

Variationen der Toll-like Rezeptoren  
beeinflussen die Suszeptibilität  
für Tuberkulose in Hyderabad, Indien  
und die Immunantwort auf  
*Mycobacterium tuberculosis*

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Dipl.-Ing. Nickel Dittrich  
aus  
Berlin

2014

Die Arbeit wurde vom 01.11.2010 bis 31.08.2014  
am Institut für Mikrobiologie und Hygiene  
der Charité Universitätsmedizin Berlin  
unter der Leitung von  
Prof. Dr. med. Ralf R. Schumann  
angefertigt.

Gutachter 1: Prof. Dr. med. Ralf R. Schumann

Gutachter 2: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Blankenstein

Disputation am: 06.03.2015

Meiner Familie.



# Danksagung

Auf der indischen Seite danke ich der Leitung des Bhagwan Mahavir Trust und den Mitarbeitern der PPM DOTS TB Klinik am Mahavir Hospital Research Centre für die klinische und mikrobiologische Arbeit im Zusammenhang mit dieser Studie, insbesondere Shruti Thada, Surabhi Goyal, Dr. Gaddam Sumanlatha, Dr. Vijaya Lakshmi Valluri und Abid Hussain. Mein besonderer Dank gilt den Teilnehmern der Studie. Außerdem danke ich Dr. Niyaz Ahmed, University of Hyderabad, für die Diskussionen und für das Bereitstellen seines Labors.

Auf deutscher Seite danke ich besonders Prof. Ralf Schumann und Melanie Conrad für die exzellente Betreuung und Inga Wyrosiak, Fränzi Creutzburg und Diana Woellner für ihre hilfreiche technische Unterstützung und für die tolle Stimmung im Labor. Den Mitarbeitern und Doktoranden des Schumann Labors, der Slevogt Gruppe und der AG Heimesaat/Bereswill danke ich für die Unterstützung und für die freundliche Atmosphäre.

Ich möchte mich auch bei Lothar Wieler und Esther Antão für die Organisation und besondere Hilfe beim Lösen schwieriger Situationen der internationalen Kollaboration und bei allen anderen Organisatoren und Mitgliedern des Graduiertenkollegs GRK1673 bedanken, insbesondere für die moralische Unterstützung von Anne Rabes, Kathrin Griß, Stefanie Meese, Noëlle O'Regan und Luis Berrocal.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mich durch diese Zeit begleitet und durch moralische Unterstützung immer wieder motiviert haben.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt (Graduiertenkolleg GRK1673, Projekt A5).

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vi
Abkürzungsverzeichnis	vii
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Tuberkulose . . . . .	1
1.2 Toll-Like Rezeptoren . . . . .	7
1.3 Genetische Variationen . . . . .	22
1.4 Zusammenfassung . . . . .	24
1.5 Aufgabenstellung . . . . .	26
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1 SNP Datenbanken . . . . .	29
2.2 Patienten und Kontrollen . . . . .	30
2.3 DNS Präparation / Sequenzierung / PCR . . . . .	30
2.4 Funktionelle Analysen . . . . .	31
2.5 Statistik . . . . .	36
2.6 Modellierung der TLR Strukturen . . . . .	37
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1 SNP Datenbanken . . . . .	39
3.2 Kohorten . . . . .	40
3.3 SNPs in der Indischen Bevölkerung . . . . .	40
3.4 Assoziation von TLR SNPs mit TB . . . . .	53
3.5 Funktionelle Analysen . . . . .	58
3.6 Modellierung der Proteinstrukturen . . . . .	68

<b>4 Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1 Vorhersage der Relevanz von Genmutationen . . . . .	72
4.2 Kohortengenerierung und -analyse . . . . .	72
4.3 Sequenzierung . . . . .	74
4.4 TLR-SNPs und TB . . . . .	76
4.5 Funktionelle Analysen . . . . .	77
4.6 Modellierung <i>in silico</i> . . . . .	80
4.7 Zusammenfassung . . . . .	81
4.8 Ausblick . . . . .	82
<b>Abstract / Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>Anhänge</b>	
A: PCR- und Sequenzierungsprimer . . . . .	114
B: ImportCohort.R . . . . .	117
C: Cohort Functions.R . . . . .	123
D: SNP Datenbanken . . . . .	131

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Die Struktur der <i>M.tb</i> Zellwand. . . . .	5
1.2	TLRs, ihre Hauptliganden und die intrazellulären Signalwege, die zur Stimulation von proinflammatorischen Zytokinen führen. . . . .	9
3.1	Vergleich der Genotypfrequenzen von TLR1-S248N und I602S zeigt genetische Verschiebung Indien nach Deutschland. . . . .	50
3.2	Vergleich der Genotypfrequenzen von TLR4-D299G und T399I zeigt geringe Verschiebung von Indien nach Deutschland. . . . .	52
3.3	Vergleich der Genotypfrequenzen von TLR8-M1V zeigt genetische Verschiebung von Indien nach Deutschland. . . . .	53
3.4	Kein Linkage-Disequilibrium zwischen TLR1-N248S, S602I oder Q266Q. . . . .	54
3.5	Linkage-Disequilibrium zwischen TLR4-D299G und T399I aber kein Linkage-Disequilibrium zwischen TLR8-M1V und anderen TLR8 SNPs . . . . .	55
3.6	PBMCs von Individuen mit dem TLR1-248N Genotyp zeigen eine höhere TNF Produktion nach Pam <sub>3</sub> Cys Stimulation. . . . .	60
3.7	PBMCs von Individuen mit dem TLR1-248N Genotyp zeigen eine höhere TNF Produktion nach H37Rv Stimulation. . . . .	61
3.8	PBMCs von Individuen mit dem TLR1-248N Genotyp zeigen eine tendenziell höhere TNF Produktion nach mykobakterieller Pam <sub>3</sub> Stimulation. . . . .	62
3.9	PBMCs von Individuen mit unterschiedlichem TLR1 Genotyp zeigen keinen Unterschied der TNF Produktion nach Stimulation mit Ultraschall-lysieren <i>M.tbs</i> . . . . .	63
3.10	Der TLR1 Polymorphismus 248N verursacht eine Heraufregulierung der NF- $\kappa$ B Expression in transfizierten HEK293 Zellen nach mykobakterieller Pam <sub>3</sub> Stimulation. . . . .	65



3.11	Der TLR1 Polymorphismus 248N verursacht eine signifikante Heraufregulierung der NF- $\kappa$ B Expression in transfizierten HEK293 Zellen nach H37Rv Stimulation. . . . .	66
3.12	Der TLR1 Polymorphismus 248N jedoch nicht 602I/S verursacht eine signifikante Heraufregulierung der NF- $\kappa$ B Expression in transfizierten HEK293 Zellen. . . . .	67
3.13	Mögliche Folgen für die Signaltransduktion der TLR1-248S Variante. . . . .	69
3.14	Eine mögliche Bindungstasche und eine funktionelle Bindungstasche der 248N Variation von TLR1, welche mit Schutz vor TB assoziiert wird, ist in der 248S Variante nicht existent. . . . .	70
4.1	Charakteristische Impfnarbe nach <i>BCG</i> Impfung. . . . .	74

# Tabellenverzeichnis

1.1	Toll-like Rezeptoren und deren Agonisten . . . . .	8
2.1	Material und Reagenzien Zellisolation . . . . .	32
2.2	Material und Reagenzien ELISA . . . . .	34
3.1	Demographie und klinische Charakteristiken der TB Patienten und Kontrollen in Hyderabad, Indien . . . . .	41
3.2	Anzahl der Sequenzierten Basen und SNPs . . . . .	42
3.3	Allel-Frequenzen der TLR1 SNPs in Indien . . . . .	43
3.4	Allel-Frequenzen der TLR2 SNPs in Indien . . . . .	47
3.5	Allel-Frequenzen der TLR4 SNPs in Indien . . . . .	48
3.6	Allel-Frequenzen der TLR7 und TLR8 SNPs in Indien . . . . .	49
3.7	Genotypfrequenzen des Toll-like Rezeptor (TLR)1-N248S SNP in Tuberkulose (TB) Patienten und gesunden Kontrollen . . . . .	56
3.8	Allel- und Genotypfrequenzen des TLR4-D299G SNP in TB Pa- tientinnen und gesunden Frauen . . . . .	57
3.9	Allel- und Genotypfrequenzen des TLR8-M1V SNP in TB Pa- tienten und gesunden Kontrollen . . . . .	58
3.10	Assoziationen der Allelfrequenzen von SNPs mit TB-Suszepti- bilität in Sub-Kohorten . . . . .	59
3.11	Vergleich der Kluftvolumina der TLR1 Varianten . . . . .	68
1	Polymerase Kettenreaktion [Polymerase chain reaction] (PCR)- und Sequenzierungs-Primer . . . . .	114
2	SNP Datenbank TLR1 . . . . .	131
3	SNP Datenbank TLR2 . . . . .	132
4	SNP Datenbank TLR4 . . . . .	133
5	SNP Datenbank TLR7 . . . . .	134
6	SNP Datenbank TLR8 . . . . .	135



## Abkürzungsverzeichnis

<b>ACP</b>	Antigen-präsentierende Zelle	<b>LD</b>	Linkage Disequilibrium
<b>AFB</b>	säurebeständiges Bakterium [acid-fast bacillus]	<b>LM</b>	Lipomannan
<b>ALR</b>	cyto-plasmic DNA receptor AIM2-like Rezeptor	<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>AP-1</b>	Aktivator-Protein-1	<b>LRR</b>	Leucin-reiche Wiederholungssequenz [Leucine-Rich Repeats]
<b>AS</b>	Aminosäure	<b>M.</b>	<i>Mycobacterium</i>
<b>BCG</b>	<i>Bacterium Calmette-Guérin</i>	<b>ManLAM</b>	mannosyliertes Lipoarabinomannan
<b>BMI</b>	Body-Mass-Index	<b>MAP</b>	mitogen-activated protein
<b>CD14</b>	Cluster of Differentiation-14	<b>MOI</b>	Multiplicity of Infection
<b>CHO</b>	Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster [Chinese Hamster Ovary]	<b>MPI</b>	Mannosyl-Phosphatidylmyo- Inositol
<b>DC</b>	Dendritische Zelle	<b>MR</b>	Mannoserezeptor
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>M.tb</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>DOTS</b>	Directly Observed Treatment, Short-Course	<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation primary response gene 88
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbend assay	<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>FCS</b>	Fötales Kalbsserum [Fetal calf serum]	<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor $\kappa$ -light-chain- enhancer of activated B cells
<b>GWAS</b>	Genomweite Assoziationsstudie [Genome Wide Association Study]	<b>NK</b>	Natürliche Killer
<b>HEK</b>	menschliche embryonale Niere [Human embryonic kidney]	<b>NLR</b>	Nod-like Rezeptor
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz- Virus	<b>ORN</b>	Oligoribonukleotid
<b>IFN</b>	Interferon	<b>PAMP</b>	pathogen-assoziierte molekulare Muster [pathogen-associated molecular pattern]
<b>IKK</b>	Inhibitor-von- $\kappa$ B-Kinase	<b>PBMC</b>	mononukleären Zelle des peripheren Blutes [peripheral blood mononuclear cells]
<b>IL</b>	Interleukin	<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung [phosphate buffered saline]
<b>IRAK</b>	IL-1R-assoziierten Kinase	<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion
<b>IRF</b>	interferon regulatory factor		
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminale Kinase		

