetes mellitus, Silikose und andere Lungenfibrosen sowie Alkohol- und Tabakkonsum (RKI, 2009).

Zudem scheinen genetische Faktoren des Wirts die Empfänglichkeit für Tuberkulose zu beeinflussen. Das „Impfunglück von Lübeck“ von 1930 lieferte erstmals Daten, die für eine genetische Disposition sprachen. 251 Neugeborene wurden durch versehentliche Gabe nicht-attenuierter Tuberkuloseerreger anstelle der üblichen BCG-Impfung mit virulenten *M. tuberculosis*-Isolaten infiziert. Insgesamt 77 Kinder starben, weitere 126 zeigten radiologische Auffälligkeiten, alle übrigen blieben gesund (Lange, 1930; Rieder, 2003). Auch statistisch aussagekräftige Zwillingsstudien zur Tuberkuloseempfindlichkeit zeigten bei eineiigen Zwillingen eine signifikant höhere Konkordanz der Erkrankungsmanifestation als bei zweieiigen Zwillingen (Kallmann *et al.*, 1943; Comstock, 1978).

Einen weiteren Hinweis auf den Einfluss genetischer Faktoren gibt das vermehrte Auftreten von Tuberkulose bei Patienten mit Defekten in der IL-12/IFN $\gamma$  Achse. Mutationen in den Genen der beiden Ketten des IFN $\gamma$ -Rezeptors (IFNGR1 und IFNGR2), STAT1 (signal transducer and activator of transcription-1), der p40-Untereinheit von IL-12 (IL12B) und der b1-Untereinheit des IL-12-Rezeptors (IL12RB1) resultieren in einer eingeschränkten

IFN $\gamma$ -Antwort (Newport *et al.*, 1996; Jouanguy *et al.*, 1997; Altare *et al.*, 1998; Remus *et al.*, 2001; Casanova *et al.*, 2002; Picard *et al.*, 2002). Diese Erkrankungen sind mit einer selektiv erhöhten Empfänglichkeit für mykobakterielle Infektionen assoziiert. Sie werden daher unter dem Namen *mendelian susceptibility to mycobacterial diseases* (MSMD) zusammengefasst (Casanova *et al.*, 2002; Ottenhoff *et al.*, 2005). Betroffene Patienten entwickeln schwere Infektionen, die speziell durch schwach pathogene Mykobakterien wie NTM und *M. bovis* BCG hervorgerufen werden.

Auch die Gene, die für die Moleküle des HLA-Systems kodieren, wurden aufgrund ihrer hohen Variabilität und ihrer wichtigen Rolle in der zellulären Immunabwehr bereits früh im Zusammenhang mit Tuberkulose untersucht. Für Varianten von HLA-DR2 wurde dabei in mehreren unabhängigen Studien in Mexiko (Teran-Escandon *et al.*, 1999) und Indien (Sriram *et al.*, 2001) eine Assoziation mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Tuberkulose gefunden, allerdings nicht in Südindien (Sanjeevi *et al.*, 1992), Hongkong (Hawkins *et al.*, 1988) und Kambodscha (Goldfeld *et al.*, 1998). Es wird daher ein Einfluss regionaler Unterschiede diskutiert. Auch für HLA-B13 (Kettaneh *et al.*, 2006), HLA-DR8 (Kettaneh *et al.*, 2006) und HLA-DQB1\*0503 (Goldfeld, 2004) konnten Fall-Kontroll-Studien einen Einfluss auf die Tuberkuloseempfindlichkeit feststellen.

Auch für einen Polymorphismus im für IFN $\gamma$  kodierenden Gen (*IFNG*) konnte eine erhöhte Empfänglichkeit für Tuberkulose nachgewiesen werden (Lopez-Maderuelo *et al.*, 2003; Tso *et al.*, 2005); andere Studien konnten diesen Zusammenhang jedoch nicht bestätigen (Fitness *et al.*, 2004; Cooke *et al.*, 2006; Oral *et al.*, 2006).

Im Gen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 konnte ein Polymorphismus identifiziert werden, der signifikant häufiger bei erkrankten Personen auftrat als in Kontrollen (Delgado *et al.*, 2002; Scola *et al.*, 2003; Oral *et al.*, 2006); in anderen Studien zeigte sich jedoch keine Assoziation (Bellamy *et al.*, 1998; Lopez-Maderuelo *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2005). An dem auch in der vorgelegten Arbeit untersuchten Probandenkollektiv konnte ein Haplotyp identifiziert werden, der mit verstärkter IL-10 Produktion und einem signifikant häufigerem Auftreten bei PPD-positiven Individuen assoziiert war (Thye *et al.*, 2009a).

Assoziationsstudien zum Vitamin-D-Rezeptor (VDR), der möglicherweise die Eliminierung von *M. tuberculosis* in Makrophagen fördert, kamen zu konträren Ergebnissen (Bellamy *et al.*, 1999; Wilkinson *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2005). Im Gen des Oberflächenrezeptors TLR-2 konnten verschiedene Polymorphismen mit einem protektiven Effekt assoziiert werden (Ben-Ali *et al.*, 2004; Ogus *et al.*, 2004; Yim *et al.*, 2006).

In tierexperimentellen Studien konnten weitere Kandidatengene mit potentielltem Einfluss auf die Tuberkuloseempfindlichkeit identifiziert werden. Das murine *Nramp1* (Skamene, 1994) spielt möglicherweise in der Makrophagenaktivierung eine Rolle (Nevo *et al.*, 2006).



Für Polymorphismen in dem humanen Homolog *SLC11A1* konnte in einer Metastudie tatsächlich ein Effekt auf die Empfänglichkeit für Tuberkulose (Li *et al.*, 2006) nachgewiesen werden. Auch *ALOX5* beeinflusste in Mausmodellen die Empfänglichkeit gegenüber Mykobakterien (Bafica *et al.*, 2005). In der hier untersuchten Studienpopulation konnte ein Polymorphismus identifiziert werden, der signifikant häufiger bei an Lungentuberkulose erkrankten Individuen auftrat (Herb *et al.*, 2008).

Auch eine Variante in dem Gen, welches für MCP1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) kodiert und für die Makrophagenrekrutierung bedeutsam ist, zeigte in dem ghanaischen Probandenkollektiv, das auch das untersuchte Kollektiv der vorgelegten Studie ist, einen protektiven Effekt (Thye *et al.*, 2009b). Ein Polymorphismus im Gen von MBL (*mannose binding lectin*) zeigte eine Assoziation mit Schutz vor Infektion mit *M. africanum* (Thye *et al.*, Manuskript in Revision), während eine Variante im Gen von IRGM (*immunity-related GTPase M*) einen Schutz von Infektionen mit *M. tuberculosis* EUAM bietet (Intemann *et al.*, 2009). Eine *CTLA4* (*cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4*)-Variante ist assoziiert mit dem Auftreten eines Phänotyps, der durch starke pulmonale Infiltrate gekennzeichnet ist (Thye *et al.*, 2009c). Für *SP110*, das die Replikation von *Listeria monocytogenes* beeinflusst (Boyartchuk *et al.*, 2004), konnte im Gegensatz zu vorherigen Studien (Tosh *et al.*, 2006) in dem erwähnten Probandenkollektiv keine Assoziation von untersuchten Polymorphismen mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Tuberkulose gefunden werden (Thye *et al.*, 2006).

Auch das hier untersuchte Protein Osteopontin (OPN) scheint in der Pathogenese der humanen Tuberkulose eine Rolle zu spielen.

## **1.2. Osteopontin**

### **1.2.1. Vorkommen von OPN**

OPN wurde erstmals als Matrixprotein des Knochens identifiziert. Dort macht es etwa 2% der nicht-kollagenen Proteine aus (McKee *et al.*, 1996a). Mittlerweile wurde auch in anderen Geweben ein zellassoziertes Vorkommen von OPN nachgewiesen. Außer in Knochen kommt OPN vor allem in epithelialen Zellen von Gastrointestinaltrakt, Gallenblase, Pankreas, Harnwegen, Lunge, Brust- und Speichel- sowie Schweißdrüsen vor (Brown *et al.*, 1992). Es findet sich dabei an der luminalen Seite der Zellen, was für eine Sekretion des Proteins spricht. Auch in Plasma, Urin und Muttermilch lässt sich OPN nachweisen (Senger *et al.*, 1989a; Senger *et al.*, 1989b; Bautista *et al.*, 1996).

Neben dem physiologischen, konstitutiven Vorhandensein von OPN in spezifischen Geweben wird es im Rahmen von pathologischen Prozessen neu synthetisiert. Bei verschie-

denen Erkrankungen findet sich eine erhöhte Transkriptionsrate. Signifikant erhöhte OPN-Plasmaspiegel finden sich z.B. bei verschiedenen Krebserkrankungen (Tuck *et al.*, 1997), Atherosklerose (O'Brien *et al.*, 1994) und chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn (Agnholt *et al.*, 2007) und rheumatoider Arthritis (Ohshima *et al.*, 2002). Durch zellbiologische Untersuchungen konnten verschiedene immunologisch relevante Zellen identifiziert werden, die nach Stimulation OPN produzieren und zumeist auch sezernieren. Es handelt sich unter anderem um Lymphozyten (Patarca *et al.*, 1989; Weber *et al.*, 1996a; Tuck *et al.*, 1998; O'Regan *et al.*, 1999), Makrophagen (Murry *et al.*, 1994; Giachelli *et al.*, 1998; Tuck *et al.*, 1998), dendritische Zellen (Shinohara *et al.*, 2006) und NKT-Zellen (Diao *et al.*, 2004).

### 1.2.2. Genetische Grundlagen

Osteopontin (OPN, synonym: ETA-1; early-T-cell-activation-gene 1) ist das Produkt des humanen Gens *SPP1* (secreted phosphoprotein 1, OMIM\*166490). Dieses findet sich auf dem langen Arm von Chromosom 4 (Young *et al.*, 1990) im Bereich 4q21-25 (Crosby *et al.*, 1996). *SPP1* hat eine Länge von etwa 8 Kilobasen (kb) (Miyazaki *et al.*, 1990; Young *et al.*, 1990) und umfasst sieben Exons und sechs Introns. Exon zwei bis sieben kodieren für das Protein (Crosby *et al.*, 1996). Drei cDNAs unterschiedlicher Länge sind bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen. Die cDNA mit der Gesamtlänge wird als *Opn a* bezeichnet und besteht aus 945 Basenpaaren (bp). Die häufigste Variante ist *Opn b* mit 903 bp, der Exon 5 fehlt. Auch eine Variante ohne Exon 4 (864 bp) ist beschrieben (*Opn c*) (Young *et al.*, 1990; Saitoh *et al.*, 1995).

### 1.2.3. Proteinstruktur und biochemische Charakteristika

OPN ist ein phosphoryliertes Glykoprotein, das sich durch einen hohen Anteil an Aspartat, Serin und Glutamat auszeichnet (Denhardt *et al.*, 1993). Das Protein weist N-terminal eine aus 16 Aminosäuren bestehende hydrophobe Sequenz auf (Patarca *et al.*, 1989).

Humanes OPN besteht insgesamt aus 314 Aminosäuren (OPN a) und hat eine Größe von etwa 60 Kilodalton. Spleißvarianten sind das OPN b, dem 14 Aminosäuren (58-71) fehlen, sowie OPN c, dem die Aminosäuren 31-57 fehlen (Kiefer *et al.*, 1989; Saitoh *et al.*, 1995). Vor kurzem wurde in Mäusezellen eine weitere Variante ohne Signalsequenz (Aminosäure 1-16) gefunden. Sie entsteht durch alternativen Translationsstart (Shinohara *et al.*, 2008).

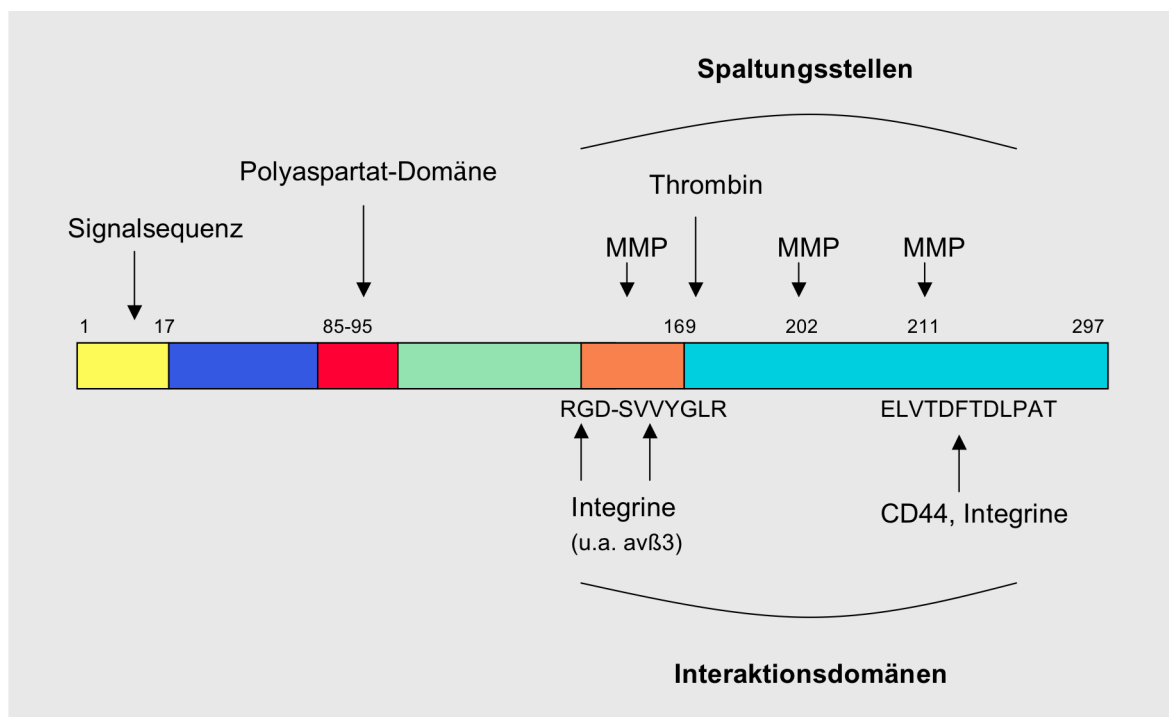
Neben unterschiedlichen Spleißformen entstehen durch posttranslationale Modifikationen weitere funktionelle Formen von OPN. Je nach Ursprungsgewebe sind unterschiedliche Veränderungen möglich; so wurden Phosphorylierungen, aber auch Glykosylierungen und Sulfatierungen beschrieben (Patarca *et al.*, 1989; Christensen *et al.*, 2005). OPN weist 34

Serin- und zwei Threoninreste als Phosphorylierungsmöglichkeiten auf (Christensen *et al.*, 2005). Der Phosphorylierungszustand variiert je nach Zelltyp stark und auch nicht-phosphorylierte Formen kommen vor (Christensen *et al.*, 2007). Weiterhin finden sich fünf O-Glykosylierungsmöglichkeiten (Christensen *et al.*, 2005). N-Glykosylierungen wurden bisher nicht gefunden.

OPN scheint keine feste Sekundärstruktur zu besitzen. Obwohl nach Computerberechnungen eine hypothetische Struktur aus acht  $\alpha$ -Helix- und sechs  $\beta$ -Faltblattsegmenten vorstellbar ist (Denhardt *et al.*, 1993), liegt OPN in Lösung unstrukturiert und ohne einheitliche Konfiguration vor (Fisher *et al.*, 2001).

#### 1.2.4. Interaktionsdomänen

OPN besitzt eine Arginin-Gycin-Asparaginsäure (RGD)-Sequenz im Bereich der AS 159-161. Hierdurch ist eine Bindung an Integrine möglich (Liaw *et al.*, 1995b; Schnapp *et al.*, 1995), die grundlegend für Adhäsion und Interaktion mit Zielzellen verantwortlich sind. Die RGD-Sequenz ist interspeziell konserviert.



**Abbildung 1.6. Schematische Darstellung von Osteopontin (modifiziert nach Wang *et al.*, 2008)**

Die verschiedenen Domänen des Proteins sind farblich dargestellt. OPN kann durch Thrombin und verschiedene Matrix-Metalloproteasen (MMP) gespalten werden. Eine Interaktion mit einer Vielzahl von Integrinen und dem CD44-Rezeptor ist über zwei Interaktionsdomänen möglich.

OPN weist eine Serin-Valin-Tyrosin-Glutaminsäure-Leucin-Arginin (SVVYGLR)-Sequenz (Yokosaki *et al.*, 1999) auf, die C-terminal an die RGD-Domäne grenzt (AS 162-168).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass diese Sequenz ebenfalls an Integrine bindet (Smith *et al.*, 1996; Yokosaki *et al.*, 1999; Green *et al.*, 2001). Allerdings ist sie kryptisch und wird erst durch Thrombinspaltung freigelegt und aktiviert (Bayless *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998; Yokosaki *et al.*, 1999). Eine weitere Integrinbindungsstelle konnte am N-terminalen OPN-Fragment im Bereich der Sequenz ELVTDFDLPAT identifiziert werden. Hier kann Integrin  $\alpha 4\beta 1$  binden (Bayless *et al.*, 2001). Mögliche weitere Interaktionsdomänen sind eine Polyaspartat-Domäne als Hydroxylapatit-Bindungsstelle (AS 85-95) (Oldberg *et al.*, 1986) und zwei Kalzium-Bindungsstellen (Patarca *et al.*, 1989).

### 1.2.5. Proteolytische Spaltung

Der Gerinnungsfaktor Thrombin ist in der Lage, OPN zu spalten. Dies geschieht in der Regel am Ende der SVVYGLR-Sequenz zwischen dem letzten Arginin (R168) und einem darauf folgenden Serin (S169) (Senger *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996; Yokosaki *et al.*, 1999). Die Spaltung scheint die biologische Aktivität des Proteins in Bezug auf die Bindung von Integrinen an die SVVYGLR-Sequenz zu verändern. So kann Integrin  $\alpha 1\beta 9$  nur nach Thrombinspaltung an die Sequenz binden (Smith *et al.*, 1996; Yokosaki *et al.*, 1999). Die Aminosäuren L167 und R168 sind entscheidend für die Bindung an  $\alpha 4$ -Integrine (Green *et al.*, 2001). Durch die Thrombinspaltung kommt es zur Freilegung und damit zur Aktivierung dieser Bindungsstelle.

*In vitro* Studien zeigen, dass das durch Spaltung mit Thrombin entstandene N-terminale Fragment eine wesentlich stärkere Adhärenz und Migration induziert als das ungespaltene Molekül (Senger *et al.*, 1994; O'Regan *et al.*, 1999). Dieser Effekt beruht auf einer Interaktion der RGD-Region mit dem  $\alpha v\beta 3$ -Integrin (Senger *et al.*, 1994). Durch die Spaltung wird die RGD-Domäne freigelegt und so aktiviert. Das nach Spaltung entstandene C-terminale Fragment besitzt keine Integrin-Bindungsstellen (Smith *et al.*, 1996), es interagiert aber mit CD44 (Weber *et al.*, 2002). Die genaue Bindungssequenz von CD44 an OPN ist nicht bekannt.

Weiterhin ist OPN ein Substrat für verschiedene Matrix-Metalloproteasen (MMP) (Agnihotri *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2004), die unter anderem im Bereich der SVVYGLR-Domäne (zwischen G166 und L167) spalten können (Agnihotri *et al.*, 2001). Die Spaltung kann die durch Integrine vermittelten Funktionen modifizieren (Yokosaki *et al.*, 2005).

### 1.2.6. Rezeptorinteraktion

Wichtiger Rezeptor für die Vermittlung der OPN-Wirkung ist das  $\alpha v\beta 3$ -Integrin, das Adhäsion und Migration der Zellen an OPN ermöglicht (Liaw *et al.*, 1994; Liaw *et al.*, 1995b; Xuan *et al.*, 1995). Der Integrinrezeptor bindet an das RGD-Motiv. Auch  $\beta 1$ - (Liaw *et al.*, 1995a; Smith *et al.*, 1996; Denda *et al.*, 1998; Barry *et al.*, 2000) und  $\beta 5$ - (Liaw *et al.*,

1995b) Integrine sowie  $\alpha v6$  (Yokosaki *et al.*, 2005) sind in der Lage, an die RGD-Sequenz von OPN zu binden und darüber Zelladhäsion zu ermöglichen. Das Integrin  $\alpha 4\beta 1$  bindet an eine andere Sequenz am N-terminalen Ende von OPN (Bayless *et al.*, 1998). Während die meisten Integrine nur in der Lage sind, Adhäsion zu vermitteln, ermöglicht allein  $\alpha v\beta 3$  die Migration von glatten Muskelzellen gegen einen OPN-Gradienten (Liaw *et al.*, 1995b).

Das Integrin  $\alpha 9\beta 1$  kann nur an das N-terminale Spaltprodukt binden (Smith *et al.*, 1996; Yokosaki *et al.*, 1999). Es bindet nicht an die RGD-Sequenz, sondern an die zuvor durch Thrombinspaltung aktivierte SVVYGLR-Region (Yokosaki *et al.*, 1999).

Eine weitere Gruppe von Rezeptoren, die als Bindungspartner von OPN verschiedene Funktionen vermitteln, bilden Mitglieder der Hyaluronsäurerezeptor-Familie CD44 (Weber *et al.*, 1996a). Nicht die Standard-Isoform CD44 s bindet an OPN, sondern Varianten, welche v6 und v7 beinhalten. Sie binden sowohl an das N-terminale als auch das C-terminale Fragment, die Bindung ist also unabhängig von der RGD-Domäne (Katagiri *et al.*, 1999). Die Bindung an CD44 konnte experimentell durch Anti- $\beta 1$ -Integrin aufgehoben werden, daher ist eine Interaktion der beiden Rezeptoren zu vermuten (Katagiri *et al.*, 1999). Eine Hypothese dazu ist die Interaktion der C-terminalen Bindungsregion mit der RGD-Region durch die Formation einer  $\beta$ -Faltblattstruktur (Kazanecki *et al.*, 2007).

Die RGD-Sequenz findet sich in der Regel bei extrazellulären Matrixproteinen, daher wurde OPN als solches klassifiziert. Allerdings konnte bisher *in vivo* außer im Knochen (Franzen *et al.*, 1985) keine Matrixassoziation festgestellt werden. *In vitro* bindet es an Fibronectin (Mukherjee *et al.*, 1995) und an Kollagen (Kaartinen *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2004).

### 1.2.7. Funktion von OPN und deren Regulation

OPN findet sich sowohl als lösliches Zytokin als auch als immobilisiertes Protein auf Zelloberflächen. Die Funktionen unterscheiden sich je nach Rezeptorprofil der Zielzellen. Durch Interaktion von OPN mit CD44-Rezeptoren werden Chemotaxis und Migration induziert (Weber *et al.*, 1996a; Katagiri *et al.*, 1999). Über Interaktion mit dem  $\alpha v\beta 3$ -Integrin fördert OPN Adhäsion und vermittelt Chemotaxis (Liaw *et al.*, 1994). In T-Zellen stimuliert es neben Adhäsion und Migration auch deren Proliferation (O'Regan *et al.*, 1999).

In Mäusezellen konnte eine intrazelluläre Form von OPN (iOPN) identifiziert werden (Shinohara *et al.*, 2008). Fehlen von iOPN führt zu eingeschränkter Migration, Adhäsion (Zohar *et al.*, 2000) sowie zu verminderter Fusion der Makrophagen zu multinukleären Riesenzellen (Zhu *et al.*, 2004). Weiterhin scheint iOPN die  $IFN\alpha$ -Expression in plasmazy-

toiden dendritischen Zellen zu vermitteln (Shinohara *et al.*, 2006). Für die Spleißvarianten OPN a, b und c konnten bisher keine spezifischen Funktionen nachgewiesen werden.

Die Bindung an  $\alpha v\beta 3$  zur Stimulation der IL-12 Produktion ist phosphorylierungsabhängig, die Interaktion mit CD44 dagegen nicht (Ashkar *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung kann außerdem die haptotaktische Aktivität von OPN verstärken (Weber *et al.*, 2002).

### 1.2.8. Assoziierte Erkrankungen

Neben seiner Rolle in der Entwicklung einer inflammatorischen Reaktion besitzt OPN wichtige Funktionen im Knochenstoffwechsel. OPN-defiziente Mäuse zeigen hypermineralisiertere und fragilere Knochen als der Wildtyp (Boskey *et al.*, 2002). Das Protein wird von Osteoklasten sezerniert und stimuliert diese mutmaßlich autokrin über das Integrin  $\alpha v\beta 3$  zu Knochenresorption (Chellaiah *et al.*, 2003).

Bei der Pathogenese von Atherosklerose scheint OPN ebenfalls beteiligt zu sein. Die Transkription von OPN-mRNA in verletztem arteriellen Endothel ist stark erhöht (Liaw *et al.*, 1995a). OPN-defiziente Mäuse zeigen kleinere atherosklerotische Läsionen als der Wildtyp (Bruemmer *et al.*, 2003; Matsui *et al.*, 2003; Strom *et al.*, 2004). Eine OPN-Überexpression führt zu einer verdickten Intima (Isoda *et al.*, 2002) und zu verstärkter Atherosklerose (Chiba *et al.*, 2002; Isoda *et al.*, 2003). Die Intimaneubildung nach Verletzung kann durch Gabe von Antikörpern gegen OPN vermindert werden (Liaw *et al.*, 1997).

Weiterhin zeigt sich, dass in vielen Krebszellen die Expression von OPN stark erhöht ist (Senger *et al.*, 1988). Dies wurde für Karzinome von Lunge, Mamma, Colon, Magen, Ovarien, Prostata und Haut sowie für Pleuramesotheliome bestätigt. OPN-Spiegel korrelieren mit der Aggressivität der Tumoren (Hu *et al.*, 2005; Kolb *et al.*, 2005) und spielen eine Rolle bei der Metastasenbildung (Oates *et al.*, 1996; Wai *et al.*, 2004). OPN unterdrückt Apoptose und fördert so unkontrollierte Proliferation (Noti, 2000; Hsieh *et al.*, 2006). Der Einsatz von OPN als Biomarker wurde bereits für verschiedene Malignome vorgeschlagen.

### 1.2.9. Regulation der Genexpression

Im Promotorbereich von OPN finden sich neben verschiedenen konsensuellen Regulationselementen auch Bindungsstellen für den Glukokortikoid- und Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptor, den Transkriptionsfaktor SP1 sowie Interferon-responsive Elemente (Craig *et al.*, 1991; Denhardt *et al.*, 1993; Patarca *et al.*, 1993; Sodek *et al.*, 2000). Entzündungsmediatoren wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-2 induzieren die OPN-Transkription (Denhardt *et al.*, 1993; Patarca *et al.*, 1993; Pollack *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1999).

Die Expression von OPN variiert abhängig von Zelltyp und Aktivitätszustand stark. In T-Zellen wird die Transkription beispielsweise durch T-bet reguliert, nicht dagegen in Makrophagen (Shinohara *et al.*, 2005). T-bet ist für die Differenzierung zu Th1-Zellen verantwortlich.

#### 1.2.10. OPN und zelluläre Immunantwort

OPN ist ein starker chemotaktischer Faktor, der in inflammatorisch veränderten Geweben zur Akkumulation von Makrophagen führt (Singh *et al.*, 1990; Weber *et al.*, 1996a; Crawford *et al.*, 1998). In Versuchen mit OPN-defizienten Mäusen zeigte sich in solchen Geweben eine stark verminderte Makrophagenakkumulation (Ophascharoensuk *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2005). Neutralisierende Antikörper gegen OPN vermindern bei Inflammation signifikant die Makrophagen- und T-Zellinfiltration (Giachelli *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998).

Für Makrophagen ist OPN offenbar ein wichtiges, konstitutiv exprimiertes Protein, das grundlegende Funktionen reguliert. OPN wird nicht von Monozyten, jedoch von aktiven, phagozytierenden Makrophagen exprimiert (Murry *et al.*, 1994; Rollo *et al.*, 1996a; Choi *et al.*, 2004). Es fördert Aktivierung (Rollo *et al.*, 1996a), Migration (Zhu *et al.*, 2004; Nystrom *et al.*, 2007) und Phagozytosefähigkeit (McKee *et al.*, 1996b) der Makrophagen. Die Hemmung der OPN-Genexpression in Makrophagen führt zu einem Monozyten-ähnlichen Phänotyp (Nystrom *et al.*, 2007) mit eingeschränkter Migration und Zytokinproduktion (Sodek *et al.*, 2006).

Viele Studien deuten darauf hin, dass OPN an Th1-Antworten beteiligt ist. OPN-mRNA wird von Th1-Zellen, nicht jedoch von Th2-spezifischen T-Zellen produziert (Nagai *et al.*, 2001). Bei OPN-defizienten Mäusen führten typische Th1-Infektionen mit *HSV* und *Listeria monocytogenes* zu einer verminderten IL-12-Antwort und einer verstärkten IL-10- und IL-4-Produktion (Ashkar *et al.*, 2000). OPN induziert in Makrophagen die IL-12-Produktion (Weber *et al.*, 2002) und führt in T-Zellen zur Bildung von IFN $\gamma$ ; dies fördert wiederum die IL-12-Produktion in Makrophagen (O'Regan *et al.*, 2000). IL-12 ist ein entscheidender Mediator der Th1-Immunantwort, der die Proliferation CD4-positiver T-Zellen zu Th1 stimuliert. Th1-Zellen aktivieren durch IFN $\gamma$  Makrophagen zu antibakterieller Aktivität. Diese Zytokinproduktion bei gleichzeitiger Inhibierung der Th2-spezifischen Zytokine sichert die Polarisierung der Immunantwort in Richtung Th1 (Abbas *et al.*, 1996). OPN beeinflusst diese Zytokinkaskade an mehreren Punkten.

Auch dendritische Zellen (DC), die eine zentrale Rolle in der frühen Immunantwort spielen, werden durch OPN beeinflusst. Es fördert deren Reifung (Kawamura *et al.*, 2005) und nach Antigenkontakt die Migration in die Lymphknoten (Weiss *et al.*, 2001). OPN stimuliert DC, so wie Makrophagen, zur IL-12 Produktion (Renkl *et al.*, 2005).

Weiterhin inhibiert OPN die induzierbare Stickstoffmonoxid (NO)-Synthetase in Makrophagen (Rollo *et al.*, 1996b; Scott *et al.*, 1998). Es kann so auch antiinflammatorische Effekte auszuüben.

### **1.2.11. Rolle von OPN bei granulomatösen Erkrankungen und Tuberkulose**

Lungenbiopsate von Patienten mit Tuberkulose und Silikose zeigen im Vergleich zu Biopsaten von nicht-granulomatösen Entzündungen eine verstärkte Expression von OPN (Nau *et al.*, 1997). OPN wurde in Epitheloidzellen und multinukleären Riesenzellen gefunden (Carlson *et al.*, 1997; O'Regan *et al.*, 1999). OPN-defiziente Mäuse zeigen eine stark verzögerte und geringere Granulombildung als Wildtyp-Mäuse (Ashkar *et al.*, 2000; O'Regan *et al.*, 2001). Das Einbringen viraler Vektoren mit OPN-Gen in Lungen von Hamstern induziert im Gegensatz zu einem Kontrollvektor Granulombildung (Chiba *et al.*, 2000). OPN hemmt die für die Granulombildung bedeutsame Fusion von Makrophagen zu Riesenzellen (Sterling *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2005).

Die Infektion von Makrophagen mit Mykobakterien führt zu einer starken Expression von OPN (Khajooe *et al.*, 2006). Nicht-granulomatöse Infektionen zeigen signifikant weniger OPN-Expression (Nau *et al.*, 1997). Weiterhin weisen Tuberkulosepatienten signifikant erhöhte OPN-Spiegel im Plasma auf, die mit der Schwere der Tuberkuloseerkrankung korrelieren (Koguchi *et al.*, 2003). OPN-defiziente Mäuse zeigen nach Infektion mit *M. bovis* BCG eine wesentlich höhere Bakterienlast und eine verlangsamte Clearance (Nau *et al.*, 1999). Bei *M. bovis* BCG-Infektionen kommt es nach einem Anstieg des OPN-Spiegels auch zu einem Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IFN $\gamma$ . Dies kann wiederum durch Antikörper gegen OPN gehemmt werden (Koguchi *et al.*, 2003).

Daher ist eine Rolle von OPN in der Induktion der INF $\gamma$ -Antwort und damit der frühen Weichenstellung in Richtung einer Th1-Immunantwort anzunehmen.



### 1.3. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Für die immunologische Antwort auf eine Infektion mit Mykobakterien und somit den klinischen Verlauf der Tuberkulose sind die Aktivierung von Makrophagen und deren Interaktion mit T-Zellen von Bedeutung. Verschiedene Studien zeigen, dass das Phosphoprotein Osteopontin (OPN) bei Aktivierung, Migration und Zelladhäsion von Makrophagen eine wichtige Rolle spielt. OPN trägt weiterhin zur T-Zell-Reifung und Ausbildung einer Th1-Immunantwort bei (Ashkar *et al.*, 2000; Nystrom *et al.*, 2007). Tierexperimentelle Untersuchungen ergaben bei OPN-defizienten Mäusen einen schwereren Verlauf der Tuberkulose im Vergleich zum Wildtyp (Nau *et al.*, 1999). Es stellt sich daher der Verdacht, dass OPN eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mykobakterien spielt.

Somit ist OPN ein Kandidatengen für Assoziationsstudien zwischen genetischen Polymorphismen und ihrem Einfluß auf die Manifestation einer Infektion mit Mykobakterien des MTBK beim Menschen.

In der vorgelegten Arbeit soll an einem ghanaischen Probandenkollektiv von 2010 Patienten mit Lungentuberkulose und 2346 exponierten, aber gesunden Kontrollindividuen, der Einfluss genetischer Polymorphismen von *SPP1*, dem für OPN kodierenden humanen Gen, auf die Empfänglichkeit und Ausprägung der Tuberkulose untersucht werden.