	[Polymerase chain reaction]		kinase 1
<b>PG</b>	Peptoglykane	<b>TB</b>	Tuberkulose
<b>PIM</b>	Phosphatidylmyo-Inositol Mannosid	<b>TBK-1</b>	TANK-binding kinase 1
<b>PPD</b>	gereinigtes <i>MTB</i> Proteinderivat [Purified protein derivate of whole <i>MTB</i> ]	<b>Th</b>	T-Helfer
<b>PRR</b>	Pattern-recognition Receptor	<b>TIR</b>	Toll-interleukin 1 Rezeptor
<b>PTB</b>	Pulmonale Tuberkulose	<b>TLR</b>	Toll-like Rezeptor
<b>RLR</b>	RNA helicase RIG-1-like Rezeptor	<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>RMSD</b>	Root mean square deviation	<b>TRAF</b>	Tumornekrosefaktor- Rezeptor-assozierte-Faktor
<b>RNTCP</b>	Revised National Tuberculosis Control Program	<b>TRAM</b>	TICAM2 oder TRIF-related adaptor molecule
<b>RNS</b>	Ribonukleinsäure	<b>TRIF</b>	TICAM1 oder Toll- interleukin 1receptor domain- containing adapter protein inducing IFN $\beta$
<b>SNP</b>	Einzelnukleotid- Polymorphismus [Single nucleotide polymorphism]	<b>TST</b>	Tuberkulintest [Tuberculin skin test]
<b>TAK1</b>	TGF $\beta$ -activated protein	<b>TU</b>	Tuberkulin Einheit [Tuberculin unit]
		<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation [World Health Organization]



# Kapitel 1

## Einleitung

In dieser Dissertation geht es um die Relevanz von Polymorphismen im Toll-like Rezeptor (TLR)-System und ihre Auswirkungen auf die Suszeptibilität (Anfälligkeit) für Tuberkulose (TB). Im südindischen Hyderabad wurden Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Proben von TB-Patienten und gesunden Kontrollen gesammelt, sequenziert und statistisch ausgewertet. Hierfür wurde unter anderem eine spezielle Software entwickelt. An einer gesunden Kontrollkohorte wurden funktionelle Untersuchungen an einem TLR1 Einzelnukleotid-Polymorphismus [Single nucleotide polymorphism] (SNP) durchgeführt und ein Computermodell der veränderten Proteinstruktur wurde generiert.

### 1.1 Tuberkulose

TB ist eine ansteckende Infektionskrankheit, die in den meisten Fällen durch *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) ausgelöst und durch Tröpfchen-Übertragung verbreitet wird. Pulmonale Tuberkulose (PTB) ist als häufigste Form der TB eine Erkrankung der Lunge, die zu Husten mit blutigem Auswurf und bei Nichtbehandlung zum Tod führt. TB stellt ein globales Gesundheitsproblem dar, das etwa 9 Millionen Menschen weltweit betrifft und eine hohe Mortalität aufweist (2012: ca. 1,3 Millionen Tote) (WHO, 2013).

Nur TB-Infizierte, die den Erreger in der Lunge tragen, sind infektiös und verteilen *M.tb* durch Husten, Niesen, Reden oder Spucken. Bereits eine kleine Anzahl dieser Bakterien reicht zur Infektion aus wenn diese eingeatmet werden. Eine Infektion führt allerdings nicht unweigerlich zur Krankheit. Das

Immunsystem isoliert vorerst die Bakterien, die jedoch, von einer Schutzschicht umgeben, teilweise jahrelang ruhen können, bevor sie bei geschwächtem Immunsystem wieder aktiv werden.

Unbehandelte TB-Infizierte stecken durchschnittlich etwa 10 bis 15 Personen pro Jahr an. Die Weltgesundheitsorganisation [World Health Organization] (WHO) schätzt, dass ein Drittel der Weltbevölkerung mit *M.tb* infiziert ist, wovon lediglich 5-10% an akuter TB erkranken. Besonders in Südost-Asien (35% der Inzidenzfälle weltweit) und Subsahara-Afrika (350 Fälle pro 100.000 Menschen) ist TB stark verbreitet.

DNS Tests an jungsteinzeitlichen Knochenfunden zeigen dass bereits vor 9.000 Jahren Menschen an TB erkrankten (Hershkovitz et al., 2008). Es gilt inzwischen als weitgehend erwiesen, dass die menschliche Suszeptibilität zu TB eine komplexe genetische Eigenschaft ist (Casanova and Abel, 2002). Grundsätzliche Kontroversen dazu existieren in humanmedizinischer Genetik bezüglich der Wirkung von häufigen und seltenen Mutationen auf die Suszeptibilität von komplexen Krankheiten (Weiss and Terwilliger, 2000; Wright and Hastie, 2001). Variabilität bezüglich der Suszeptibilität von TB wurde 1926 in Lübeck versehentlich demonstriert, als einigen Neugeborenen lebende *M.tb* anstelle der Impfung *Bacterium Calmette-Guérin (BCG)* gespritzt wurde. Einige Säuglinge erkrankten tödlich, während andere keine Symptome zeigten (Dubos, 1987). Obwohl somit eine deutliche genetische Prädisposition wahrscheinlich ist (Abel et al., 2014) wurde bisher kein klarer, einzelner genetischer Suszeptibilitätsmarker identifiziert. Unter den zahlreichen Kandidatengenomen gilt den Mitgliedern der TLR-Familie, kürzlich entdeckten Schlüsselproteinen der angeborenen Immunität, seit einiger Zeit besonderes Interesse. Ob ein Individuum TB entwickelt oder nach dem Kontakt asymptomatisch bleibt hängt von der Fähigkeit des Wirtes ab, *M.tb* effektiv abzutöten oder seine Replikation ausreichend zu kontrollieren (Ma et al., 2007), beides zentrale Aufgaben des angeborenen Immunsystems.

### 1.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Die Inhalation von *M.tb* aktiviert eine Immunantwort des angeborenen Immunsystems in pulmonalen Alveolarmakrophagen und Dendritischen Zellen (DCs), die zur Wirtsimmunität beitragen. In der frühen Phase der Infekti-



on werden *M.tb* von phagozytischen Immunzellen internalisiert und vermehren sich daraufhin intrazellulär. Die mit Bakterien beladenen Immunzellen können problemlos die Alveolarbarriere passieren und *M.tb* zu verschiedenen extrapulmonalen Orten des Wirtsorganismus übertragen (Bermudez et al., 2002; Teitelbaum et al., 1999). Die intrazelluläre Replikation und simultane Verbreitung des Pathogens geschieht vor der Antwort des adaptiven Immunsystems. Dies verdeutlicht die besondere Fähigkeit von *M.tb* sich eine geschützte Nische zu schaffen, in der es einer Elimination des Immunsystems aus dem Weg gehen und theoretisch dauerhaft überleben kann (Chackerian et al., 2002; Hingley-Wilson et al., 2003).

Nach der Inhalation von infizierten Aerosolen in die Lunge des Wirts kommt *M.tb* zuerst mit Alveolarmakrophagen in Kontakt. Der Makrophage hat in diesem Fall zentrale Bedeutung, da er sowohl an der Phagozytose und Zerstörung der Mykobakterien als auch am Einleiten der adaptiven T-Zell-Immunität beteiligt ist. Mykobakterien, die der initialen intrazellulären Zerstörung entgehen, können sich vermehren und den Makrophagen zerstören, worauf Chemokine freigesetzt werden, die Monozyten und andere Entzündungszellen in die Lunge locken. Monozyten differenzieren sich in Makrophagen, die Mykobakterien phagozytieren aber nicht zerstören (Van Crevel et al., 2002). In diesem Infektionsstadium vermehren sich die Mykobakterien logarithmisch, es entsteht jedoch noch wenig Gewebeschaden.

Zwei bis drei Wochen nach der Infektion entwickelt sich eine T-Zell-Immunität und Antigen-spezifische T-Lymphozyten treffen ein, vermehren sich stark innerhalb der frühen Läsionen oder Tuberkeln und setzen pro-inflammatorische Zytokine, wie Interferon (IFN)- $\gamma$  frei, die wiederum die Makrophagen dazu anregen, die intrazellulären Mykobakterien zu zerstören. Daraufhin stoppt das logarithmische Wachstum der Bakterien und eine zentrale Nekrose in diesen Läsionen oder Granulomen hemmt das extrazellulären Wachstum der Mykobakterien.

Verschiedene Szenarien können nun folgen: Die Infektion kann bei einigen Individuen ruhen, in der Lunge fortschreiten oder sich hämatogen ausbreiten. Zusätzlich kann noch Monate oder Jahre später eine Reaktivierung stattfinden (Van Crevel et al., 2002). Granulome enthalten oft nekrotisches Gewebe, das Löcher und eine gasbildende Verbreitung von Mykobakterien hervorrufen kann

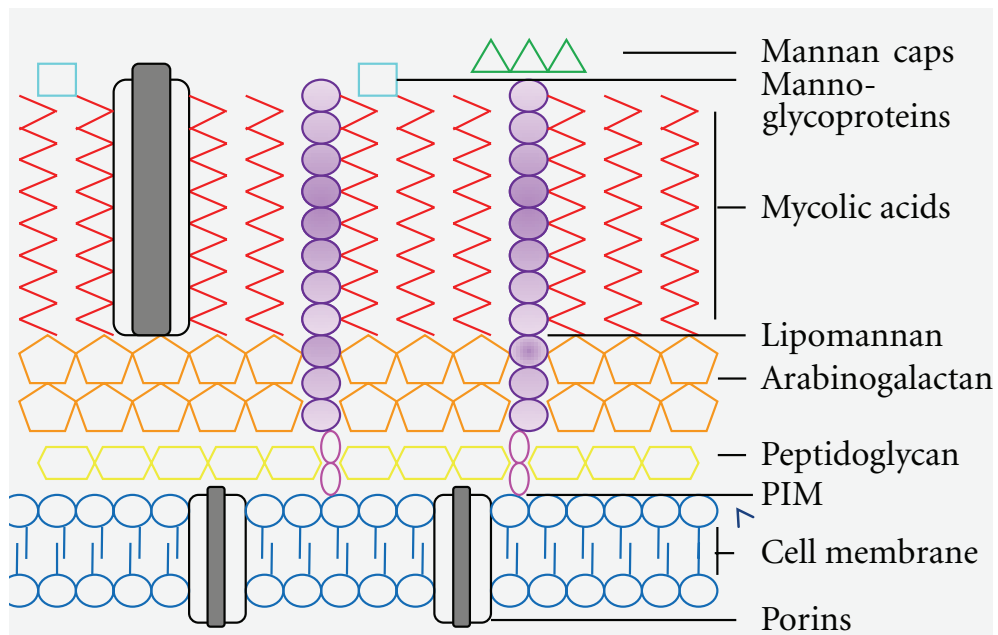
(Kleinnijenhuis et al., 2011).

*M.tb* ist ein langsam wachsendes intrazelluläres Pathogen, das innerhalb der Makrophagen des Wirts überleben kann. Da die Zellwand hauptsächlich aus hydrophoben Mykolsäuren besteht, ist es ein säurebeständiges Bakterium. Hydrophobe Mykolsäuren sind spezifische Komponenten der mykobakteriellen Zellwand und machen etwa 50% des Trockengewichts aus. Durch diese dicke Mykolsäureschicht wird der Eintritt von Nährstoffen beeinträchtigt, was ein langsames Wachstum und zugleich einen erhöhten zellulären Schutz von Degradierung durch lysosomale Enzyme zur Folge hat (Brennan and Nikaido, 1995). Die Mykolsäuren sind als Schicht über den externen Bereich der Zellwand verteilt, während die inneren Schichten der Mykobakterien hauptsächlich aus Arabinogalactan, Phosphatidylmyo-Inositol Mannoside (PIMs) und Peptidoglykanen bestehen (Torrelles and Schlesinger, 2010). Zusätzliche Komponenten sind unter anderem mannosehaltige Biomoleküle wie mannosyliertes Lipoarabinomannan (ManLAM), das verwandte Lipomannan (LM) und Mannoglykoproteine. Mannan und Arabinomannan befinden sich auf der Oberfläche und bilden die äußere Kapsel des Bakteriums. ManLAM, LM und PIMs haben alle eine konservierte Mannosyl-Phosphatidylmyo-Inositol (MPI) Domäne, welche wahrscheinlich die Strukturen in der Plasma-Membran verankern (Briken et al., 2004) (Abbildung 1.1).

Die Suszeptibilität für *M.tb* kann von inadäquater oder exzessiver akuter Inflammation herrühren. Also könnten SNPs in Genen, die die Balance von pro- und anti-inflammatorischen Antworten steuern, zu unterschiedlichem TB-Risiko des Wirts führen, wie bereits in Zebrafisch- und Humanstudien beispielhaft gezeigt wurde (Tobin et al., 2010). Genotyp-spezifische Therapien könnten die inflammatorische Antwort auf mykobakterielle Infektionen möglicherweise in der Zukunft optimieren helfen (Tobin et al., 2012). Diese personalisierte Therapie erfordert die Kenntnis der Immunantwort des Wirtes auf *M.tb* und Assoziation des Genotyps mit TB Risiko (Zhang et al., 2013).

### 1.1.2 Tumornekrosefaktor

Die Interaktion zwischen *M.tb* und den Zellen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems resultieren in der Ausscheidung von Chemokinen und Zytokinen. Die wichtigsten sind der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF), Zytokine



**Abbildung 1.1** – Die Struktur der *M.tb* Zellwand.

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Hauptkomponenten und der Verteilung der Zellwand. Die innere Schicht besteht aus Peptidoglykan, welche mit der Arabinogalaktanschicht verbunden ist. Die äußere Membran beinhaltet Mykolsäuren. Abbildung von Kleinnijenhuis et al. (Kleinnijenhuis et al., 2011)

der Interleukin (IL)-1 Familie (IL-1 $\beta$ , IL-18), IL-12 und IFN $\gamma$ .

TNF-knockout Mäuse erliegen einer Infektion mit *M.tb* schnell und haben einen signifikant höheres mykobakterielles Wachstum in den inneren Organen verglichen mit 'wildtyp'-Tieren. TNF wird ebenfalls benötigt, um Granulome zu bilden, was ein wichtiger Vorgang ist, um die Bakterien davon abzuhalten, sich zu replizieren (Flynn et al., 1995).

*M.tb* nistet sich in Makrophagen ein, weshalb der Verlauf der Infektion von der Interaktion zwischen dem Bakterium und den Wirtsmakrophagen abhängt. Paradoxe Weise bieten Makrophagen eine intrazelluläre Nische für das Pathogen, beschränken es aber gleichzeitig durch verschiedene Mechanismen. Es wird vermutet, dass *M.tb* in ruhenden Makrophagen residiert, wogegen aktive Makrophagen die antimikrobielle Antwort liefern um das Bakterium zu limitieren. Auch die Apoptose der ruhenden Makrophagen ist wahrscheinlich ein Teil der Immunantwort (Basu et al., 2007; Leemans et al., 2005). Es gibt mehrere Anzeichen dafür, dass TNF eine wichtige Rolle für die Steuerung der mit *M.tb* assoziierten Apoptose spielt. Eine Inaktivierung von TNF führt z.B. dazu, dass *M.tb* der Apoptose der Wirtsmakrophagen entgehen kann (Balcewicz-Sablinska et al., 1998; Rojas et al., 1999).

### 1.1.3 19-kDA Antigen

Das 19-kDA Antigen ist ein von *M.tb* exprimiertes, Zellwand-assoziiertes Lipoprotein. Mit der Ausnahme einiger langsam wachsender mykobakterieller Stämme wurden noch keine Homologe identifiziert (Young et al., 1992). Die biologische Funktion dieses Proteins ist noch nicht gänzlich geklärt. Bei *M.tb* wurde es als wichtigstes Antikörper-induzierendes Antigen identifiziert (Verbon et al., 1990) und war das erste Antigen, für das gezeigt wurde, dass es eine spezifische T-Zellantwort induziert (Lamb et al., 1988). Später wurde weiterhin gezeigt, dass es eine Vielzahl an biologischen Antworten während der TB Infektion induziert (Brightbill et al., 1999). Es wurde ferner gezeigt, dass das synthetische 19-kDA Lipopeptid eine TLR2-abhängige Makrophagen- und menschliche embryonale Niere [Human embryonic kidney] (HEK)293-Antwort hervorruft (Beery, 2003; Pennini et al., 2006).

Interessanterweise wird von dem 19-kDA Lipopeptid - verglichen mit dem prototypischen Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, das einen identischen Lipidanker, je-

doch nur ein kurzes Peptid von einem Serin und vier Lysin-Residuen aufweist - eine 100-fache Menge benötigt um Zellen über TLR2 zu aktivieren. Es wurde gezeigt, dass der Peptid-Teil einen deutlichen Einfluss auf die biologische Aktivität des Lipopeptids hat (Schromm et al., 2009).

## 1.2 Toll-Like Rezeptoren

Das angeborene Immunsystem weist verschiedene Klassen von Pattern-Recognition Rezeptoren (PRRs) auf, die entweder an der Zelloberfläche oder intrazellulär exprimiert werden oder in den Blutkreislauf und Gewebeflüssigkeiten ausgeschieden werden (Medzhitov, 2001). PRRs erkennen bestimmte sogenannte pathogen-assoziierte molekulare Muster [pathogen-associated molecular pattern] (PAMP) zur Initiierung und Koordination des angeborenen Immunsystems des Wirtes (Akira et al., 2006). Von diesen PRRs spielen besonders die TLRs, die Nod-like Rezeptoren (NLRs) und z.B. C-Typ Lektin Rezeptoren eine wichtige Rolle beim Erkennen von *M.tb* (Thada et al., 2013). Ebenfalls zu den PRRs gehören die RNA helicase RIG-1-like Rezeptoren (RLRs) und die cyto-plasmic DNA receptor AIM2-like Rezeptoren (ALRs) (Netea et al., 2012; Takeuchi and Akira, 2010; Unterholzner et al., 2010).

Unter den PRRs sind die TLRs als erstes beschrieben worden und daher am intensivsten erforscht. TLRs aktivieren eine Entzündungsreaktion, nachdem sie mit PAMPs in Kontakt getreten sind, eine Reaktion, die die erste Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems darstellt (Kawai and Akira, 2010). Anschließend wird durch Stimulation der TLRs auch die adaptive zelluläre und humorale Immunantwort initiiert und moduliert (Iwasaki and Medzhitov, 2010; Netea et al., 2012). Mitglieder der TLR Protein-Familie erkennen von verschiedenen Pathogenen stammende Liganden und starten wichtige Schritte der schützenden Immunantwort gegen Infektionserreger (Ma et al., 2007) (Tabelle 1.1).

Unter den Mitgliedern der bis heute beschriebenen humanen TLR Familie wurden TLR1, -2, -3, -4, -5, -6 und -9 mit der Erkennung von bakteriellen Bestandteilen in Verbindung gebracht (Akira et al., 2006). TLR2 mit seinen Heterodimerisierungspartnern TLR1 und -6, sowie TLR4 und -9 und deren