Dafür sollen zuerst relevante Abschnitte der DNA-Sequenz von *SPP1* in einem Teil der Studienpopulation sequenziert werden, um gegebenenfalls neue, bisher unbekannte Polymorphismen zu entdecken und einen ersten Anhalt für die Verteilung der Varianten bei Patienten und Kontrollpersonen zu erhalten. Einzelne Polymorphismen sollen ausgewählt und in dem gesamten Probandenkollektiv genotypisiert werden. Die Verteilung der Varianten in Fällen und Kontrollen soll dann statistisch auf eine mögliche Assoziation mit phänotypischen Merkmalen der Infektion mit Mykobakterien des MTBK untersucht werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Studienpopulation

Die in dieser Studie untersuchten Probanden wurden im Rahmen des Projekts „*Association and linkage approaches to identify human genetic variants contributing to natural protection against pulmonary tuberculosis*“ des Deutschen Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN), gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung, rekrutiert.

Die Rekrutierung der Patienten mit Lungentuberkulose und der Kontrollgruppe erfolgte von September 2001 bis Juli 2004 in Ghana, Westafrika. Das Studienprotokoll war von den Ethikkommissionen der Kwame Nkrumah University in Kumasi und des Ghana Health Service in Accra genehmigt worden. Die Probanden hatten nach umfassender Aufklärung über den Studienablauf ihre freiwillige Teilnahme durch Unterschrift oder Daumenabdruck bestätigt. Die Dokumentation der Daten sowie die klinische Untersuchung und Probenentnahme wurden von ghanaischen Studienärzten und Krankenschwestern durchgeführt.

Die Patienten wurden am Korle Bu Teaching Hospital in Accra, am Komfo Anokye Teaching Hospital in Kumasi und in 15 weiteren Krankenhäusern oder Polykliniken in Accra und Kumasi sowie Distrikt-Krankenhäusern der Ashanti-Region (Obuasi, Agona, Mampong, Agogo, Konongo und Nkawie), der Eastern Region (Nkawkaw und Atibie) und der Central Region (Assin Fosu und Dunkwa) von Ghana aufgenommen.

Klinische Symptome einer Tuberkulose wie Husten, Hämoptysen, Atemnot, Thoraxschmerzen, Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsverlust wurden mit standardisierten, strukturierten Fragebögen dokumentiert. Die Erhebung beinhaltete neben der Aufnahme demographischer Daten (Alter, Geschlecht) eine körperliche Untersuchung, Röntgenbild des Thorax (posterior-anterior), mikroskopische Untersuchung von zwei unabhängigen Sputumproben nach Ziehl-Neelsen-Färbung, Kultur auf Löwenstein-Jensen-Medium und einen HIV 1/2-Test (Capillus, Trinity Biotech, Bray, Ireland). Extrapulmonale Manifestationen wurden nicht berücksichtigt. Alle Patienten wurden im Rahmen des ghanaischen nationalen Tuberkuloseprogramms (*national tuberculosis program*, NTP) nach dem von der WHO empfohlenen DOTS (*directly observed treatment, short course*)-Schema behandelt.

Einschlusskriterien waren der Nachweis von Mykobakterien in Sputum oder Kultur, kein Hinweis auf eine frühere Tuberkulose und ein Alter zwischen sechs und 60 Jahren. Ausschlusskriterien waren unvollständige Dokumentation auf den Fragebögen, ein positiver HIV-Test, Hinweise auf Alkoholabhängigkeit, Drogenabhängigkeit, Diabetes oder andere immunkompromittierende Erkrankungen oder die Rücknahme der Einverständniserklärung. Die endgültige Fallgruppe bestand aus 2010 Personen.

Die Kontrollgruppe wurde unter nichtverwandten Mitgliedern der Patienten-Haushalte und in der direkten Nachbarschaft der Patienten (*community controls*) rekrutiert. Die Dokumentation beinhaltete die Aufnahme demographischer Daten, Anamnese, körperliche Untersuchung, Röntgen-Untersuchung des Thorax und einen PPD-Test (Tuberculin Test PPD Mérieux, bioMérieux, Nürtingen, Deutschland). Der PPD-Test wurde gemäß den Herstellerangaben ab einer Hautinduration von zwei Millimetern Durchmesser als positiv gewertet. Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren Zeichen einer aktuellen oder stattgehabten Tuberkulose im Thorax-Röntgenbild, Alter außerhalb der definierten Grenzen von sechs bis 66 Jahren, Rücknahme der Einverständniserklärung und unvollständige Dokumentation auf den Fragebögen. Die endgültige Kontrollgruppe umfasste 2346 Personen, davon 127 mit negativem und 2219 mit positivem PPD-Test. Die gesamte Studienpopulation bestand somit aus 4356 Personen.

Den Probanden wurden 10 ml Citrat-Blut und 5 ml EDTA (Ethyldiamintetraacetat)-Blut abgenommen. Aus dem Citrat-Blut wurden B-Lymphozyten isoliert und der Überstand zur Stabilisierung der DNA mit 8 M Urea-Lösung zu gleichen Volumenteilen versetzt. Das EDTA-Blut wurde für den HIV-Test verwendet.

## 2.2. Materialien

### 2.2.1. Chemikalien

Die für die Untersuchungen verwendeten Chemikalien und deren Hersteller werden im Folgenden aufgeführt.

**Tabelle 2.1. Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

Chemikalien	Hersteller
HPLC-Wasser (LiChrosolv)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hi-Di-Formamid	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ampuwa-Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Delta Select, Dreieich, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Osterode, Deutschland
BSA (Bovines Serumalbumin)	Biomol, Hamburg, Deutschland
HOT FIREPol DNA-Polymerase	Solis Biodyne, Tartu, Estland
FIREPol DNA-Polymerase	Solis Biodyne, Tartu, Estland

Fortsetzung der Tabelle 2.1. auf der Folgeseite.

**Tabelle 2.2. Fortsetzung von Tabelle 2.1.**

25 mM MgCl <sub>2</sub>	Solis Biodyne, Tartu, Estland
10x Solution S	Solis Biodyne, Tartu, Estland
20 mM dNTP Mix	Solis Biodyne, Tartu, Estland
Sephadex™ G-50 DNA Grade	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Bromphenolblau	Sigma, Osterode, Deutschland
Xylencyanol	Serva, Heidelberg, Deutschland
100bp DNA-Längenstandard	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Tris-Base	Biomol, Hamburg, Deutschland
Tris-HCL	Biomol, Hamburg, Deutschland
EDTA	Biomol, Hamburg, Deutschland
Borsäure	Biomol, Hamburg, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Gibco BLR, Karlsruhe, Deutschland
Puffer B und BD	Solis Biodyne, Tartu, Estland
<i>Taq</i> -Polymerase	Solis Biodyne, Tartu, Estland

### 2.2.2. Puffer und Lösungen

Verschiedene Puffer und Lösungen wurden im Labor eigenständig hergestellt. Die Zusammensetzung wird im Folgenden aufgelistet.

**Tabelle 2.3. Verwendete Lösungen**

Reagenzien	Inhaltsstoffe	Konzentration
1 x TBE-Puffer	Tris-Base EDTA Borsäure Aqua dest.	108 g 7,4 g 55 g ad 1 l
1 x TE-Puffer	Tris-HCL EDTA Aqua dest.	10 mM 1 mM
1 x TE-PCR	Tris-HCL EDTA	10 mM 0,2 mM
Ethidiumbromid-Lösung	Ethidiumbromid Aqua dest.	5 mg/ml
PCR-Farbladepuffer	Bromphenolblau Xylencyanol Glycerol	2,5 mg/ml 2,5 mg/ml 60 %
Agarosegel	Agarose 1 x TBE-Puffer	1,5 %

### 2.2.3. Reaktionssysteme

Für verschiedene Untersuchungen wurden kommerziell angefertigte Reaktionssysteme genutzt. Auf die Verwendung der Kits wird im Abschnitt 2.3. eingegangen.

**Tabelle 2.4. Verwendete Kits**

Anwendung	Name	Hersteller
DNA-Isolierung	AGOWA mag Maxi DNA Isolation Kit	AGOWA GmbH, Berlin, Deutschland
DNA-Amplifizierung	GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Sequenzierreaktion	BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA

### 2.2.4. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Primer) für die Sequenzierung der ausgewählten Bereiche von *SPP1* wurden mit Hilfe der Software Primer3 am Computer entworfen und bei MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

**Tabelle 2.5. Primer zur Sequenzierung**

Bereich	Name	Sequenz (5'-3')	Produktlänge
Promotor	SPP1-pro1000-F	GCATTTGCATCTAATATGTGCT	600 bp
	SPP1-pro1000-R	TCAGCATCCAGGAAGAGC	
Exon 1	SPP1-pro+ex1-F	AGGCAAGAGTGGTTGCAGAT	700 bp
	SPP1-pro+ex1-R	TTTGAGGACCCAGTGGAAGT	
Exon 2 und 3	SPP1-exon2+3-F	TTGATCTGTTTGTAGGTTTAGAGAGC	684 bp
	SPP1-exon2+3-R	TTCATAGCAGGCAGTCAATCA	
Exon 4	SPP1-exon4-F	GGGGAATGAAAGGATCAAATG	661 bp
	SPP1-exon4-R	GATGGGCCTCTGATTGAAAA	
Exon 5	SPP1-exon5-F	TGCATAACAGAGTCACCTTTCAA	850 bp
	SPP1-exon5-R	AGCGCTAGTCAGAACCATCAG	
Exon 6	SPP1-Exon6-F	AGGATTACCATATTCCCATCCCTA	965 bp
	SPP1-Exon6-R	TGTTTTATTAATTGCTGGACAACC	
3'-UTR	SPP1-3'UTR-F	AGTTTGTGGCTTCATGGAAACT	679 bp
	SPP1-3'UTR-R	GAGAGTGGGAAGGTGGATGAG	

Basenabfolge der designten Primers (in 5'-3'-Richtung), Bereich der erwünschten Sequenzierung und die erwartete Länge des Sequenzierungsprodukts. T: Thymin, A: Adenin, G: Guanin, C: Cytosin.

Tabelle 2.6. Primer zur Genotypisierung

Name	Sequenz (5'-3')	Modifizierung
spp1rs7687316_F	ATGCCCATCCCGTAAAT	-
spp1rs7687316_R	TGTCATGAGGTTTTCTGCC	-
spp1rs7687316_A	CACACTTCCCCCTCTGGTTTTGTGGTTAAAACAA	3' 6-Fam
spp1rs7687316_S	AAACCAAAAACGCACACACACAA	5' Cy5, 3' Pho
SPP1rs7435825_F	AGGACATCACCTCACAC	-
SPP1rs7435825_R	TTCCTGACTATCAATCACATCG	-
SPP1rs7435825_A	TGGGTTTCAGCACTCTGGTCATCCAG	3' 6-Fam
SPP1rs7435825_S	GACTCGTTTCATAACTGTCCTTCCC	5' Cy5, 3' Pho
spp1rs4660_F	TTCCAAAGTCAGCCGTG	-
spp1rs4660_R	CACATTAGTTATTTCCAGACTCAAATAG	-
spp1rs4660_A	TTGGGGTCTACAACCAGCATATCTTCATGGCTGG	5' Cy5, 3' Pho
spp1rs4660_S	AATACGAAATTTCAAGTGTTTATCTTCTTCTCCTTC	3' 6-Fam
SPP1rs1126616_F	GGAGTTGAATGGTGCATAC	-
SPP1rs1126616_R	GGTCTACAACCAGCATATCT	-
SPP1rs1126616_A	ATTCCGATGTGATTGATAGTCAGGAACTTTCCAA	5' Cy5, 3' Pho
SPP1rs1126616_S	AAGCCAATGATGAGAGCAATGAG	3' 6-Fam
SPP1rs11730582_F	ACTAGTGCCATTTGTCTAAG	-
SPP1rs11730582_R	CCACTCTTGCCTGTATGA	-
SPP1rs11730582_A	GCTAAGCTTGAGTAGTAAAGGACAGAGGC	3' 6-Fam
SPP1rs11730582_S	GTTCTCTGAACTCCTTGACAG	5' Cy5, 3' Pho
SPP1rs28357094_F	AGTGGCAGAAAACCTCAT	-
SPP1rs28357094_R	GGCGTTTGGCTGAGAAG	-
SPP1rs28357094_A	CTGCAGACATCCTCCACCAACACAGG	3' 6-Fam
SPP1rs28357094_S	AGGCGGCGAGATTGTG	5' Cy5, 3' Pho
SPP1rs2853744_F	GGAACAAGGATAGGTAGGC	-
SPP1rs2853744_R	GTATGCAGTAGCTTGTTACTTAG	-
SPP1rs2853744_A	TGCTTGAGAGGGCTGCTTCAGGAG	5' Cy5, 3' Pho
SPP1rs2853744_S	GTTTCTGACTGAGAGCAGGATGA	3' 6-Fam
SPP1rs6812524_F	CATGTGGACAGCCAGGA	-
SPP1rs6812524_R	AGGTCTGCGAACTTCTT	-
SPP1rs6812524_A	GACTCATCAGACTGGTGAGAATCATCAGTGTCAT	3' 6-Fam
SPP1rs6812524_S	TACATCATCAGAGTCGTTTCGAGTCAATG	5' Cy5, 3' Pho
SPP1rs41497449_F	TGCCCATCCCGTAAATGAA	-
SPP1rs41497449_R	CAACTGGCCTGAGACGA	-
SPP1rs41497449_A	CTGCTGCTGACAACCAAGCCCTCCC	5' Cy5, 3' Pho
SPP1rs41497449_S	TGTGCTCTGCCTCCTCCT	3' 6-Fam

Basenabfolgen der Primer für die Genotypisierung. F: Vorwärtsprimer, R: Rückwärtsprimer, S: Sensoroligonukleotid, A: Ankeroligonukleotid, 6-Fam: 6-FAM-Phosphoramidit ; Pho: Phosphat; Cy5:Cyanin.

Für die Genotypisierung der ausgewählten Polymorphismen wurden jeweils ein *forward* und ein *reverse* Primer sowie ein Sensor- und ein Anker-Primer entworfen (vgl. 2.3.10.). Je nach Verwendung wurden diese zum Teil mit Modifizierungen versehen. Die Primer wurden mit Hilfe der Software LightCycler Probe Design entworfen und bei Biomers (Ulm, Deutschland) synthetisiert.

### 2.2.5. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.7. Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Name	Bezeichnung	Hersteller
Filterplatten	Muliscreen HTS	Millipore, Billerica, USA
Filterpipettenspitzen	Bioclean, 10-1000 µl	RAININ, Oakland, USA
Pipettenspitzen	für Gilsonpipetten, 200 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Filterpipettenspitzen	Biosphere, 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Platten	96- und 384-Well	Thermo Scientific, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
96er Mikrotiterplatten	Micropore	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

### 2.2.6. Geräte

**Tabelle 2.8. Verwendete Laborgeräte**

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

### 2.2.7. Elektronische Datenbanken und Datenverarbeitungsprogramme

**Tabelle 2.9. EDV-Programme**

Anwendung	Programm	Hersteller
Sequenzanalyse	SeqScape Software v2.1.1.	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sequenzanalyse	Sequencing Analysis Software	Applied Biosystems, Foster City, USA
Primerdesign	Primer3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3/">frodo.wi.mit.edu/primer3/</a>
Primerdesign	LightCycler Probe Design Software 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Statistische Auswertung	Haploview	<a href="http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview">www.broadinstitute.org/haploview/haploview</a>
Haplotypenberechnung	UNPHASED 3.0.13	<a href="http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased">www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased</a>
Statistische Auswertung	STATA 9.0	StataCorp, College Station, USA
Primer-Abgleich am humanen Genom	BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov">blast.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Textverarbeitung	Microsoft Word X, Mac	Microsoft Corp., Redmond, USA
Literaturverwaltung	Endnote 6.0.1.	Thompson Research Group, Nashville, USA
Powerberechnung	Genetic Power Calculator	<a href="http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/cc2.html">pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/cc2.html</a>

**Tabelle 2.10. Datenbanken**

Anwendung	Datenbank	Quelle
Genetische Informationen	National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Datenbank (Publikationen)	PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>
Datenbank (SNPs)	DbSNP	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/">www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/</a>
Datenbank (SNPs)	Chip Bioinformatics	<a href="http://snpper.chip.org/">snpper.chip.org/</a>
Gendatenbank	HapMap	<a href="http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/">hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Datenbank Mykobakterien	MIRU-VNTRplus	<a href="http://www.miru-vntrplus.org">www.miru-vntrplus.org</a>



## **2.3. Methoden**

Im Folgenden werden die in den experimentellen Untersuchungen angewendeten Methoden beschrieben. Die genomische DNA der meisten Blutproben der Studienpopulation lag zu Beginn der Arbeit bereits in ausreichender Menge isoliert vor, musste jedoch von einzelnen Proben neu isoliert werden.

Für die initiale Re-Sequenzierung des Gens *SPP1* wurden 69 Proben ausgewählt. Um einen Überblick über die Verteilung der Polymorphismen in den verschiedenen Versuchsgruppen zu erhalten, wurden je 23 Patienten, 23 Kontrollen mit positiven PPD-Test und 23 Kontrollen mit negativem PPD-Test ausgewählt. Diese Anzahl wurde definiert, um eine ausreichend große statistische Power zu gewährleisten. Polymorphismen, die in dieser Gruppe gefunden werden, haben statistisch eine Frequenz von mindestens 2%.

Die 69 DNA-Isolate wurden mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert und sequenziert, um bisher unbekannte Mutationen zu identifizieren. Danach wurden nach definierten Kriterien (Lokalisation im Promotor oder in den Exons, Häufigkeitsunterschiede in Fall- und Kontrollgruppe, beschriebene Assoziationen) ausgewählte Polymorphismen mittels Genotypisierung in der gesamten Studienpopulation untersucht. Die Auswertung erfolgte mit Methoden der genetisch-epidemiologischen Statistik.

### **2.3.1. DNA-Isolierung**

Die DNA-Extraktion aus dem mit Harnstoff versetzten Citrat- oder EDTA-Blut erfolgte mit dem AGOWA mag Maxi DNA Isolation Kit. Dieses Reaktionssystem ermöglicht eine Abtrennung der DNA aus dem Vollblut durch Bindung an magnetische Partikel.

Initial werden die Zellen durch Zugabe von Proteasen lysiert, wodurch die DNA freigesetzt wird. Diese bindet an die zugefügten magnetischen Partikel. Durch magnetische Separation bildet sich ein Pellet der DNA-beladenen Partikel am Boden des Reaktionsgefäßes und der Überstand kann verworfen werden. Die an Magnetpartikel gebundene DNA wird gewaschen und abschließend mit einem Elutionspuffer von diesen gelöst. Die Ausbeute der DNA ist abhängig von der Anzahl der Leukozyten im Blut.

### **2.3.2. Phi-Amplifizierung**

Die Phi-Amplifizierung ist eine Methode zur Vervielfältigung des gesamten Genoms aus kleinen DNA-Mengen (*whole genome amplification*, WGA). Das auf PCR (s. 2.3.4.) basierende Verfahren wurde mit dem GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit durchgeführt. Es wurden hexamere Oligonukleotide (*random primer*) eingesetzt, die durch ihre kurze Sequenz bereits bei einer Temperatur von 30°C unspezifisch an verschiedene DNA-Abschnitte binden. So wird die Kettenverlängerung gleichzeitig an unterschiedlichen DNA-

Abschnitten initiiert und das gesamte Genom vervielfältigt. Mit der Phi-Amplifizierung lassen sich aus der primären genomischen DNA Amplifikate von über 10 kb Länge erzeugen (Kumar *et al.*, 2007). Im Folgenden sind Reaktionsansatz und Reaktionsablauf der Phi-Amplifizierung dargestellt. Aus 10 ng eingesetzter genomischer DNA erhält man etwa 4-7 µg amplifizierte DNA.

**Tabelle 2.11. Reaktionsansatz und Temperaturzyklen für die Phi-Amplifizierung**

Schritt	Ansatz	Temperatur	Dauer
1. Denaturierung	1 µl (10 ng DNA in TE-Puffer) 9 µl Probenpuffer	95°C	3 min
2. Amplifizierung	10 µl Denaturierungsansatz (s.o.) 9 µl Reaktionspuffer 1 µl Enzym-Mix	30°C	90 min
3. Enzyminaktivierung		65°C	10 min

### 2.3.3. Primerdesign für die Sequenzierung

Die Oligonukleotide (Primer) für PCR und Sequenzierung wurden mit Hilfe des Programms Primer3 entworfen. Aus der bekannten genomischen Sequenz (<http://snpper.chip.org/bio/show-sequence/?TYPE=U&GENE=17620>) wurden Abschnitte ausgewählt, die für die beabsichtigten Untersuchungen von Interesse waren. Diese beinhalteten den Promotorbereich (bis 750 bp in 5'-Richtung vom Startkodon), die sieben Exons und die untranslatierte Region am 3'-Ende des DNA-Strangs (3'-UTR).

Verschiedene Gesichtspunkte wurden für die Anfertigung der Primer berücksichtigt. Für jeden zu amplifizierenden Abschnitt wurden jeweils ein Primer komplementär zum 3'-Ende (*forward primer*) und einer komplementär zum 5'-Ende (*reverse primer*) der DNA-Stränge angefertigt. Die Oligonukleotide sollten für ein spezifisches Bindungsverhalten eine Länge von ca. 17 bis 30 Nukleotiden haben und die Basen Adenin (A) und Thymin (T) in etwa gleicher Verteilung enthalten wie Cytosin (C) und Guanin (G). Eine ausreichende Spezifität der Primer sowie der Ausschluss von Primer-Dimeren wurde durch die Software Primer3 garantiert. Mit Hilfe des Programms BLAST wurden die Primersequenzen mit der humanen Gensequenz abgeglichen.

Die bei MWG Biotech angefertigten Oligonukleotide wurden in gefriergetrockneter (lyophilisierter) Form geliefert. Für die Reaktionen wurden sie in Lösung mit einer Konzentration von 10 pmol/µl gebracht. Um die optimalen Reaktionsbedingungen für die Primer zu ermitteln, wurden mit bekannten DNA-Proben verschiedene Reaktionsansätze (MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, Pufferzusätze) und Temperaturen getestet.

### 2.3.4. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von definierten DNA-Abschnitten (Mullis *et al.*, 1986). Der Reaktionsansatz beinhaltet neben einem Aliquot genomischer DNA und für den Abschnitt spezifischen Primern das Enzym *Taq*-Polymerase, die DNA-Bausteine Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) sowie Reaktionspuffer und Magnesiumchlorid.

Nach initialer Trennung der DNA-Doppelstränge (Denaturierung) durch Erhitzen auf 95°C, können die Primer bei einer für sie spezifischen Bindungs (*annealing*)-Temperatur an die komplementären Einzelstränge der DNA-Matrix binden. Durch das hitzestabile Enzym *Taq*-Polymerase wird der neue Strang ausgehend von den Primern in 3'-Richtung verlängert (Elongation). Dabei werden die Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) komplementär zur DNA-Einzelstrang-Matrize angefügt. Durch Wiederholen der Temperaturzyklen werden die einzelnen Schritte mehrfach durchlaufen und die DNA-Sequenz wird exponentiell vervielfältigt. Folgend sind beispielhaft für die Promotorregion Reaktionsansatz und Temperaturzyklen aufgeführt.

**Tabelle 2.12. PCR-Ansatz**

Komponente	Konzentration	Volumen pro Ansatz	Finale Konzentration
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/μl	0,2 μl	1 U
Reaktionspuffer BD	10 x	2 μl	1 x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 μl	2,5 mM
dNTP Mix	10 mM	0,4 μl	200 μM
<i>Forward primer</i>	10 pmol/μl	1 μl	0,5 μM
<i>Reverse primer</i>	10 pmol/μl	1 μl	0,5 μM
DNA Probe	ca. 5 ng/μl	2 μl	10 ng/rxn
H <sub>2</sub> O		ad 20 μl	

Inhaltsstoffe sowie deren Konzentration und Menge für den Reaktionsansatz der PCR-Reaktion. m: milli, p: piko, μ: Mikro, M: molare Masse, rxn: *reaction*, Reaktion, U: Units, g: Gramm, l: Liter

**Tabelle 2.13. PCR-Programm**

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	94	3 min	1
2. Denaturierung	94	30 s	} 35
3. <i>annealing</i>	60	1 min	
4. Elongation	72	1 min	
5. Finale Elongation	72	10 min	1

Reaktionsschritte der PCR. Die Schritte 2.-4. wurden insgesamt 35 Mal wiederholt, Schritt 1. und 5. stehen nur am Anfang bzw. am Ende der PCR-Reaktion

Die auf Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ )-Konzentration und *annealing*-Temperatur der Primer optimierten Reaktionsbedingungen für die PCR der verschiedenen amplifizierten Genabschnitte sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 2.14. Optimierte Reaktionsbedingungen**

Amplifizierter Bereich	$T_{annealing}$ (°C)	[ $MgCl_2$ ]
SPP1-pro1000	60	2 mM
SPP1-pro+ex1	60	1,5 mM
SPP1-exon2+3	60	2 mM
SPP1-exon	60	1,5 mM
SPP1-exon5	55	1,5 mM
SPP1-exon6	60	2 mM
SPP1-3'UTR	60	2 mM

Optimale Temperatur und  $MgCl_2$ -Konzentration für die PCR der zu amplifizierenden Bereiche.

### 2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese

Amplifizierte PCR-Produkte werden zur Kontrolle und Größenbestimmung mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu werden sie mit einem Ladepuffer, der Glycerol und die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol enthält, auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei einer angelegten Spannung von 100 V für 25 min. Da sich kürzere DNA-Fragmente schneller im elektrischen Feld zum Pluspol bewegen, trennen sich die PCR-Produkte so ihrer Länge nach auf. Zur Kontrolle werden zusätzlich eine Negativkontrolle und ein DNA-Längenstandard mit DNA-Fragmenten bekannter Größe aufgetragen. Das Agarosegel ist mit Ethidiumbromid (0,2  $\mu g/ml$ ) versetzt. Dieses interkaliert mit der DNA und macht die entstehenden Komplexe unter UV-Licht sichtbar. Das Ergebnis wird fotografisch dokumentiert.

### 2.3.6. Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden für die folgende Sequenzierreaktion mit dem Sephadex/Micropore-System gereinigt. Dazu werden spezielle 96-Well Filterplatten mit in den Boden eingelassener Membran mit Sephadex-Pulver (Sephadex G50 superfine) befüllt. Dieses quillt nach Zugabe von HPCL-Wasser auf und bildet so einen Gelfilter. Aufzureinigende Produkte werden auf das Gel gegeben und durch Zentrifugieren durch diesen Filter gepresst. Überschüssige Primer und dNTPs werden von dem Gel zurückgehalten, während die Sequenzierungsprodukte als Filtrat aufgefangen werden.

### 2.3.7. Sequenzierreaktion mittels Kettenabbruchverfahren

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Der Ablauf der Reaktion entspricht grundsätzlich dem der PCR, allerdings enthält der Ansatz zusätzlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs). Werden diese zufällig in den neu synthetisierten Strang eingebaut, kann keine weitere Base binden und es kommt zum Kettenabbruch (Sanger *et al.*, 1977). So entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die je nach terminalem ddNTP mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Sequenzierreaktion wird mit nur einem Primer durchgeführt; für einige Abschnitte wurde jedoch sowohl eine Reaktion mit dem *forward* als auch eine Reaktion mit dem *reverse primer* durchgeführt, um den zu sequenzierenden Bereich optimal aufzulösen. In den folgenden Tabellen werden der Reaktionsansatz und die Temperaturzyklen für die Sequenzierreaktion aufgeführt.

**Tabelle 2.15. PCR-Ansatz**

Komponente	Volumen/Ansatz
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	1 µl
BigDye Reaktionspuffer	3 µl
Primer (5 pmol/µl)	1 µl
PCR-Produkt	1 µl
H <sub>2</sub> O	4 µl

Reaktionsansatz der PCR für die Sequenzierreaktionen mit dem BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix.

**Tabelle 2.16. PCR-Temperaturzyklen**

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	96	5 min	1
2. Denaturierung	96	30 s	} 24
3. Annealing	50	15 s	
4. Elongation	60	4 min	

Reaktionsschritte der PCR. Der erste Schritt steht nur am Beginn der Reaktion, danach werden die Schritte 2.-4. insgesamt 24 Mal wiederholt.

### 2.3.8. Aufreinigung der Produkte der Sequenzierreaktion

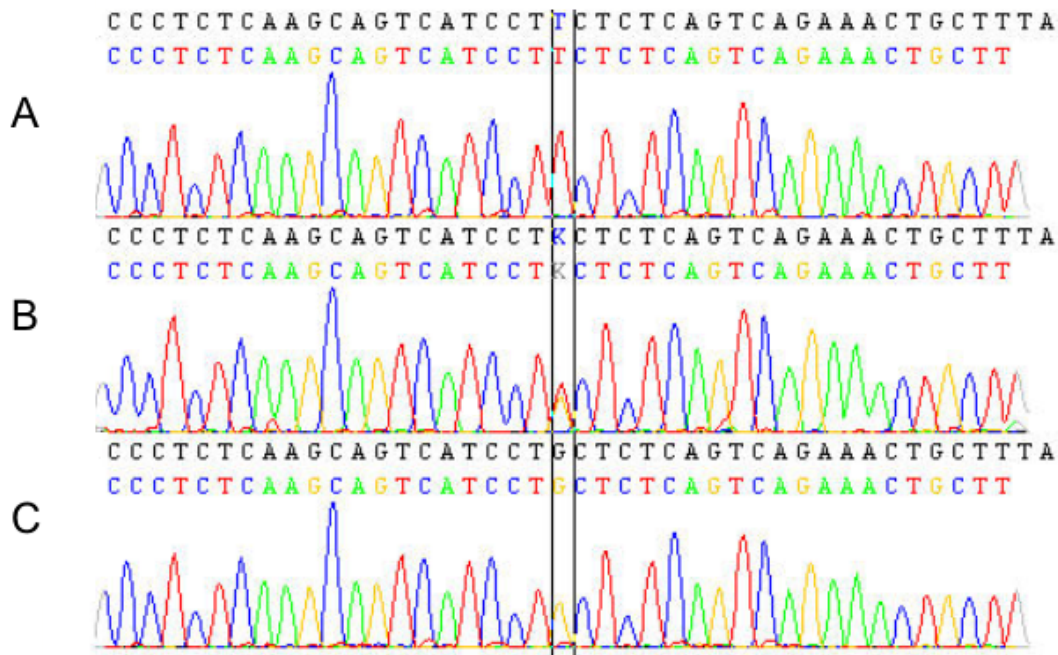
Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden für die folgende Sequenzanalyse erneut mit dem Sephadex/Micropore-System gereinigt. Die gereinigten Produkte werden für die nachfolgende Analyse im Kapillarsequencer mit HiDi Formamid gemischt (5 µl Produkt auf 12 µl HiDi Formamid). Durch den Zusatz des Formamids werden die Produkte denaturiert, so dass sie zur Analyse einsträngig vorliegen.

### 2.3.9. Sequenzanalyse

Die Analyse der gereinigten Proben erfolgt automatisch im Kapillarsequencer. Die Auftrennung erfolgt elektrophoretisch anhand der Länge der Fragmente. Die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide zeigen nach Anregung mit Laserstrahlen einer definierten Wellenlänge für jede der Basen eine spezifische Farbe, die vom Gerät detektiert wird. Dadurch kann die genaue Basenabfolge der Probe bestimmt werden.

Die ermittelten Sequenzen der Proben wurden mit Hilfe des Programms SeqScape mit der Referenzsequenz aus der Datenbank des NCBI (*contig accession number*: NT\_016354.18) verglichen, um bisher unbekannte Polymorphismen zu detektieren.

Die folgende Abbildung 2.1. zeigt die Ergebnisse der Analyse, wie sie durch das Programm SeqScape dargestellt werden.



**Abbildung 2.1. Darstellung der Basenabfolge am Beispiel der Variante rs2853744**

Ergebnis der Analyse mit dem Kapillarsequenzier. Darstellung mit dem Programm SeqScape. Die y-Achse stellt die Intensität der Fluoreszenz dar, die x-Achse zeigt die elektrophoretisch aufgetrennten fluoreszenzmarkierten ddNTPs. A: homozygote Mutation TT, B: heterozygote Mutation (K [internationale Nomenklatur]: Austausch T zu G), C: Wildtyp GG.

### 2.3.10. Primerdesign für die Genotypisierung

Aus den detektierten Polymorphismen wurden einzelne Einzelnukleotidaustausche (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) ausgewählt, die in der gesamten Studienpopulation analysiert wurden. Für diese Genotypisierung wurden mit dem Programm Roche Light-Cycler Probe Design Software 2.0 für jeden SNP jeweils erneut ein *forward* und *reverse primer* entworfen, die ebenfalls die bereits unter 2.3.3. beschriebenen Bedingungen erfüllen sollten. Das Amplifikat sollte eine Größe von etwa 300 bp haben.

Zusätzlich wurden für jede Mutation jeweils zwei fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide entworfen. Diese wurden komplementär zu der Sequenz im Bereich der Mutation (Sensor) und zu der direkt angrenzenden Sequenz (Anker) hergestellt. Für das Sensor-Oligonukleotid wurde eine Schmelztemperatur von etwa 65°C angesetzt. Das Anker-Oligonukleotid sollte eine etwa 5°C höhere Schmelztemperatur haben, um einen sicheren Energietransfer (FRET, siehe 2.3.11.) über den gesamten Temperaturbereich der Schmelzanalyse zu ermöglichen.

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers synthetisiert, in lyophilisiertem Zustand geliefert und für die Reaktionen in Lösung gebracht. Die Konzentration der Arbeitslösung betrug für die *forward* und *reverse primer* je 10 pmol/μl und für die fluoreszenzmarkierten Anker- und Sensorprimer 5 pmol/μl.

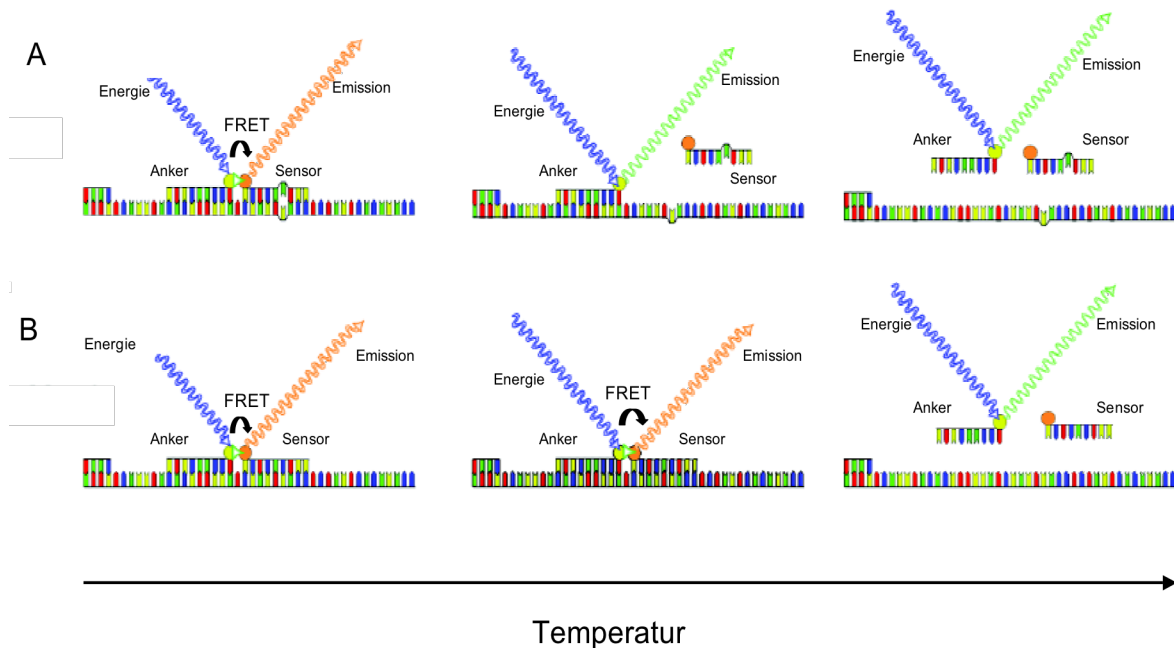
### 2.3.11. Genotypisierung mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) ist ein Verfahren, das auf der Basis von Energieübertragung den Abstand zweier Moleküle zueinander anzeigt. Dabei wird aufgenommene Energie von einem angeregten Molekül (Donor) direkt auf ein Empfängeremolekül (Akzeptor) übertragen, wenn dieses sich in unmittelbarer Umgebung befindet. Der Abstand der Moleküle beträgt dabei typischerweise weniger als 10 nm. Der Mechanismus dieses nichtstrahlenden Energietransfers („virtuelles Photon“) wird als Förster-Energietransfer bezeichnet (Förster, 1948). Nur wenn es sich bei den Donor- und Akzeptormolekülen um fluoreszierende Stoffe handelt, spricht man von FRET.

In dissoziiertem Zustand emittiert der Donor aufgenommene Energie, während bei geeigneter räumlicher Nähe der beiden Stoffe die Energie vom Donor auf den Akzeptor übertragen wird und daher dieser die Energie emittiert. Diese veränderte Emission kann durch Messung der Fluoreszenz quantifiziert werden.

Zur Analyse von Punktmutationen (Genotypisierung) mit dieser Methode werden in einem speziellen PCR-Verfahren zwei Oligonukleotide als Sensor und Anker (als Donor bzw. Akzeptor) an den DNA-Strang im Bereich der zu untersuchenden Mutation hybridisiert (siehe 2.3.10.). Beide sind an der sich zugewandten Seite mit fluoreszierenden Molekülen (Fluorophoren) markiert (5-Cyanin und 6-FAM-phosphoramid). Bei Anregung durch Bestrahlung mit Licht im Absorptionsbereich des Donors führt die direkte Nachbarschaft der Fluorophoren hauptsächlich zur Energieemission durch den Akzeptor. Aufgrund der niedrigeren Schmelztemperatur des Sensors dissoziiert dieser bei kontinuierlichem Erhitzen des Reaktionsgemisches (0.05°C/s, Temperaturbereich 35-75°C) zuerst vom DNA-Strang. Die räumliche Trennung der Fluorophoren führt zur Zunahme der Energieemission des Ankers. Bei höheren Temperaturen löst sich auch der Anker vom DNA-Strang.

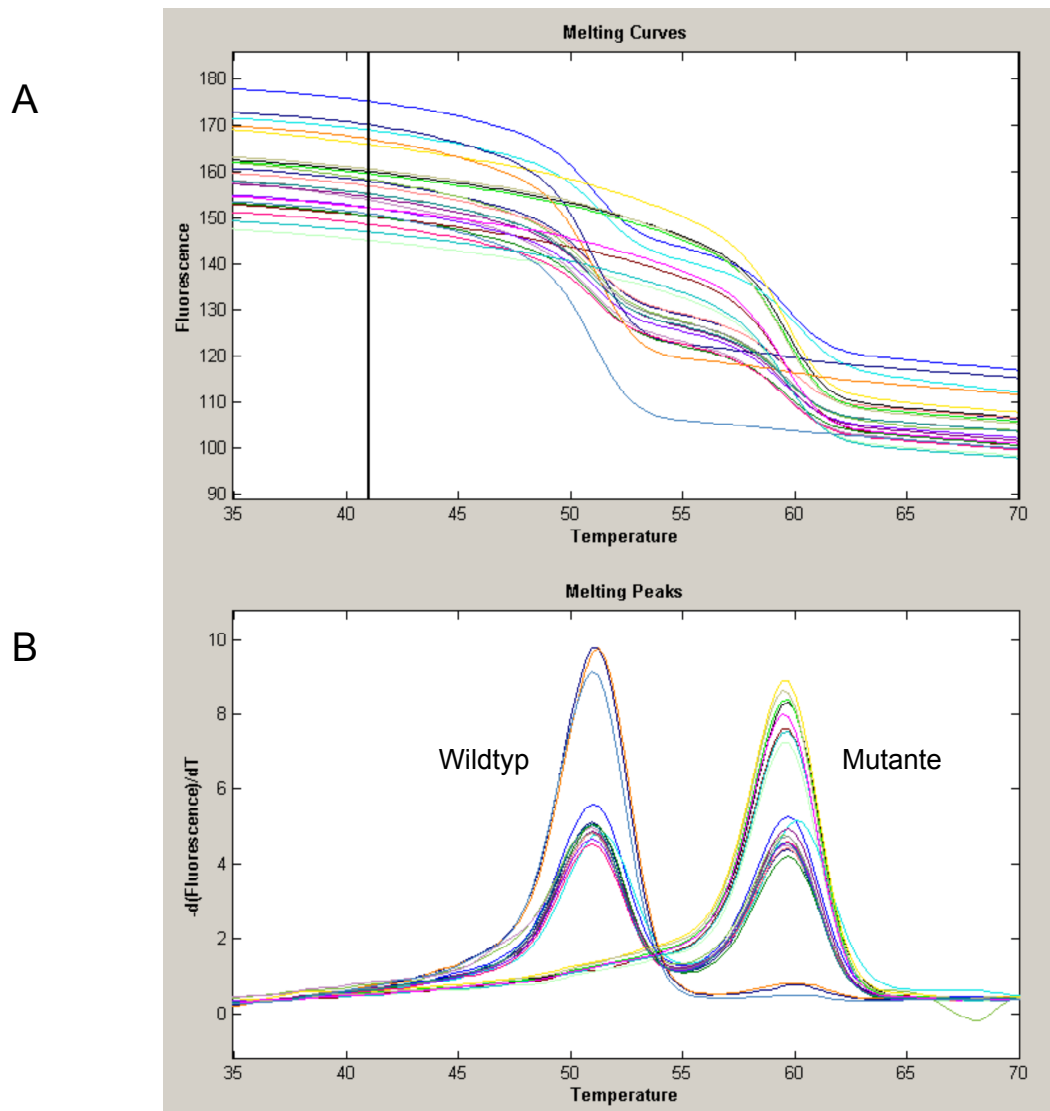




**Abbildung 2.2. Schematische Darstellung der Detektion von Punktmutationen mit der FRET-Methode.**

Bei langsamer Temperaturerhöhung löst sich der Sensor im Fall der Mutation (A) aufgrund der nicht optimalen Bindung schneller von der DNA-Matrize als im Fall des Wildtyps (B). Die dadurch hervorgerufene räumliche Trennung von Anker (gebunden an der DNA-Matrize) und Sensor führt zu einer Veränderung der Fluoreszenz-Emission.

Der Sensor wird in der Regel komplementär zum Wildtyp angefertigt. Bei einer Mutation führt die nicht-komplementäre Basenpaarung zu einer weniger festen Bindung und daher bereits bei niedrigerer Temperatur zur Dissoziation des Sensors vom DNA-Strang. Durch die spezifischen Schmelzkurven lassen sich Wildtyp und Mutation unterscheiden. Die Abnahme der Fluoreszenz während des Temperaturanstiegs wird durch die Analysensoftware des LightTypers graphisch dargestellt und kann so ausgewertet werden. Abbildung 2.3. zeigt ein Bildschirmfoto der Software mit den Schmelzkurvenanalysen.



**Abbildung 2.3. Schmelzkurven am Beispiel der Variante rs2853744**

A: Graphische Darstellung der Intensität der Fluoreszenz (y-Achse) gegen die Temperatur (x-Achse). B: Erste Ableitung der Intensität der Fluoreszenz gegen die Temperatur. Der Sensor ist in diesem Fall an die Mutante angepasst. Bei Temperaturerhöhung kommt es daher zunächst zu einer Änderung der Fluoreszenz bei Proben, die den Wildtyp enthalten (hier etwa bei 51°C), während die DNA-Proben, welche die Mutation enthalten, erst bei ca. 59°C eine Fluoreszenzänderung aufweisen. Die Abbildung stammt aus dem Programm Sequencing Analysis Software.

Die folgenden Tabellen 2.17. und 2.18. zeigen beispielhaft Reaktionsansatz und Temperaturzyklen für die Genotypisierung der OPN-Variante rs2853744 G/T.

**Tabelle 2.17. Reaktionsansatz für die Genotypisierung**

Komponente	Konzentration	Volumen (µl)	Finale Konzentration
Puffer	10 x	1,00	1 x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,80	2 mM
<i>forward primer</i>	10 pmol/µl	0,50	0,5 µM
<i>reverse primer</i>	10 pmol/µl	0,10	0,1 µM
Sensor	5 pmol/µl	0,50	0,25 µM
Anchor	5 pmol/µl	0,50	0,25 µM
Solution S	10 x	1,00	1 x
DNTPs	10 mM	0,20	200 µM
BSA	20 mg/ml	0,25	0,5 µg/µl
DMSO	100 %	0,50	5 %
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,20	1 U/rxn
DNA	5 ng/µl	2,00	10 ng/rxn
H <sub>2</sub> O		2,45	
Gesamt-Volumen (µl)		10,00	

Inhaltsstoffe sowie deren Konzentration und Menge für den Reaktionsansatz der Genotypisierung. m: milli, p: piko, µ: Mikro, M: molare Masse, rxn: *reaction*, Reaktion, U: Units, g: Gramm, l: Liter

**Tabelle 2.18. PCR-Temperaturzyklen für die Genotypisierung**

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	94	3 min	1
2. Denaturierung	94	30 s	}
3. Annealing	60	1 min	
4. Elongation	72	1 min	}
5. Finale Elongation	72	10 min	

Reaktionsschritte der PCR für die Genotypisierung. Der erste Schritt steht nur am Beginn der Reaktion, danach werden die Schritte 2.-4. insgesamt 45 Mal wiederholt. Am Ende der Reaktion steht eine finale Elongation.

### 2.3.12. Statistische Verfahren

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurden die Methoden der genetischen Epidemiologie angewendet. Die aus der Schmelzkurvenanalyse erhaltenen Daten für die neun ausgewählten Polymorphismen (vgl. 3.2.1.) wurden initial daraufhin untersucht, ob sie sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befinden. Die Assoziationsanalyse wurde unter Einbeziehung der verschiedenen beeinflussenden Variablen durchgeführt. Alle statistischen Auswertungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit dem Programm STATA (Version 9) durchgeführt.

### 2.3.12.1. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) beschreibt die Genotypenverteilung für biallelische Mutationen. Es gilt für eine ideale Population, die durch eine sehr große Individuenzahl gekennzeichnet ist, in der eine gleichmäßige und unbeeinflusste Durchmischung des Erbguts (Panmixie) herrscht und keine Migration der Individuen stattfindet. Selektion oder spontane Mutationen treten unter diesen angenommenen Verhältnissen nicht auf. In natürlichen Populationen sind diese Bedingungen meist nicht gegeben; trotzdem wird das HWG zur Beschreibung der Genotypenverteilung angewendet.

Für zwei angenommene Allele P und Q mit ihren Häufigkeiten p und q gilt  $p+q=1$  und  $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2$ , wobei  $p^2$  und  $q^2$  die Homozygotenhäufigkeiten und  $2pq$  die Heterozygotenhäufigkeit beschreibt. Starkes Ungleichgewicht im HWG bei Kontrollpopulationen ist entweder ein Indikator für Genotypisierungsfehler oder deutet auf unterschiedliche Populationssubstrukturen (Ethnien) hin (Gillespie, 1998). Eine signifikante Abweichung vom HWG im Patientenkollektiv deutet möglicherweise auf eine kausale Assoziation mit der Erkrankung hin.

### 2.3.12.2. Powerberechnung

Die statistische Power (Teststärke) bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der ein tatsächlich existierender Effekt in einer Studie gefunden wird (Cohen, 1969). Die Power hängt von mehreren Faktoren ab. Einerseits beeinflussen die Art und Verteilung der Daten und die Art des statistischen Tests die Power. Auch die anzunehmende Größe des nachzuweisenden Effekts und das Signifikanzniveau gehen in die Powerberechnungen ein. Der Effekt bezeichnet in diesem Fall die Tuberkulose-Inzidenz und wird für Ghana auf 0,003 geschätzt, das Signifikanzniveau wird auf  $p=0,05$  festgelegt. Für die gesamte Auswertung wurde die Häufigkeit des mit Krankheit assoziierten Allels auf durchschnittlich 0,1 geschätzt und das relative Risiko auf 1,4. Weiterhin hängt die Power von der Größe der Studienpopulation ab. Es wurde ein multiplikatives Modell angenommen.

Die Power der einzelnen Analysen wurde mit der öffentlich zugänglichen Software Genetic Power Calculator (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/cc2.html>) errechnet. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, sollte die Power mindestens 80% betragen.

### 2.3.12.3. Assoziationsanalyse

Die Zusammenhänge zwischen genetischen Polymorphismen und phänotypischen Merkmalen einer Erkrankung können mit verschiedenen statistischen Testverfahren untersucht werden. Zur multivariaten Analyse abhängiger Variablen werden logistische Regressionen angewendet, die den statistischen Zusammenhang zwischen einer nominalskalierten,

dichotomen, abhängigen Variablen und mindestens einer unabhängigen Variablen beurteilen. In der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie ist die abhängige Variable der jeweilige Phänotyp der mykobakteriellen Infektion. Die unterschiedlichen Phänotypen werden im Rahmen der Ergebnisse dargestellt. Als unabhängige Variable werden die analysierten genetischen Polymorphismen untersucht. Da in Fall-Kontroll-Studien die Bestimmung des relativen Risikos nicht möglich ist, wird das Wahrscheinlichkeitsverhältnis als Odds Ratio ermittelt. Odds bezeichnet das Quotenverhältnis einer Gruppe. Sie wird für jeden Polymorphismus durch den Quotienten der Wahrscheinlichkeiten (*probability*, P) P (krank)/ P (gesund) angegeben. Die Odds Ratio vergleicht die Odds zweier Gruppen miteinander.

Als Hypothese wird das Vorhandensein einer Assoziation angenommen. Die Fehlerwahrscheinlichkeit  $p$  bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, dass der beobachtete Effekt durch Zufall entstanden ist (sog. Fehler der 1. Art). Um statistisch belastbare Ergebnisse zu erhalten, wird  $p$  für die Auswertungen in der Regel auf maximal 0,05 festgelegt (Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$ ). Das Konfidenzintervall entspricht also 95 %.

Durch die logistische Regression können die Einflüsse verschiedener Parameter (Ethnie, Alter, Geschlecht) auf die Erkrankungsmanifestation getestet werden. Diese Faktoren können das Ergebnis in Richtung eines kausalen Zusammenhangs zwischen Variablen und Phänotyp verfälschen. Daher müssen sie soweit wie möglich identifiziert und die Analyse entsprechend korrigiert werden.

#### **2.3.12.4. Haplotypenberechnung**

Genetische Varianten können gemeinsam vererbt werden. Eine solche Kombination von Polymorphismen wird als Haplotyp bezeichnet. Man spricht von einem Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD). Je größer der Wert des LD ist, desto stärker ist die gemeinsame Vererbung. Haplotypen wurden auf der Basis der Genotypen mit dem frei zugänglichen Programm Haploview abgeschätzt.

#### **2.3.12.5. Bonferroni-Korrektur**

Bei multiplem Testen kommt es zwangsläufig zu einer Zunahme der Fehlerwahrscheinlichkeit  $p$ . Um dieser Tatsache zu begegnen, wird die Bonferroni-Korrektur angewendet und der für einen SNP erhaltene  $p$ -Wert mit der Anzahl der Testungen multipliziert. Da in dieser Studie neun SNPs untersucht wurden, war der generelle Korrekturfaktor 9. Zusätzlich wurde nach verschiedenen Untergruppen stratifiziert. So musste zum Beispiel ein  $p$ -Wert, der nur für einen mykobakteriellen Genotyp signifikant war, zusätzlich mit 6 multipliziert werden, da für insgesamt sechs mykobakterielle Genotypen getestet wurde. Auch bei Stratifizierungen für Geschlecht oder Ethnien musste der  $p$ -Wert entsprechend korrigiert werden.

### 3. ERGEBNISSE

Im Folgenden sollen zunächst demographische Variablen der Studienpopulation dargestellt werden. Danach werden die Ergebnisse der Sequenzierung der *SPP1*-Abschnitte und die Resultate aus den Genotypisierungen der ausgewählten Varianten beschrieben.

#### 3.1. Allgemeine Beobachtungen in der Studiengruppe

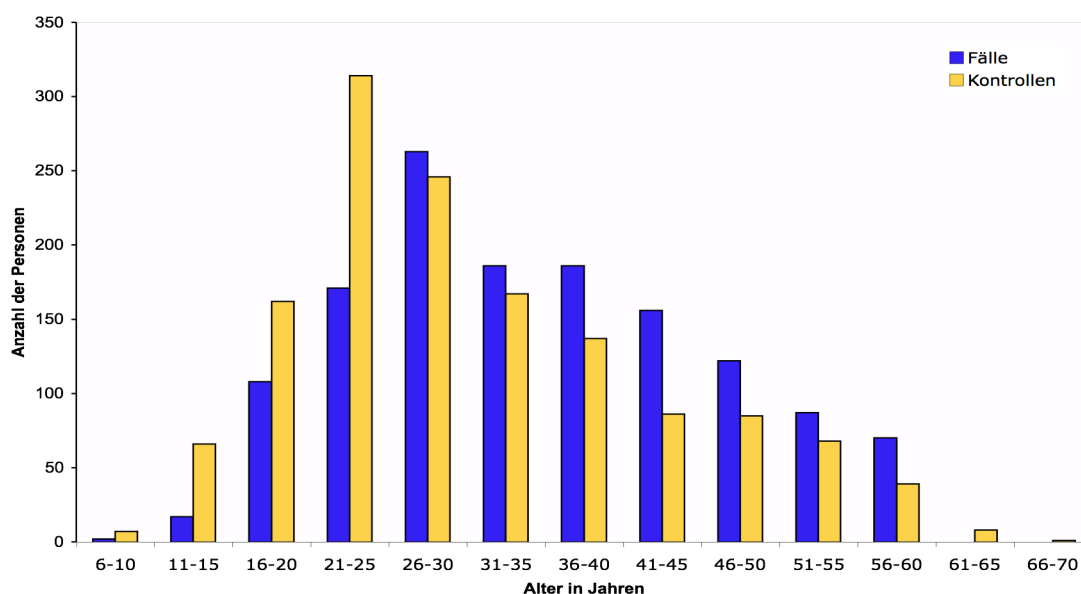
Die Studienpopulation bestand aus 2010 Fällen und 2346 Kontrollen. Es fand sich eine leicht differierende Verteilung innerhalb der Fälle und Kontrollen in Bezug auf Alter und Geschlecht, die in Tabelle 3.1. beschrieben wird. Insgesamt nahmen mehr Männer als Frauen an der Studie teil (2759 Männer und 1597 Frauen). Die männlichen Probanden waren über Fall- und Kontrollgruppe etwa gleich häufig verteilt. In der Fallgruppe fanden sich signifikant weniger Frauen als Männer.

**Tabelle 3.1. Demographische Verteilung der Studienpopulation**

	Alter	Frauen (%)	Männer (%)	Gesamt
Fälle	34,1 (9-60)	640 (31,8)	1370 (68,2)	2010
Kontrollen	32,5 (6-66)	957 (40,8)	1389 (59,2)	2346
Gesamt	33,2	1597	2759	4356

Alter und Geschlecht der Studienteilnehmer, sowie deren Verteilung über Fall- und Kontrollgruppe. Das Durchschnittsalter ist in Jahren angegeben, in den Klammern findet sich die Altersspanne.

Das Alter der Patienten der Studienpopulation betrug im Gesamtdurchschnitt 33,2 Jahre, in der Fallgruppe 34,1 Jahre. Es fand sich ein Erkrankungsgipfel um das 30. Lebensjahr. In Abb. 3.1. ist die Altersverteilung von Fällen und Kontrollen graphisch dargestellt.



**Abbildung 3.1. Altersverteilung für Fälle und Kontrollen (in Prozent)**

Verteilung der Probanden (Fälle/Kontrollen) über die verschiedenen Altersklassen. In der Klasse der 66-70 jährigen sind keine Fälle enthalten, da diese anhand des Studiendesigns ausgeschlossen wurden.

Neben dem Phänotyp „Erkrankung“ wurden weitere Phänotypen definiert, um der variablen Manifestation der Tuberkulose gerecht zu werden. Als Maß für die Etablierung einer Immunantwort wurde die Größe der Reaktion im PPD-Test untersucht. Dieser wurde nur in den Kontrollen durchgeführt, da für die Fallgruppe ein positives Ergebnis anzunehmen war. Der Test wurde entsprechend den Herstellerangaben ab einem Durchmesser der Hautinduration von 1 mm als positiv gewertet. Die Kontrollgruppe bestand aus 2219 PPD-positiven und 127 PPD-negativen Personen.

**Tabelle 3.2. Ergebnisse des PPD-Test bei den Kontrollpatienten**

PPD-Test	Kontrollpatienten (%)
Positiv	2219 (94,6)
Negativ	127 (5,4)
Gesamt	2346

Als Maß für die Schwere der Tuberkuloseerkrankung wurde die Ausprägung von Infiltraten sowie Kavernenbildung in der Thorax-Röntgenaufnahme der Patienten bestimmt. Die radiologischen Befunde wurden von Radiologen ausgewertet und entsprechend ihrer Ausprägung in einer Skala von 0 (keine Läsionen) bis 3 (schwere Läsionen) eingeordnet. Insgesamt wurden bei 1825 der 2010 erkrankten Personen die radiologischen Befunde dokumentiert.

**Tabelle 3.3. Radiologische Befunde in der Fallgruppe**

Schweregrad	Infiltrate (%)	Kavernen (%)
0	17 (0,9)	108 (5,9)
1	354 (19,4)	821 (45,0)
2	1087 (59,6)	665 (36,4)
3	367 (20,1)	231 (12,7)

Anzahl (Prozent) der Patienten mit keinen (Schweregrad 0) bis schweren (Schweregrad 3) Infiltraten oder Kavernen in der Thorax-Röntgenaufnahme.

### 3.1.1. Ethnische Zugehörigkeiten der Studienpopulation

Die Rekrutierung der Studienpopulation erfolgte aus verschiedenen in Ghana ansässigen ethnischen Gruppen. 61,2% waren Akan (dazu zählen die Ashanti, Fante und Akuapem), 17,4% Ga-Adangbe und 8,3% Ewe. 11,6% gehörten einer ethnisch inhomogenen Gruppe aus dem Norden Ghanas an, hierzu gehörten Dagomba, Sissala, Gonja und Kusasi. Diese werden im Folgenden als Northerners bezeichnet. Für insgesamt 68 Probanden, also 1,6% aller Studienteilnehmer, konnte die ethnische Zugehörigkeit nicht ausreichend sicher bestimmt werden.

Die proportionale Verteilung der Ethnien zwischen Fällen und Kontrollen zeigte keine signifikanten Abweichungen. In Tabelle 3.4. sind die Ethnien und ihr Vorkommen in Fall- und Kontrollgruppe aufgeführt.

**Tabelle 3.4. Ethnische Gruppen in der Studienpopulation**

Ethnie	Fälle (%)	Kontrollen			Gesamt
		Gesamt (%)	PPD-positiv (%)	PPD-negativ (%)	
Akan	1279 (63,6)	1387 (59,1)	1292 (58,2)	95 (74,8)	2666
Ewe	142 (7,1)	219 (9,3)	214 (9,6)	5 (3,9)	361
Ga-Adangbe	292 (14,5)	465 (19,8)	456 (20,6)	9 (7,1)	757
Northerners	259 (12,9)	245 (10,4)	229 (10,3)	16 (12,6)	504
Unbekannt	38 (1,9)	30 (1,3)	28 (1,3)	2 (1,6)	68
Gesamt	2010	2346	2219	127	4356

### 3.1.2. Verteilung der mykobakteriellen Genotypen

Für die Klassifizierung der mykobakteriellen Genotypen wurden die Isolate auf Löwenstein-Jensen-Agar kultiviert und an das Nationale Referenzzentrum für Mykobakterien am Forschungszentrum Borstel versandt (Leitung: Frau Dr. Rüscher-Gerdes). Dort erfolgte die



Differenzierung auf Grundlage von biochemischen Nachweisen, Wachstumsverhalten und molekulargenetischen Methoden. Die eingesetzten Verfahren waren Spoligotyping, IS6110 Fingerprinting und Genotypisierung der für *M. tuberculosis* spezifischen *pk*s1/15 Deletion. Für die Stratifizierungen wurden die Mykobakterien nach phylogenetischen Gesichtspunkten eingeteilt.

Die modernen *M. tuberculosis* sensu stricto Stämme unterscheiden sich von den *M. africanum*-Stämmen durch die vorhandene RD (*region of difference*) 9 und die Deletion von Tb (tuberculosis) D1 (Brosch *et al.*, 2002). Die modernen *M. tuberculosis* sensu stricto Stämme können durch verschiedene Deletionen weiter differenziert werden. Die Deletion *pk*s15/1 definiert die große Gruppe *M. tuberculosis* Euro-American (Gagneux *et al.*, 2006). Weiterhin zählen nach der Nomenklatur von Gagneux *et al.* (2007) zu den *M. tuberculosis* sensu stricto Stämmen die Gruppe *M. tuberculosis* East-Asian, die durch die Deletion von RD105 gekennzeichnet wird, und *M. tuberculosis* Indo-Oceanic, für die die Deletion von RD239 spezifisch ist. Die *M. africanum*-Stämme können in die Gruppen West African 1, definiert durch die Deletion von RD 711, und West African 2, die durch das Fehlen von RD 702 gekennzeichnet ist, unterteilt werden (Gagneux *et al.*, 2006). Unter der Betrachtung von weiteren Deletionsregionen werden immer feinere Unterteilungen der mykobakteriellen Genotypen möglich. Eine neuere Studie von Wirth *et al.* (2008) differenziert so die *M. tuberculosis* Euro-American (EUAM)-Stämme weiter in die Stämme LAM, Cameroon, S, Uganda I, Uganda II, Ghana, X und Haarlem.

Auch für die hier vorliegende Studie wurde durch das Referenzzentrum Borstel eine spezifischere Unterteilung der mykobakteriellen Genotypen durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte auf der Grundlage der Nomenklatur der MIRU-VNTRplus Datenbank ([www.miruvntrplus.org](http://www.miruvntrplus.org)) (Allix-Beguec *et al.*, 2008). Zwischen dieser und der einiger anderer Studien bestehen teilweise Abweichungen. Vollständigkeitshalber wurden daher die in der Studie von Wirth *et al.* (2008) verwendeten Namen im Folgenden in Klammern dazugefügt.

Insgesamt konnten bei 1567 Patienten die mykobakteriellen Isolate genotypisiert werden. In 304 Fällen war eine eindeutige Identifizierung der mykobakteriellen Spezies nicht möglich. Tabelle 3.5. zeigt die Verteilung der typisierten Mykobakterien des MTBK.

Tabelle 3.5. Verteilung der Erreger des MTBK

Gruppe	Gagneux <i>et al.</i>	Wirth <i>et al.</i>	Fälle	(%)
<i>M. tuberculosis</i> (sensu stricto)	Euro-American	TB 2 (Cameroun, Uganda I, II)	475	30,3
		TB1 (Ghana)	138	8,8
		LAM	1	0,1
		Haarlem	111	7,1
	East-African-Indian	Dehli	13	0,8
		CAS/Dehli	8	0,5
	East-Asian	Beijing	11	0,7
Indo-Oceanic	EAI	24	1,5	
<i>M. africanum</i>	Afri 1		136	8,7
	Afri 2		336	21,4
<i>M. bovis</i>	Bov		10	0,6
Nicht klassifizierbar			304	19,4
Insgesamt			1567	100,0

Einteilung der Mykobakterien in Untergruppen, Spalte 1, und Differenzierung mykobakteriellen Genotypen durch Gagneux *et al.* (2007), Spalte 2, und Wirth *et al.* (2008), Spalte 3. Die Differenzierung erfolgte nach spezifischen genetischen Markern. Weiterhin ist der numerische und prozentuale Anteil der Genotypen in dem hier untersuchten Kollektiv angegeben.

### 3.2. Re-Sequenzierung relevanter Abschnitte von *SPP1*

Die genetische Sequenz von Abschnitten des *SPP1*-Gens wurde bei 69 Personen der Studienpopulation analysiert. Die ausgewählte Gruppe setzte sich aus 23 an Lungentuberkulose erkrankten Personen und je 23 PPD-positiven und 23 PPD-negativen Kontrollen zusammen. Die Sequenzierung umfasste 756 bp der 5'-UTR, alle sieben Exons und deren angrenzende, intronische Bereiche sowie 304 bp der nichttranslatierten 3'-UTR. Es wurden insgesamt sieben Abschnitte ausgewählt, die diese Bereiche beinhalteten.

Die Sequenzierung erfolgte durch das Kettenabbruchverfahren nach Sanger (vgl. 2.3.7.) mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. In den ausgewählten Bereichen konnten insgesamt 31 Polymorphismen detektiert werden. 16 SNPs waren exonisch lokalisiert. Vier davon kodierten für einen nicht-synonymen Aminosäureaustausch und fünf für einen synonymen Austausch. Drei Einzelnukleotidaustausche fanden sich in Exon 1 und vier Austausche in dem untranslatierten Bereich von Exon 7, welche beide nicht für das Protein kodieren. Sieben der SNPs lagen im Promotorbereich.

12 SNPs waren zuvor nicht in der Polymorphismen-Datenbank (dbSNP) des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) beschrieben. Diese wurden an das NCBI übermittelt und erhielten eine ss-Nummer (ss: *submitted SNP*, übermittelter SNP). Die bekannten SNPs wurden zur einfacheren Identifizierung nach Abgleich mit der Datenbank mit ihrer rs-Nummer (rs: *reference SNP*, Referenz-SNP) benannt.

Da das Protein OPN in verschiedenen Spleißvarianten vorliegt, ist die auf der Grundlage der mRNA erstellte Nomenklatur in der Datenbank nicht einheitlich. Die häufigste Variante ist OPN b mit fehlendem Exon 4 und somit insgesamt sechs Exons. Vollständigkeitshalber wurde jedoch bei der hier angewendeten Nomenklatur die Spleißvariante gewählt, die alle sieben Exons beinhaltet. Die Nomenklatur ist daher im Vergleich zu anderen Studien nicht zwingend kohärent. Anhand der rs-Nummern sind die Nukleotidaustausche dennoch eindeutig zu identifizieren.

Die folgende Tabelle 3.6. gibt eine Übersicht über die Lokalisation und Art der Mutationen. Außerdem wird für jede untersuchte genetische Variante die Häufigkeit des selteneren Allels (*minor allele frequency*, MAF) angegeben. Die MAF wurden mit dem Programm Haploview sowohl für die gesamte sequenzierte Studiengruppe von 69 Personen, als auch jeweils für die Fall- und die Kontrollgruppen errechnet. Es zeigte sich keine signifikant unterschiedliche Verteilung der Mutationen über Fälle, PPD-positive und PPD-negative Kontrollen.