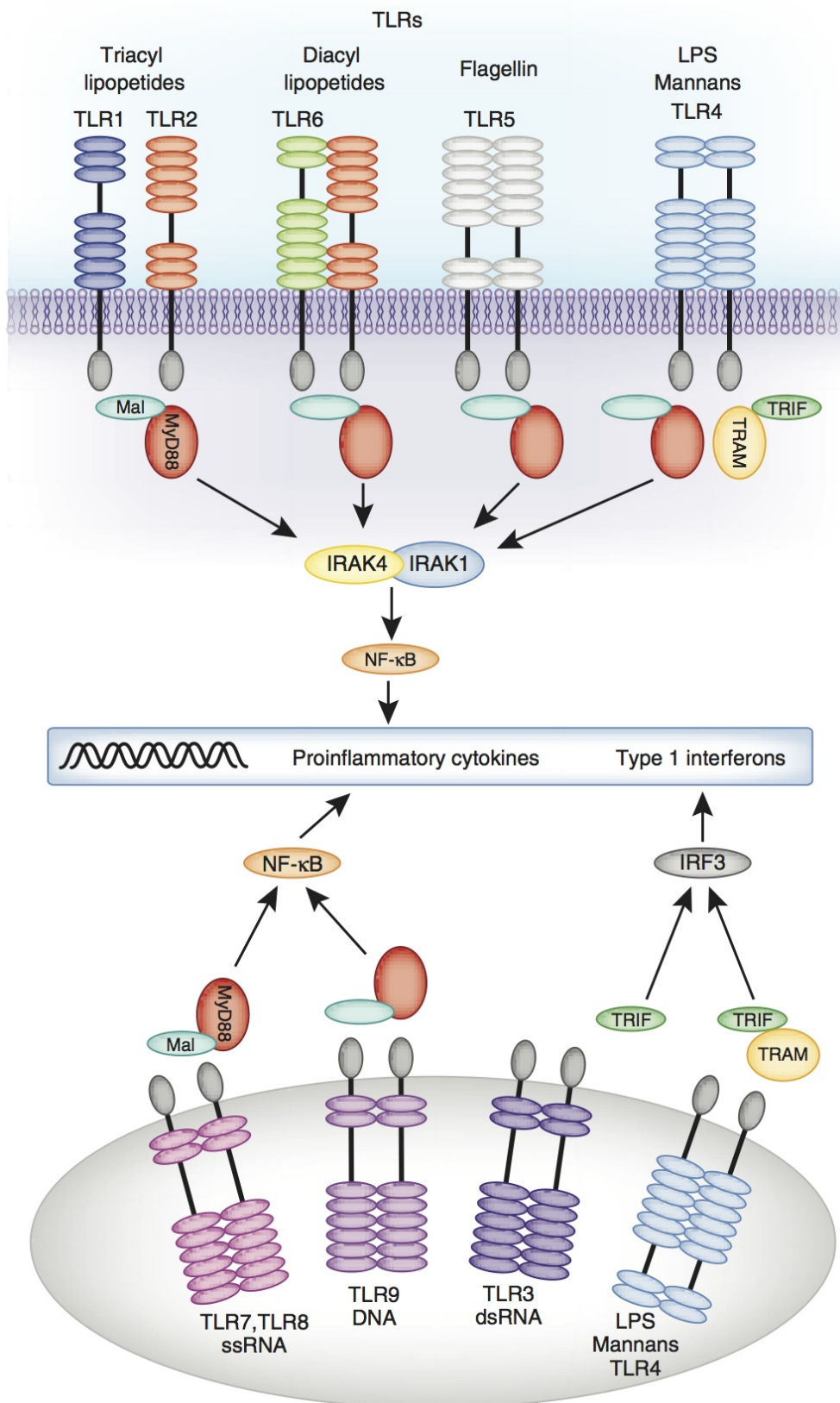
**Tabelle 1.1** – Toll-like Rezeptoren und deren Agonisten

Rezeptor	Erkennt	Agonist
TLR1 (+ TLR2)	Lipoproteine, triacyliert	Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>
TLR2	Lipoproteine	LAM-MS / HKLM
TLR3	Doppelsträngige RNS	Poly(I:C) / Poly(I:C) LMW
TLR4	Lipopolysaccharide	E. coli K12LPS
TLR5	Flagellin <i>S. typhimurium</i>	Flagellin
TLR6 (+ TLR2)	Lipoproteine, diacyliert	FSL-1
TLR7	Einzelsträngige RNS	Imiquimod
TLR8	Einzelsträngige RNS	ssRNA40
TLR9	DNS	ODN2006 (Typ B)

Adaptermolekül Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) zählen in der TLR Familie zu den wichtigsten Molekülen für das Einleiten der Immunantwort auf *M.tb*. Die Aktivierung von TLRs führt zur Signaltransduktion und Nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) Aktivierung (Thada et al., 2013), was letztlich zur Ausschüttung von TNF führt, einem wichtigen Zytokin für die Makrophagenaktivierung und Granulombildung bei TB (Lin et al., 2007; Rojas et al., 1999). Unter den zehn beim Menschen aktiven TLRs, erkennt TLR2 mikrobielle Lipopeptide (Brightbill et al., 1999). TLR2 kann ein Heterodimer mit TLR1 oder -6 bilden und der TLR2/1 Heterodimer erkennt triazylierte Lipopeptide, während der TLR2/6 Komplex der Rezeptor für diazylierte Lipopeptide ist (Li et al., 2013). Der TLR2/1 Komplex interagiert zu einem frühen Zeitpunkt mit Lipopeptiden, die von *M.tb* und *Mycobacterium (M.) leprae* stammen (Krutzik et al., 2003; Takeuchi et al., 2002), weshalb in dieser Studie dieser Komplex primär untersucht wurde (Abbildung 1.2).

Es gibt mehrere Gründe zur Annahme, dass TLR-Varianten zu erhöhter Suszeptibilität von TB führen. Ma et al. haben gezeigt, dass es eine signifikante Erhöhung der Anzahl an seltenen SNPs in TLR1, -6 und -10 bei TB-Patienten verglichen mit den gepaarten Kontrollen in Nordamerika gibt (Ma et al., 2007).

TLRs sind Typ I Transmembranproteine, die eine Ektodomäne (extrazelluläre Domäne), eine Transmembranregion und zytosolische Toll-interleukin 1 Rezeptor (TIR)-Domänen einschließen. Die Ektodomäne beinhaltet Leucinreiche Wiederholungssequenzen, welche die Erkennung von PAMPs herbeifüh-



**Abbildung 1.2** – TLRs, ihre Hauptliganden und die intrazellulären Signalwege, die zur Stimulation von proinflammatorischen Zytokinen führen. Abbildung von Netea et al. (Netea et al., 2012)

ren, während die TIR-Domänen die Downstream-Signalwege aktivieren (Kawai and Akira, 2011).

TLRs sind phylogenetisch konservierte Mediatoren des angeborenen Immunsystems, die essentiell für die Mikroben Erkennung auf Makrophagen und DCs sind (Belvin and Anderson, 1996; Medzhitov et al., 1997; Visintin et al., 2001). Zuerst wurde Toll in *Drosophila* als ein Typ-I-Transmembranrezeptor gefunden, welcher die dorsal-ventrale Polarität während der Embryogenese kontrolliert (Stein et al., 1991). Nach der Identifizierung von Toll als essentiellen Rezeptor der angeborenen Immunantwort gegen Pilzinfektionen bei *Drosophila*, führten Homologiestudien zur Entdeckung eines Homologs von Toll im Menschen (Medzhitov et al., 1997). Er ist heute als TLR4 bekannt, der gemeinsam mit MD-2 bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) erkennt und die Genexpression von inflammatorischen Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen induziert (Medzhitov et al., 1997). Spätere Studien haben mehrere strukturähnliche Proteine zu TLR4 identifiziert. Zur Zeit sind 13 Säugetier-TLRs bekannt von denen TLR1-10 im Menschen identifiziert wurden. TLRs sind Transmembranproteine mit sogenannten Leucin-reichen Wiederholungssequenzen [Leucine-Rich Repeats] (LRRs) in ihrer extrazellulären Domäne. Die zytoplasmatische Domäne der TLRs ist homolog zu der Signaldomäne des IL-1 Rezeptors und auch als TIR Domäne bekannt. Die TIR Domäne verbindet den TLR mit der IL-1R-assoziierten Kinase (IRAK), einer Serinkinase, die Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B aktivieren und somit zu einer Produktion von Zytokinen führt. Die Aktivierung von TLRs durch ihre spezifischen Liganden kann verschiedene biologische Folgen haben, von Zytokinsekretion, Modulation der adaptiven Immunantwort und Apoptose bis hin zur direkten antimikrobiellen Aktivität (Krutzik and Modlin, 2004; Liu et al., 2010; Parker et al., 2005).

Humane TLRs sind spezifisch für konservierte PAMPs von Bakterien, Viren und Pilzen (Beutler, 2009; Coll and O'Neill, 2010). TLRs aktivieren eine Kaskade von Molekülen, was die Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und eine Heraufregulierung von kostimulatorischen Molekülen bewirkt. TLRs werden auf verschiedenen Zellen unterschiedlich ausgebildet und bilden eine Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem indem sie DCs und andere Antigen-präsentierende Zellen (APCs)



aktivieren (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Die bekannten Liganden für TLRs sind Nukleinsäuren (TLR3, 7-9), die von intrazellulären TLRs erkannt werden (Blasius and Beutler, 2010), triazylierte Lipopeptide (TLR1/2), diazylierte Lipopeptide (TLR2/6), LPS (TLR4) und Flagellin (TLR5), die von extrazellulären TLRs erkannt werden (Kumagai and Akira, 2010; Uciechowski et al., 2011, 2013).

Von den 10 humanen TLRs werden TLR1, -2, -4, -6, -8 und -9 mit dem Erkennen von Mykobakterien in Verbindung gebracht. Die meisten wichtigen *M.tb*-Zell-Oberflächenliganden, welche mit den TLRs und anderen Rezeptoren interagieren, sind das 19 und das 27 kDa Lipoprotein, das 28 kDa Glykolipoprotein, LM und ManLAM (Jo et al., 2007; Jung et al., 2006; Noss et al., 2001). Diese Interaktion resultiert in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Stickoxid entweder durch einen MyD88-abhängigen oder -unabhängigen Signalübertragungsweg (Jo, 2008; Xu et al., 2007; Yamamoto et al., 2003a). Der MyD88-abhängige Weg involviert die frühe Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Alle TLRs mit Ausnahme von TLR3 aktivieren diesen Weg. TLR3 kann ausschließlich und TLR4 zusätzlich über einen MyD88-unabhängigen Weg die Zelle stimulieren, der zur Aktivierung von Typ-I Interferonen führt (Covert et al., 2005).

### 1.2.1 Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)

Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) ist ein wichtiger Signalüberträger innerhalb der TLR-induzierten Signalkaskade. Auch für die *M.tb*-induzierte Makrophagenaktivierung scheint er essentiell zu sein (Underhill et al., 1999b): Verglichen mit Wildtyp-Mäusen sind MyD88 knock-out-Mäuse deutlich empfänglicher für eine TB-Infektion (Fremond et al., 2007).

#### MyD88-abhängiger Signalweg

Die Ligandenbindung führt zur TLR Dimerisierung und Konformationsänderung, wodurch sich der TLR dann mit MyD88 verbindet und mit IRAK-4 über deren entsprechende Todesdomäne interagiert (Burns et al., 2003; Medzhitov et al., 1998; Muzio, 1997; Suzuki et al., 2002). Sobald IRAK-4 an MyD88

gebunden hat, rekrutiert und phosphoryliert es IRAK-1, wodurch die Kinase-Funktion von IRAK-1 aktiviert wird. Anschließend wird IRAK-1 autophosphoryliert, wodurch der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierte-Faktor (TRAF)6 zu dem MyD88 / IRAK-4 / IRAK-1 Komplex rekrutiert wird. Danach dissoziieren IRAK-1 und TRAF6 von dem Rezeptorkomplex und interagieren mit zusätzlichen Molekülen, wodurch eine c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und eine Inhibitor-von- $\kappa$ B-Kinase (IKK) aktiviert werden. Diese Proteine induzieren dann das Aktivator-Protein-1 (AP-1) und NF- $\kappa$ B, welches in den Zellkern transloziert und die Transkription einer Reihe von Genen induziert, welche proinflammatorische Zytokine wie TNF, IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  und Chemokine encodieren (Takeda and Akira, 2004; Thada et al., 2013).