Tabelle 3.6. Polymorphismen im *SPP1*-Gen

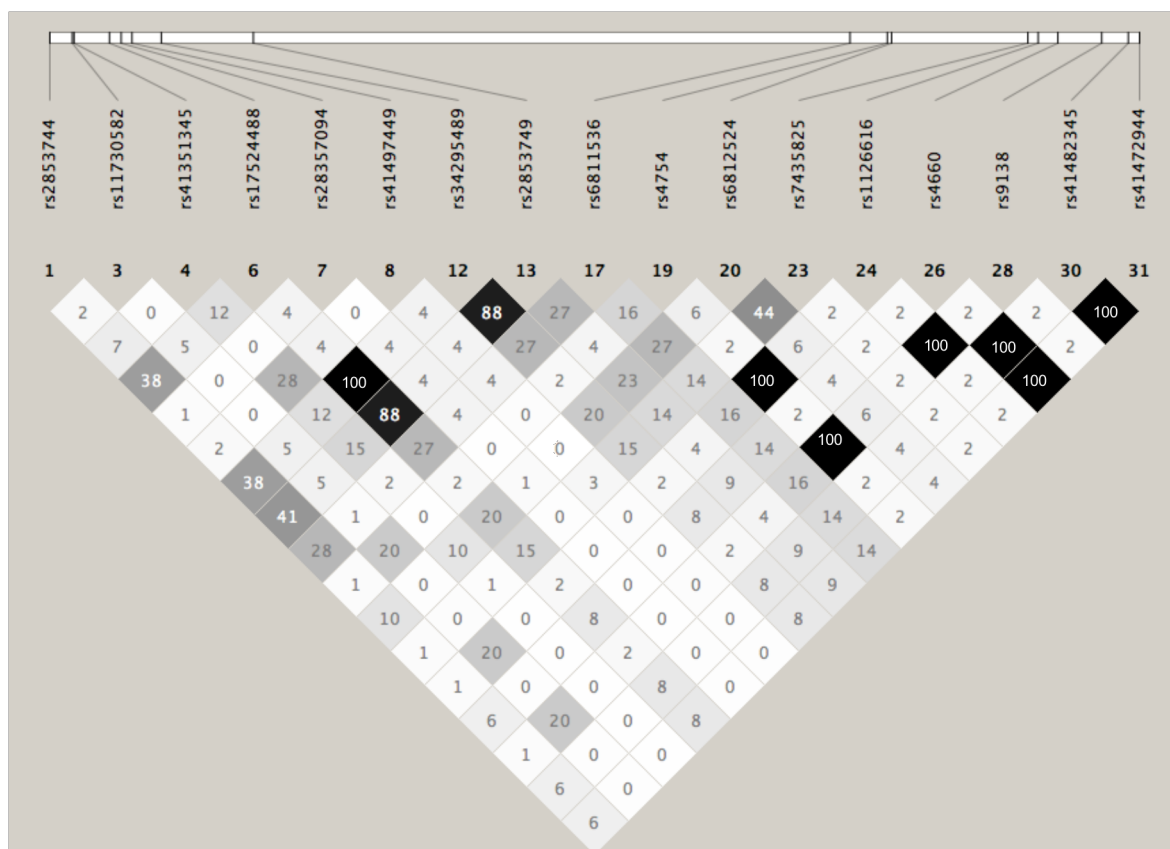
Lokalisation	Position	Name	N-Austausch	AS-Austausch	MAF
Promotor	<b>-554</b>	<b>rs2853744</b>	<b>G/T</b>	-	<b>0,309</b>
	-396*	ss120250324	G/A	-	0,007
	<b>-381</b>	<b>rs11730582</b>	<b>T/C</b>	-	<b>0,051</b>
	-368	rs41351345	G/T	-	0,14
	-220*	ss120250325	C/T	-	0,023
	<b>-94</b>	<b>rs17524488</b>	<b>Ins (G)</b>	-	<b>0,493</b>
	<b>-5</b>	<b>rs28357094</b>	<b>T/G</b>	-	<b>0,044</b>
Exon 1	<b>79</b>	<b>rs41497449</b>	<b>G/A</b>	-	<b>0,044</b>
	114*	ss120250326	A/G	-	0,015
	144*	ss120250327	C/T	-	0,007
Intron 1	Ex1+130*	ss120250328	C/T	-	0,007
	Ex1+156	rs34295489	ins (TG)	-	0,493
	Ex2-220	rs2853749	C/T	-	0,493
	Ex2-99	rs12331948	A/G	-	0,015
Exon 4	291*	ss120250329	A/G	T42T	0,007
Intron 4	Ex4+221*	ss120250330	G/C	-	0,007
Intron 5	Ex6-222	rs6811536	C/T	-	0,485
	Ex6-84*	ss120250331	A/G	-	0,007
Exon 6	460	rs4754	T/C	D94D	0,147
	<b>493</b>	<b>rs6812524</b>	<b>G/A</b>	<b>S105S</b>	<b>0,257</b>
	701*	ss120250332	C/A	R175S	0,015
Exon 7	c.817*	ss120250333	G/A	A213 A	0,007
	<b>c.849</b>	<b>rs7435825</b>	<b>G/A</b>	<b>S224W</b>	<b>0,132</b>
	<b>c.928</b>	<b>rs1126616</b>	<b>C/T</b>	<b>A250A</b>	<b>0,147</b>
Exon 7	c.1002*	rs120250334	G/A	S275N	0,007
	<b>c.1080</b>	<b>rs4660</b>	<b>G/A</b>	<b>R301H</b>	<b>0,118</b>
Exon7 UTR	138	rs1126772	A/G	-	0,029
	294	rs9138	A/C	-	0,147
	405*	ss120250334	G/A	-	0,015
	498	rs41482345	A/T	-	0,119
3'-UTR	71	rs41472944	G/A	-	0,119

N: Nukleotid; AS: Aminosäure; UTR: untranslatierte Region; A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin; Abkürzung der AS nach internationaler Nomenklatur: A: Alanin, D: Aspartat, H: Histidin, N: Asparagin, R: Arginin. Positionsangaben beziehen sich auf die Position der Mutation in der Referenz-mRNA, bei intronischen Varianten auf den Abstand vom nächstgelegenen Exon, bei Varianten in der UTR von Exon 7 auf den Abstand zum translatierten Abschnitt von Exon 7 und bei der Variante in der 3'-UTR auf den Abstand vom gesamten Exon 7. Für die Genotypisierung ausgewählte SNPs sind fettgedruckt.

### 3.2.1. Auswahl der SNPs für die Genotypisierung

Um eine ausreichende statistische Power zu gewährleisten, wurden für die weiteren Untersuchungen initial nur SNPs ausgewählt, bei denen die Allelfrequenz der selteneren Variante mindestens 0,05 betrug (*minor allele frequency*, MAF). Um eine größere Auswahl an genetischen Varianten zu erhalten, wurden im Verlauf zwei weitere Polymorphismen, die jeweils eine MAF von 0,05 nur knapp nicht erreichten, in die Auswahl mit aufgenommen. Sie wurden bereits in verschiedenen Studien zu genetischen Assoziationen von Osteopontin mit Erkrankungsmanifestationen untersucht und wurden daher als relevant für die vorliegende Untersuchung eingeschätzt.

Für diese insgesamt 17 Polymorphismen wurden mit Hilfe der Software Haploview die paarweisen Kopplungsungleichgewichte (*linkage disequilibria*, LDs) errechnet, um auf eine mögliche gemeinsame Vererbung zu prüfen. Das LD zweier Polymorphismen wird als Quadrat des Korrelationsquotienten nach Pearson ( $r$ ) angegeben. Wenn  $r^2$  sich dem Wert 1 bzw. 100% nähert, ist davon auszugehen, dass die SNPs relativ nahe beieinander liegen und gemeinsam vererbt werden. Als Grenzwert für die Annahme einer gemeinsamen Vererbung wurde hier  $r^2 = 0,8$  gesetzt. Das folgende Schema in Abbildung 3.2. zeigt alle ermittelten paarweisen LD.



**Abbildung 3.2. LD der 17 ausgewählten Polymorphismen**

Die paarweisen LD für die untersuchten 17 SNPs sind als  $r^2$  dargestellt. Die farbige Unterlegung korreliert mit der Stärke der Assoziation. Darstellung mit der Haploview 4.1 Software.

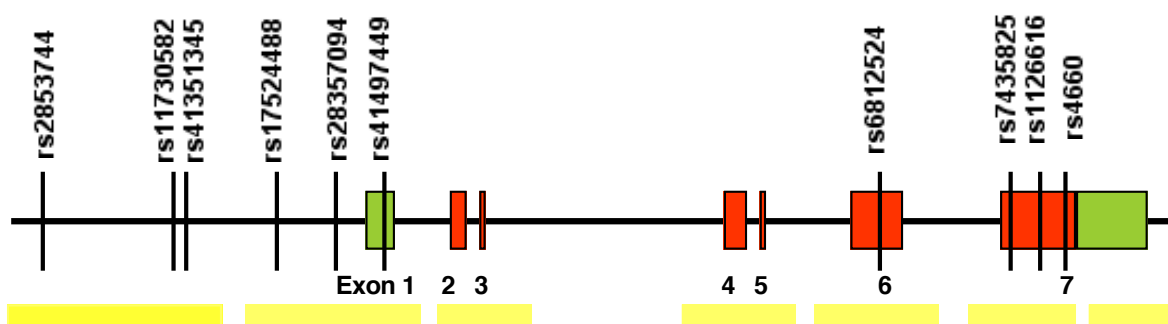
Es zeigte sich in der Haploview-Analyse, dass einige SNPs gemeinsam vererbt werden. Eine Genotypisierung aller Varianten ist daher nicht zwingend notwendig, da die genetische Information sich wiederholen würde. Die Analyse mit dem Programm Haploview ergab, dass durch die Genotypisierung von insgesamt 11 SNPs die Informationen aller 17 SNPs erfasst werden kann. Die SNPs rs1126616 - rs4754 - rs9138, rs17524488 - rs34295489 - rs2853749 und rs4660 - rs41482345 - rs41472944 fanden sich jeweils in einem Kopplungsgleichgewicht größer 0,8 und werden dementsprechend gemeinsam vererbt. Es wurde sich daher auf die Typisierung der Varianten rs1126616, rs17524488 und rs4660 beschränkt.

Die Variante rs6811536 wurde nachträglich aufgrund ihrer Lokalisation im Intron (Intron 5) aus der Auswahl ausgeschlossen. Die Variante rs41351345 wurde ebenfalls ausgeschlossen, da bisher keine Studie eine Assoziation dieser Variante mit Krankheitsbildern finden konnte. Es blieben neun SNPs in *SPP1* für die weitere Untersuchung durch Genotypisierung.

### 3.3. Genotypisierung der ausgewählten *SPP1*-Varianten

Für die Genotypisierung wurden anhand der Kriterien Häufigkeit der Mutation (MAF > 0,05), Lokalisation (Promotorregion, sieben Exons, 3'UTR) und unabhängige Vererbung der Varianten insgesamt neun Polymorphismen ausgewählt.

Diese wurden in den DNA-Proben der 4356 Studienteilnehmer mit der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Methode im LightTyper-Gerät analysiert. Die Ergebnisse wurden mit den Programmen STATA und Haploview untersucht.

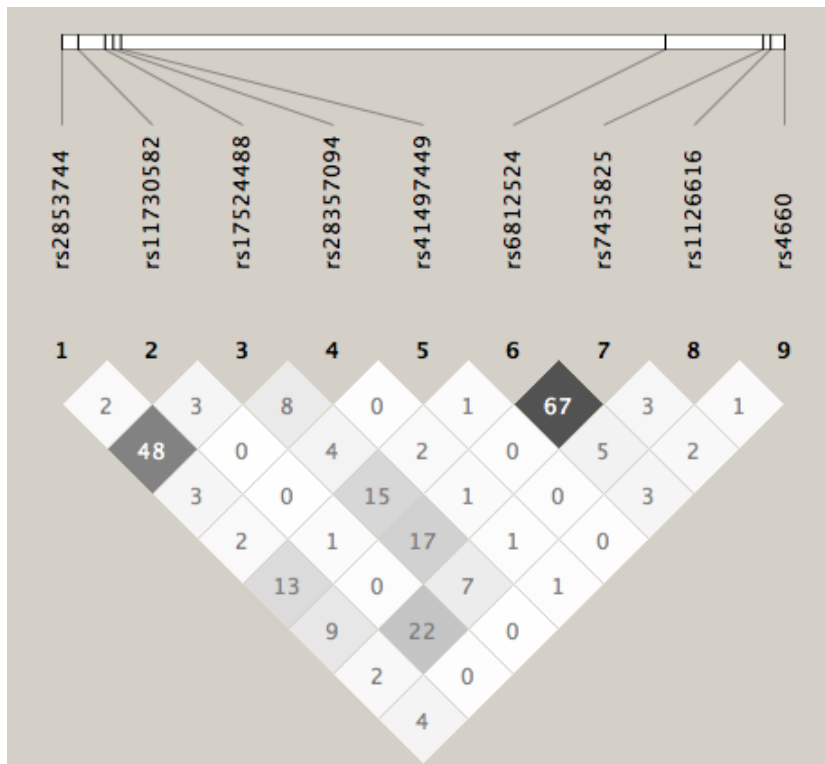


**Abbildung 3.3. Schematische Darstellung der für die Typisierung ausgewählten Varianten in *SPP1***

Die roten und grünen Kästen stellen die Exons dar, wobei die kodierenden Bereiche der Exons rot und die nicht-kodierenden exonischen Bereiche grün markiert sind. Die gelben Felder geben die sequenzierten Abschnitte wieder.

Um die Unabhängigkeit der typisierten Varianten zu bestätigen, wurden in dem gesamten Studienkollektiv mit Hilfe der Software Haploview erneut die paarweisen LDs zwischen

den einzelnen Varianten errechnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 3.4. dargestellt. Es zeigte sich, wie erwartet, ausschließlich ein hohes Kopplungsgleichgewicht von  $r^2 = 0,67$  zwischen den SNPs rs6812524 und rs7435825. Der gesetzte Grenzwert von  $r^2 > 0,8$  wird jedoch nicht erreicht. Von einer unabhängigen Vererbung ist also auszugehen.



**Abbildung 3.4. Paarweise LD der genotypisierten SPP1-Varianten**

Die paarweisen LD der genotypisierten SNPs sind als  $r^2$  dargestellt, die farbige Unterlegung korreliert mit der Stärke der Assoziation. Haploview 4.1 Software.

Im Folgenden werden die typisierten *SPP1*-Varianten beschrieben. Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden für alle untersuchten SNPs zuerst auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht getestet, um mögliche methodische Fehler (z.B. Genotypisierungsfehler) aufzudecken.

Weiterhin wurden für die neun getesteten Polymorphismen mittels der Software Haploview Berechnungen möglicher Haplotypen durchgeführt. Diese ergaben allerdings keine abweichenden Verteilungen zwischen Fällen und Kontrollen.

Für alle Varianten wurden Fall- und Kontrollgruppe mit der Odds Ratio (OR) in Bezug auf die unterschiedlichen Phänotypen verglichen. Durch multivariate logistische Regression und ordinal logistische Regression wurde die Berechnung der Odds Ratio für eventuelle Einflussfaktoren korrigiert. Da Effekte möglicherweise nur in einzelnen Subpopulationen sichtbar werden, wurden Stratifizierungen nach Geschlecht, Ethnie und mykobakteriellen Genotypen durchgeführt. Um den verschiedenen Vererbungsmodellen gerecht zu werden,

wurden neben dem additiven auch dominante und rezessive Vererbungsmodelle berechnet. Dabei ergaben sich jedoch keine abweichenden Ergebnisse.

In der folgenden Auflistung der Ergebnisse werden neben den grundlegenden Informationen über die Mutation nur auffällige Zusammenhänge dargestellt. Der p-Wert wird im Folgenden unkorrigiert als nominaler p-Wert ( $p_{\text{nom.}}$ ) und nach Bonferroni-Korrektur als korrigierter p-Wert ( $p_{\text{korrr.}}$ ) bezeichnet.

### 3.3.1. Variante rs2853744

Dieser Einzelnukleotidaustausch liegt im Promotorbereich, 554 Basenpaare vom Transkriptionsstartpunkt des ersten Exons entfernt. Die Referenzbase Guanin (G) wird dabei durch Thymin (T) ersetzt. In unserem Studienkollektiv konnte insgesamt für 2001 Fälle und 2334 Kontrollen der Genotyp bestimmt werden. 17 Proben konnten aufgrund von nicht differenzierbaren Schmelzkurven nicht eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden. Die Heterozygotenhäufigkeit betrug in der Gesamtpopulation 43,5%.

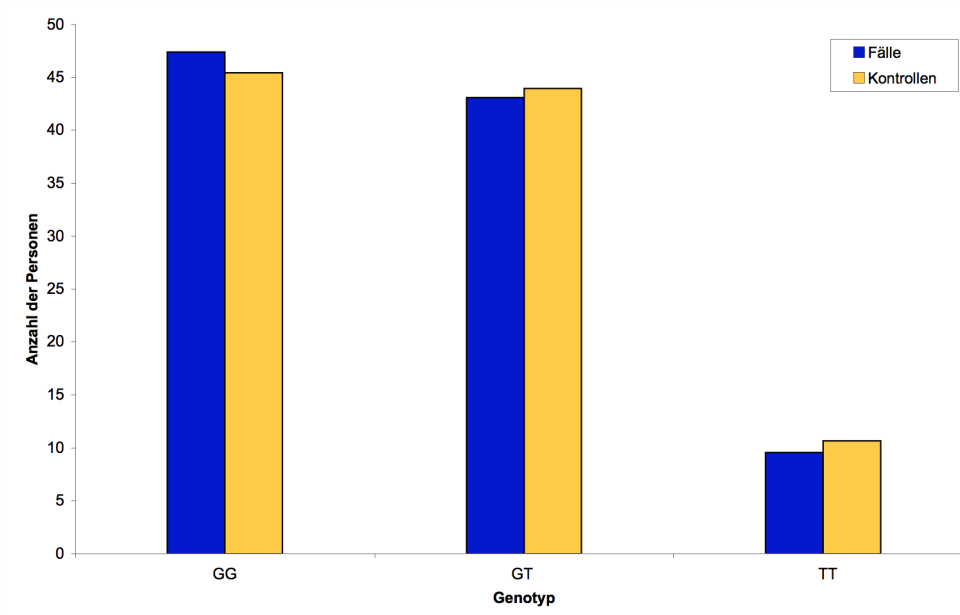
**Tabelle 3.7. Verteilung der Variante rs2853744**

Phänotyp	P (HWG)	GG (%)	GT (%)	TT (%)	Gesamt	
Erkrankung	Gesamt	2010 (46,3)	1889 (43,5)	440 (10,1)	4339	
	Fälle	0,81	948 (47,4)	862 (43,1)	191 (9,6)	2001
	Kontrollen	0,98	1062 (45,4)	1027 (43,9)	249 (10,7)	2338
Radiol. Infiltrate	Gesamt	894 (47,1)	824 (43,4)	182 (9,6)	1900	
	0	10 (52,6)	8 (42,1)	1 (5,3)	19	
	1	170 (44,1)	182 (47,2)	34 (8,8)	386	
	2	530 (47,2)	478 (42,6)	114 (10,2)	1122	
	3	184 (49,3)	156 (41,8)	33 (8,9)	373	
PPD-Test	positiv	1006 (45,5)	969 (43,8)	237 (10,7)	2212	
	Negativ	56 (44,4)	58 (46,0)	12 (9,5)	126	

Numerische Verteilung von Fällen und Kontrollen für die jeweiligen Phänotypen. Die prozentuale Verteilung wurde zusätzlich in Klammern aufgeführt. In der dritten Spalte findet sich das nur für den Phänotyp Erkrankung berechnete Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Abbildung 3.5. stellt graphisch die Häufigkeiten der Genotypen bei Fällen und Kontrollen dar. Im weiteren Verlauf wird auf diese Darstellung für alle nicht-signifikanten Ergebnisse verzichtet, da sich daraus keine neuen Erkenntnisse ergeben.





**Abbildung 3.5. Verteilung der Variante rs2853744 in der Fall- und Kontrollgruppe**

Die y-Achse beschreibt die Anzahl der Individuen bei Fällen und Kontrollen, auf der x-Achse sind die drei möglichen Genotypen aufgeführt.

### 3.3.2. Variante rs11730582

Diese Variante liegt im Promotorbereich, 381 Basenpaare von dem Beginn von Exon 1 entfernt. Die Base Thymin wird durch Cytosin ersetzt. Die Heterozygotenhäufigkeit betrug in der Gesamtpopulation 7,9%.

**Tabelle 3.8. Variante rs11730582**

Phänotyp		p (HWG)	TT	CT	CC	Gesamt
Erkrankung	Gesamt	0,65	3995 (91,9)	344 (7,9)	9 (0,2)	4348
	Fälle	0,21	1840 (91,7)	162 (8,1)	4 (0,2)	2006
	Kontrollen	0,09	2155 (92,0)	182 (7,8)	5 (0,2)	2342
Radiol. Infiltrate	Gesamt		1741 (91,4)	159 (8,4)	4 (0,2)	1904
	0		17 (89,5)	2 (10,5)	0 (0,0)	19
	1		351 (91,2)	34 (8,8)	0 (0,0)	385
	2		1024 (91,0)	98 (8,7)	3 (0,3)	1125
	3		349 (93,1)	25 (6,7)	1 (0,3)	375
PPD-Test	Positiv		2034 (91,8)	177 (8,0)	4 (0,2)	2215
	Negativ		121 (95,3)	5 (3,9)	1 (0,8)	127

Nummerische Verteilung von Fällen und Kontrollen für die jeweiligen Phänotypen. Die prozentuale Verteilung wurde zusätzlich in Klammern aufgeführt. In der dritten Spalte findet sich das nur für den Phänotyp Erkrankung berechnete Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Für diese Variante zeigt sich eine stark differierende Verteilung der Genotypen zwischen Frauen und Männern in Bezug auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit. So findet sich bei der logistischen Regression für Frauen ein annähernd signifikanter p-Wert für einen Zusammenhang der TT-Variante mit einem selteneren Auftreten von Tuberkulose (OR 0,69,  $p_{\text{nom.}}=0,06$ ).

### 3.3.3. Variante rs17524488

Der Austausch liegt im Promotorbereich, 154 Basenpaare von dem Beginn des Exon 1 entfernt. Es handelt sich um eine Insertion von G. Ein Basenpaar weiter in Richtung des 3'-Endes findet sich eine weitere bei NCBI registrierte Insertion von G (rs11439060). Auch ein Austausch von G zu T, ein Basenpaar weiter in Richtung des 5'-Endes, ist dokumentiert (rs3841116). Es ist anzunehmen, dass es sich bei allen beschriebenen Varianten um die gleiche Mutation handelt, da jeweils ein Guanin vor oder nach einem weiteren Guanin eingefügt wird.

Bei Typisierung mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse wird die Insertion durch die Strangverschiebung durch einen Austausch der komplementären Base von T zum eingefügten G registriert. Ein möglicherweise tatsächlicher Austausch von T zu G kann nicht differenziert werden. Insgesamt konnte für 4 Patienten und 6 Kontrollen kein eindeutiger Genotyp bestimmt werden.

**Tabelle 3.9. Variante rs17524488**

Phänotyp		p (HWG)	GG (ins)	GT	TT (WT)	Gesamt
Erkrankung	Gesamt	0,950	1020 (23,5)	2161 (49,7)	1165 (26,8)	4346
	Fälle	0,959	450 (22,4)	999 (49,8)	557 (27,8)	2006
	Kontrollen	0,750	570 (24,4)	1162 (49,7)	608 (26,0)	2340
Radiol. Infiltrate	Gesamt		452 (27,9)	791 (48,9)	375 (23,2)	1618
	0		7 (43,8)	9 (56,3)	0 (0,0)	16
	1		74 (23,9)	171 (55,2)	65 (21,0)	310
	2		270 (28,0)	465 (48,3)	228 (23,7)	963
	3		101 (30,7)	146 (44,9)	82 (24,9)	329
PPD-Test	Positiv		513 (25,7)	1000 (50,0)	487 (24,4)	2000
	Negativ		26 (31,3)	35 (42,17)	22 (26,5)	83

Numerische Verteilung von Fällen und Kontrollen für die jeweiligen Phänotypen. Die prozentuale Verteilung wurde zusätzlich in Klammern aufgeführt. In der dritten Spalte findet sich das nur für den Phänotyp Erkrankung berechnete Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

### 3.3.4. Variante rs28357094

Die Variante findet sich fünf Basenpaare vom Transkriptionsstartpunkt entfernt im Promotorbereich. Die Mutation führt zu einem Austausch von Thymin (T) zu Guanin (G). Aufgrund von uneindeutiger Zuordnung zu Genotypen konnten vier Fälle und zwei Kontrollen nicht identifiziert werden. Die Heterozygotenhäufigkeit in der hier untersuchten Studienpopulation beträgt 13,5%.

**Tabelle 3.10. Verteilung der Variante rs28357094**

Phänotyp		p (HWG)	TT (%)	GT (%)	GG (%)	Gesamt
Erkrankung	Gesamt	0,880	3739 (86,0)	589 (13,5)	22 (0,51)	4350
	Fälle	0,117	1718 (85,6)	282 (14,1)	6 (0,3)	2006
	Kontrollen	0,249	2021 (86,2)	307 (13,1)	16 (0,68)	2344
Radiol. Infiltrate	Gesamt		1633 (85,7)	265 (13,9)	6 (0,3)	1904
	0		17 (89,5)	2 (10,5)	0 (0,0)	19
	1		331 (86,0)	52 (13,5)	2 (0,5)	385
	2		964 (85,5)	160 (14,2)	3 (0,3)	1127
	3		321 (86,1)	51 (13,7)	1 (0,3)	373
PPD-Test	Positiv		1914(86,3)	287 (13,0)	16 (0,7)	2217
	Negativ		107 (84,3)	20 (15,8)	0 (0,0)	127

Nummerische Verteilung von Fällen und Kontrollen für die jeweiligen Phänotypen. Die prozentuale Verteilung wurde zusätzlich in Klammern aufgeführt. In der dritten Spalte findet sich das nur für den Phänotyp Erkrankung berechnete Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

### 3.3.5. Variante rs41497449

Die Variante findet sich an Position 79 in Exon 1. Exon 1 wird nicht translatiert. Die Referenzvariante Guanin (G) wird durch Adenin (A) ersetzt.

Es zeigte sich ein leicht abweichendes HWG in der Gesamtpopulation, welches allerdings nur in den Kontrollen, nicht aber in den Fällen, tatsächlich vorhanden war. Die Stratifizierung für die einzelnen Ethnien zeigt, dass innerhalb der einzelnen Gruppen das HWG jeweils erfüllt ist. Es handelt sich daher höchstwahrscheinlich um ein Artefakt durch die Durchmischung verschiedener Subpopulationen.

**Tabelle 3.11. Verteilung der Variante rs41497449**

Phänotyp		HWG	GG (%)	AG (%)	AA (%)	Gesamt
Erkrankung	Gesamt	0,02	3967 (91,7)	365 (8,4)	15 (0,4)	4347
	Fälle	0,56	1833 (91,4)	167 (8,3)	5 (0,3)	2005
	Kontrollen	0,0071	2134 (91,1)	198 (8,5)	10 (0,4)	2342
Radiol. Infiltrate	Gesamt		1741 (91,5)	156 (8,2)	5 (0,3)	1902
	0		16 (84,2)	3 (15,8)	0 (0,0)	19
	1		359 (93,3)	26 (6,8)	0 (0,0)	385
	2		1,025 (91,3)	96 (8,6)	2 (0,2)	1123
	3		341 (90,9)	31 (8,3)	3 (0,8)	375
PPD-Test	Positiv		2021 (91,2)	185 (8,3)	9 (0,4)	2215
	Negativ		113 (89,0)	13 (10,2)	1 (0,8)	127

Numerische Verteilung von Fällen und Kontrollen für die jeweiligen Phänotypen. Die prozentuale Verteilung wurde zusätzlich in Klammern aufgeführt. In der dritten Spalte findet sich das nur für den Phänotyp Erkrankung berechnete Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

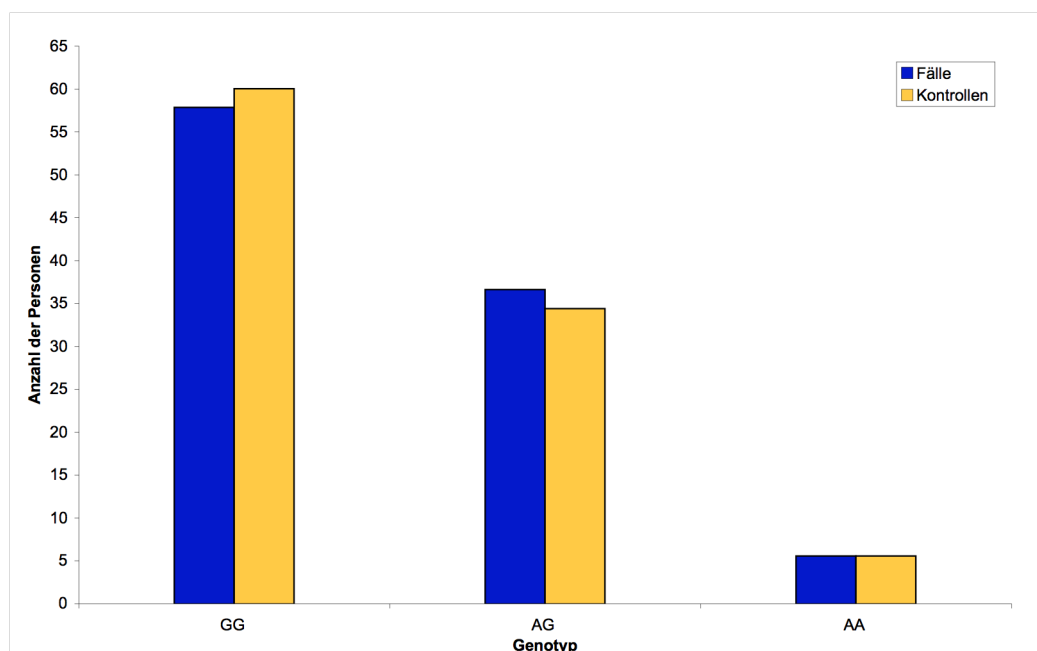
### 3.3.6. Variante rs6812524

Diese Mutation ist an Position 493 in Exon 6 gelegen. Der Austausch der Base Guanin (G) zu Adenin (A) führt zu einem synonymen Aminosäureaustausch, bei dem die Aminosäure Serin bestehen bleibt. Aufgrund von uneindeutigen Ergebnissen konnte 6 Fällen und 14 Kontrollen kein eindeutiger Genotyp zugeordnet werden.

**Tabelle 3.12. Verteilung der Variante rs6812524**

Phänotyp		p(HWG)	GG (%)	AG (%)	AA (%)	Gesamt
Erkrankung	Gesamt	0,6127	2559 (59,0)	1536 (35,4)	241 (5,6)	4336
	Fälle	0,7109	1159 (57,8)	734 (36,6)	111 (5,5)	2004
	Kontrollen	0,2844	1400 (60,0)	802 (34,4)	130 (5,6)	2332
Radiol. Infiltrate	Gesamt		1107 (58,3)	694 (36,5)	99 (5,2)	1900
	0		10 (52,6)	7 (36,8)	2 (10,5)	19
	1		244 (63,71)	126 (32,9)	13 (3,4)	383
	2		646 (57,3)	413 (36,7)	68 (6,0)	1127
	3		207 (55,8)	148 (39,9)	16 (4,3)	371
PPD-Test	Positiv		1319 (59,8)	761 (34,5)	125 (5,7)	2205
	Negativ		81 (63,8)	41 (32,3)	5 (3,9)	127

Numerische Verteilung von Fällen und Kontrollen für die jeweiligen Phänotypen. Die prozentuale Verteilung wurde zusätzlich in Klammern aufgeführt. In der dritten Spalte findet sich das nur für den Phänotyp Erkrankung berechnete Hardy-Weinberg-Gleichgewicht



**Abbildung 3.6. Variante rs6812524**

Verteilung der möglichen Genotypen GG, AG und AA der Variante rs6812524 in *SPP1* bei Fällen und Kontrollen.

Für die Ethnie der Ewe zeigt sich ein leicht signifikanter p-Wert, der aber der erforderlichen Bonferroni-Korrektur nicht standhält.

**Tabelle 3.13. Logistische Regression für Ethnie der Ewe**

Genotyp	Fälle (%)	Kontrollen (%)	OR (95% CI)	p <sub>nom.</sub>	p <sub>korr.</sub>
GG	69 (49,29)	145 (66,51)	1		
AG	62 (44,29)	63 (28,90)	0,50 (0,32-0,79)	<b>0,003</b>	0,108
AA	9 (6,43)	10 (4,59)	0,52 (0,20-1,35)	0,181	n.s.

Numerische und prozentuale Verteilung von erkrankten Personen und gesunden Kontrollen über die drei möglichen Genotypen. Die Odds Ratio (OR) ist mit zugehörigem Konfidenzintervall (*confidence interval*, CI) angegeben. Die letzten beiden Spalten führen den nominalen (p<sub>nom.</sub>) und den nach Bonferroni korrigierten (p<sub>korr.</sub>) p-Wert auf. Die Korrektur wurde mit den Faktoren 9 für die Anzahl der getesteten SNPs und 4 für die Anzahl der unterschiedlichen Ethnien durchgeführt.

In der logistischen Regression zeigt sich in der mit *M. tuberculosis* infizierten Subgruppe der Fallpopulation ein Trend für eine Assoziation mit einer erniedrigten Erkrankungswahrscheinlichkeit (p=0,02), welcher aber nach Bonferroni-Korrektur nicht signifikant bleibt. Es ist anzunehmen, dass der auffällige p-Wert allein durch den mykobakteriellen Genotyp TB1 hervorgerufen wird, da für den Genotyp TB2 keine Assoziation besteht.

**Tabelle 3.14. Logistische Regression der Variante rs6812524 zwischen Fällen und Kontrollen**

	GT	Fälle (%)	Kontrollen (%)	OR (95% CI)	P <sub>nom.</sub>	P <sub>korr.</sub>
<i>M. tuberculosis</i>	GG	605 (56,02)	-	1		
	AG	415 (38,43)	-	0,84 (0,72-0,97)	0,02	n.s.
	AA	60 (5,56)	-	0,94 (0,68-1,29)	0,687	n.s.
EUAM	GG	583 (56,27)	-	1		
	AG	396 (38,22)	-	0,84 (0,72-0,98)	<b>0,031</b>	
	AA	57 (5,5)	-	0,95 (0,69-1,32)	0,757	
TB1	GG	64 (46,38)	1400 (60,03)	1		
	AG	68 (49,28)	802 (34,39)	0,55 (0,39- 0,79)	<b>0,00097</b>	0,058
	AA	6 (4,35)	130 (5,57)	1,03 (0,44- 2,42)	0,948	n.s.

Die Regression beinhaltet eine Stratifizierung nach Alter, Geschlecht und Ethnie, diese nimmt nur geringen Einfluss auf die p-Werte. GT: Genotyp.

**Tabelle 3.15. Logistische Regression der Variante rs6812524 in Bezug auf die Untergruppen der mykobakteriellen Genotypen**

	GT	Fälle (%)	Kontrollen (%)	OR (95% CI)	P <sub>nom.</sub>	P <sub>korr.</sub>
Stamm 1 (751 Fälle)	GG	421 (56,1)	-	1		
	AG	287 (38,2)	-	0,84 (0,71-1,00)	0,049	n.s.
	AA	43 (5,7)	-	0,91 (0,63-1,31)	0,61	n.s.
Stämme RD100 (266 Fälle)	GG	136 (50,8)	-	1		
	AG	114 (42,5)	-	0,68 (0,53-0,89)	0,005	
	AA	16 (6,0)	-	0,79 (0,46-1,37)	0,40	
TB1 (Ghana) (138 Fälle)	GG	64 (46,4)	1400 (60,0)	1		
	AG	68 (49,3)	802 (34,4)	0,55 (0,39- 0,79)	0,00097	0,044
	AA	6 (4,4)	130 (5,6)	1,03 (0,44- 2,42)	0,948	n.s.

Die Korrektur für den Genotyp TB1 wurde mit den Faktoren 9 für die Anzahl der getesteten SNPs und 5 für die Anzahl der mykobakteriellen Genotypen durchgeführt. Die Verteilungen der Genotypen in den Gruppen Stamm1, Stämme RD100 und TB1 werden jeweils mit der Gesamtzahl der gesunden Kontrollen (vierte Spalte) verglichen. Diese ist nur im Abschnitt TB1 detailliert aufgeführt. GT: Genotyp.

### 3.3.7. Variante rs7435825

Dieser SNP liegt in Exon 7 und führt durch Austausch von Guanin (G) zu Adenin (A) zum Austausch der Aminosäure Serin (S) zu Asparagin (N). Insgesamt konnten sechs Proben nicht genotypisiert werden (3 Fälle und 3 Kontrollen).

Tabelle 3.16. Verteilung der Variante rs7435825

Phänotyp		HWG	GG (%)	AG (%)	AA (%)	Gesamt
Erkrankung	Gesamt		2991 (68,8)	1241 (28,5)	118 (2,7)	4350
	Fälle	0,48	1356 (67,6)	593 (29,6)	58 (2,9)	2007
	Kontrollen	0,66	1635 (69,8)	648 (27,7)	60 (2,6)	2343
Radiol. Infiltrate	Gesamt		1298 (68,1)	557 (29,2)	50 (2,6)	1905
	0		12 (63,2)	6 (31,6)	1 (5,3)	19
	1		271 (70,2)	108 (28,0)	7 (1,81)	386
	2		762 (67,7)	329 (29,2)	34 (3,0)	1125
	3		253 (67,5)	114 (30,4)	8 (2,13)	375
PPD-Test	Positiv		1545 (69,7)	614 (27,7)	57 (2,6)	2216
	Negativ		90 (70,9)	34 (26,8)	3 (2,4)	127

Numerische Verteilung von Fällen und Kontrollen für die jeweiligen Phänotypen. Die prozentuale Verteilung wurde zusätzlich in Klammern aufgeführt. In der dritten Spalte findet sich das nur für den Phänotyp Erkrankung berechnete Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Stratifizierung nach Ethnien zeigt für die Gruppe der Ewe eine Assoziation mit einer verminderten Erkrankungswahrscheinlichkeit bei der heterozygoten Variante. Nach Korrektur ist diese jedoch nicht signifikant.

Tabelle 3.17. Logistische Regression für die Ethnie der Ewe

Genotyp	Fälle (%)	Kontrollen (%)	OR (95% CI)	p <sub>nom.</sub>	p <sub>korr.</sub>
GG	87 (61,27)	163 (74,43)	1		
AG	53 (37,32)	52 (23,74)	0,48 (0,31-0,76)	<b>0,002</b>	0,072
AA	2 (1,41)	4 (1,83)	0,53 (0,21-1,36)	0,941	n.s.

Die Korrektur wurde mit den Faktoren 9 für die Anzahl der getesteten SNPs und 4 für die Anzahl der unterschiedlichen Ethnien durchgeführt.

Auch die logistische Regression der einzelnen mykobakteriellen Genotypen zeigt auffällige Ergebnisse. In der Gruppe der mit dem Genotyp TB 1 infizierten Erkrankten zeigt sich eine Assoziation der heterozygoten Variante mit einer verminderten Empfänglichkeit für Lungentuberkulose. Diese hält aber der Bonferroni-Korrektur nicht stand.

Tabelle 3.18. Logistische Regression der diversen Genotypen

		Fälle (%)	Kontrollen (%)	OR (95% CI)	p <sub>nom.</sub>	p <sub>korrr.</sub>
<i>M. tuberculosis</i>	GG	-	-	1		
	AG	-	-	0,85 (0,73-1,00)	0,044	
	AA	-	-	0,89 (0,56-1,37)	0,0569	
EUAM	GG	689 (66,31)	-	1		
	AG	322 (30,99)	-	0,85 (0,72-1,00)	<b>0,044</b>	n.s.
	AA	28 (2,69)	-	0,90 (0,57-1,43)	0,662	n.s.
TB 1	GG	84 (61,31)	1.635 (69,78)	1		
	AG	50 (36,50)	648 (27,66)	0,67 (0,46-0,96)	<b>0,028</b>	1,26
	AA	3 (2,19)	60 (2,56)	1,03 (0,32-3,34)	0,964	n.s.

Die Korrektur für den Genotyp TB1 wurde mit den Faktoren 9 für die Anzahl der getesteten SNPs und 5 für die Anzahl der mykobakteriellen Genotypen durchgeführt. Die Werte beinhalten keine Korrektur auf Geschlecht, Ethnie oder Alter.

### 3.3.8. Variante rs1126616

Diese Variante liegt in Exon 7 an Position 928. Die Mutation von Cytosin (C) zu Thymin (T) führt zu einem synonymen Aminosäureaustausch der Aminosäure Alanin (A). Bei der Auswertung der Genotypisierung konnten 10 Fälle und 14 Kontrollen nicht eindeutig einem Genotyp zugordnet werden. Die Heterozygotenhäufigkeit in der Studienpopulation beträgt 24,3%.

Tabelle 3.19. Verteilung der Variante rs1126616

Phänotyp		HWG	CC (%)	CT (%)	TT (%)	Gesamt
Erkrankung	Gesamt		3193 (73,7)	1052 (24,3)	87 (2,0)	4332
	Fälle	0,65	1451 (72,6)	502 (25,1)	47 (2,4)	2000
	Kontrollen	0,65	1742 (74,7)	550 (23,6)	40 (1,7)	2332
Radiol. Infiltrate	Gesamt		1360 (71,7)	489 (25,8)	47 (2,5)	1896
	0		15 (79,0)	3 (15,8)	1 (5,3)	19
	1		259 (67,5)	118 (30,7)	7 (1,8)	384
	2		809 (72,2)	286 (25,5)	25 (2,2)	1120
	3		277 (74,3)	82 (22,0)	14 (3,8)	373
PPD-Test	Positiv		1639 (74,3)	529 (24,0)	37 (1,7)	2205
	Negativ		103 (81,1)	21 (16,5)	3 (2,4)	127

Numerische Verteilung von Fällen und Kontrollen für die jeweiligen Phänotypen. Die prozentuale Verteilung wurde zusätzlich in Klammern aufgeführt. In der dritten Spalte findet sich das nur für den Phänotyp Erkrankung berechnete Hardy-Weinberg-Gleichgewicht



Diese Variante zeigt eine stark differierende Verteilung der Genotypen zwischen Frauen und Männern in Bezug auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit. So findet sich bei der logistischen Regression für die Frauen ein annähernd signifikanter p-Wert für einen Zusammenhang der CC-Variante (Wildtyp) mit einem selteneren Auftreten von Tuberkulose (OR 0,8,  $p_{\text{nom.}}=0,057$ ).

### 3.3.9. Variante rs4660

Diese Variante führt durch eine Mutation von Guanin (G) zu Adenosin (A) an Position 1080 in Exon 7 zu einem Aminosäureaustausch von Arginin (R) zu Histidin (H). Aufgrund von uneindeutiger Genotypisierung konnten 54 Fälle und 73 Kontrollen nicht analysiert werden.

**Tabelle 3.20. Verteilung der Variante rs4660**

Phänotyp		HWG	GG (%)	AG (%)	AA (%)	Gesamt
Erkrankung	Gesamt		3337 (79,1)	827 (19,6)	56 (1,3)	4220
	Fälle	0,98	1544 (79,1)	384 (19,7)	24 (1,2)	1952
	Kontrollen	0,44	1793 (79,1)	443 (19,5)	32 (1,4)	2268
Radiol. Infiltrate	Gesamt		1460 (78,8)	369 (19,9)	25 (1,4)	1854
	0		15 (83,3)	3 (16,7)	0 (0,0)	18
	1		290 (77,1)	78 (20,7)	8 (2,1)	376
	2		876 (79,6)	212 (19,3)	13 (1,2)	1101
	3		279 (77,7)	76 (21,2)	4 (1,1)	359
PPD-Test	Positiv		1695 (79,0)	420 (19,6)	30 (1,4)	2145
	Negativ		98 (79,7)	23 (18,7)	2 (1,6)	123

Nummerische Verteilung von Fällen und Kontrollen für die jeweiligen Phänotypen. Die prozentuale Verteilung wurde zusätzlich in Klammern aufgeführt. In der dritten Spalte findet sich das nur für den Phänotyp Erkrankung berechnete Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

## 4. DISKUSSION

Im Folgenden sollen zunächst die Gründe der Auswahl von Osteopontin für eine Assoziationsanalyse mit dem Risiko für die Erkrankung an Tuberkulose erläutert werden. Weiterhin sollen die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen in die aktuelle wissenschaftliche Debatte eingeordnet werden.

### 4.1. Osteopontin und Immunität gegenüber Mykobakterien

Die Infektion mit Mykobakterien des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes (MTBK) führt in etwa 5-10% der Fälle zu einer manifesten Tuberkulose (WHO, 2008). In den meisten Fällen verhindern angeborene und erworbene Abwehrmechanismen des humanen Wirtsorganismus die Vermehrung und Ausbreitung der Erreger. Die Etablierung einer spezifischen Immunantwort hat für die Kontrolle der Infektion eine entscheidende Bedeutung. Ein zentraler Schritt der immunologischen Abwehr der Mykobakterien ist die initiale Produktion von Interleukin (IL)-12 durch infizierte Makrophagen (North *et al.*, 2004). Dieses Zytokin führt zur Akkumulation von Entzündungszellen am Ort der Infektion und zur Differenzierung von T-Lymphozyten zu spezifischen, für die Abwehr intrazellulärer Pathogene ausgebildeten Th1-Zellen. Diese spezialisierten Zellen sezernieren Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und andere Zytokine, die die Ausbreitung der Erreger verhindern und zur Bildung von Granulomen führen. Eine solche Weichenstellung in Richtung einer Th1-Antwort ist für die effiziente Kontrolle der Mykobakterien unerlässlich. Wichtige Schritte der Regulation dieser entscheidenden Aufgabe sind nicht vollständig aufgeklärt.

Osteopontin (OPN) beeinflusst Inflammation, Gewebsregeneration und Apoptose (Denhardt *et al.*, 1993; Denhardt *et al.*, 2001; Scatena *et al.*, 2007). Als chemotaktischer Faktor wirkt es auf T-Zellen, Makrophagen und Neutrophile und beeinflusst die Funktion und Differenzierung dieser Zellen (Denhardt *et al.*, 2001; Koh *et al.*, 2007; Nystrom *et al.*, 2007). Vieles deutet darauf hin, dass OPN die Th1-Antwort beeinflusst. In murinen Makrophagen induziert es über die Interaktion mit Integrin  $\alpha\beta 3$  die Produktion von IL-12, das die Immunantwort in Richtung einer Th1-Antwort lenkt, und inhibiert über den CD44-Rezeptor die Produktion des Th1-supprimierenden Zytokins IL-10 (Ashkar *et al.*, 2000). Auch humanes OPN aus mononukleären Zellen kann die T-Zell-abhängige IL-12-Produktion fördern (O'Regan *et al.*, 2000). Ergebnisse aus *in vivo* Studien unterstützen die Rolle von OPN in der Th1-Antwort. In verschiedenen Th1-Modellen, wie z.B. experimenteller Autoimmun-Enzephalitis, Injektion von Polyvinylpyrrolidon (PVP) und der Infektion mit Herpes simplex Virus-1 (HSV1), fanden sich bei OPN-defizienten Mäusen verminderte IL-12- und IFN $\gamma$ -Spiegel und erhöhte IL-10-Spiegel im Vergleich zu OPN-kompetenten Mäusen (Ashkar *et al.*, 2000; Chabas *et al.*, 2001). Auch bei granulomatösen Entzündun-

gen spielt OPN eine Rolle. Bei OPN-defizienten Mäusen induzierten *Schistosoma mansoni*-Eier wesentlich kleinere Granulome mit weniger OPN-haltigen Makrophagen im Vergleich zu OPN-kompetenten Mäusen (O'Regan *et al.*, 2001). Bei der Abwehr mykobakterieller Infektionen scheint OPN wichtige Funktionen zu erfüllen. Nach Infektion mit Erregern des MTBK produzieren Makrophagen verstärkt OPN (Nau *et al.*, 1997; Khajooee *et al.*, 2006). Ein Vergleich der Gen-Expression humaner Makrophagen nach Infektion mit *M. bovis* BCG zeigte, dass besonders solche Makrophagen, die eine Resistenz gegen mykobakterielle Infektionen aufweisen, OPN produzieren, nicht aber sensible (Khajooee *et al.*, 2006). *In vivo* zeigte sich bei OPN-defizienten Mäusen eine eingeschränkte Immunabwehr nach einer Infektion mit *M. bovis* BCG sowie eine starke Granulombildung (Nau *et al.*, 1999). Bei Patienten mit MSMD (*mendelian susceptibility to mycobacterial diseases*)-Immundefizienz und disseminierter Infektion mit *M. bovis* korrelierte die Produktion von OPN umgekehrt mit der Schwere der Erkrankung und mit Tod (Nau *et al.*, 2000). Auch Tuberkulosepatienten zeigten signifikant erhöhte OPN-Spiegel im Plasma, die mit der Schwere der Erkrankung korrelierten (Koguchi *et al.*, 2003; Inomata *et al.*, 2005).

In Zusammenschau dieser Befunde ergab sich notwendigerweise die Auswahl von *SPP1*, dem für OPN kodierenden Gen, als Kandidatengen für eine Assoziationsstudie in dem vorhandenen Studienkollektiv von ghanaischen Tuberkulose-Patienten und gesunden Kontrollpersonen.

Die *SPP1*-Varianten für die Genotypisierung wurden auf der Basis verschiedener Kriterien ausgesucht. Prinzipielle Kriterien waren die Häufigkeit der Einzelnukleotidaustausche (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) in der Re-Sequenzierung, die im Rahmen dieser Untersuchung durchgeführt wurde sowie eine Lokalisation im Promotorbereich, den Exons oder der untranslatierten Region des 3'-Endes (3'-UTR). Für Varianten in der Promotorregion wurde zusätzlich als Entscheidungskriterium mit einbezogen, ob für diese Varianten bereits in der Literatur Assoziationen mit anderen Erkrankungen beschrieben worden waren.

Neben der Empfänglichkeit für eine Lungentuberkulose wurden auch andere phänotypische Merkmale der Erkrankung, radiologische Befunde und Reaktivität im PPD-Test auf Assoziationen mit *SPP1*-Polymorphismen untersucht (siehe 4.2.2 und 4.2.3).

## **4.2. Assoziation von Polymorphismen des *SPP1*-Gens mit der Empfänglichkeit für Lungentuberkulose**

1949 wurde erstmals die Theorie geäußert, dass Infektionskrankheiten entscheidend zu natürlicher Selektion beitragen (Haldane, 1949). Krankheiten, die die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen, üben einen Selektionsdruck auf den Genpool einer Population aus.

Genetische Polymorphismen, die vor einer solchen Erkrankung schützen und damit das Überleben der Art sichern, werden bevorzugt weitervererbt (positive Selektion). Die Verbreitung von Infektionskrankheiten kann somit das Auftreten von solchen schützenden genetischen Varianten beeinflussen (Hill, 1998).

Diese Theorie wurde erstmals anhand des Zusammenhangs der genetisch bedingten Thalassämien mit der Empfänglichkeit für Malaria beschrieben (Haldane, 1949). Homozygotie einer der verursachenden genetischen Varianten führt bei Mutationsträgern zu schweren Erkrankungen und Tod meist vor dem Reproduktionsalter. Es wäre daher zu erwarten, dass die Mutationen im Laufe der Zeit aus einer Population verloren gehen. Die genetische Variante führt jedoch durch ein verändertes Verhalten der Erythrozyten zu einem erschwerten Überleben der Malariaerreger in den Blutzellen. Die Mutationsträger sind daher vor schwerer Malaria tropica geschützt. Heterozygote Mutationsträger haben zwar leichte klinische Symptome der Anämie, aber gleichzeitig einen Überlebensvorteil gegenüber Individuen, die nicht diesen genetischen Schutz vor Malaria tropica haben. Die Mutation tritt besonders in Regionen auf, in denen Malaria tropica endemisch ist oder war (Wong *et al.*, 1986; Serjeant, 1994).

Für eine Selektion von Genvarianten, die einen relativen Schutz vor Infektionskrankheiten vermitteln, müssen gewisse Voraussetzungen erfüllt sein. Es muss eine dauerhafte Erregerexposition in der Population bestehen und die Erkrankung muss mit einer hohen Mortalitätsrate einhergehen (Stead, 1997), da schützende Varianten erst nach mehreren Generationen ihre Frequenz in einer gegebenen Population erhöhen (Dean *et al.*, 2002).

Bei Tuberkulose handelt es sich, so wie bei der Malaria, um eine komplexe (polygene) Erkrankung. Im Gegensatz zu monogenen Erkrankungen existiert nicht ein einzelnes Gen, welches die Entstehung der Krankheit bedingt. An der Ätiologie der Tuberkulose wie auch der Malaria ist offenbar eine Vielzahl von Genen beteiligt. Solche komplexen genetischen Erkrankungen, deren Vererbungsmuster nicht allein durch die Mendelschen Gesetze erklärbar sind, kommen in der Allgemeinbevölkerung häufig vor. Klassische Beispiele sind Adipositas, Diabetes mellitus, Mammakarzinom, Morbus Crohn und Schizophrenie.

In Assoziationsstudien sind die genetischen Grundlagen solcher Erkrankungen immer schwer zu identifizieren. Der zu erwartende Effekt einer einzelnen genetischen Mutation ist meist gering und kann durch eine große Anzahl an Störfaktoren leicht beeinflusst werden. Daher finden sich in Studien, die zu einzelnen Mutationen in Bezug auf die Empfänglichkeit für eine bestimmte Krankheit durchgeführt wurden, häufig widersprüchliche Ergebnisse. Zur Tuberkulose wurde bereits eine Vielzahl von Assoziationsstudien durchgeführt und es konnten einige genetische Varianten identifiziert werden, die zu einer veränderten Empfänglichkeit für Tuberkulose beitragen (siehe 1.1.8.). Allerdings sind auch hier

die Ergebnisse häufig wenig eindeutig oder gar widersprüchlich (Berrington *et al.*, 2007; Takiff, 2007).

Genetische Varianten des *SPP1*-Gens wurden bisher noch nicht hinsichtlich der Empfänglichkeit für Tuberkulose untersucht. Ergebnisse aus Assoziationsstudien zu verschiedenen anderen Infektions- oder Autoimmunerkrankungen können möglicherweise Hinweise auf Polymorphismen geben, die auch für Tuberkulose eine Rolle spielen könnten. Für Multiple Sklerose (Niino *et al.*, 2003; Chiocchetti *et al.*, 2005) und Systemischen Lupus Erythematoses (Forton *et al.*, 2002; D'Alfonso *et al.*, 2005) ergab sich ein Zusammenhang von einzelnen genetischen Polymorphismen im *SPP1*-Gen mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit. Bei Patienten mit juveniler Oligoarthritis zeigte sich eine Assoziation einer OPN-Variante mit besonders schwerem Verlauf der Erkrankung (Marciano *et al.*, 2006). Auch eine Assoziation zwischen einem Polymorphismus im Promotorbereich von OPN und einem verbesserten Ansprechen auf Interferon-Therapie bei Patienten mit Hepatitis C konnte nachgewiesen werden (Naito *et al.*, 2005).

Aufgrund der aufgeführten Studienergebnisse scheint ein Einfluss des Proteins OPN auf die Ausprägung Th1-gesteuerter Immunreaktionen vorstellbar und damit auch ein Einfluss von Varianten im Gen *SPP1* auf die Ausprägung der Tuberkulose.

#### 4.2.1. Verteilung der genotypisierten *SPP1*-Varianten

Es ist bekannt, dass verschiedene demographische Faktoren wie Alter, Geschlecht und ethnische Zugehörigkeit mit der Empfänglichkeit für Tuberkulose korrelieren. In der vorgelegten Untersuchung wurden diese Merkmale daher als beeinflussende Faktoren in die Auswertungen mit einbezogen und die Verteilung der *SPP1*-Genotypen in Bezug auf diese Faktoren betrachtet. In der nachfolgenden Assoziationsanalyse wurden diese Faktoren als Korrekturfaktoren berücksichtigt.

In der Fallgruppe der Studienpopulation betrug das Verhältnis von Frauen zu Männern etwa 1:2. Da die Patienten in den ghanaischen Krankenhäusern konsekutiv gesammelt wurden, ist anzunehmen, dass die Verteilung repräsentativ ist. Tatsächlich ist bekannt, dass Männer eine erhöhte Empfänglichkeit für Tuberkulose haben (Jimenez-Corona *et al.*, 2006). Die Ursachen dafür sind unklar; neben sozioökonomischen Faktoren wurden auch genetische Einflüsse verantwortlich gemacht (Bellamy *et al.*, 2000). Da die Rekrutierung der Individuen der Kontrollgruppe aus den Haushalten und der Nachbarschaft der Patienten erfolgte, sind keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Verteilung möglich.

Über die Altersverteilung der Lungentuberkulose ist in der vorliegenden Studie aufgrund des Designs keine Aussage zu treffen. Es wurden Individuen mit einem Alter von 6 bis 60 bzw. bei Kontrollpatienten bis 66 Jahren in die Studie aufgenommen. Diese Einschrän-

kung wurde gewählt, da Kinder möglicherweise anders auf eine Tuberkuloseinfektion reagieren als Erwachsene und somit die Studienergebnisse beeinflussen können. Es ist bekannt, dass Kinder statistisch häufiger eine disseminierte Form der Tuberkulose entwickeln und häufiger extrapulmonale Manifestationen zeigen (Cailhol *et al.*, 2005). Diese Manifestationen waren durch das Studiendesign ausgeschlossen.

Durch Ausschluss von Patienten unter sechs Jahren wurden allerdings möglicherweise interessante Erkenntnisse vernachlässigt. Es ist denkbar, dass eine genetische Prädisposition für eine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber mykobakteriellen Infektionen sich eben in dieser Altersgruppe manifestiert. Wie bereits für die Erkrankungen des MSMD (*mendelian susceptibility to mycobacterial diseases*)-Formenkreises angenommen wurde (vgl. 1.1.8.), werden prädisponierte Personen möglicherweise aufgrund hoher Durchseuchungsraten in hochendemischen Regionen früh infiziert und versterben bereits im Kindesalter an einer fulminanten Tuberkulose (Ottenhoff *et al.*, 2005). Dem entgegen steht jedoch, dass bereits in einigen Studien, u.a. zu dem für NRAMP1 kodierenden Gen *SLC11A1*, welches das am längsten bekannte und am besten untersuchte mit Tuberkulose assoziierte Gen ist, sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern eine Assoziation mit einem signifikant häufigeren Auftreten von Tuberkulose festgestellt werden konnte (Malik *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2009).

In Bezug auf die ebenfalls untersuchte Kovariable der Ethnie zeigten in der vorgelegten Studie einige der untersuchten *SPP1*-Polymorphismen unterschiedliche Verteilungen zwischen den untersuchten, in Ghana ansässigen ethnischen Gruppen (Akan, Ewe, Ga-Adangbe, Northeners). So waren in der gesamten Studienpopulation für die Variante rs11730582 91,9 % homozygot für den Wildtyp T; bei alleiniger Betrachtung der Ethnie der Ewe zeigten sogar 94,7 % diesen Genotyp. Variante rs1126616 in Exon 7 fand sich im Gesamtkollektiv in 73,7 %, während sie bei der Ethnie Ga-Adangbe nur in 70,0 % vorhanden war.

Das Vorkommen der Polymorphismen wurde auch mit Daten anderer ethnischer Gruppen, wie sie im Rahmen des internationalen HapMap Projekts (<http://www.hapmap.org>) verfügbar sind, verglichen. Für die Variante rs2853744 im Promotorbereich von *SPP1* fand sich der seltenere Genotyp TT bei 10,1% aller Probanden. Im Rahmen des HapMap Projekts wurde eine ebenfalls westafrikanische Studiengruppe aus der Ethnie der Yoruba (Nigeria) dokumentiert. Diese zeigte mit 8,5% eine ähnlich hohe Häufigkeit des TT-Genotyps. Die in der vorliegenden Studie untersuchte Gruppe aus mehr als 4000 Personen erscheint also, obwohl sie etwa zur Hälfte aus Tuberkulosepatienten besteht, repräsentativ. Bei Europäern (Datenbank des *Centre d'Étude du Polymorphisme Humain*, CEPH) findet sich im Gegensatz dazu in den HapMap-Daten kein Individuum mit dieser

Mutation. Auch bei den in Exon 6 und 7 gelegenen Polymorphismen rs6812524 und rs7435825 kamen die homozygoten Genotypen rs6812524 AA und rs7435825 AA bei Kaukasiern und Han-Chinesen nicht vor. Bei den Yoruba fand sich der Genotyp rs6812524 AA dagegen mit einer Häufigkeit von 3,1% und in unserem Studienkollektiv von 5,6%. Der homozygote Genotyp rs7435825 AA war in der vorliegenden Untersuchung bei 2,7% der Probanden vorhanden, in einer Studie an einer Population aus dem südlichen Afrika dagegen bei 33,3%.

Auch bei den Varianten rs11730582 und rs1126616 fanden sich spezifische Verteilungen in den unterschiedlichen ethnischen Gruppen. So fand sich der Genotyp rs11730582 TT in unserem Probandenkollektiv bei 91,9 % der Personen, während kaum Individuen homozygot für die Mutation C waren (0,2%). Die Daten der HapMap-Datenbank geben bei Afroamerikanern Allelhäufigkeiten von 86% T und 14% C an, was den Häufigkeiten in der vorgelegten Untersuchung etwa entspricht. Bei Kaukasiern fanden sich dagegen das Allel T bei nur 56% und C bei 44%. Das Allel T der Variante rs1126616 kommt in dieser Untersuchung (Genotyp TT 2,0%) bei Menschen aus dem westlichen Afrika ebenso wie bei Kaukasiern (T-Allel 26%) eher selten vor. Die Inzidenz bei Han-Chinesen ist mit 65% wesentlich höher.

Eine unterschiedliche Häufigkeit des Vorkommens genetischer Varianten in Populationen aus unterschiedlichen geographischen Regionen kann einen Hinweis auf die Adaptation des genetischen Materials an eine lokal auftretende selektionsbedingende Ursache geben, wie zum Beispiel eine Infektionskrankheit mit spezifischen Erregern (Hill, 1998). Diese Möglichkeit besteht auch für die hier beschriebenen Varianten von *SPP1*. Dabei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass die unterschiedliche Verteilung bestimmter Varianten zwischen den Ethnien auch durch Selektion durch andere Faktoren beeinflusst werden kann. Andere häufig tödlich verlaufende Infektionskrankheiten, wie z.B. HIV-Infektion oder Malaria, sind ebenfalls in der Lage, die Selektion von genetischen Polymorphismen zu beeinflussen. Über den Zusammenhang von diesen Krankheiten mit genetischen Varianten in *SPP1* sind bisher nur wenige Studien durchgeführt worden (Naito *et al.*, 2005; Maeno *et al.*, 2006).

Um die dargestellten Variablen der Studienpopulation Alter, Geschlecht und Ethnie als mögliche beeinflussende Parameter in die folgende Assoziationsanalyse mit einzubeziehen, wurden diese in der logistischen Regression als Stratifizierungsfaktoren verwendet. Die Zusammensetzung der Studiengruppe aus verschiedenen Subpopulationen, die möglicherweise durch ein unterschiedliches genetisches Profil charakterisiert sind, kann eine tatsächlich existierende Assoziation einer genetischen Variante mit Tuberkuloseempfindlichkeit statistisch verschleiern.

#### 4.2.2. Assoziation von *SPP1*-Varianten mit Empfänglichkeit für Lungentuberkulose

In der vorgelegten Studie zeigte der Vergleich aller Tuberkulose-Fälle mit den gesunden Kontrollen bezüglich der neun genotypisierten *SPP1*-Varianten keine signifikanten Häufigkeitsunterschiede. Um eine Assoziation annehmen zu können, wäre zu erwarten gewesen, dass ein *SPP1*-Polymorphismus, der vor Lungentuberkulose schützt, vermehrt in der Kontrollpopulation zu finden wäre. Ein Einfluss der untersuchten genetischen Faktoren auf die Empfänglichkeit für Lungentuberkulose kann daher nicht bestätigt werden.

Die Ergebnisse widersprechen der für die vorliegende Arbeit aufgestellten Hypothese, dass ein Zusammenhang von *SPP1*-Polymorphismen mit einer veränderten Empfänglichkeit für Tuberkulose besteht.

Personen mit Tuberkulose-Infektion haben signifikant höhere OPN-Spiegel im Plasma als gesunde Kontrollindividuen (Koguchi *et al.*, 2003). Da die Expression von OPN zur Bildung der Th1-Zytokine IL-12 und IFN $\gamma$  führt (Ashkar *et al.*, 2000), kann somit die gegen Mykobakterien schützende Immunantwort unterstützt werden. Folglich kann ein möglicher Zusammenhang zwischen der Höhe der OPN-Expression und der Ausprägung der Immunantwort angenommen werden. Patienten mit einer genetisch bedingten verminderten Produktion von OPN durch die Variante rs28357094 G zeigen somit möglicherweise aufgrund einer schwächeren Immunabwehr eine erhöhte Anfälligkeit für Tuberkulose. Die hier durchgeführte Untersuchung konnte diese Annahme nicht bestätigen.

Es konnte bereits eine Assoziation eines OPN-Haplotypen mit reduzierter Expression eines OPN-Reportergens gezeigt werden (Giacopelli *et al.*, 2004). Der Haplotyp setzt sich aus verschiedenen Polymorphismen im Promotorbereich zusammen, die auch in der vorliegenden Studie untersucht wurden (rs28357094, rs17524488, rs11730582). Für die Promotor-Variante rs28357094 G ist weiterhin eine Assoziation mit einer verminderten OPN-Produktion beschrieben (Giacopelli *et al.*, 2004), die auf eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor SP1 in diesem Bereich zurückgeführt wird (Wang *et al.*, 2000). Durch die Mutation würde eine schwächere Bindung von SP1 und dadurch eine geringere Promotoraktivität von *SPP1* hervorgerufen (Giacopelli *et al.*, 2004). In der vorliegenden Untersuchung war keine dieser Varianten mit Empfänglichkeit für bzw. Schutz vor Tuberkulose assoziiert.

Eine weitere Studie untersuchte einen OPN-Haplotyp, der sich aus verschiedenen Polymorphismen im Bereich der Exone 6 und 7 sowie der 3'-UTR zusammensetzt. Dieser war mit erhöhten OPN-Spiegeln assoziiert (Chiocchetti *et al.*, 2004). Er war außerdem mit einem erhöhten Auftreten bei Autoimmun-Lymphoproliferativen Syndromen (ALPS) (Chiocchetti *et al.*, 2004) und Multipler Sklerose (MS) (Chiocchetti *et al.*, 2005) assoziiert.



Die Autoren stellten aufgrund ihrer Ergebnisse die Hypothese auf, dass hohe OPN-Spiegel für bestimmte Autoimmunerkrankungen prädisponieren (Chiocchetti *et al.*, 2004). In zellbiologischen Untersuchungen führte die OPN-Applikation zu einer Produktion von IL-12 und IFN $\gamma$  (Ashkar *et al.*, 2000). Dadurch könnte es eine Hyperreagibilität des Immunsystems bedingen. Bei bestimmten Infektionen durch intrazelluläre Erreger oder Viren wie z.B. *Schistosoma mansoni* oder *Mycobacterium bovis* konnte allerdings in Tierversuchen nachgewiesen werden, dass umgekehrt ein OPN-Mangel zu einem Phänotyp schwerer Erkrankung führt (Nau *et al.*, 1999; O'Regan *et al.*, 2001). Dies scheint zunächst im Widerspruch zu den zuvor beschriebenen Befunden zu stehen. Der Gegensatz erklärt sich möglicherweise durch die Überlegung, dass ein hoher OPN-Spiegel durch ein reagibleres Immunsystem zu einer effektiveren Abwehr führen könnte, da die Th1-Antwort der erworbenen Immunität schneller etabliert werden kann (Ashkar *et al.*, 2000). Was sich bei Autoimmunerkrankungen als Nachteil äußert, könnte bei der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen für den Wirt von Vorteil sein.

In zellbiologischen Untersuchungen konnte auch eine Hochregulation der Genexpression von OPN in humanen Monozyten bei Infektion mit *M. tuberculosis* nachgewiesen werden (Ragno *et al.*, 2001). Verschiedene Studien zeigten einen Zusammenhang der Expression von OPN mit der Ausbildung einer adäquaten Th1-Reaktion (Ashkar *et al.*, 2000; O'Regan *et al.*, 2000; Maeno *et al.*, 2006), die für die protektive Immunantwort auf die Infektion mit Mykobakterien essentiell ist (Flynn *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass OPN-defiziente Mäuse nach einer Infektion mit *M. bovis* BCG eine verminderte Fähigkeit der Bakterienbeseitigung und eine verstärkte Granulombildung gezeigt haben (Nau *et al.*, 1999), ist ebenfalls Hinweis auf die funktionelle Bedeutung von OPN in der Immunantwort auf eine entsprechende Infektion.