### **MyD88-unabhängiger Signalweg**

TICAM1 oder Toll-interleukin 1receptor domain-containing adapter protein inducing IFN $\beta$  (TRIF) spielt eine wichtige Rolle im MyD88-unabhängigen Signalweg. Das TRIF-verwandte Adaptermolekül TICAM2 oder TRIF-related adaptor molecule (TRAM) verbindet TLR4 mit TRIF (Fitzgerald et al., 2003; Yamamoto et al., 2003b). TLR4 und TRAM werden zum Endosom transportiert und die folgende Rekrutierung von TRIF geschieht noch vor der Initiierung (Kagan et al., 2008), die TANK-binding kinase 1 (TBK-1) involviert, was wiederum eine interferon regulatory factor (IRF)-3-Phosphorylierung induziert und somit IRF-3 aktiviert und IFN- $\beta$  induziert (Doyle et al., 2002; Hoshino et al., 2002; Toshchakov et al., 2002). IRF-3 kann sich auch mit kanonischen IKKs, welche aus IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  bestehen, assoziieren. Diese beiden phosphorylieren Ser32 und Ser36 von I $\kappa$ B $\alpha$ , wodurch NF- $\kappa$ B aktiviert wird (Takeda and Akira, 2004; Thada et al., 2013).

### **1.2.2 Toll-like Rezeptor 1**

TLR1 ist ein Typ-1 Transmembranprotein, bestehend aus 786 Aminosäuren mit einer 581 Aminosäuren umfassenden, Leucin-reichen extrazellulären Domäne, einer aus 23 Aminosäuren bestehenden Transmembrandomäne (Aminosäure 582-604) und einer 181 Aminosäure langen zytoplasmatischen Signaldomäne. TLR1 wird vor allem in der Milz und in peripheren Blutzellen expri-

miert (Zarembler and Godowski, 2002). Der humane TLR1 spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr gegen *M.tb*. Eine Studie in Vietnam und Seattle hat 17 Polymorphismen in der kodierenden Region identifiziert, von denen 7 synonym (C114T (H38H) , A914T (H305L), C944T (P315L), T1583C (C528C), G1677A (P559P), T1760G (V587G), T1892G (L631R)) und 10 nicht synonym sind (G1968A (L656L), C2198T (P733L), T130C (S44P), A1482G (V494V), C1938T (H646H), G239C (R80T), C352T (H118Y), A743G (N248S), A1518G (S506S), und T1805G (I602S)). Davon sind 7 in der extrazellulären Domäne und 2 in der intrazellulären Domäne des Rezeptors lokalisiert (Hawn et al., 2007).

Andere Studien haben gezeigt, dass TLR1-Polymorphismen mit verminderter Zelloberflächenexpression des Rezeptors assoziiert sind (Uciechowski et al., 2011). Das Vorhandensein der Variationen R80T, N248S und I602S nSNPs wurde dabei mit invasiver Aspergillose (Kesh et al., 2005) und Morbus Crohn (Pierik et al., 2006) in Verbindung gebracht. Bei Malaria und *H. pylori* induzierten gastrischen Erkrankungen wurde die Variation 602S als Risikofaktor beschrieben (Leoratti et al., 2008; Yang et al., 2013). Eine Studie aus Deutschland hat gezeigt, dass das Auftreten der Variationen 743A und 1805G mit TLR1-Defizit und verminderter Funktionalität korrelieren und stark mit Suszeptibilität zu TB assoziiert sind (Uciechowski et al., 2011). In Afro-Amerikanern und kaukasisch-amerikanischen Patienten wurden häufige Varianten wie N248S und S602I und seltene Varianten wie H305L und P315L mit einer veränderten Immunantwort auf *M.tb*-Liganden und Suszeptibilität für Lepra assoziiert (Ma et al., 2007).

Die TLR1 T1805G Variante ist ein verbreiteter Polymorphismus, der zu einer Aminosäureveränderung in der Transmembrandomäne des TLR1-Moleküls führt und eine Substitution von Isoleucin durch Serin verursacht. Studien haben gezeigt, dass dieser Aminosäureaustausch die TLR1-Expression an der Zelloberfläche beeinflusst und zu einer Beeinträchtigung der Entzündungsreaktion führt. Er ist vermutlich der häufigste SNP, der TLR-Funktionen beeinflusst, der bisher identifiziert wurde (Johnson et al., 2007). Mit TLR1 T1805G transfizierte HEK293 Zellen zeigen substanziell stärkeres NF- $\kappa$ B Signal wenn sie mit Lipopeptiden oder *M.tb* stimuliert werden (Hawn et al., 2007). Außerdem produzieren Individuen mit dem 1805TT Genotyp in einem Vollblut-

assay nach Lipopeptid-Stimulation deutlich mehr IL-6 als Personen mit dem 1805GG Genotyp (Hawn et al., 2007). Eine weitere Studie zeigte eine verminderte Zelloberflächen-Expression von TLR1 und eine verminderte inflammatorische Antwort auf den Lipopeptidagonisten für TLR2/1. Außerdem wurde durch Transfektionsversuche gezeigt, dass dieser Effekt durch T1805G verursacht wurde und nicht durch ein verbundenes Allel.

Diese Studie zeigte auch, dass T1805G eine häufige Varianz ist und ebenfalls mit einem erhöhten Leprarisiko in Verbindung steht (Johnson et al., 2007). Diese Ergebnisse wurden von weiteren Gruppen repliziert und bestätigt (Barreiro et al., 2009; Uciechowski et al., 2011). Weiterhin wurde T1805G ebenfalls mit Morbus Crohn in Verbindung gebracht (Pierik et al., 2006). In Verbindung mit weiteren Studien zu Infektionskrankheiten (Leoratti et al., 2008) lassen diese Studien auf einen möglichen Zusammenhang von TLR1 T1805G mit der klinischen Suszeptibilität für TB und der angeborenen Immunantwort schließen. Der Grund, dass die Ergebnisse dennoch unterschiedlich ausfallen, kann darin bestehen, dass die Frequenz dieses Polymorphismus stark zwischen den verschiedenen Bevölkerungen schwankt (Hawn et al., 2007).

TLR2/1 Heterodimere spielen eine wichtige Rolle bei der Wirtsabwehr gegen mykobakterielle Infektionen. Beim TLR1 Gen spielen zwei SNPs eine wichtige Rolle: A743 (S248N, rs4833095) und der oben erwähnte T1805G (I602, rs5743618). Es wurde beschrieben, dass sie mit mykobakteriellen Infektionen (Ma et al., 2007; Uciechowski et al., 2011) sowie mit Lepra und Sepsis in Verbindung stehen (Johnson et al., 2007; Wyllie et al., 2000). Verschiedene Studien zeigen, dass die TLR1 Genotypen 743AA/1805GG mit verminderter TLR1 Expression auf der Zelloberfläche sowie verminderter TLR1 Funktion korrelieren, während heterozygote 743AG/1805TG und homozygote 743GG/1805TT Genotypen positiv mit Expression von TLR1 auf der Zelloberfläche korrelieren (Hawn et al., 2007; Johnson et al., 2007; Schumann and Tapping, 2007; Uciechowski et al., 2011). Uciechowski et al. haben Hinweise darauf gefunden, dass die TLR1 SNPs A743G und T1805G teilweise für TLR1-Defekte verantwortlich sind, welche bei älteren Menschen beobachtet werden (Uciechowski et al., 2011, 2013).

Als Antwort auf die Stimulation mit dem TLR1 Liganden Pam<sub>3</sub>Cys war die Variante 602I unverändert in der Lage, NF- $\kappa$ B-Signalübertragung einzu-

leiten, während die 602S Variante verminderte Signalübertragung zeigte, was impliziert, dass 602I Lipopeptidantworten reguliert. Die Variante N248, die relativ häufig bei kaukasischen Amerikanern vorkommt, enthält eine konservierte Aminosäure der extrazellulären Domäne von TLR1, die eine vermeintliche Glykolisierungsstelle darstellt. Ein Austausch des Asn mit Ser könnte in veränderter Glykolisierung des TLR1 resultieren, was möglicherweise Form oder Funktion des Rezeptors verändern könnte (Ma et al., 2007; Thada et al., 2013).

### 1.2.3 Toll-like Rezeptor 2

Die DNS, die für TLR2 kodiert, besteht aus 2352 Basen, welche 784 Aminosäuren kodieren (Rock et al., 1998). Dieser Typ-I-Transmembranrezeptor besteht aus einer extrazellulären Leucin-reichen Domäne (Aminosäuren 1-588), einer einzelnen Transmembrandomäne (Aminosäure 589-609) und einer zytosmatischen Domäne (Aminosäure 610-784). Er wurde als Hauptmediator der Makrophagenaktivierung als Antwort auf *M.tb* beschrieben (Toshchakov et al., 2002). Er erkennt 19-kDa Lipoproteine, welche zur Produktion inflammatorischer Zytokine, wie TNF und IFN- $\gamma$  führen. Diese Zytokine werden hauptsächlich von T-Helfer (Th)1-Zellen ausgeschüttet (Basu et al., 2007; Fricke et al., 2006; Lopez et al., 2003; Means et al., 1999). Mehrere Studien haben gezeigt, dass Phagozytose in Abwesenheit von TLRs nicht zur Immunantwort führt. Folglich können Polymorphismen im TLR2 Gen zu einer verminderten Antwort von Makrophagen auf bakterielle Peptide führen, was im Endeffekt zu einer abgeschwächten Immunantwort im Wirt führen dürfte (Underhill et al., 1999a).

Bisher sind 89 SNPs im TLR2-Gen beschrieben. Viele dieser SNPs haben keine direkte Auswirkung auf die Zellfunktion und es gibt nur wenig Literatur über funktionelle Polymorphismen von TLR2. Die extrazelluläre Domäne von TLR2 ist ausschlaggebend für die Bindung von verschiedenen Liganden und für die Dimerisierung mit TLR1 und TLR6 (Bulut et al., 2001; Ozinsky et al., 2000). Fünf SNPs wurden in dieser Region identifiziert (Akira et al., 2001; Janeway Jr. and Medzhitov, 2002; Kirschning et al., 1998). Von diesen fünf wurden drei (Arg753Gln, Arg677Trp und Pro681His) mit reduzierter NF- $\kappa$ B Aktivierung und einem erhöhten Infektionsrisiko in Verbindung gebracht, indem die TLR2-Bindung mit MyD88 blockiert wird (Medzhitov et al., 1998;

Texereau et al., 2005). Pro681His kommt in asiatischen und in afrikanischen Bevölkerungen vor, scheint aber bei Kaukasiern nicht aufzutreten. Diese Variante wurde mit Lepra in Korea (Kang and Chae, 2001) und mit Suszeptibilität für TB in Tunesien (Ben-Ali et al., 2004) assoziiert (Thada et al., 2013).

Es wird angenommen, dass TLR2 durch dessen stimulierenden Effekt auf TNF-Produktion in Makrophagen wichtig für das Einleiten der angeborenen Immunantwort des Wirtes ist (Bafica et al., 2005; Underhill et al., 1999b). TLR2 ist auch wichtig für die Ausschüttung von IL-12 bei Makrophagen aber nicht in DCs (Pompei, Jang et al. 2007). TLR2<sup>-/-</sup> (knockout) Mäuse zeigen fehlerhafte Granulombildung und eine stark erhöhte Suszeptibilität für *M.tb* verglichen mit den Wildtypmäusen (Drennan et al., 2004; Reiling et al., 2002). Ebenso zeigen sie fehlerhafte Kontrolle einer chronischen Infektion mit *M.tb* (Drennan et al., 2004; Kleinnijenhuis et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass TLR2 bei der direkten Stimulation von Natürliche Killer (NK)-Zellen durch *BCG* involviert ist (Marcenaro et al., 2008) und mykobakterielle Peptoglykane (PG) an eine lösliche Form von TLR2 binden (Esin et al., 2013).

TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimere zeigen verschiedene Spezifitäten gegenüber mikrobiellen Agonisten, die durch die LRR Motive determiniert werden (Takeda et al., 2002; Takeuchi et al., 2001, 2002). In einer Studie wurde gezeigt, dass drei SNPs in der LRR Region liegen: P315L ist einer der SNPs, der Einfluss auf das angeborene Immunsystem und klinische Suszeptibilität für viele Infektionskrankheiten hat (Omueti et al., 2007).

Der TLR2 Arg677Trp (R677W) Polymorphismus inhibiert die von *M. leprae* und *M.tb* gesteuerte NF- $\kappa$ B Aktivierung (Bochud et al., 2003; Kang et al., 2002). Eine Studie hat gezeigt, dass Patienten mit dem 677W Allel niedrigere basale und mykobakteriell-stimulierte Serum-IL-12-Spiegel hatten. IL-12 wird für die Aktivierung des IFN  $\gamma$ -Signalweges und die Induktion der Th1 Antwort benötigt, die ausschlaggebend für die Zellgesteuerte Immunität ist. Studien haben gezeigt, dass die über TLR2 durch Lipoproteine von *M.tb* induzierte Signaltransduktion die Expression von MHC-II und das Verarbeiten von Antigenen durch Makrophagen inhibiert (Fulton et al., 2004; Pai et al., 2004). Dadurch könnte ein Teil der infizierten Makrophagen nicht in der Lage sein, den CD4<sup>+</sup> T-Zellen *M.tb* Antigene zur Verfügung zu stellen, was in einer unzureichenden Aktivierung von T-Zellen resultieren kann und somit eine Um-

gehung der Immunüberwachung und Nischenbildung, in denen *M.tb* überleben und ausharren kann, befördert (Jo, 2008; Noss et al., 2001; Thada et al., 2013).

#### 1.2.4 Toll-like Rezeptor 4

TLR4 besteht aus 839 Aminosäuren und wird durch bakterielles LPS aktiviert. LPS bindet zunächst an den Cluster of Differentiation-14 (CD14) Rezeptor, welcher es dann zum TLR4-Rezeptorkomplex transferiert. TLR4 bildet Homodimere und einen Komplex mit dem MD-2 Protein. Dieser Komplex besteht somit aus zwei TLR4 und zwei MD-2 Molekülen (Hailman et al., 1994; Tobias et al., 1995). Die Transmembrandomäne (Aminosäuren 632-839) von TLR4 spielt eine wichtige Rolle in der funktionellen Oligomerisation. Studien mit TLR4-transfizierten Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster [Chinese Hamster Ovary] (CHO) Zellen und Mausmakrophagen zeigen die Wichtigkeit von TLR4 beim Erkennen von *M.tb* (Kleinnijenhuis et al., 2011; Means et al., 2001, 1999).

TLR4 kann vermutlich ebenfalls durch das Hitzeschockprotein 60/65 aktiviert werden (Bulut et al., 2005; Ohashi et al., 2000), ein Protein das von verschiedenen *M.tb* Spezies abgesondert wird. Auch eine Reihe anderer Proteine wurden als TLR4-Liganden postuliert, jedoch kamen vielfach Zweifel auf, besonders wenn bakterielle Expressionssysteme verwendet wurden, ob kleinste LPS-Kontaminationen in den Proteinpräparationen völlig ausgeschlossen werden konnten. Neben der Signaltransduktion über MyD88 kann TLR4 auch intrazelluläre Signale durch einen zweiten Signalübertragungsweg einleiten, der durch TRIF initiiert wird (Kleinnijenhuis et al., 2011).

Eine Mutation (V651F) kann die Antwort von TLR4 auf LPS-Stimulation beeinflussen (Nishiya et al., 2006). In der ektoplasmatischen LRR Domäne wurden fünf Aminosäure-verändernde Mutationen gefunden: S73R, A97V, Y98C, T175A und T399I, die relativ häufig bei Kaukasiern vorkommen (Schröder and Schumann, 2005). Die Aminosäuresubstitutionen können Proteinstruktur und -funktion verändern, aber es ist immer noch nicht klar, ob Y98C und T175A die Funktion von TLR4 beeinflussen. S73R hat eine leicht erhöhte Häufigkeit bei Typhuspatienten.

Zwei nichtsynonyme TLR4-Polymorphismen wurden beschrieben: eine A/G Verschiebung bei SNP rs4986790, die einen D/G Polymorphismus bei Amino-

säure 299 hervorruft und ein C/T Veränderung bei SNP rs4968791, die einen T/I Polymorphismus bei Aminosäure 399 hervorruft. Es wurde gezeigt, dass die entstandenen Zustände (Nukleotid G und T, bzw. Aminosäure G und I) die Liganden-Bindungsstelle des Rezeptors verändern (Ferwerda et al., 2007a; Rallabhandi et al., 2006). Diese beiden SNPs sind bei Kaukasiern relativ häufig und treten meistens gekoppelt auf (kosegregierend). Im weltweiten Vergleich ist das Vorkommen aber höchst unterschiedlich: D299G und T399I SNPs wurden weder bei Koreanern, Taiwan-Chinesen noch bei Japanern gefunden (Kim et al., 2008; Nakada et al., 2005) und bei Vietnamesen nur höchst selten. D299G scheint mit TB-Suszeptibilität bei HIV-infizierten Patienten in Tansania assoziiert zu sein (Papadopoulos et al., 2010). Es gibt jedoch keine Assoziation zwischen D299G und TB Suszeptibilität in Gambia (Newport et al., 2004) und Mexiko (Rosas-Taraco et al., 2007; Thada et al., 2013). Die kosegregierenden Mutationen T399I und D299G, die in der ektoplasmatischen LRR Domäne liegen, sind signifikant mit einer verminderten Zytokinantwort auf LPS-Stimulation und einer erhöhten Suszeptibilität für verschiedene Infektionen assoziiert (Ameziane et al., 2003; Hawn et al., 2005; Lorenz et al., 2002; Mockenhaupt et al., 2006), indem sie die extrazelluläre Domäne des TLR4 verändern (Schröder and Schumann, 2005). Diese LRR-Mutationen können potentiell die Phosphorylierung von TLR4 stören und als Folge Signaltransduktion und inflammatorische Mediatorausschüttung verändern und so potentiell zu veränderter TB-Suszeptibilität führen (Thada et al., 2013).

### 1.2.5 TLR7 und TLR8

Humane TLR7 und TLR8 erkennen Einzelstrang-Ribonukleinsäure (RNS), die in der Regel viralen Ursprungs ist. Sie können nicht nur Oligoribonukleotide (ORNs) (natürliche Agonisten) erkennen, sondern auch synthetische Immunantwort-Modifizierer (chemische Agonisten) wie Imidazoquinoline. Obwohl sie sehr homolog sind, ergänzen sich TLR7 und -8 bei der Erkennung von verschiedenen, sequenzspezifischen RNS Motiven mit der möglichen Implikation, verschiedene Viren zu erkennen (Gantier et al., 2010).

TLR8 kann Einzelstrang-RNS von Pathogenen wie RNS-Viren erkennen. Für die hier dargestellte Studie von Interesse wurde eine Heraufregulierung der TLR8-Proteinexpression bei Makrophagen nach *BCG* Infektion gezeigt



(Davila et al., 2008; Kleinnijenhuis et al., 2011).

Auf Genomebene kodiert der TLR8 Gen-Lokus für zwei verschiedene Spleiß-Varianten mit alternativen Translationsstarts, deren funktioneller Beitrag noch nicht bekannt ist (Du et al., 2000; Oh et al., 2008). Proteine der TLR8-Variante 1 und 2 (TLR8v1 und TLR8v2) haben bis auf 19 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus bei TLR8v1, die identische Sequenz. Es wurden signifikante Korrelationen zwischen TLR8-Polymorphismen und aktiver TB sowie einer Heraufregulierung von TLR8 mRNA im Blut von TB-Patienten nachgewiesen (Davila et al., 2008). Dies suggeriert eine mögliche Rolle von TLR8 beim Erkennen von phagozytierten Bakterien.

TLR8 liegt auf dem X-Chromosom und erkennt Einzelstrang-RNS von Pathogenen wie RNS-Viren. 149 SNPs wurden bei indonesischen und russischen TB-Patienten untersucht, von denen vier signifikant mit pulmonaler TB bei Männern assoziiert wurden (Davila et al., 2008). Drei dieser Varianten sind die Nukleotide -129C/G, -2167A/G und -1145 A/G und liegen in der regulatorischen (Promoter) Region. Die vierte Variante, Aminosäure M1V, liegt im Startkodon. Bei den indonesischen Männern zeigte das Vorhandensein des A-Allels bei M1V eine erhöhte Suszeptibilität für pulmonale TB, während das G-Allel protektiv wirkte. Eine weitere Studie zeigte, dass dieselbe Assoziation auch bei männlichen türkischen Kindern existiert (Dalgic et al., 2011a; Thada et al., 2013). Die G-Variante des M1V Polymorphismus wird mit einem protektiven Effekt bezüglich TB in Zusammenhang gebracht, könnte jedoch gleichzeitig ein Risikofaktor für *H. pylori*-Infektionen sein (Gantier et al., 2010).