In einer aktuellen Studie an OPN-defizienten Mäusen zeigte sich zwar eine Hochregulation der OPN-Produktion in Makrophagen nach Infektion mit Mykobakterien, es fand sich jedoch kein Zusammenhang mit Bakterienwachstum, Zytokinproduktion oder der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen in der frühen Entzündungsreaktion (van der Windt *et al.*, 2009). Im Vergleich von OPN-defizienten zu Wildtyp-Mäusen zeigte sich kein Unterschied im Ausmaß der pulmonalen Inflammation, Granulomgröße und der Anzahl oder zellulären Zusammensetzung der Lungeninfiltrate.

Ebenfalls im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Studienergebnissen konnte in einigen Studien keine eingeschränkte Immunabwehr bei OPN-Mangel in Th1-Modelle nachgewiesen werden. So führten Infektionen mit dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* (Abel *et al.*, 2005) oder auch Vaccinia-Virus, Influenzaviren oder *Borrelia burgdorferi* bei OPN-defizienten Mäusen zu einer normalen Immunreaktion (Potter *et al.*,

2002; Abel *et al.*, 2005; Craig-Mylius *et al.*, 2005). Eine weitere tierexperimentelle Studie zur Entstehung von Autoimmunkrankheiten (experimentelle Autoimmun-Enzephalitis [EAE], anti-c2 AK-induzierte Arthritis [CAIA] oder Kollagen-induzierter Arthritis [CIA]) konnte ebenfalls, im Gegensatz zu vorherigen Studien (Chabas *et al.*, 2001), keinen Einfluss von OPN auf diese Erkrankungen nachweisen (Blom *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Widersprüche stellten die Autoren der oben genannten Studie die Hypothese auf, dass die durch eine stark eingeschränkte Th1-Immunantwort gekennzeichneten Phänotypen bei OPN-defizienten Mäusen durch Gene ausgelöst werden, die in unmittelbarer Umgebung von *SPP1* auf Chromosom 4 liegen und an den *SPP1*-Locus gekoppelt sind. Die Autoren gehen davon aus, dass bei der Züchtung OPN-defizienter Mäuse diese Gene (z.B. verschiedene Chemokine und NOS) versehentlich ebenfalls deletiert wurden (Blom *et al.*, 2003).

Als weitere Ursachen für die gegensätzlichen Ergebnisse der Studien werden systematische Verfälschungen der älteren Studien durch Verunreinigungen der OPN-Lösungen mit Endotoxinen angeführt (Abel *et al.*, 2005; van der Windt *et al.*, 2009). Solche Verunreinigungen könnten die dem OPN zugeschriebenen Effekte, wie Migration und Zytokininduktion, erklären (Konno *et al.*, 2005). Endotoxine sind als Bestandteile von Bakterien starke Makrophagenaktivatoren; sie wirken chemotaktisch und können eine Immunreaktion hervorrufen.

Die genannten Erklärungsversuche scheinen jedoch aufgrund der Vielzahl repräsentativer Studien mit zum Teil unterschiedlichstem Design, die einen Einfluss von OPN auf die Immunreaktion der murinen und humanen Tuberkulose nahe legen, nicht ausreichend zu sein. Es wäre allerdings denkbar, dass die unterschiedlichen Reaktionen, die in den verschiedenen Versuchsanordnungen dokumentiert werden konnten, jeweils von der Art des spezifischen Stimulus abhängig sind. Möglicherweise zeigt sich dabei der Einfluss unterschiedlicher mykobakterieller Genotypen auf die Aktivierung der Immunantwort. Es ist denkbar, dass OPN nur für die Abwehr einiger mykobakterieller Genotypen ein wichtiger Stimulus ist, für andere jedoch nicht entscheidend zur Abwehr beiträgt. So ergab eine Studie von Nau *et al.* (1999), dass OPN-defiziente Mäuse nach Infektion mit *M. bovis* BCG vermehrt schwerere Erkrankungen entwickeln und statistisch häufiger versterben als OPN-kompetente Mäuse. In einer aktuellen Studie von van der Windt *et al.* (2009) wurden Mäuse dagegen mit einem virulentem *M. tuberculosis*-Stamm infiziert. Dabei zeigten sich bei den OPN-defizienten Mäusen eine geringere pulmonale Inflammation und eine erhöhte Sterblichkeit der OPN-kompetenten Mäuse. In einer weiteren Studie konnte eine erhöhte Expression von OPN bei mit *M. tuberculosis* infizierten Makrophagen, wie sie in einer vorherigen Studie beschrieben worden war (Ragno *et al.*, 2001), nicht nachgewiesen werden (Thuong *et al.*, 2008).

Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, dass Ergebnisse aus Tierexperimenten nicht immer direkt auf den Menschen zu übertragen sind. Speziell das Mausmodell stellt kein adäquates Modell für die menschliche Tuberkulose dar. Die Pathogenese variiert beträchtlich zwischen tierexperimenteller und natürlich vorkommender humaner Tuberkulose (Basaraba, 2008), denn Mäuse entwickeln eine primär chronische Infektion und bilden keine verkäsenden Granulome (Berrington *et al.*, 2007). Weiterhin werden in Tierexperimenten häufig hohe Infektionsdosen attenuierter mykobakterieller Laborstämme verwendet und die Infektion erfolgt meist nicht auf physiologischem Weg. Daher sind solche Versuche nur eingeschränkt auf humane Situationen zu übertragen. Trotzdem werden Mausmodelle genutzt, da die Möglichkeit der Ausschaltung (*knock out*) einzelner Gene besteht (Orme *et al.*, 2001).

#### 4.2.3. Assoziation von *SPP1*-Varianten mit Reaktivität im PPD-Test

OPN scheint bei der primären Immunantwort auf Mykobakterien ein wichtiger Faktor zu sein, da es zur Differenzierung der T-Zellen in Richtung der für die Abwehr von Tuberkuloseerregern essentiellen Th1-Antwort führt. Um die Immunkompetenz der infizierten Individuen in der Studienpopulation zu objektivieren, wurde ein PPD-Test durchgeführt. Dieser zeigt die Ausbildung spezifischer T-Zellen und damit die Etablierung einer adäquaten Immunantwort an. Der PPD-Test wurde nur in der Kontrollgruppe der Studienpopulation durchgeführt, da bei den erkrankten Personen von einer positiven Reaktion des Tests auszugehen ist. Innerhalb dieser Gruppe wurde das Vorkommen der genotypisierten *SPP1*-Polymorphismen bei PPD-positiven und PPD-negativen Individuen untersucht. Der Vergleich der beiden Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der untersuchten *SPP1*-Varianten.

In der Studienregion Ghana betrug die Inzidenz der Tuberkulose zur Zeit der Datenerhebung 2001 bis 2004 281/100.000 Personen (National Tuberculosis Control Program, 2003). Aktuellere Zahlen aus dem Jahr 2006 geben die Inzidenz mit 218/100.000 Personen an (WHO, 2008). Ghana gilt damit als Hochendemiegebiet für Tuberkulose. Es ist davon auszugehen, dass die gesamte Bevölkerung Kontakt mit Tuberkulosebakterien hat oder hatte.

Epidemiologische Studien in der ebenfalls hochendemischen Elfenbeinküste ergaben, dass etwa 20% der Individuen trotz wiederholter Exposition einen negativen PPD-Test beibehalten (Kassim *et al.*, 2000). In der vorgelegten Untersuchung hatten nur 127 von 2346 Kontrollpersonen (5,4%) einen negativen PPD-Test. Interessanterweise stammte ein Großteil dieser Personen aus Haushaltsgemeinschaften von Tuberkulosefällen (Thye *et al.*, 2009a). Es scheint folglich eine Personengruppe zu geben, die trotz entsprechender

Infektionsexposition keine Sensibilisierung gegen die Pathogene zeigt. Möglicherweise sind auch hier genetische Faktoren von Bedeutung (Thye *et al.*, 2009a).

Die Sensitivität des PPD-Tests wird mit nur 77% angegeben (Pai *et al.*, 2008b). Daher ist eine Verfälschung der Untersuchungsergebnisse durch ungenaue Testmethoden möglich. Die neueren Interferon-Gamma-Release-Assay (IGRA)-Verfahren sind mit 78-90% sensitiver (Pai *et al.*, 2008b). Allerdings konnte auch in Untersuchungen mit diesen Testsystemen nicht eindeutig geklärt werden, wie hoch die Infektionsrate der Tuberkulose tatsächlich ist. Exponierte Personen aus dem Umfeld von Patienten mit aktiver Lungentuberkulose zeigten nur zum Teil einen positiven IGRA (Martineau *et al.*, 2007). Auch bei diesem Testsystem bleibt es daher zweifelhaft, ob ein negativer Test Ausdruck einer fehlenden immunologischen Antwort auf die Erreger ist, oder ob tatsächlich keine Infektion stattgefunden hat. Nicht zuletzt sind IGRA-Studien in Afrika noch nicht in großem Umfang durchgeführt worden.

Allerdings konnte an dem hier untersuchten Probandenkollektiv bereits gezeigt werden, dass ein Haplotyp im IL-10-Gen, der sich durch eine geringere IL-10-Produktion auszeichnet (*low-producer*), bei Individuen mit einem negativen PPD-Test signifikant seltener auftritt als bei PPD-positiven Kontrollen und Fällen (Thye *et al.*, 2009a). Der Nachweis über den PPD-Test scheint also theoretisch sensitiv genug, um signifikante Unterschiede in der Immunreaktion nachzuweisen.

#### **4.2.4. Assoziation von *SPP1*-Varianten mit radiologischen Befunden in der Fallgruppe**

Um neben dem Erkrankungsrisiko auch die Ausprägung und den Schweregrad der Erkrankung quantifizieren zu können, wurde der radiologische Befund der Tuberkulosepatienten als weiterer Phänotyp definiert. Die Erhebung im Rahmen der Studie beinhaltete die Durchführung einer posterior-anterioren Röntgenuntersuchung des Thorax und die anonymisierte Auswertung der Bilder. Dabei wurden die Merkmale Infiltrate, Kavernenbildung, knotige Läsionen, pulmonale Restriktionen, Kalzifizierungen, Pleuraergüsse und Pleuradicke nach Schweregraden eingeteilt. Da pulmonale Infiltrate und Kavernenbildung als Zeichen für zelluläre Infiltration und Nekrose die häufigsten radiologischen Zeichen einer Lungentuberkulose sind (Lee *et al.*, 2000), wurden diese beiden phänotypischen Parameter für die Assoziationsanalysen verwendet. Für die weiteren Merkmale ergaben sich keine ausreichend großen Gruppen, für die statistische Assoziationsuntersuchungen sinnvoll gewesen wären.

Die Annahme, dass eine *SPP1*-Variante zwar nicht vor dem Ausbruch der Tuberkulose-Erkrankung schützt, aber im Verlauf der Erkrankung die Ausprägung des Lungenbefalls,

gemessen an der Ausprägung der radiologisch verifizierbaren Läsionen, beeinflusst, konnte durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Verschiedene Studien hatten Hinweise auf eine Assoziation der pulmonalen Inflammation bei Tuberkulose mit der Produktion von OPN ergeben. OPN führt zur Etablierung einer T-Zell-vermittelten Antwort gegen mykobakterielle Antigene und zur Akkumulation von Entzündungszellen in infizierten Bereichen (Singh *et al.*, 1990; Weber *et al.*, 1996b; Crawford *et al.*, 1998). In Lungenbiopsaten von Tuberkulosepatienten fand sich nach differentiellen Färbeverfahren in Entzündungsbereichen mehr OPN als bei gesunden Kontrollpersonen (Nau *et al.*, 1997). Es wurde in tierexperimentellen Studien gezeigt, dass OPN-defiziente Mäuse nach einer Infektion mit *M. bovis* einen im Vergleich zu OPN-intakten Mäusen stärkeren Lungenbefall aufwiesen (Nau *et al.*, 1999). Auch an dem in dieser Studie untersuchten Probandenkollektiv konnte eine *CTLA4*-Variante mit dem Auftreten einer schweren Lungentuberkulose assoziiert werden (Thye *et al.*, 2009c).

Letztendlich gibt es keine eindeutigen Belege, inwiefern der radiologisch sichtbare Lungenbefall tatsächlich ein Maß für die Schwere der Tuberkulose ist. Die oben beschriebenen Studien legen allerdings nahe, dass ein direkter Zusammenhang besteht und daher eine Beeinflussung durch genetische Polymorphismen möglich ist.

Die exakte Definition des Phänotyps ist ein entscheidendes Maß für die klinische Validität einer Studie (Silverman *et al.*, 2000; Bottema *et al.*, 2005). Da Tuberkulose sehr unterschiedliche Manifestationsformen aufweist (Lungentuberkulose, extrapulmonale Tuberkulose) kommt dieser Definition eine besondere Relevanz zu. In der vorliegenden Studie wurde als primärer Phänotyp der Erkrankung der Nachweis von Mykobakterien im Sputum oder Kultur definiert. Patienten mit radiologisch erkennbaren Lungeninfiltraten und den klinischen Zeichen einer manifesten Lungentuberkulose, jedoch ohne mikroskopisch-mikrobiologischen Nachweis, wurden, dem primären Studiendesign entsprechend, aus der Studie ausgeschlossen. Als weitere Subphänotypen wurden die Ausprägung der radiologischen Auffälligkeiten und in der Kontrollgruppe die Reaktion auf den PPD-Test definiert. Durch diese Einschränkung können möglicherweise systematische Fehler entstanden oder vorhandene Assoziationen mit *SPP1* nicht erkannt worden sein.

Eine offene Lungentuberkulose, so wie im Design der Untersuchung als Phänotyp beschrieben, ist nicht die einzige Manifestationsform einer Infektion mit Mykobakterien des MTB-Komplexes. Organ- oder Lymphknotentuberkulosen kommen in Hochinzidenzländern wesentlich häufiger als in Europa vor (Golden *et al.*, 2005). Dies mag einerseits epidemiologische und soziale Ursachen haben, andererseits gibt es eindeutige Hinweise auch für genetische Faktoren. So zeigte eine auf nationaler Ebene durchgeführte Untersuchung in Großbritannien, dass Tuberkulosepatienten, die vom Indischen Subkontinent

stammten, über die Hälfte der extrapulmonalen Tuberkulose-Fälle ausmachten; 54% hatten eine Lymphknotentuberkulose. Kaukasische Patienten entwickelten dagegen wesentlich häufiger eine urogenitale Tuberkulose (Kumar *et al.*, 1997). Eine andere Studie kam zu dem Ergebnis, dass die perikardiale Tuberkulose, die in Industrieländern so gut wie nicht vorkommt, häufige Ursache kardialen Versagens in Südafrika ist (Strang, 1984).

Zwischen Infektion und Ausbruch der Tuberkulose liegt eine sehr variable Zeitspanne. Diese Latenzzeit wäre ein Surrogatparameter, um Aufschluss über die Kompetenz des Immunsystems zu erhalten. Zusammenfassend zeigt sich, dass durch die Definition des Phänotyps der Lungentuberkulose möglicherweise ein Teil der Patienten nicht als solche identifiziert werden konnten. Das Vorliegen von Sputum-negativen, extrapulmonalen oder disseminierten Tuberkulosefällen wäre möglicherweise als besondere Verlaufsform und somit als ein gesonderter Phänotyp zu differenzieren.

### 4.3. Differenzierung der mykobakteriellen Genotypen

In der vorliegenden Studie wurde erstmalig in einer Assoziationsstudie zu Tuberkulose eine Differenzierung der mykobakteriellen Genotypen und entsprechende statistische Stratifizierungen vorgenommen. Die Relevanz dieser Differenzierung soll im Folgenden erläutert werden.

Lange Zeit wurde angenommen, dass Mykobakterien eine nur geringe genetische Variabilität aufweisen. Die Sequenzhomologie der unterschiedlichen Stämme wurde noch bis vor wenigen Jahren mit 99,97-99,99 % angegeben (Sreevatsan *et al.*, 1997; Fleischmann *et al.*, 2002; Gutacker *et al.*, 2002; Garnier *et al.*, 2003). Der Einfluss mykobakterieller genetischer Faktoren auf phänotypische Charakteristika einer klinisch manifesten Tuberkulose wurde daher als gering und nicht relevant eingeschätzt. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass im mykobakteriellen Genom eine Vielzahl von Mutationen vorkommt, die entscheidend zur Ausprägung der phänotypischen Merkmale der Erkrankung durch verschiedene mykobakterielle Stämme beiträgt (Gagneux *et al.*, 2006; Hershberg *et al.*, 2008).

Mykobakterien vermehren sich hauptsächlich klonal (Wirth *et al.*, 2008). Differenzierungen der Stämme, und somit genotypische Varianten, entstehen durch Deletionen und Duplikationen. Ein Austausch des genetischen Materials zwischen genotypischen Varianten findet in der Regel nicht statt. Folglich ist eine spezifische Anpassung der unterschiedlichen Stämme an die Eigenschaften des jeweiligen Wirts, mit der Folge der Ausprägung verschiedenster Charakteristika, vorstellbar.

Es ist bekannt, dass Mykobakterien eine charakteristische geographische Verbreitung der Genotypen aufweisen (Hirsh *et al.*, 2004; Malik *et al.*, 2005; Gagneux *et al.*, 2007). Dazu

tragen einerseits maßgeblich äußere Einflüsse wie die Verbreitung bzw. Migration des menschlichen Wirts bei, andererseits nehmen auch Wirtsfaktoren auf die geographische Verteilung der Mykobakterien Einfluss (Gagneux *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2008). So zeigte sich bei amerikanischen Tuberkulosepatienten aus verschiedenen Herkunftsländern überproportional häufig eine Übereinstimmung von mykobakteriellem Genotyp und Herkunftsregion des jeweiligen Patienten (Hirsh *et al.*, 2004). Sicherlich ist diese Tatsache teilweise durch soziale Kontakte zu erklären, sie ist aber auch ein starkes Indiz für eine spezifische Interaktion von Wirtsfaktoren und mykobakteriellem Genotyp.

Im Vergleich ethnischer Gruppen wurde schon früh eine unterschiedliche Empfänglichkeit für Tuberkulose beschrieben. Im Rahmen eines Tuberkuloseausbruchs in einem Pflegeheim in den USA zeigte sich bei Kontaktpersonen afrikanischer Abstammung eine höhere Konversionsrate des PPD-Tests als bei anderen Kontaktpersonen (Stead *et al.*, 1990). Studien in Gefängnissen und an Soldaten, für die etwa gleiche sozioökonomische Umstände angenommen wurden, zeigten ebenfalls eine unterschiedliche Empfänglichkeit für Tuberkulose (Cummins, 1908; Borrel, 1920). Die genannten Studien sind umstritten, da soziale und umweltbedingte Einflussfaktoren bei der Auswertung der Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden können. Weiterhin können solche Studien als Grundlage rassistischer Ideologien genutzt werden. Die Unterschiede zwischen ethnischen Gruppen bieten jedoch auch Hinweise auf eine Adaptation des genetischen Materials an die jeweils lokal auftretenden Tuberkuloseerreger.

Auch eine variierende phänotypische Ausprägung der Erkrankung durch unterschiedliche mykobakterielle Stämme kann Anhaltspunkt für einen Einfluss genetischer Faktoren des Erregers auf die Ausprägung der Erkrankung sein. So zeigte der Vergleich von zwölf MTBK-Isolaten in Bezug auf ihre Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf der Tuberkulose bei Mäusen entscheidende Unterschiede in Virulenz, Zytokininduktion und Immunpathologie (Lopez *et al.*, 2003). In anderen Untersuchungen zeigte sich bei Infektion mit dem *M. tuberculosis* Beijing-Isolat eine signifikant höhere Bakterienlast, vermehrte Disseminierung der Infektion (Tsenova *et al.*, 2005) und eine deutlich erhöhte Letalität (Manca *et al.*, 2001) als bei anderen Stämmen. In einer neueren Studie konnten jedoch klinisch und radiologisch keine Unterschiede zwischen den Phänotypen von *M. tuberculosis* und *M. africanum* beim Menschen gefunden werden (Meyer *et al.*, 2008).

Auch die weltweite Verteilung der Erreger deutet auf eine spezifische Anpassung an die Wirtsbedingungen hin. Nach derzeitigem Wissensstand traten Vorläufer der heutigen Mykobakterien (*M. protuberculosis*) bereits vor etwa drei Millionen Jahren bei Vorfahren des modernen Menschen in Ostafrika auf (Brosch *et al.*, 2002; Gutierrez *et al.*, 2005). Diese verbreiteten sich entsprechend der Migrationsroute der Menschen nach Norden

und auf die arabische Halbinsel. Dort spalteten sich möglicherweise die Erreger des MTBK vor etwa 40 000 Jahren von *M. protuberculosis* ab (Hershberg *et al.*, 2008; Wirth *et al.*, 2008). Die Trennung der ältesten Stämme EAI (East Asian-Indian) und LAM (Latin American-Mediterranean) trat vor etwa 13 000 Jahren auf (Wirth *et al.*, 2008). Die von *M. tuberculosis* sensu stricto abstammenden Stämme folgten vor etwa 5 000-8 000 Jahren den Menschen in die verschiedenen geographischen Regionen. Drei differenzierte Zweige wanderten nach Afrika (*M. tuberculosis* African lineage), Asien (*M. tuberculosis* Asian lineage) und Europa ein (*M. tuberculosis* European lineage) (Wirth *et al.*, 2008). Dort erfolgte offenbar die weitere Diversifizierung in unterschiedliche Genotypen. Es wird inzwischen angenommen, dass diese frühe geographische Trennung zu einer stammespezifischen Adaptation an die verschiedenen humanen Wirte geführt hat (Gagneux *et al.*, 2006; Hershberg *et al.*, 2008). Die Forschung hierzu ist jedoch weiterhin im Wandel (Smith *et al.*, 2009).

Die Einordnung der Mykobakterien in phylogenetische Linien war in der vorliegenden Studie bei Isolaten von 1567 infizierten Personen möglich. Die mykobakteriellen Isolate von 443 Patienten konnten nicht eindeutig differenziert werden und wurden daher in die Stratifizierungen nicht mit einbezogen. Die Inzidenzen der einzelnen Genotypen zeigten geringe Abweichungen zu zuvor beschriebenen Studien. So fand sich *M. africanum* in nur etwa 30% aller Patienten, während in einer anderen Studie die Häufigkeit von *M. africanum* in Westafrika mit 40% angegeben wird (Gagneux *et al.*, 2007).

#### **4.3.1. Assoziation von *SPP1*-Varianten mit Erkrankung durch unterschiedliche mykobakterielle Genotypen**

Die in dieser Studie vorgenommene Unterteilung der Mykobakterien in die untergeordneten Spezies (*M. tuberculosis* und *M. africanum*) und die daraus ableitbaren Genotypen ermöglicht eine detailliertere Betrachtung spezifischer Interaktionen genetischer Wirts- und Erregerfaktoren. Die Differenzierung der mykobakteriellen Genotypen erfolgte anhand von Spoligotyping, IS6110 Fingerprinting sowie der Genotypisierung der für *M. tuberculosis* EUAM spezifischen Deletion *pkc15/1* (siehe auch 1.1.5.3).

Innerhalb der Fallgruppe der Studienpopulation konnten so je nach verursachendem Genotyp entsprechende Untergruppen gebildet werden. Die hier untersuchten *SPP1*-Genotypen wurden auf ihre Verteilung in den verschiedenen Gruppen hin analysiert. Dabei zeigte sich für den *SPP1*-Polymorphismus rs6812524 ein deutlicher Trend zu einer unterschiedlichen Verteilung zwischen Fall- und Kontrollgruppe. Während in der gesamten Studienpopulation die homozygote Wildtyp-Variante rs6812524 GG bei 60% aller Kontrollpersonen und bei 57,8% aller Infizierten auftrat, war dieser Genotyp in der Untergruppe der mit dem mykobakteriellen Genotyp TB1 Infizierten nur zu 46,4% vorhanden.

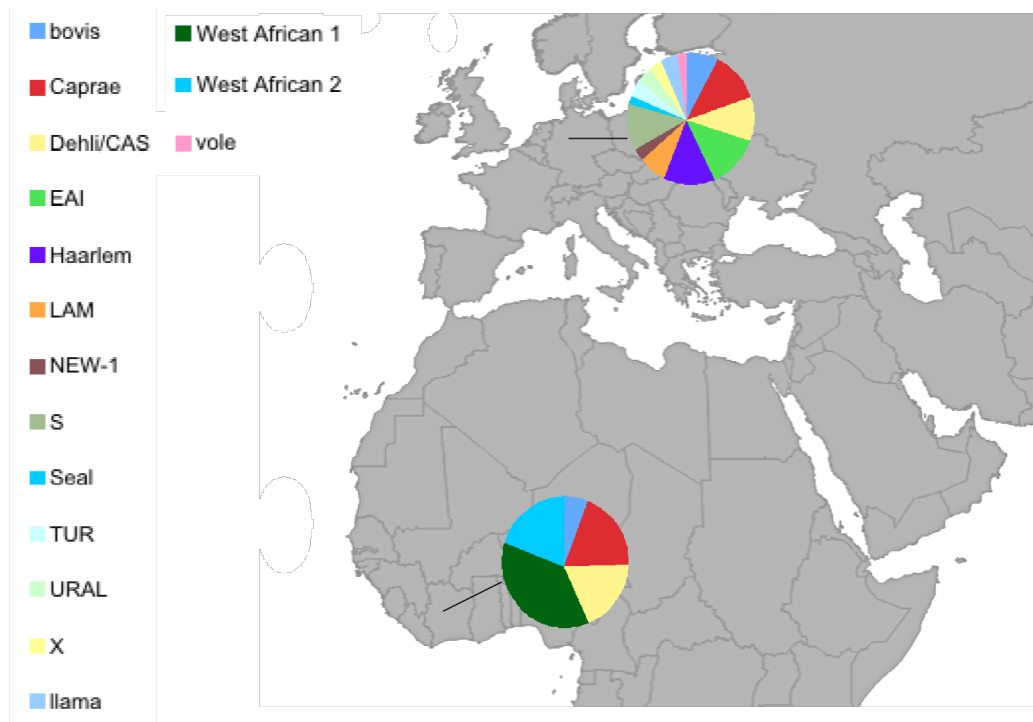


Die heterozygote Variante AG trat dagegen in der TB1-Gruppe zu 49,3% auf, im Vergleich zu 34,4% bei den Kontrollpersonen der Gesamtpopulation.

Es ist also vorstellbar, dass die homozygote Wildtyp-Variante rs6812524 GG tendenziell vor einer Erkrankung mit Mykobakterien des Genotyps TB1 schützt, während die heterozygote Variante häufiger mit Erkrankung assoziiert ist. Nach Bonferroni-Korrektur auf multiples Testen erreichten diese Werte jedoch keine Signifikanz ( $p_{\text{nom.}}=0,00097$ ;  $p_{\text{korrr.}}=0,058$ , OR=0,55, CI 0,39-0,79). Obwohl die OR einen deutlichen Schutz vor einer Erkrankung durch den Genotyp TB1 nahe legt, erreicht der Effekt dieser Variante die Signifikanzgrenze nicht. Ihr scheint jedoch eine besondere Bedeutung zuzukommen. Dies soll im Folgenden näher betrachtet werden.

Der Genotyp TB 1, in der Publikation von Wirth *et al.* (2008) synonym auch „Ghana“ genannt, lässt sich in die Gruppe der *M. tuberculosis* Euro-American (EUAM) einordnen (Wirth *et al.*, 2008). Er zeigt gemeinsam mit den Stämmen Haarlem und Stamm X die Deletion RD (*region of difference*) 100 und scheint daher eine gemeinsame geographische Herkunft mit diesen zu haben. Während jedoch der Genotyp TB1 vor allem in Ghana gefunden wurde, finden sich die anderen beiden Stämme vorwiegend in Europa (Allix-Beguec *et al.*, 2008; Weniger *et al.*, 2010). Der Stamm Haarlem findet sich besonders in Osteuropa und Russland, während der X-Stamm in Großbritannien, den USA und ehemaligen britischen Kolonien gefunden wird. Aufgrund der gemeinsamen phylogenetischen Information von TB1 mit diesen Stämmen ist anzunehmen, dass es sich um einen Genotyp handelt, der sich ebenfalls in Europa entwickelt und angepasst hat. Ein Import nach Westafrika hat möglicherweise erst vor kurzer Zeit stattgefunden.

In Europa ist der *SPP1*-Genotyp GG des Polymorphismus rs6812524 wesentlich häufiger als in Westafrika. Da in der vorliegenden Studie der Genotyp mit relativem Schutz vor einer Infektion mit *M. tuberculosis* TB1 assoziiert war, ist vorstellbar, dass die in Europa häufigeren Tuberkuloseinfektionen mit dem mykobakteriellen Genotyp TB1 zu einer Selektion des schützenden *SPP1*-Allels rs6812524 G geführt haben. Durch das über lange Zeiträume bestehende endemische Vorkommen der Infektion und der hohen Mortalität der Tuberkulose erscheint eine Selektion möglich. Diese Annahme wurde allerdings bisher nicht in Studien überprüft. Da der mykobakterielle Genotyp TB1 in Westafrika seltener vorkommt, ist die Selektion der G-Variante dort möglicherweise weniger stark ausgeprägt.



**Abbildung 4.1. Mykobakterielle Genotypen in Ghana und Deutschland**

Die Differenzierung der mykobakteriellen Genotypen erfolgte anhand spezifischer genetischer Marker. Die Daten stammen aus der MIRU-VNTRplus Datenbank ([www.miru-vntrplus.org](http://www.miru-vntrplus.org); Allix-Beguec *et al.*, 2008).

TB1 ist durch die Deletion RD724 gekennzeichnet, die bei allen anderen Genotypen nicht vorhanden ist (Gagneux *et al.*, 2006). Eine spezifische Funktion dieser Deletion ist bisher nicht bekannt. Es ist vorstellbar, dass die Deletion mit einer Änderung von Funktion oder Aktivität im Stoffwechsel der Tuberkulosebakterien und somit mit einem veränderten mykobakteriellen oder Krankheitsphänotyp assoziiert ist. So gibt es zum Beispiel Hinweise darauf, dass Gene, die in der RD1-Region liegen, möglicherweise gemeinsam für ein spezialisiertes sekretorisches System kodieren (Guinn *et al.*, 2004). Die RD1-Region unterscheidet die Erreger des MTBK von den anderen Mykobakterien. Die Deletion könnte so zu einem veränderten Phänotyp der Mykobakterien führen. Auch für die Region pks 15/1, die die EUAM-Stämme von anderen *M. tuberculosis sensu stricto*-Stämmen unterscheidet, konnte eine vermehrte Produktion von phenolischen Glykolipiden nachgewiesen werden. Dies könnte möglicherweise eine Modulation der Zytokinantwort zur Folge haben (Sinsimer *et al.*, 2008).

Auch für die weiteren Deletions-Regionen werden funktionelle Implikationen angenommen, wobei Deletionen nicht zwangsläufig Pathogenitätsfaktoren entsprechen. Die phylogenetische Differenzierung der Mykobakterien mit Hilfe der Bestimmung von RDs wird nicht unter funktionellen, sondern unter rein genetischen Aspekten durchgeführt, wobei die funktionelle Relevanz der deletierten Regionen häufig nicht endgültig geklärt ist. Viele weitere Polymorphismen (SNPs, Deletionen, andere Mutationen) sind für spezifische

Genotypen charakteristisch. Umgekehrt ist nicht jede Mutation mit einem *in vitro* oder *in vivo* veränderten Phänotyp assoziiert. Das zeigt sich beispielhaft bei zwei SNPs, die sowohl bei dem hochvirulenten Genotyp Beijing als auch bei TB1 identifiziert wurden (Homolka *et al.*, 2009). Bisher liess sich kein funktionelles Korrelat dieser Varianten identifizieren.

Es ist jedoch grundsätzliches Ziel solcher Untersuchungen, die Implikationen der mykobakteriellen Genotypen im Zusammenhang mit variablen humanen Faktoren und Phänotypen zu beschreiben. Mykobakterien haben möglicherweise in der langen Zeit, in der sie im humanen Wirt persistierten, eine Anpassung durchlaufen, die sie gegen bestimmte Wirtseigenschaften resistent gemacht haben. So korrelieren mykobakterielle Polymorphismen, z.B. solche, die für Medikamentenresistenz verantwortlich sind, möglicherweise mit Mutationen verschiedener humaner Wirtsgene, die für Antigenpräsentation oder andere Funktionen zuständig sind (Gutierrez *et al.*, 2005). Da der *SPP1*-Genotyp rs6812524 GG tendenziell Schutz vor einer Infektion mit TB1 bietet, stellt er einen möglichen Wirtsfaktor dar, an den der mykobakterielle Genotyp TB1 nicht ausreichend adaptiert ist.

Auch laborchemisch lassen sich unterschiedliche Reaktionen der mykobakteriellen Genotypen nachweisen. Der Stamm CDC1551 führte im Mausmodell im Vergleich zu dem Laborstamm Erdman zu einer höheren Ausschüttung von Zytokinen durch infizierte Monozyten, unter anderem von  $TNF\alpha$  (Manca *et al.*, 1999; van Crevel *et al.*, 2001). Insgesamt zeigte sich bei Infektionen mit dem Stamm CDC1551 eine frühere und stärker ausgeprägte Immunantwort, die mit einer erhöhten Tuberkulin-Konversionsrate einherging (Malik *et al.*, 2005). Weitere Untersuchungen ergaben, dass Oberflächenlipide eines spezifischen *M. tuberculosis*-Genotyps eine Th1-spezifische Immunantwort induzierten, während diese bei einem anderen Genotyp sogar unterdrückt wurde (Manca *et al.*, 2004). OPN greift in die Regulation der Th1-Antwort im Rahmen der frühen Reaktion auf die Infektion durch Mykobakterien des MTB-Komplexes ein. Es wäre vorstellbar, dass die *SPP1*-Variante rs6812524 A möglicherweise bei Infektionen durch den Stamm TB1 zu einer verstärkten Immunabwehr durch OPN führt.