### 1.2.6 Toll-like Rezeptor-Heterodimere

Heterodimere sind Molekülverbindungen zweier unterschiedlicher Moleküle. Im Fall von TLRs können sich verschiedene TLRs miteinander verbinden, um eine weitere Vielfalt von Pathogenen erkennen zu können. TLR2 kann mit TLR1 oder -6 einen heterodimeren Komplex bilden um Makrophagen zu aktivieren (Ozinsky et al., 2000), welches ein wichtiger Abwehrschritt gegen *M.tb* ist.

### 1.2.7 Toll-like Rezeptoren und Mykobakterien

Bakterielle Lipopeptide aktivieren TLRs1, -2 und -6 und interagieren mit TLR10. Lipoproteine von Bakterien und Mykoplasmen sind durch ihre ungewöhnlichen, mit zwei oder drei Fettsäuren azylierten Aminosäure-Dihydroxypropylcysteinen charakterisiert. Lipoproteine sind Teil der äußeren Membran von sowohl Gram-negativen, als auch -positiven Bakterien, von *Rhodopseudomonas Viridis* und von Mycoplasma (Shibata et al., 2000). Synthetische Analoge und der N-terminale Teil des Lipoproteins von *E. coli* wurden zum ersten Mal 1983 synthetisiert. Sie dienen als potente Immunoadjuvantien in vivo und in vitro. Immunisierung von Meerschweinchen und Schweinen mit einem komplett synthetischen Impfstoff, der aus dem eingebauten Lipotripeptid-Adjuvanten Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Ser und aus B- und T-Zellepitopen des Maul-und-Klauenseuche-Virus besteht, führt zu einem langanhaltenden Schutz gegen Virenbefall (Wiesmuller et al., 1989). Aus der Konjugation von Klasse I limitierten Peptiden mit Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Ser folgte 1989 zum ersten Mal effizientes Priming von Virus-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (Wiesmuller et al., 1989).

Obwohl die Interaktion von *M.tb* mit TLRs die Fresszellen aktiviert, führt sie selbst nicht zur sofortigen Vernichtung der Mykobakterien. Nach der Interaktion von spezifischen mykobakteriellen Strukturen mit den TLRs werden Signalwege aktiviert, in denen MyD88 eine wichtige Rolle spielt (Underhill et al., 1999b). Anschliessend werden IRAK, TRAF6, TGF $\beta$ -activated protein kinase 1 (TAK1) und mitogen-activated protein (MAP) Kinase in einer Signalkaskade rekrutiert, die zur Aktivierung und nuklearen Translokation der Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B führt (Takeda and Akira, 2004). Dies führt zur Transkription der in der Aktivierung der angeborenen Immunantwort involvierten Gene, hauptsächlich der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL1 $\beta$ , IL-12 und Stickstoffmonoxid (Akira, 2003; Kleinnijenhuis et al., 2011).

### 1.2.8 Lipopeptide und TLR Forschung

Zellaktivierung durch Lipoproteine und Lipopeptide wird durch ihre Interaktion mit TLRs gesteuert. Lipoproteine repräsentieren eine der molekularen Verbindungen zwischen Wirt-Abwehr-Mechanismen und mikrobiellen Produk-

ten (Aliprantis et al., 1999). TLRs haben Sequenz-Ähnlichkeiten zu den zytoplasmatischen Regionen der IL-1 Rezeptorfamilie und wirken über die selben Signalmoleküle wie zum Beispiel MyD88, IRAK, TRAF, MAP-Kinasen und NF- $\kappa$ B. Die N-terminalen Teile von bakteriellen Lipoproteinen sind Effektoren für die angeborene Immunantwort. Die korrespondierenden Säugetier-TLRs1, -2 und -6 wurden identifiziert (Takeda et al., 2003).

Lipopeptide wie Pam<sub>3</sub>-Cys-SK<sub>4</sub> rufen über die Heterodimere TLR2/1 oder TLR2/6 zelluläre Antworten hervor (Takeuchi and Akira, 2002). Die Kristallstrukturen der TLR2/1 und TLR2/6 Heterodimere mit den synthetischen Liganden Pam<sub>3</sub>-Cys-SK<sub>4</sub> oder Pam<sub>2</sub>-Cys-SK<sub>4</sub> wurden beschrieben (Kang et al., 2009).

Struktur-Wirkungsstudien mit synthetischen Lipopeptid-Analogen haben die strukturelle Basis der Interaktion mit TLR1, -2 und -6 gezeigt (Buwitt-Beckmann et al., 2005). Kürzlich wurde ebenfalls die Interaktion von Lipopeptiden mit TLR10 beschrieben (Guan et al., 2010).

### 1.2.9 Tumornekrosefaktor $\alpha$

Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF) ist ein Zytokin, das eine wichtige Rolle bei der Tuberkuloseerkrankung spielt, indem es die Ausschüttung verschiedener Zytokine und Chemokine, sowie die Apoptose induziert (Stenger, 2005). TNF wird außerdem für die Erhaltung des Granuloms und für die Kontrolle der TB benötigt (Flynn et al., 1995). Wirte mit Defiziten in TNF oder dessen Rezeptoren haben eine erhöhte Suszeptibilität für mykobakterielle Infektionen (Bean et al., 1999; Garcia et al., 1997; Kaneko et al., 1999; Kindler et al., 1989; Roach et al., 2002). TNF kontrolliert dabei sowohl den angeborenen sowie den erworbenen Teil der Immunantwort auf TB. Patienten, die sich einer Therapie gegen chronische Entzündungskrankheiten mit einem monoklonalen Antikörper gegen TNF unterziehen, sind anfällig für TB, woraus geschlossen werden kann, dass TNF eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von TB beim Menschen spielt (Gardam et al., 2003; Keane et al., 2001; Mohan et al., 2004).

### 1.2.10 Geschlechterunterschiede

Einige Studien zeigen, dass Frauen generell eine überlegene systemische Immunität gegenüber Männern haben, was allerdings auch zu einer erhöhten Suszeptibilität für Autoimmunkrankheiten führt (Nalbandian and Kovacs, 2005; Olsen and Kovacs, 1996; Whitacre et al., 1999). Dass das Geschlecht einen Einfluss auf die Suszeptibilität für Infektionen hat, wurde bereits früh gründlich untersucht (Terres et al., 1968). Epidemiologisch-klinische Daten und Tiermodelle von verschiedenen Krankheiten beim Menschen, wie Sepsis (Beery, 2003) und Listeriose (Pasche et al., 2005), zeigen, dass Männer und Frauen auf Infektionen unterschiedlich reagieren.

Dieser Unterschied wird dem Effekt zugeschrieben, den Sexualhormone auf in Entzündungen und Immunität involvierte, regulierende Gene haben (Morell, 1995; Salem, 2004). So wird zum Beispiel bei weiblichen Mäusen, die mit *L. monocytogenes* infiziert wurden, durch Östrogen die Produktion des immunosuppressiven Zytokins IL-10 gefördert und das schützende Zytokin  $\text{IFN}\gamma$  herabreguliert (Pasche et al., 2005).

Denkbar ist auch, dass dieser Unterschied auf unterschiedliche soziale Rollen und Beziehungen zurückzuführen ist und dass z.B. das männliche Immunsystem durch stärkere Reduzierung auf Konkurrenz und weniger auf soziale Bindungen geschwächt ist.

## 1.3 Genetische Variationen

Epidemiologische Studien bei Menschen haben gezeigt, dass genetische Variationen in den für PRRs und deren nachgeordneten Signalüberträgern kodierenden Genen Suszeptibilität für, den Schweregrad und die Folgen der Krankheit beeinflussen (Kleinnijenhuis et al., 2011). Ein besseres Verständnis von PRRs und deren Erkennen von Mykobakterien zusammen mit immungenetischen Studien bei TB-Patienten sollte somit nicht nur zu einem besseren Verständnis der Pathogenese von TB führen, sondern könnte auch zur Entwicklung neuer Interventionsstrategien dienen.

Es wurden bisher vier genomweite Studien durchgeführt um Polymorphismen zu finden, die mit der Suszeptibilität für TB in Verbindung stehen (Mahasirimongkol et al., 2012; Png et al., 2012; Thye et al., 2012, 2010). Hierbei

wurden Variationen auf den Chromosomen 18q11.2 und 11q13 bei Afrikanern aber keine bei Asiaten gefunden, die mit der Suszeptibilität für TB assoziiert werden konnten.

Genetische Variationen wurden innerhalb des TLR-Signalsystems beschrieben, die zur Suszeptibilität und zum Verlauf bestimmter Krankheiten beitragen, und welche durch selektiven Druck aufgetreten sein könnten (Casanova et al., 2011a; Schröder and Schumann, 2005). Durch die Veränderung, *M.tb* zu erkennen wird ebenfalls die Suszeptibilität zu TB alteriert und SNPs in dem TLR2/1 Heterodimer könnten daher diesen Prozess beeinflussen (Hawn et al., 2007; Schumann and Tapping, 2007).

### 1.3.1 Einzelnukleotid-Polymorphismen

Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) sind Punktmutationen in der DNS, die in mindestens 1% der Bevölkerung vorkommen. An der Stelle des SNP existiert hier ein anderes Basenpaar als bei einem Großteil von Mitgliedern derselben Spezies. Es wird zwischen synonymen und nichtsynonymen Basenpaarveränderungen unterschieden. Letztere bewirkt eine Aminosäureveränderung an der entsprechenden Position. Aminosäureverändernde SNPs stehen im Verdacht die Eigenschaften des angeborenen Immunsystems verändern zu können und damit zu beeinflussen, wie das betroffene Individuum auf Erreger reagiert und Krankheiten entwickelt.

Im Fall von TLR2/1 wurden SNPs gefunden, die die Liganden-bindenden Taschen verändern und somit die Möglichkeit beeinflussen, wichtige mikrobielle Liganden zu erkennen. Dies könnte Auswirkungen für Malaria (Hamann et al., 2010), Lepra (Johnson et al., 2007) und anderen Krankheiten (Hawn et al., 2007) haben. Der SNP TLR1-S602I (rs5743618) wurde in mehreren Populationen mit TB assoziiert (Ma et al., 2007; Randhawa et al., 2011; Zhang et al., 2013). Studien zur indischen Bevölkerung sind jedoch rar und die Ergebnisse limitiert auf die SNPs TLR1-S602I, TLR2-R753Q und einige wenige SNPs in anderen TLRs (Selvaraj et al., 2010).