Der SNP rs6812524, der als starker Trend mit Schutz vor Erkrankungen durch den Genotyp TB1 assoziiert war, führt durch die Substitution der Base Guanin zu Adenin an Position 493 in Exon 6 zu einem synonymen Austausch der Aminosäure Serin. Dieser verursacht keine strukturelle Modifikation des Proteins. Allerdings ist bekannt, dass durch Nukleotidsubstitutionen an der dritten Position eines Kodons möglicherweise Veränderungen der Translationseffizienz durch unterschiedlich eingesetzte tRNA (Transfer-RNA) hervorgerufen werden (Grantham *et al.*, 1980; Robinson *et al.*, 1984; Bulmer, 1988). Mög-

licherweise trifft eine solche Genregulation auf Translationsebene auch auf die hier untersuchte Variante zu. Weiterhin ist denkbar, dass die Variante im Kopplungsgleichgewicht mit einem Austausch liegt, der ursächlich für die Assoziation verantwortlich ist. Der Polymorphismus rs6812524 liegt in einem starken Kopplungsgleichgewicht mit dem ebenfalls typisierten Polymorphismus rs7435825 ( $r^2=0,68$ ). Der üblicherweise gesetzte Grenzwert von  $r^2=0,80$  wird allerdings nicht erreicht. Die Variante rs7435825 führt durch die Mutation von Guanin zu Adenin zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Asparagin und kann somit einen Einfluss auf die Proteinfunktion haben. Entsprechend der Variante rs6812524 zeigt sich eine leicht abweichende Verteilung der Genotypen innerhalb der Subgruppe der mit dem Genotyp TB1 infizierten Probanden im Vergleich mit denjenigen Fällen, die mit anderen Genotypen infiziert sind. Diese Verteilung ist allerdings nach Bonferroni-Korrektur nicht signifikant ( $p=0,08$ ). Es ist also unwahrscheinlich, dass die Häufung des Genotyps rs6812524 GG durch den Polymorphismus rs7435825 verursacht wird.

TB1 fand sich in der untersuchten Studienpopulation nur in 138 Fällen (8,8% der Infizierten). Die Folge einer entsprechenden Stratifizierung ist, dass die Fallzahlen je nach Ausmaß der Stratifizierungen und der Bildung von Untergruppen abnehmen und damit die statistische Aussagekraft, insbesondere bei den geringen zu erwartenden Effekten, eingeschränkt wird. Um diesem Problem Rechenschaft zu tragen, wurde für alle Berechnungen die statistische Power wie beschrieben berechnet (vgl. 2.3.12.2.).

#### 4.4. Schlussfolgerung

Interaktionen genetischer Varianten des Wirts mit genetischen Charakteristika der Erreger des MTB-Komplexes scheinen maßgeblich zu der Empfänglichkeit für Tuberkulose sowie deren klinischer Ausprägung beizutragen (Lopez *et al.*, 2003; Caws *et al.*, 2008). Nach den bisher vorliegenden Befunden zur Wirtsgenetik ist Tuberkulose als polygene, komplexe Erkrankung durch eine Vielzahl unterschiedlicher Gene beeinflusst. Neben Th1-Zytokinen wie  $IFN\gamma$ , IL-12 oder  $TNF\alpha$  (Lopez-Maderuelo *et al.*, 2003; Fitness *et al.*, 2004; Tso *et al.*, 2005; Cooke *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008) sind weitere immunologische Systeme in die antimykobakterielle Immunantwort involviert. Die einzelnen beeinflussenden genetischen Faktoren zeigen jeweils nur vergleichsweise schwache Assoziationen (Bellamy, 2005). Somit wäre auch der zu erwartende Effekt von genetischen Polymorphismen in *SPP1* gering.

Assoziationen werden in aller Regel erst in großen Studienpopulationen sichtbar, da im anderen Fall die statistische Power nicht groß genug wäre. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Studienpopulation besteht aus insgesamt 4356 Individuen, einer im Vergleich zu anderen Assoziationsstudien sehr großen Population. Ein Trend für eine Assoziation wurde in der Gruppe der Infizierten ( $n = 138$ ) mit dem mykobakteriellen Genotyp TB1

gefunden. Der schützende Effekt, der für die Variante rs6812524 GG bei mit diesem Genotyp infizierten Studienteilnehmern sichtbar wird, erreicht allerdings nach der erforderlichen Bonferroni-Korrektur keine Signifikanz. An der hier untersuchten Studienpopulation konnten jedoch bereits solche differentiellen Effekte einzelner Gene gezeigt werden (Herb *et al.*, 2008; Intemann *et al.*, 2009; Thye *et al.*, 2010).

Aktuell konnte durch die Zusammenführung der hier beschriebenen, in Ghana durchgeführten Erhebung mit einer weiteren genomweiten Assoziationsanalyse aus Gambia, eine Studiengruppe mit insgesamt mehr als 11 000 Individuen untersucht werden. Dabei wurde bestätigt, dass erst in einer Population in der beschriebenen Größe bestimmte Assoziationen sichtbar werden können (Thye *et al.*, 2010).

Es ist somit nicht auszuschliessen, dass der in der vorgelegten Untersuchung als Trend beschriebene Effekt des *SPP1*-Genotyps rs6812524 GG erst in einer noch größeren Studienpopulation, in der der mykobakterielle Genotyp TB1 dann häufiger vorkäme, zu einem signifikanten Assoziationsbefund führen würde.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an einem ghanaischen Probandenkollektiv von 2010 Patienten mit Lungentuberkulose und 2346 gesunden Kontrollindividuen, den Einfluss von genetischen Polymorphismen in *SPP1* auf die Empfänglichkeit und Ausprägung der Lungentuberkulose zu untersuchen. *SPP1* kodiert für das Protein Osteopontin (OPN), das in der Th1-Immunantwort und damit in der Abwehr gegen Mykobakterien eine Rolle spielt.

Zunächst wurden in DNA-Proben von 69 Studienprobanden relevante Abschnitte der genetischen Sequenz von *SPP1* analysiert. Insgesamt fanden sich in diesen Bereichen 31 Polymorphismen. Durch die Auswahl der DNA-Proben von je 23 infizierten, 23 PPD-positiven und 23 PPD-negativen Individuen konnte eine Einschätzung über die Verteilung der Genotypen in den verschiedenen Gruppen erfolgen. Anhand definierter Kriterien erfolgte die Auswahl von 9 Polymorphismen zur weiteren Genotypisierung in dem gesamten Studienkollektiv. Bei dem Vergleich der untersuchten Polymorphismen in der Patienten- und der Kontrollgruppe zeigte sich keine unterschiedliche Verteilung der einzelnen Varianten. Nach Stratifizierung in die verschiedenen mykobakteriellen Genotypen zeigte sich jedoch ein häufigeres Auftreten des *SPP1*-Genotyp rs6812524 GG in der Gruppe der Patienten, die mit dem mykobakteriellen Genotyp TB1 infiziert waren. Dieser Trend war nach Bonferroni-Korrektur jedoch nicht mehr signifikant.

Zusammenfassend ergibt sich ein starker Anhalt für einen Einfluss des *SPP1*-Polymorphismus rs6812524 auf die Abwehr einer Infektion mit dem mykobakteriellen Genotyp TB1.

## 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	Mikro
A	Adenin
APC	Antigen-präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bacille-Calmette-Guérin
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CD	cluster of differentiation
ddH <sub>2</sub> 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
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
IFN	Interferon
IFNGR	Interferon-Gamma-Rezeptor
IL	Interleukin
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
LD	linkage disequilibrium
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MAF	minor allele frequency
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimol
MSMD	mendelian susceptibility to mycobacterial diseases

MTBK	<i>M. tuberculosis</i> -Komplex
n	Nano
NEEO	Niedrige Elektroendosmose
NO	Stickstoffmonoxid
NTM	nicht tuberkulöse Mykobakterien
OPN	Osteopontin
OR	odds ratio
PCR	polymerase chain reaction
PPD	purified portein derivate
RD	region of difference
RKI	Robert-Koch-Institut
SNP	single nucleotid polymorphism
SPP1	secreted phosphoprotein 1
STAT	signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
TbD1	<i>M. tuberculosis</i> Deletion 1
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Units
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organisation



## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383(6603): 787-93.
- Abel, B., Freigang, S., Bachmann, M.F., Boschert, U., Kopf, M. (2005). Osteopontin is not required for the development of Th1 responses and viral immunity. *J Immunol* 175(9): 6006-13.
- Agnholt, J., Kelsen, J., Schack, L., Hvas, C.L., Dahlerup, J.F., Sorensen, E.S. (2007). Osteopontin, a protein with cytokine-like properties, is associated with inflammation in Crohn's disease. *Scand J Immunol* 65(5): 453-60.
- Agnihotri, R., Crawford, H.C., Haro, H., Matrisian, L.M., Havrda, M.C., Liaw, L. (2001). Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol Chem* 276(30): 28261-7.
- Allix-Beguec, C., Harmsen, D., Weniger, T., Supply, P., Niemann, S. (2008). Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *J Clin Microbiol* 46(8): 2692-9.
- Altare, F., Jouanguy, E., Lamhamedi, S., Doffinger, R., Fischer, A., Casanova, J.L. (1998). Mendelian susceptibility to mycobacterial infection in man. *Curr Opin Immunol* 10(4): 413-7.
- Ashkar, S., Weber, G.F., Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M.E., Jansson, M., Zawaideh, S., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Glimcher, M.J., Cantor, H. (2000). Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287(5454): 860-4.
- Bafica, A., Scanga, C.A., Serhan, C., Machado, F., White, S., Sher, A., Aliberti, J. (2005). Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest* 115(6): 1601-6.
- Baker, L., Brown, T., Maiden, M.C., Drobniowski, F. (2004). Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for Mycobacterium tuberculosis. *Emerg Infect Dis* 10(9): 1568-77.
- Barnes, P.F., Lu, S., Abrams, J.S., Wang, E., Yamamura, M., Modlin, R.L. (1993). Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun* 61(8): 3482-9.
- Barrera, L. (2007). The Basics of Clinical Bacteriology. Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care. Palomino, J.C., Leão, S.C., Ritacco, V.
- Barry, S.T., Ludbrook, S.B., Murrison, E., Horgan, C.M. (2000). A regulated interaction between alpha5beta1 integrin and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 267(3): 764-9.
- Basaraba, R.J. (2008). Experimental tuberculosis: the role of comparative pathology in the discovery of improved tuberculosis treatment strategies. *Tuberculosis (Edinb)* 88 Suppl 1: S35-47.
- Bautista, D.S., Denstedt, J., Chambers, A.F., Harris, J.F. (1996). Low-molecular-weight variants of osteopontin generated by serine proteinases in urine of patients with kidney stones. *J Cell Biochem* 61(3): 402-9.
- Bayless, K.J., Davis, G.E. (2001). Identification of dual alpha 4beta1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. *J Biol Chem* 276(16): 13483-9.
- Bayless, K.J., Meininger, G.A., Scholtz, J.M., Davis, G.E. (1998). Osteopontin is a ligand for the alpha4beta1 integrin. *J Cell Sci* 111 ( Pt 9): 1165-74.
- Bellamy, R. (2005). Genetic susceptibility to tuberculosis. *Clin Chest Med* 26(2): 233-46, vi.

- Bellamy, R., Beyers, N., McAdam, K.P., Ruwende, C., Gie, R., Samaai, P., Bester, D., Meyer, M., Corrah, T., Collin, M., Camidge, D.R., Wilkinson, D., Hoal-Van Helden, E., Whittle, H.C., Amos, W., van Helden, P., Hill, A.V. (2000). Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 8005-9.
- Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, K.P., Thursz, M., Whittle, H.C., Hill, A.V. (1999). Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 179(3): 721-4.
- Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, K.P., Whittle, H.C., Hill, A.V. (1998). Assessment of the interleukin 1 gene cluster and other candidate gene polymorphisms in host susceptibility to tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 79(2): 83-9.
- Ben-Ali, M., Barbouche, M.R., Bousnina, S., Chabbou, A., Dellagi, K. (2004). Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 11(3): 625-6.
- Berrington, W.R., Hawn, T.R. (2007). Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* 219: 167-86.
- Blom, T., Franzen, A., Heinegard, D., Holmdahl, R. (2003). Comment on "The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease". *Science* 299(5614): 1845; author reply 1845.
- Borrel, A. (1920). Pneumonie et tuberculosis chez les troupes noires. *Ann. Inst. Pasteur* 3: 105-148.
- Boskey, A.L., Spevak, L., Paschalis, E., Doty, S.B., McKee, M.D. (2002). Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif Tissue Int* 71(2): 145-54.
- Bottema, R.W., Reijmerink, N.E., Koppelman, G.H., Kerkhof, M., Postma, D.S. (2005). Phenotype definition, age, and gender in the genetics of asthma and atopy. *Immunol Allergy Clin North Am* 25(4): 621-39.
- Boyartchuk, V., Rojas, M., Yan, B.S., Jobe, O., Hurt, N., Dorfman, D.M., Higgins, D.E., Dietrich, W.F., Kramnik, I. (2004). The host resistance locus sst1 controls innate immunity to *Listeria monocytogenes* infection in immunodeficient mice. *J Immunol* 173(8): 5112-20.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolingen, D., Cole, S.T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6): 3684-9.
- Brown, L.F., Berse, B., Van de Water, L., Papadopoulos-Sergiou, A., Perruzzi, C.A., Manseau, E.J., Dvorak, H.F., Senger, D.R. (1992). Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 3(10): 1169-80.
- Bruemmer, D., Collins, A.R., Noh, G., Wang, W., Territo, M., Arias-Magallona, S., Fishbein, M.C., Blaschke, F., Kintscher, U., Graf, K., Law, R.E., Hsueh, W.A. (2003). Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J Clin Invest* 112(9): 1318-31.
- Bulmer, M. (1988). Codon usage and intragenic position. *J Theor Biol* 133(1): 67-71.
- Cailhol, J., Decludt, B., Che, D. (2005). Sociodemographic factors that contribute to the development of extrapulmonary tuberculosis were identified. *J Clin Epidemiol* 58(10): 1066-71.
- Carlson, I., Tognazzi, K., Manseau, E.J., Dvorak, H.F., Brown, L.F. (1997). Osteopontin is strongly expressed by histiocytes in granulomas of diverse etiology. *Lab Invest* 77(1): 103-8.

- Casanova, J.L., Abel, L. (2002). Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* 20: 581-620.
- Caws, M., Thwaites, G., Dunstan, S., Hawn, T.R., Lan, N.T., Thuong, N.T., Stepniewska, K., Huyen, M.N., Bang, N.D., Loc, T.H., Gagneux, S., van Soolingen, D., Kremer, K., van der Sande, M., Small, P., Anh, P.T., Chinh, N.T., Quy, H.T., Duyen, N.T., Tho, D.Q., Hieu, N.T., Torok, E., Hien, T.T., Dung, N.H., Nhu, N.T., Duy, P.M., van Vinh Chau, N., Farrar, J. (2008). The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 4(3): e1000034.
- Chabas, D., Baranzini, S.E., Mitchell, D., Bernard, C.C., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Sobel, R.A., Lock, C., Karpuj, M., Pedotti, R., Heller, R., Oksenberg, J.R., Steinman, L. (2001). The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 294(5547): 1731-5.
- Chellaiah, M.A., Hruska, K.A. (2003). The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int* 72(3): 197-205.
- Chiba, S., Okamoto, H., Kon, S., Kimura, C., Murakami, M., Inobe, M., Matsui, Y., Sugawara, T., Shimizu, T., Uede, T., Kitabatake, A. (2002). Development of atherosclerosis in osteopontin transgenic mice. *Heart Vessels* 16(3): 111-7.
- Chiba, S., Rashid, M.M., Okamoto, H., Shiraiwa, H., Kon, S., Maeda, M., Murakami, M., Inobe, M., Kitabatake, A., Chambers, A.F., Uede, T. (2000). The role of osteopontin in the development of granulomatous lesions in lung. *Microbiol Immunol* 44(4): 319-32.
- Chiocchetti, A., Comi, C., Indelicato, M., Castelli, L., Mesturini, R., Bensi, T., Mazzarino, M.C., Giordano, M., D'Alfonso, S., Momigliano-Richiardi, P., Liguori, M., Zorzon, M., Amoroso, A., Trojano, M., Monaco, F., Leone, M., Magnani, C., Dianzani, U. (2005). Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol* 163(1-2): 172-8.
- Chiocchetti, A., Indelicato, M., Bensi, T., Mesturini, R., Giordano, M., Sametti, S., Castelli, L., Bottarel, F., Mazzarino, M.C., Garbarini, L., Giacobelli, F., Valesini, G., Santoro, C., Dianzani, I., Ramenghi, U., Dianzani, U. (2004). High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 103(4): 1376-82.
- Choi, J.S., Cha, J.H., Park, H.J., Chung, J.W., Chun, M.H., Lee, M.Y. (2004). Transient expression of osteopontin mRNA and protein in amoeboid microglia in developing rat brain. *Exp Brain Res* 154(3): 275-80.
- Christensen, B., Kazanecki, C.C., Petersen, T.E., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Sorensen, E.S. (2007). Cell type-specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties. *J Biol Chem* 282(27): 19463-72.
- Christensen, B., Nielsen, M.S., Haselmann, K.F., Petersen, T.E., Sorensen, E.S. (2005). Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications. *Biochem J* 390(Pt 1): 285-92.
- Cohen, J. (1969). Statistical power analysis for the behavioral sciences. New York, Academic Press.
- Comstock, G.W. (1978). Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am Rev Respir Dis* 117(4): 621-4.
- Cooke, G.S., Campbell, S.J., Sillah, J., Gustafson, P., Bah, B., Sirugo, G., Bennett, S., McAdam, K.P., Sow, O., Lienhardt, C., Hill, A.V. (2006). Polymorphism within the interferon-

- gamma/receptor complex is associated with pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 174(3): 339-43.
- Cooper, A.M., Magram, J., Ferrante, J., Orme, I.M. (1997). Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 186(1): 39-45.
- Craig, A.M., Denhardt, D.T. (1991). The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone. *Gene* 100: 163-71.
- Craig-Mylius, K., Weber, G.F., Coburn, J., Glickstein, L. (2005). *Borrelia burgdorferi*, an extracellular pathogen, circumvents osteopontin in inducing an inflammatory cytokine response. *J Leukoc Biol* 77(5): 710-8.
- Crawford, H.C., Matrisian, L.M., Liaw, L. (1998). Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression in vivo. *Cancer Res* 58(22): 5206-15.
- Crosby, A.H., Lyu, M.S., Lin, K., McBride, O.W., Kerr, J.M., Aplin, H.M., Fisher, L.W., Young, M.F., Kozak, C.A., Dixon, M.J. (1996). Mapping of the human and mouse bone sialoprotein and osteopontin loci. *Mamm Genome* 7(2): 149-51.
- Cummins, S.L. (1908). Tuberculosis in the Egyptian Army. *Br. J. Tuberc.* 1: 35-78.
- D'Alfonso, S., Barizzone, N., Giordano, M., Chiocchetti, A., Magnani, C., Castelli, L., Indelicato, M., Giacopelli, F., Marchini, M., Scorza, R., Danieli, M.G., Cappelli, M., Migliaresi, S., Bigliardo, B., Sabbadini, M.G., Baldissera, E., Galeazzi, M., Sebastiani, G.D., Minisola, G., Ravazzolo, R., Dianzani, U., Momigliano-Richiardi, P. (2005). Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52(2): 539-47.
- Dean, M., Carrington, M., O'Brien, S.J. (2002). Balanced polymorphism selected by genetic versus infectious human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3: 263-92.
- Delgado, J.C., Baena, A., Thim, S., Goldfeld, A.E. (2002). Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 186(10): 1463-8.
- Denda, S., Reichardt, L.F., Muller, U. (1998). Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin alpha8 beta1 and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol Biol Cell* 9(6): 1425-35.
- Denhardt, D.T., Guo, X. (1993). Osteopontin: a protein with diverse functions. *Faseb J* 7(15): 1475-82.
- Denhardt, D.T., Noda, M., O'Regan, A.W., Pavlin, D., Berman, J.S. (2001). Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 107(9): 1055-61.
- Detjen, A.K., Keil, T., Roll, S., Hauer, B., Mauch, H., Wahn, U., Magdorf, K. (2007). Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 45(3): 322-8.
- Detjen, A.K., Magdorf, K. (2009). [Characteristics of childhood tuberculosis]. *Pneumologie* 63(4): 207-18.
- Diao, H., Kon, S., Iwabuchi, K., Kimura, C., Morimoto, J., Ito, D., Segawa, T., Maeda, M., Hamuro, J., Nakayama, T., Taniguchi, M., Yagita, H., Van Kaer, L., Onoe, K., Denhardt, D., Rittling, S., Uede, T. (2004). Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* 21(4): 539-50.

- Diel, R., Ernst, M., Doscher, G., Visuri-Karbe, L., Greinert, U., Niemann, S., Nienhaus, A., Lange, C. (2006). Avoiding the effect of BCG vaccination in detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection with a blood test. *Eur Respir J* 28(1): 16-23.
- Filliol, I., Motiwala, A.S., Cavatore, M., Qi, W., Hazbon, M.H., Bobadilla del Valle, M., Fyfe, J., Garcia-Garcia, L., Rastogi, N., Sola, C., Zozio, T., Guerrero, M.I., Leon, C.I., Crabtree, J., Angiuoli, S., Eisenach, K.D., Durmaz, R., Joloba, M.L., Rendon, A., Sifuentes-Osornio, J., Ponce de Leon, A., Cave, M.D., Fleischmann, R., Whittam, T.S., Alland, D. (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): 759-72.
- Fisher, L.W., Torchia, D.A., Fohr, B., Young, M.F., Fedarko, N.S. (2001). Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 280(2): 460-5.
- Fitness, J., Floyd, S., Warndorff, D.K., Sichali, L., Malema, S., Crampin, A.C., Fine, P.E., Hill, A.V. (2004). Large-scale candidate gene study of tuberculosis susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 71(3): 341-9.
- Fleischmann, R.D., Alland, D., Eisen, J.A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., DeBoy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey, E., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Umayam, L.A., Ermolaeva, M., Salzberg, S.L., Delcher, A., Utterback, T., Weidman, J., Khouri, H., Gill, J., Mikula, A., Bishai, W., Jacobs Jr, W.R., Jr., Venter, J.C., Fraser, C.M. (2002). Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 184(19): 5479-90.
- 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., Schreiber, R., Mak, T.W., Bloom, B.R. (1995). Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2(6): 561-72.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physik* 437: 55.
- Forton, A.C., Petri, M.A., Goldman, D., Sullivan, K.E. (2002). An osteopontin (SPP1) polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. *Hum Mutat* 19(4): 459.
- Franzen, A., Heinegard, D. (1985). Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 232(3): 715-24.
- Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., de Jong, B.C., Narayanan, S., Nicol, M., Niemann, S., Kremer, K., Gutierrez, M.C., Hilty, M., Hopewell, P.C., Small, P.M. (2006). Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8): 2869-73.
- Gagneux, S., Small, P.M. (2007). Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* 7(5): 328-37.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S.V., Hewinson, R.G. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(13): 7877-82.
- Gatfield, J., Pieters, J. (2000). Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 288(5471): 1647-50.

- Giachelli, C.M., Lombardi, D., Johnson, R.J., Murry, C.E., Almeida, M. (1998). Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol* 152(2): 353-8.
- Giacopelli, F., Marciano, R., Pistorio, A., Catarsi, P., Canini, S., Karsenty, G., Ravazzolo, R. (2004). Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol Genomics* 20(1): 87-96.
- Gillespie, J.H. (1998). Population Genetics, John Hopkins University Press.
- Golden, M.P., Vikram, H.R. (2005). Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician* 72(9): 1761-8.
- Goldfeld, A.E. (2004). Genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. *Tuberculosis (Edinb)* 84(1-2): 76-81.
- Goldfeld, A.E., Delgado, J.C., Thim, S., Bozon, M.V., Ugliero, A.M., Turbay, D., Cohen, C., Yunis, E.J. (1998). Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. *Jama* 279(3): 226-8.
- Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Mercier, R., Pave, A. (1980). Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Res* 8(1): r49-r62.
- Green, P.M., Ludbrook, S.B., Miller, D.D., Horgan, C.M., Barry, S.T. (2001). Structural elements of the osteopontin SVVYGLR motif important for the interaction with alpha(4) integrins. *FEBS Lett* 503(1): 75-9.
- Guinn, K.M., Hickey, M.J., Mathur, S.K., Zakel, K.L., Grotzke, J.E., Lewinsohn, D.M., Smith, S., Sherman, D.R. (2004). Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* 51(2): 359-70.
- Gutacker, M.M., Mathema, B., Soini, H., Shashkina, E., Kreiswirth, B.N., Graviss, E.A., Musser, J.M. (2006). Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of Mycobacterium tuberculosis strains from 4 geographic sites. *J Infect Dis* 193(1): 121-8.
- Gutacker, M.M., Smoot, J.C., Migliaccio, C.A., Ricklefs, S.M., Hua, S., Cousins, D.V., Graviss, E.A., Shashkina, E., Kreiswirth, B.N., Musser, J.M. (2002). Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in Mycobacterium tuberculosis complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* 162(4): 1533-43.
- Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., Supply, P., Vincent, V. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog* 1(1): e5.
- Haldane, J.B.S. (1949). Disease and Evolution. *La Ricerca Scientifica* 19: 2-11.
- Hauer, B. (2008). Interferon-Gamma-Release-Assays zur Diagnose der tuberkulösen Infektion. *Mikrobiologie* 18: 67-75.
- Hawkins, B.R., Higgins, D.A., Chan, S.L., Lowrie, D.B., Mitchison, D.A., Girling, D.J. (1988). HLA typing in the Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council study of factors associated with the breakdown to active tuberculosis of inactive pulmonary lesions. *Am Rev Respir Dis* 138(6): 1616-21.
- Henderson, R.A., Watkins, S.C., Flynn, J.L. (1997). Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 159(2): 635-43.
- Herb, F., Thye, T., Niemann, S., Browne, E.N., Chinbuah, M.A., Gyapong, J., Osei, I., Owusu-Dabo, E., Werz, O., Rusch-Gerdes, S., Horstmann, R.D., Meyer, C.G. (2008). ALOX5 variants associated with susceptibility to human pulmonary tuberculosis. *Hum Mol Genet* 17(7): 1052-60.

- Hershberg, R., Lipatov, M., Small, P.M., Sheffer, H., Niemann, S., Homolka, S., Roach, J.C., Kremer, K., Petrov, D.A., Feldman, M.W., Gagneux, S. (2008). High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol* 6(12): e311.
- Hill, A.V. (1998). The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol* 16: 593-617.
- Hirsh, A.E., Tsolaki, A.G., DeRiemer, K., Feldman, M.W., Small, P.M. (2004). Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14): 4871-6.
- Homolka, S., Koser, C., Archer, J., Rusch-Gerdes, S., Niemann, S. (2009). Single-nucleotide polymorphisms in Rv2629 are specific for *Mycobacterium tuberculosis* genotypes Beijing and Ghana but not associated with rifampin resistance. *J Clin Microbiol* 47(1): 223-6.
- Horstmann, R.D. (2003). Genetik der Empfänglichkeit und Resistenz gegenüber Tuberkulose. *Internist (Berl)* 44(11): 1385-93.
- Hou, P., Troen, T., Ovejero, M.C., Kirkegaard, T., Andersen, T.L., Byrjalsen, I., Ferreras, M., Sato, T., Shapiro, S.D., Foged, N.T., Delaisse, J.M. (2004). Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. *Bone* 34(1): 37-47.
- Hsieh, Y.H., Juliana, M.M., Hicks, P.H., Feng, G., Elmets, C., Liaw, L., Chang, P.L. (2006). Papilloma development is delayed in osteopontin-null mice: implicating an antiapoptosis role for osteopontin. *Cancer Res* 66(14): 7119-27.
- Hu, Z., Lin, D., Yuan, J., Xiao, T., Zhang, H., Sun, W., Han, N., Ma, Y., Di, X., Gao, M., Ma, J., Zhang, J., Cheng, S., Gao, Y. (2005). Overexpression of osteopontin is associated with more aggressive phenotypes in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11(13): 4646-52.
- Inomata, S., Shijubo, N., Kon, S., Maeda, M., Yamada, G., Sato, N., Abe, S., Uede, T. (2005). Circulating interleukin-18 and osteopontin are useful to evaluate disease activity in patients with tuberculosis. *Cytokine* 30(4): 203-11.
- Intemann, C.D., Thye, T., Niemann, S., Browne, E.N., Amanua Chinbuah, M., Enimil, A., Gyapong, J., Osei, I., Owusu-Dabo, E., Helm, S., Rusch-Gerdes, S., Horstmann, R.D., Meyer, C.G. (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.
- Isoda, K., Kamezawa, Y., Ayaori, M., Kusuhara, M., Tada, N., Ohsuzu, F. (2003). Osteopontin transgenic mice fed a high-cholesterol diet develop early fatty-streak lesions. *Circulation* 107(5): 679-81.
- Isoda, K., Nishikawa, K., Kamezawa, Y., Yoshida, M., Kusuhara, M., Moroi, M., Tada, N., Ohsuzu, F. (2002). Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res* 91(1): 77-82.
- Jimenez-Corona, M.E., Garcia-Garcia, L., DeRiemer, K., Ferreyra-Reyes, L., Bobadilla-del-Valle, M., Cano-Arellano, B., Canizales-Quintero, S., Martinez-Gamboa, A., Small, P.M., Sifuentes-Osornio, J., Ponce-de-Leon, A. (2006). Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area. *Thorax* 61(4): 348-53.
- Jin, J., Sun, L., Jiao, W., Zhao, S., Li, H., Guan, X., Jiao, A., Jiang, Z., Shen, A. (2009). SLC11A1 (Formerly NRAMP1) gene polymorphisms associated with pediatric tuberculosis in China. *Clin Infect Dis* 48(6): 733-8.

- Jouanguy, E., Lamhamedi-Cherradi, S., Altare, F., Fondaneche, M.C., Tuerlinckx, D., Blanche, S., Emile, J.F., Gaillard, J.L., Schreiber, R., Levin, M., Fischer, A., Hivroz, C., Casanova, J.L. (1997). Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J Clin Invest* 100(11): 2658-64.
- Kaartinen, M.T., Pirhonen, A., Linnala-Kankkunen, A., Maenpaa, P.H. (1997). Transglutaminase-catalyzed cross-linking of osteopontin is inhibited by osteocalcin. *J Biol Chem* 272(36): 22736-41.
- Kallmann, F., Reisner, D. (1943). Twin studies on the significance of genetic factors in tuberculosis. *Am. Rev. Tuberc.* 47: 549-74.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35(4): 907-14.
- Kassim, S., Zuber, P., Wiktor, S.Z., Diomande, F.V., Coulibaly, I.M., Coulibaly, D., Kadio, A., Yapi, A., Toure, K.C., Blekou, P.B., Irie, B., Greenberg, A.E., Binkin, N.J. (2000). Tuberculin skin testing to assess the occupational risk of Mycobacterium tuberculosis infection among health care workers in Abidjan, Cote d'Ivoire. *Int J Tuberc Lung Dis* 4(4): 321-6.
- Katagiri, Y.U., Sleeman, J., Fujii, H., Herrlich, P., Hotta, H., Tanaka, K., Chikuma, S., Yagita, H., Okumura, K., Murakami, M., Saiki, I., Chambers, A.F., Uede, T. (1999). CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res* 59(1): 219-26.
- Kaufmann, S.H. (1999). Killing vs suicide in antibacterial defence. *Trends Microbiol* 7(2): 59-61.
- Kawamura, K., Lyonaga, K., Ichiyasu, H., Nagano, J., Suga, M., Sasaki, Y. (2005). Differentiation, maturation, and survival of dendritic cells by osteopontin regulation. *Clin Diagn Lab Immunol* 12(1): 206-12.
- Kazanecki, C.C., Uzwiak, D.J., Denhardt, D.T. (2007). Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *J Cell Biochem* 102(4): 912-24.
- Kettaneh, A., Seng, L., Tiev, K.P., Toledano, C., Fabre, B., Cabane, J. (2006). Human leukocyte antigens and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis of case-control studies. *Int J Tuberc Lung Dis* 10(7): 717-25.
- Khajoev, V., Saito, M., Takada, H., Nomura, A., Kusuhara, K., Yoshida, S.I., Yoshikai, Y., Hara, T. (2006). Novel roles of osteopontin and CXC chemokine ligand 7 in the defence against mycobacterial infection. *Clin Exp Immunol* 143(2): 260-8.
- Kiefer, M.C., Bauer, D.M., Barr, P.J. (1989). The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin. *Nucleic Acids Res* 17(8): 3306.
- Koguchi, Y., Kawakami, K., Uezu, K., Fukushima, K., Kon, S., Maeda, M., Nakamoto, A., Owan, I., Kuba, M., Kudeken, N., Azuma, M., Yara, S., Shinzato, T., Higa, F., Tateyama, M., Kadota, J., Mukae, H., Kohno, S., Uede, T., Saito, A. (2003). High plasma osteopontin level and its relationship with interleukin-12-mediated type 1 T helper cell response in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167(10): 1355-9.
- Koh, A., da Silva, A.P., Bansal, A.K., Bansal, M., Sun, C., Lee, H., Glogauer, M., Sodek, J., Zohar, R. (2007). Role of osteopontin in neutrophil function. *Immunology* 122(4): 466-75.
- Kolb, A., Kleeff, J., Guweidhi, A., Esposito, I., Giese, N.A., Adwan, H., Giese, T., Buchler, M.W., Berger, M.R., Friess, H. (2005). Osteopontin influences the invasiveness of pancreatic



- cancer cells and is increased in neoplastic and inflammatory conditions. *Cancer Biol Ther* 4(7): 740-6.
- Konno, S., Hoshi, T., Taira, T., Plunkett, B., Huang, S.K. (2005). Endotoxin contamination contributes to the in vitro cytokine-inducing activity of osteopontin preparations. *J Interferon Cytokine Res* 25(5): 277-82.
- Kritski, A., Melo, F.A.F.d. (2007). Tuberculosis in Adults. Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care. Palomino, J.C., Leão, S.C., Ritacco, V.
- Kumar, D., Watson, J.M., Charlett, A., Nicholas, S., Darbyshire, J.H. (1997). Tuberculosis in England and Wales in 1993: results of a national survey. Public Health Laboratory Service/British Thoracic Society/Department of Health Collaborative Group. *Thorax* 52(12): 1060-7.
- Kumar, G., Rech, R., Kopolka, K., K. Lavrenov, E. Garnova, S. Lavasini, R. Deadman, Hamilton, S. (2007). Genomic DnA preparation using illustra GenomiPhi V2 and HY DnA Amplification Kits. *Discovery Matters* 6.
- Kumar, V., Khosla, R., Gupta, V., Sarin, B.C., Sehajpal, P.K. (2008). Differential association of tumour necrosis factor-alpha single nucleotide polymorphism (-308) with tuberculosis and bronchial asthma. *Natl Med J India* 21(3): 120-2.
- Ladel, C.H., Szalay, G., Riedel, D., Kaufmann, S.H. (1997). Interleukin-12 secretion by Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *Infect Immun* 65(5): 1936-8.
- Lalvani, A., Brookes, R., Wilkinson, R.J., Malin, A.S., Pathan, A.A., Andersen, P., Dockrell, H., Pasvol, G., Hill, A.V. (1998). Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1): 270-5.
- Lange, B. (1930). Untersuchungen zur Klärung der Ursachen der im Anschluss an die Calmette-Impfung augetretenen Säuglingserkrankungen in Lübeck. *Zeitschr Tuberkulose* 59: 1-18.
- Lee, J.Y., Lee, K.S., Jung, K.J., Han, J., Kwon, O.J., Kim, J., Kim, T.S. (2000). Pulmonary tuberculosis: CT and pathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr* 24(5): 691-8.
- Lewis, S.J., Baker, I., Davey Smith, G. (2005). Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and pulmonary tuberculosis risk. *Int J Tuberc Lung Dis* 9(10): 1174-7.
- 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.
- Liaw, L., Almeida, M., Hart, C.E., Schwartz, S.M., Giachelli, C.M. (1994). Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ Res* 74(2): 214-24.
- Liaw, L., Lindner, V., Schwartz, S.M., Chambers, A.F., Giachelli, C.M. (1995a). Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ Res* 77(4): 665-72.
- Liaw, L., Lombardi, D.M., Almeida, M.M., Schwartz, S.M., deBlois, D., Giachelli, C.M. (1997). Neutralizing antibodies directed against osteopontin inhibit rat carotid neointimal thickening after endothelial denudation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(1): 188-93.
- Liaw, L., Skinner, M.P., Raines, E.W., Ross, R., Cheresch, D.A., Schwartz, S.M., Giachelli, C.M. (1995b). The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest* 95(2): 713-24.

- Lin, Y., Zhang, M., Hofman, F.M., Gong, J., Barnes, P.F. (1996). Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun* 64(4): 1351-6.
- Lopez, B., Aguilar, D., Orozco, H., Burger, M., Espitia, C., Ritacco, V., Barrera, L., Kremer, K., Hernandez-Pando, R., Huygen, K., van Soolingen, D. (2003). A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes. *Clin Exp Immunol* 133(1): 30-7.
- Lopez-Maderuelo, D., Arnalich, F., Serantes, R., Gonzalez, A., Codoceo, R., Madero, R., Vazquez, J.J., Montiel, C. (2003). Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167(7): 970-5.
- MacMicking, J.D., North, R.J., LaCourse, R., Mudgett, J.S., Shah, S.K., Nathan, C.F. (1997). Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10): 5243-8.
- Maeno, Y., Nakazawa, S., Dao le, D., Van Tuan, N., Giang, N.D., Van Hanh, T., Taniguchi, K. (2006). Osteopontin is involved in Th1-mediated immunity against Plasmodium falciparum infection in a holoendemic malaria region in Vietnam. *Acta Trop* 98(3): 305-10.
- Malik, A.N., Godfrey-Faussett, P. (2005). Effects of genetic variability of Mycobacterium tuberculosis strains on the presentation of disease. *Lancet Infect Dis* 5(3): 174-83.
- Manca, C., Reed, M.B., Freeman, S., Mathema, B., Kreiswirth, B., Barry, C.E., 3rd, Kaplan, G. (2004). Differential monocyte activation underlies strain-specific Mycobacterium tuberculosis pathogenesis. *Infect Immun* 72(9): 5511-4.
- Manca, C., Tsenova, L., Barry, C.E., 3rd, Bergtold, A., Freeman, S., Haslett, P.A., Musser, J.M., Freedman, V.H., Kaplan, G. (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): 6740-6.
- Manca, C., Tsenova, L., Bergtold, A., Freeman, S., Tovey, M., Musser, J.M., Barry, C.E., 3rd, Freedman, V.H., Kaplan, G. (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): 5752-7.
- Marciano, R., Giacomelli, F., Divizia, M.T., Gattorno, M., Felici, E., Pistorio, A., Martini, A., Ravazzolo, R., Picco, P. (2006). A polymorphic variant inside the osteopontin gene shows association with disease course in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 65(5): 662-5.
- Martin, S.M., Schwartz, J.L., Giachelli, C.M., Ratner, B.D. (2004). Enhancing the biological activity of immobilized osteopontin using a type-1 collagen affinity coating. *J Biomed Mater Res A* 70(1): 10-9.
- Martineau, A.R., Newton, S.M., Wilkinson, K.A., Kampmann, B., Hall, B.M., Nawroly, N., Packe, G.E., Davidson, R.N., Griffiths, C.J., Wilkinson, R.J. (2007). Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J Clin Invest* 117(7): 1988-94.
- Matsui, Y., Rittling, S.R., Okamoto, H., Inobe, M., Jia, N., Shimizu, T., Akino, M., Sugawara, T., Morimoto, J., Kimura, C., Kon, S., Denhardt, D., Kitabatake, A., Uede, T. (2003). Osteopontin deficiency attenuates atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(6): 1029-34.
- McKee, M.D., Nanci, A. (1996a). Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech* 33(2): 141-64.

- McKee, M.D., Nanci, A. (1996b). Secretion of Osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues: a potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis. *Anat Rec* 245(2): 394-409.
- McKinney, J.D., Honer zu Bentrup, K., Munoz-Elias, E.J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W.T., Swenson, D., Sacchetti, J.C., Jacobs, W.R., Jr., Russell, D.G. (2000). Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406(6797): 735-8.
- Meyer, C.G., Scarisbrick, G., Niemann, S., Browne, E.N., Chinbuah, M.A., Gyapong, J., Osei, I., Owusu-Dabo, E., Kubica, T., Rusch-Gerdes, S., Thye, T., Horstmann, R.D. (2008). Pulmonary tuberculosis: virulence of *Mycobacterium africanum* and relevance in HIV co-infection. *Tuberculosis (Edinb)* 88(5): 482-9.
- Miyazaki, Y., Setoguchi, M., Yoshida, S., Higuchi, Y., Akizuki, S., Yamamoto, S. (1990). The mouse osteopontin gene. Expression in monocytic lineages and complete nucleotide sequence. *J Biol Chem* 265(24): 14432-8.
- Mukherjee, B.B., Nemir, M., Beninati, S., Cordella-Miele, E., Singh, K., Chackalaparampil, I., Shanmugam, V., DeVouge, M.W., Mukherjee, A.B. (1995). Interaction of osteopontin with fibronectin and other extracellular matrix molecules. *Ann N Y Acad Sci* 760: 201-12.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.
- Murry, C.E., Giachelli, C.M., Schwartz, S.M., Vracko, R. (1994). Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol* 145(6): 1450-62.
- Nagai, S., Hashimoto, S., Yamashita, T., Toyoda, N., Satoh, T., Suzuki, T., Matsushima, K. (2001). Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1- and T(h)2-polarized cells. *Int Immunol* 13(3): 367-76.
- Naito, M., Matsui, A., Inao, M., Nagoshi, S., Nagano, M., Ito, N., Egashira, T., Hashimoto, M., Mishihiro, S., Mochida, S., Fujiwara, K. (2005). SNPs in the promoter region of the osteopontin gene as a marker predicting the efficacy of interferon-based therapies in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 40(4): 381-8.
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Okamura, H. (2001). Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 12(1): 53-72.
- Nau, G.J., Chupp, G.L., Emile, J.F., Jouanguy, E., Berman, J.S., Casanova, J.L., Young, R.A. (2000). Osteopontin expression correlates with clinical outcome in patients with mycobacterial infection. *Am J Pathol* 157(1): 37-42.
- Nau, G.J., Guilfoile, P., Chupp, G.L., Berman, J.S., Kim, S.J., Kornfeld, H., Young, R.A. (1997). A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(12): 6414-9.
- Nau, G.J., Liaw, L., Chupp, G.L., Berman, J.S., Hogan, B.L., Young, R.A. (1999). Attenuated host resistance against *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice lacking osteopontin. *Infect Immun* 67(8): 4223-30.
- Nevo, Y., Nelson, N. (2006). The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochim Biophys Acta* 1763(7): 609-20.
- Newport, M.J., Huxley, C.M., Huston, S., Hawrylowicz, C.M., Oostra, B.A., Williamson, R., Levin, M. (1996). A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 335(26): 1941-9.

- Niino, M., Kikuchi, S., Fukazawa, T., Yabe, I., Tashiro, K. (2003). Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol* 136(1-2): 125-9.
- North, R.J., Jung, Y.J. (2004). Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 22: 599-623.
- Noti, J.D. (2000). Adherence to osteopontin via alphavbeta3 suppresses phorbol ester-mediated apoptosis in MCF-7 breast cancer cells that overexpress protein kinase C-alpha. *Int J Oncol* 17(6): 1237-43.
- Nystrom, T., Duner, P., Hultgardh-Nilsson, A. (2007). A constitutive endogenous osteopontin production is important for macrophage function and differentiation. *Exp Cell Res* 313(6): 1149-60.
- O'Brien, E.R., Garvin, M.R., Stewart, D.K., Hinohara, T., Simpson, J.B., Schwartz, S.M., Giachelli, C.M. (1994). Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb* 14(10): 1648-56.
- O'Regan, A.W., Chupp, G.L., Lowry, J.A., Goetschkes, M., Mulligan, N., Berman, J.S. (1999). Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol* 162(2): 1024-31.
- O'Regan, A.W., Hayden, J.M., Berman, J.S. (2000). Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol* 68(4): 495-502.
- O'Regan, A.W., Hayden, J.M., Body, S., Liaw, L., Mulligan, N., Goetschkes, M., Berman, J.S. (2001). Abnormal pulmonary granuloma formation in osteopontin-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 164(12): 2243-7.
- Oates, A.J., Barraclough, R., Rudland, P.S. (1996). The identification of osteopontin as a metastasis-related gene product in a rodent mammary tumour model. *Oncogene* 13(1): 97-104.
- Ogus, A.C., Yoldas, B., Ozdemir, T., Uguz, A., Olcen, S., Keser, I., Coskun, M., Cilli, A., Yegin, O. (2004). The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* 23(2): 219-23.
- Ohshima, S., Yamaguchi, N., Nishioka, K., Mima, T., Ishii, T., Umeshita-Sasai, M., Kobayashi, H., Shimizu, M., Katada, Y., Wakitani, S., Murata, N., Nomura, S., Matsuno, H., Katayama, R., Kon, S., Inobe, M., Uede, T., Kawase, I., Saeki, Y. (2002). Enhanced local production of osteopontin in rheumatoid joints. *J Rheumatol* 29(10): 2061-7.
- Oldberg, A., Franzen, A., Heinegard, D. (1986). Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(23): 8819-23.
- Ophascharoensuk, V., Giachelli, C.M., Gordon, K., Hughes, J., Pichler, R., Brown, P., Liaw, L., Schmidt, R., Shankland, S.J., Alpers, C.E., Couser, W.G., Johnson, R.J. (1999). Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int* 56(2): 571-80.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J.S., Moore, K.W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J.F., Kastelein, R.A. (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13(5): 715-25.

- Oral, H.B., Budak, F., Uzaslan, E.K., Basturk, B., Bekar, A., Akalin, H., Ege, E., Ener, B., Goral, G. (2006). Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. *Cytokine* 35(3-4): 143-7.
- Orme, I.M., Roberts, A.D. (2001). Animal models of mycobacteria infection. *Curr Protoc Immunol* Chapter 19: Unit 19 5.
- Ottenhoff, T.H., Verreck, F.A., Hoeve, M.A., van de Vosse, E. (2005). Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* 85(1-2): 53-64.
- Pai, M., Ramsay, A., O'Brien, R. (2008a). Evidence-based tuberculosis diagnosis. *PLoS Med* 5(7): e156.
- Pai, M., Zwerling, A., Menzies, D. (2008b). Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med* 149(3): 177-84.
- Patarca, R., Freeman, G.J., Singh, R.P., Wei, F.Y., Durfee, T., Blattner, F., Regnier, D.C., Kozak, C.A., Mock, B.A., Morse, H.C., 3rd, et al. (1989). Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med* 170(1): 145-61.
- Patarca, R., Saavedra, R.A., Cantor, H. (1993). Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol* 13(3-4): 225-46.
- Pflanz, S., Timans, J.C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Wagner, J.L., To, W., Zurawski, S., McClanahan, T.K., Gorman, D.M., Bazan, J.F., de Waal Malefyt, R., Rennick, D., Kastelein, R.A. (2002). IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16(6): 779-90.
- Picard, C., Fieschi, C., Altare, F., Al-Jumaah, S., Al-Hajjar, S., Feinberg, J., Dupuis, S., Soudais, C., Al-Mohsen, I.Z., Genin, E., Lammas, D., Kumararatne, D.S., Leclerc, T., Rafii, A., Frayha, H., Murugasu, B., Wah, L.B., Sinniah, R., Loubser, M., Okamoto, E., Al-Ghonaium, A., Tufenkeji, H., Abel, L., Casanova, J.L. (2002). Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am J Hum Genet* 70(2): 336-48.
- Pollack, S.B., Linnemeyer, P.A., Gill, S. (1994). Induction of osteopontin mRNA expression during activation of murine NK cells. *J Leukoc Biol* 55(3): 398-400.
- Porcelli, S.A., Modlin, R.L. (1999). The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 17: 297-329.
- Potter, M.R., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Roper, R.J., Weis, J.H., Teuscher, C., Weis, J.J. (2002). Role of osteopontin in murine Lyme arthritis and host defense against *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 70(3): 1372-81.
- Ragno, S., Romano, M., Howell, S., Pappin, D.J., Jenner, P.J., Colston, M.J. (2001). Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology* 104(1): 99-108.
- Remus, N., Reichenbach, J., Picard, C., Rietschel, C., Wood, P., Lammas, D., Kumararatne, D.S., Casanova, J.L. (2001). Impaired interferon gamma-mediated immunity and susceptibility to mycobacterial infection in childhood. *Pediatr Res* 50(1): 8-13.
- Renkl, A.C., Wussler, J., Ahrens, T., Thoma, K., Kon, S., Uede, T., Martin, S.F., Simon, J.C., Weiss, J.M. (2005). Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype. *Blood* 106(3): 946-55.
- Rieder, H.L. (2003). Die Abklärung der Lübecker Säuglingstuberkulose. *Pneumologie* 57(7): 402-5.

- RKI. (2009). "Tuberkulose." RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten- Merkblätter für Ärzte.
- Roach, D.R., Briscoe, H., Saunders, B., France, M.P., Riminton, S., Britton, W.J. (2001). Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J Exp Med* 193(2): 239-46.
- Robinson, M., Lilley, R., Little, S., Emtage, J.S., Yarranton, G., Stephens, P., Millican, A., Eaton, M., Humphreys, G. (1984). Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 12(17): 6663-71.
- Rollo, E.E., Denhardt, D.T. (1996a). Differential effects of osteopontin on the cytotoxic activity of macrophages from young and old mice. *Immunology* 88(4): 642-7.
- Rollo, E.E., Laskin, D.L., Denhardt, D.T. (1996b). Osteopontin inhibits nitric oxide production and cytotoxicity by activated RAW264.7 macrophages. *J Leukoc Biol* 60(3): 397-404.
- Rüsch-Gerdes, S., Hillemann, D. (2008). Moderne mykobakteriologische Labordiagnostik. *Pneumologie* 62(9): 533-40.
- Saitoh, Y., Kuratsu, J., Takeshima, H., Yamamoto, S., Ushio, Y. (1995). Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy. *Lab Invest* 72(1): 55-63.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Sanjeevi, C.B., Narayanan, P.R., Prabakar, R., Charles, N., Thomas, B.E., Balasubramaniam, R., Olerup, O. (1992). No association or linkage with HLA-DR or -DQ genes in south Indians with pulmonary tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 73(5): 280-4.
- Scatena, M., Liaw, L., Giachelli, C.M. (2007). Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(11): 2302-9.
- Schnapp, L.M., Hatch, N., Ramos, D.M., Klimanskaya, I.V., Sheppard, D., Pytela, R. (1995). The human integrin alpha 8 beta 1 functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. *J Biol Chem* 270(39): 23196-202.
- Scola, L., Crivello, A., Marino, V., Gioia, V., Serauto, A., Candore, G., Colonna-Romano, G., Caruso, C., Lio, D. (2003). IL-10 and TNF-alpha polymorphisms in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis: implication for ageing and life span expectancy. *Mech Ageing Dev* 124(4): 569-72.
- Scott, J.A., Weir, M.L., Wilson, S.M., Xuan, J.W., Chambers, A.F., McCormack, D.G. (1998). Osteopontin inhibits inducible nitric oxide synthase activity in rat vascular tissue. *Am J Physiol* 275(6 Pt 2): H2258-65.
- Senger, D.R., Perruzzi, C.A., Gracey, C.F., Papadopoulos, A., Tenen, D.G. (1988). Secreted phosphoproteins associated with neoplastic transformation: close homology with plasma proteins cleaved during blood coagulation. *Cancer Res* 48(20): 5770-4.
- Senger, D.R., Perruzzi, C.A., Papadopoulos, A. (1989a). Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation. *Anticancer Res* 9(5): 1291-9.
- Senger, D.R., Perruzzi, C.A., Papadopoulos, A., Tenen, D.G. (1989b). Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochim Biophys Acta* 996(1-2): 43-8.
- Senger, D.R., Perruzzi, C.A., Papadopoulos-Sergiou, A., Van de Water, L. (1994). Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. *Mol Biol Cell* 5(5): 565-74.

- Serjeant, G.R. (1994). The geography of sickle cell disease: Opportunities for understanding its diversity. *Ann Saudi Med* 14(3): 237-46.
- Shiloh, M.U., Nathan, C.F. (2000). Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of Salmonella and mycobacteria. *Curr Opin Microbiol* 3(1): 35-42.
- Shin, H.D., Park, B.L., Kim, Y.H., Cheong, H.S., Lee, I.H., Park, S.K. (2005). Common interleukin 10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. *Exp Mol Med* 37(2): 128-32.
- Shinohara, M.L., Jansson, M., Hwang, E.S., Werneck, M.B., Glimcher, L.H., Cantor, H. (2005). T-bet-dependent expression of osteopontin contributes to T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(47): 17101-6.
- Shinohara, M.L., Kim, H.J., Kim, J.H., Garcia, V.A., Cantor, H. (2008). Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(20): 7235-9.
- Shinohara, M.L., Lu, L., Bu, J., Werneck, M.B., Kobayashi, K.S., Glimcher, L.H., Cantor, H. (2006). Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 7(5): 498-506.
- Silverman, E.K., Palmer, L.J. (2000). Case-control association studies for the genetics of complex respiratory diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22(6): 645-8.
- Singh, K., DeVouge, M.W., Mukherjee, B.B. (1990). Physiological properties and differential glycosylation of phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin secreted by normal rat kidney cells. *J Biol Chem* 265(30): 18696-701.
- Sinsimer, D., Huet, G., Manca, C., Tsenova, L., Koo, M.S., Kurepina, N., Kana, B., Mathema, B., Marras, S.A., Kreiswirth, B.N., Guilhot, C., Kaplan, G. (2008). The phenolic glycolipid of Mycobacterium tuberculosis differentially modulates the early host cytokine response but does not in itself confer hypervirulence. *Infect Immun* 76(7): 3027-36.
- Skamene, E. (1994). The Bcg gene story. *Immunobiology* 191(4-5): 451-60.
- Smith, L.L., Cheung, H.K., Ling, L.E., Chen, J., Sheppard, D., Pytela, R., Giachelli, C.M. (1996). Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin. *J Biol Chem* 271(45): 28485-91.
- Smith, L.L., Giachelli, C.M. (1998). Structural requirements for alpha 9 beta 1-mediated adhesion and migration to thrombin-cleaved osteopontin. *Exp Cell Res* 242(1): 351-60.
- Smith, N.H., Hewinson, R.G., Kremer, K., Brosch, R., Gordon, S.V. (2009). Myths and misconceptions: the origin and evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Nat Rev Microbiol* 7(7): 537-44.
- Sodek, J., Batista Da Silva, A.P., Zohar, R. (2006). Osteopontin and mucosal protection. *J Dent Res* 85(5): 404-15.
- Sodek, J., Ganss, B., McKee, M.D. (2000). Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11(3): 279-303.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Connell, N.D., Kreiswirth, B.N., Whittam, T.S., Musser, J.M. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(18): 9869-74.
- Sriram, U., Selvaraj, P., Kurian, S.M., Reetha, A.M., Narayanan, P.R. (2001). HLA-DR2 subtypes & immune responses in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 113: 117-24.

- Stead, W.W. (1997). 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., 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): 422-7.
- Stenger, S., Mazzaccaro, R.J., Uyemura, K., Cho, S., Barnes, P.F., Rosat, J.P., Sette, A., Brenner, M.B., Porcelli, S.A., Bloom, B.R., Modlin, R.L. (1997). Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 276(5319): 1684-7.
- Sterling, H., Saginario, C., Vignery, A. (1998). CD44 occupancy prevents macrophage multinucleation. *J Cell Biol* 143(3): 837-47.
- Strang, J.I. (1984). Tuberculous pericarditis in Transkei. *Clin Cardiol* 7(12): 667-70.
- Strom, A., Franzen, A., Wangnerud, C., Knutsson, A.K., Heinegard, D., Hultgardh-Nilsson, A. (2004). Altered vascular remodeling in osteopontin-deficient atherosclerotic mice. *J Vasc Res* 41(4): 314-22.
- Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., Locht, C. (2000). Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 36(3): 762-71.
- Takiff, H.E. (2007). Host Genetics and Susceptibility. Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care. Palomino, J.C., Leão, S.C., Ritacco, V.
- Teran-Escandon, D., Teran-Ortiz, L., Camarena-Olvera, A., Gonzalez-Avila, G., Vaca-Marin, M.A., Granados, J., Selman, M. (1999). Human leukocyte antigen-associated susceptibility to pulmonary tuberculosis: molecular analysis of class II alleles by DNA amplification and oligonucleotide hybridization in Mexican patients. *Chest* 115(2): 428-33.
- Thuong, N.T., Dunstan, S.J., Chau, T.T., Thorsson, V., Simmons, C.P., Quyen, N.T., Thwaites, G.E., Thi Ngoc Lan, N., Hibberd, M., Teo, Y.Y., Seielstad, M., Aderem, A., Farrar, J.J., Hawn, T.R. (2008). Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles. *PLoS Pathog* 4(12): e1000229.
- Thye, T., Browne, E.N., Chinbuah, M.A., Gyapong, J., Osei, I., Owusu-Dabo, E., Brattig, N.W., Niemann, S., Rusch-Gerdes, S., Horstmann, R.D., Meyer, C.G. (2009a). IL10 haplotype associated with tuberculin skin test response but not with pulmonary TB. *PLoS One* 4(5): e5420.
- Thye, T., Browne, E.N., Chinbuah, M.A., Gyapong, J., Osei, I., Owusu-Dabo, E., Niemann, S., Rusch-Gerdes, S., Horstmann, R.D., Meyer, C.G. (2006). No associations of human pulmonary tuberculosis with Sp110 variants. *J Med Genet* 43(7): e32.
- Thye, T., Nejentsev, S., Intemann, C.D., Browne, E.N., Chinbuah, M.A., Gyapong, J., Osei, I., Owusu-Dabo, E., Zeitels, L.R., Herb, F., Horstmann, R.D., Meyer, C.G. (2009b). MCP-1 promoter variant -362C associated with protection from pulmonary tuberculosis in Ghana, West Africa. *Hum Mol Genet* 18(2): 381-8.
- Thye, T., Scarisbrick, G., Browne, E.N., Chinbuah, M.A., Gyapong, J., Osei, I., Owusu-Dabo, E., Niemann, S., Rusch-Gerdes, S., Meyer, C.G., Horstmann, R.D. (2009c). CTLA4 autoimmunity-associated genotype contributes to severe pulmonary tuberculosis in an African population. *PLoS One* 4(7): e6307.
- Thye, T., Vannberg, F.O., Wong, S.H., Owusu-Dabo, E., Osei, I., Gyapong, J., Sirugo, G., Sisay-Joof, F., Enimil, A., Chinbuah, M.A., Floyd, S., Warndorff, D.K., Sichali, L., Malema, S., Crampin, A.C., Ngwira, B., Teo, Y.Y., Small, K., Rockett, K., Kwiatkowski, D., Fine, P.E., Hill, P.C., Newport, M., Lienhardt, C., Adegbola, R.A., Corrah, T., Ziegler, A., Morris, A.P., Meyer, C.G., Horstmann, R.D., Hill, A.V. (2010). Genome-wide association analyses identi-



- fies a susceptibility locus for tuberculosis on chromosome 18q11.2. *Nat Genet* 42(9): 739-41.
- Tosh, K., Campbell, S.J., Fielding, K., Sillah, J., Bah, B., Gustafson, P., Manneh, K., Lisse, I., Sirugo, G., Bennett, S., Aaby, P., McAdam, K.P., Bah-Sow, O., Lienhardt, C., Kramnik, I., Hill, A.V. (2006). Variants in the SP110 gene are associated with genetic susceptibility to tuberculosis in West Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(27): 10364-8.
- Trinchieri, G., Pflanz, S., Kastelein, R.A. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19(5): 641-4.
- Tsai, A.T., Rice, J., Scatena, M., Liaw, L., Ratner, B.D., Giachelli, C.M. (2005). The role of osteopontin in foreign body giant cell formation. *Biomaterials* 26(29): 5835-43.
- Tsenova, L., Ellison, E., Harbacheuski, R., Moreira, A.L., Kurepina, N., Reed, M.B., Mathema, B., Barry, C.E., 3rd, Kaplan, G. (2005). Virulence of selected Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J Infect Dis* 192(1): 98-106.
- 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): 358-63.
- Tuck, A.B., O'Malley, F.P., Singhal, H., Harris, J.F., Tonkin, K.S., Kerkvliet, N., Saad, Z., Doig, G.S., Chambers, A.F. (1998). Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int J Cancer* 79(5): 502-8.
- Tuck, A.B., O'Malley, F.P., Singhal, H., Tonkin, K.S., Harris, J.F., Bautista, D., Chambers, A.F. (1997). Osteopontin and p53 expression are associated with tumor progression in a case of synchronous, bilateral, invasive mammary carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 121(6): 578-84.
- Ulrichs, T., Porcelli, S.A. (2000). CD1 proteins: targets of T cell recognition in innate and adaptive immunity. *Rev Immunogenet* 2(3): 416-32.
- van Crevel, R., Nelwan, R.H., de Lenne, W., Veeraragu, Y., van der Zanden, A.G., Amin, Z., van der Meer, J.W., van Soolingen, D. (2001). Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment. *Emerg Infect Dis* 7(5): 880-3.
- van der Windt, G.J., Wieland, C.W., Wiersinga, W.J., Florquin, S., van der Poll, T. (2009). Osteopontin is not crucial to protective immunity during murine tuberculosis. *Immunology* 128(1 Suppl): e766-76.
- van Embden, J.D., Cave, M.D., Crawford, J.T., Dale, J.W., Eisenach, K.D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T.M., et al. (1993). Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31(2): 406-9.
- van Pinxteren, L.A., Cassidy, J.P., Smedegaard, B.H., Agger, E.M., Andersen, P. (2000). Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells. *Eur J Immunol* 30(12): 3689-98.
- Wai, P.Y., Kuo, P.C. (2004). The role of Osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res* 121(2): 228-41.
- Wang, D., Yamamoto, S., Hijjiya, N., Benveniste, E.N., Gladson, C.L. (2000). Transcriptional regulation of the human osteopontin promoter: functional analysis and DNA-protein interactions. *Oncogene* 19(50): 5801-9.
- Weber, G.F., Ashkar, S. (2000). Molecular mechanisms of tumor dissemination in primary and metastatic brain cancers. *Brain Res Bull* 53(4): 421-4.

- Weber, G.F., Ashkar, S., Glimcher, M.J., Cantor, H. (1996a). Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271(5248): 509-12.
- Weber, G.F., Cantor, H. (1996b). The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev* 7(3): 241-8.
- Weber, G.F., Zawaideh, S., Hikita, S., Kumar, V.A., Cantor, H., Ashkar, S. (2002). Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. *J Leukoc Biol* 72(4): 752-61.
- Weiss, J.M., Renkl, A.C., Maier, C.S., Kimmig, M., Liaw, L., Ahrens, T., Kon, S., Maeda, M., Hotta, H., Uede, T., Simon, J.C. (2001). Osteopontin is involved in the initiation of cutaneous contact hypersensitivity by inducing Langerhans and dendritic cell migration to lymph nodes. *J Exp Med* 194(9): 1219-29.
- Weniger, T., Krawczyk, J., Supply, P., Niemann, S., Harmsen, D. (2010). MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. *Nucleic Acids Res* 38 Suppl: W326-31.
- WHO (2008). Global tuberculosis control : surveillance, planning, financing : WHO report 2008.
- WHO (2009). WHO Report 2009, Global Tuberculosis Control.
- Wilkinson, R.J., Llewelyn, M., Toossi, Z., Patel, P., Pasvol, G., Lalvani, A., Wright, D., Latif, M., Davidson, R.N. (2000). Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 355(9204): 618-21.
- Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Beguec, C., Wolbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., van Soolingen, D., Rusch-Gerdes, S., Loch, C., Brisse, S., Meyer, A., Supply, P., Niemann, S. (2008). Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex. *PLoS Pathog* 4(9): e1000160.
- Wong, C., Antonarakis, S.E., Goff, S.C., Orkin, S.H., Boehm, C.D., Kazazian, H.H., Jr. (1986). On the origin and spread of beta-thalassemia: recurrent observation of four mutations in different ethnic groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(17): 6529-32.
- Xuan, J.W., Hota, C., Shigeyama, Y., D'Errico, J.A., Somerman, M.J., Chambers, A.F. (1995). Site-directed mutagenesis of the arginine-glycine-aspartic acid sequence in osteopontin destroys cell adhesion and migration functions. *J Cell Biochem* 57(4): 680-90.
- Yim, J.J., Lee, H.W., Lee, H.S., Kim, Y.W., Han, S.K., Shim, Y.S., Holland, S.M. (2006). The association between microsatellite polymorphisms in intron II of the human Toll-like receptor 2 gene and tuberculosis among Koreans. *Genes Immun* 7(2): 150-5.
- Yokosaki, Y., Matsuura, N., Sasaki, T., Murakami, I., Schneider, H., Higashiyama, S., Saitoh, Y., Yamakido, M., Taooka, Y., Sheppard, D. (1999). The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J Biol Chem* 274(51): 36328-34.
- Yokosaki, Y., Tanaka, K., Higashikawa, F., Yamashita, K., Eboshida, A. (2005). Distinct structural requirements for binding of the integrins alphavbeta6, alphavbeta3, alphavbeta5, alpha5beta1 and alpha9beta1 to osteopontin. *Matrix Biol* 24(6): 418-27.
- Young, M.F., Kerr, J.M., Termine, J.D., Wewer, U.M., Wang, M.G., McBride, O.W., Fisher, L.W. (1990). cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* 7(4): 491-502.

- Yu, X.Q., Fan, J.M., Nikolic-Paterson, D.J., Yang, N., Mu, W., Pichler, R., Johnson, R.J., Atkins, R.C., Lan, H.Y. (1999). IL-1 up-regulates osteopontin expression in experimental crescentic glomerulonephritis in the rat. *Am J Pathol* 154(3): 833-41.
- Yu, X.Q., Nikolic-Paterson, D.J., Mu, W., Giachelli, C.M., Atkins, R.C., Johnson, R.J., Lan, H.Y. (1998). A functional role for osteopontin in experimental crescentic glomerulonephritis in the rat. *Proc Assoc Am Physicians* 110(1): 50-64.
- Zhu, B., Suzuki, K., Goldberg, H.A., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., McCulloch, C.A., Sodek, J. (2004). Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors: evidence of a role for an intracellular form of osteopontin. *J Cell Physiol* 198(1): 155-67.
- Zohar, R., Suzuki, N., Suzuki, K., Arora, P., Glogauer, M., McCulloch, C.A., Sodek, J. (2000). Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. *J Cell Physiol* 184(1): 118-30.

## 8. DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian G. Meyer, der mir das Thema zur Verfügung gestellt hat und mich durch viele interessante Diskussionen mit konstruktiver Kritik für das wissenschaftliche Arbeiten und Schreiben begeistert hat.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Thorsten Thye für seine Betreuung der Arbeit und die hilfreiche Unterstützung bei der statistischen Auswertung und dem Umgang mit dem Programm STATA, dies zusammen mit Dr. Christopher Intemann.

Prof. Dr. Rolf Horstmann und der gesamten AG Medizinische Grundlagenforschung danke ich weiterhin herzlich für die vielen Hilfestellungen, die immer offenen Ohren für meine Fragen und natürlich für die intensive Einarbeitung in die Labortechniken. Frau Birgit Muntau hat mir die Technik der Sequenzierung nahe gebracht, Frau Christa Ehmen und Herr Jürgen Sievertsen haben mich in die Kunst der Genotypisierung eingeweiht. Herr Gerd Ruge unterstützte mich bei der Amplifizierung der DNA-Proben. Weiterhin haben mich auch Frau Birgit Förster, Frau Britta Liedigk und Frau Ulrike Herzog mit vielen Tipps und Tricks im Laboralltag unterstützt.

Ich danke auch meinen Eltern Elfi und Holger Matthews und meinem Freund Martin Vedder für ihre tatkräftige Unterstützung beim Korrekturlesen und der Überarbeitung der Arbeit. Ihnen, meiner Schwester Elena Matthews und meinem Großvater Wilhelm Meierfeldt danke ich für die immer aufmunternden Worte und die gelegentlich notwendige Ablenkung.

## 9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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.

Hanna Matthews