### 1.3.2 Aminosäure-Austausch in Toll-like Rezeptoren

Der bei Kaukasiern häufige TLR1 SNP N248 betrifft eine hochkonservierte Aminosäure in der extrazellulären Domäne von TLR1. Dies gilt ebenfalls für den TLR6 SNP N253, wobei beide einen putativen Glykolisierungsort darstellen. Ein Austausch der Aminosäure N mit S könnte zu einer veränderten Glykosylierung und damit möglicherweise zu einer Veränderung der TLR1-Faltung oder -Funktion führen (z.B. PAMP-Erkennung oder Signaltransduktion) (Ma et al., 2007).

Der S602I Aminosäure-Austausch in TLR1 verändert die erste Aminosäure der intrazellulären Domäne von TLR1, dieses Residuum variiert in TLR10 (L602) und TLR6 (I607) (Ma et al., 2007). TLR6 wurde mit der *M.tb*-Wirt-Interaktion in der Maus in Verbindung gebracht. Außerdem wurde in CHO Zellen gezeigt, dass sich Maus-TLR6 und -2 in einer Liganden-unabhängigen Weise assoziieren, um einen Komplex zu bilden, der zur NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion führt (Ozinsky et al., 2000). Ähnliche Studien mit HEK293 Zellen zeigten NF- $\kappa$ B-Aktivierung als Konsequenz der Co-Expression von humanen TLR2 und -6, und dass die zytoplasmischen Domänen dieser TLRs nötig sind um Signale zu übermitteln (Takeuchi et al., 2001).

## 1.4 Zusammenfassung

Die Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, die durch *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) hervorgerufen ist, und für die schon sehr früh, z.B. durch Zwillingsstudien, eine starke familiäre Komponente beschrieben wurde (Comstock, 1978; Sorensen et al., 1988). Dennoch sind bis heute keine klaren genetischen Suszeptibilitätsmarker identifiziert worden, vielmehr gibt es verschiedene Kandidaten-Gene, unter denen sich auch die Toll-like Rezeptoren (TLRs) befinden (Dye and Williams, 2010; Möller et al., 2010). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die direkte, „angeborene“ Immunantwort von Mykobakterien über Mitglieder der TLRs Familie induziert wird, hier scheint besonders die TLR2-Familie mit den Heterodimerisierungspartnern TLR1 und -6 von Bedeutung zu sein (Jo, 2008).

TLRs sind essentielle Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Während dieses System zwischen Spezies einen hohen Grad der Konservierung zeigen,

kann genetische Variabilität des TLR Systems in der menschlichen Population beobachtet werden (Wellcome Trust Case Control and Consortium, 2007). Es sind zehn humane TLRs bekannt und es wurde eine komplexe Signalkaskade für diese TLRs identifiziert.

Um individuelle TB-Suszeptibilität zu verstehen, ist es wichtig, nachzuvollziehen, wie TLR SNPs mit der Krankheit in spezifischen Populationen assoziiert sind und die funktionellen Konsequenzen der strukturverändernden SNPs zu verstehen. In dieser Arbeit werden Assoziationen zwischen TLR1-248N und TLR8-1V und Schutz vor TB und zwischen TLR4 -299G und Risiko für TB in Südostindien untersucht. Durch das Darstellen der funktionellen Relevanz wird ebenfalls erörtert, wie TLR1-248N mit veränderter NF- $\kappa$ B-Aktivierung und erhöhter TNF-Ausschüttung assoziiert ist.

Polymorphismen in einzelnen Genen des TLR-Signalnetzwerks können die Suszeptibilität für verschiedene Krankheiten beeinflussen (Kawai and Akira, 2010). Bisher konnte jedoch noch nicht klar definiert werden, welche Gene und Genveränderungen in diesem komplexen Netzwerk wirklich zur Suszeptibilität für bestimmte Erkrankungen beitragen. Das Wissen über den Einfluss von genetischen Varianten im TLR Netzwerk auf die Prädisposition zu TB kann unser Verständnis für die Krankheitsentstehung verbessern.

Vorarbeiten des Betreuerlabors konnten zeigen, dass sich Genvariationen in TLR1 stark auf Suszeptibilität und Verlauf von Lepra, eine Erkrankung, die durch ein mit *M.tb* eng verwandtes Bakterium (*M. leprae*) hervorgerufen wird, auswirken (Johnson et al., 2007). Eine dieser Studien wurde in Bangladesch durchgeführt, einem Gebiet mit hoher TB-Prävalenz (Schuring et al., 2009). Andere konnten einen Zusammenhang zwischen TLR2-Varianten und tuberkulöser Meningitis in Vietnam nachweisen (Caws et al., 2008). Elemente der Signaltransduktionskaskade, wie das mal/TIRAP Protein sind ebenfalls für die Erkennung von Mykobakterien essentiell und genetische Variationen scheinen für Suszeptibilität und Verlauf von TB wichtig zu sein (Corr and O'Neill, 2009).

Wie im Betreuerlabor mit herausgefunden wurde, unterscheiden sich die genetischen Variationen der TLRs weltweit stark in ihrer Frequenz, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass es hier einen Selektionsdruck gab, der durch Infektionskrankheiten verursacht worden sein könnte (Ferwerda et al., 2009, 2007a). Da außerdem TB-Fälle hier in Deutschland nur noch sehr selten auf-

treten, ist für dieses Projekt sehr wertvoll, dass es im Rahmen einer internationalen Graduiertenschule angesiedelt werden konnte, die gemeinsam mit der Central University of Hyderabad, Indien, durchgeführt wird. So kann neben gesunden Freiwilligen auch eine große Zahl TB-Patienten aus Indien genotypisiert und auf ihre Krankheitsverläufe hin untersucht werden.

## 1.5 Aufgabenstellung

Tuberkulose stellt ein weltweites Gesundheitsproblem dar, wovon etwa 9 Millionen Menschen betroffen sind und knapp 2 Millionen Menschen jährlich sterben. Aufklärung, kostenlose Therapien und Impfprogramme dämmen die Verbreitung der Krankheit besonders in Industrienationen erfolgreich ein, jedoch ist, besonders in den letzten Jahren, ein Anstieg der Infektionszahlen, auch aufgrund von multiresistenten Erregern, zu beobachten. Da nur etwa 5-10% der Infizierten tatsächlich an aktiver TB erkranken scheinen Gründe wie genetische Variationen einen erheblichen Einfluss auf die Suszeptibilität zu haben.

TLRs stellen einen wichtigen Baustein im Abwehrmechanismus gegen Bakterien im allgemeinen und Mykobakterien im speziellen dar. Genetische Veränderungen der Immunsystemproteine können zu einer alternativen Reaktion des Wirtes auf Pathogene bewirken. Folglich wird hier die Hypothese untersucht, dass Polymorphismen in den TLRs die TB-Suszeptibilität, untersucht an Südindischen Kohorten, verändert. Somit war Ziel dieser Arbeit die Bedeutung genetischer Variationen innerhalb der TLRs und deren Einfluss auf die Suszeptibilität für TB zu untersuchen. Dafür sollte auf die unterschiedliche Verteilung von SNPs in TLRs bei TB Patienten und Kontrollen aus Hyderabad, Indien eingegangen und interessante Abschnitte der TLRs sequenziert und ausgewertet werden. Hierfür sollten eine Kohorte mit TB-Patienten in Hyderabad und jeweils eine gesunde Kontrollkohorte in Hyderabad und Berlin generiert werden.

Weiterhin sollten diese Studien mit funktionellen molekularen Analysen durch in vitro und in silico Untersuchungen erweitert werden, welche die Konsequenzen der genetischen Variationen für die Wirt-Pathogen-Interaktion erklären. Die Frequenz von SNPs des TLR Signalsystems von Menschen in Hyderabad verglichen mit Europa und deren potentielle Rolle für TB-Suszeptibilität



sollte durch Genotypisierung gesunder Kontrollen ermittelt werden. Durch Extraktion von Immunzellen der Kontrollen in Deutschland und Stimulation mit entsprechenden Liganden sollte Aufschluss über die funktionelle Relevanz dieser Variationen geben. Des Weiteren sollten Transfektionsversuche mit entsprechenden 'wildtyp' und 'mutierten' Plasmiden *in vitro* an einer Standardzelllinie etabliert und durchgeführt werden.

Funktionell sind die genetischen Variationen im TLR2-System bisher nicht ausreichend untersucht. Im Betreuerlabor stehen etablierte gain-of-function und loss-of-function Experimentalsysteme zur Verfügung, die jetzt durch die zusätzliche Überexpression der genetischen TLR-Mutanten ergänzt werden sollen. So sollte funktionell untersucht werden, inwieweit sich die genetischen Variationen auf die Induktion der Entzündungsreaktion im Wirt auswirken.



# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 SNP Datenbanken

Es wurde eine Übersichtsdatenbank für TLR SNPs erstellt. Dafür wurden unter anderem folgende Informationen zusammengetragen: Name und alternative Namen für die Genvariante, chromosomale Lokalisation des Gens, Anzahl der Basenpaare, Exons und deren Position, mRNA- und Aminosäuresequenzen im FASTA Format; zu den SNPs rs-Nummern, mRNA und Aminosäureposition, Basenpaar- und Aminosäureveränderung, PolyPhen2<sup>1</sup> Vorhersage und Bewertung, bekannte TB Assoziationen, Linkage Disequilibrium (LD) und bisherige Veröffentlichungen. Durch diese Übersicht konnte eine gut informierte Entscheidung über die zu sequenzierenden Bereiche der Proben-DNS getroffen werden, in denen möglichst viele relevante SNPs liegen. Grundlage der Datenbank bildet die Online-SNP-Datenbank dbSNP oder auch GeneViewReport von NCBI<sup>2</sup>, in welcher bekannte SNPs für sämtliche Gene aufgelistet sind. Zu den dort beschriebenen non-synonymous SNPs (siehe Abschnitt 1.3.1) wurde eine Literatur-Recherche durchgeführt und einen Score zur Wahrscheinlichkeit der individuellen allgemeinen Relevanz errechnet. Zur Berechnung des Scores wurde der Online-Dienst PolyPhen2 des Brigham and Women's Hospital der Harvard University, Boston, USA verwendet.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von PolyPhen2 und der Literaturrecherche konnten interessante von weniger interessanten SNPs unterschieden

---

<sup>1</sup><http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (August 2014)

<sup>2</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> (August 2014)

und die Wahrscheinlichkeit, dass ein jeweiliger SNP einflussreich ist, abgeschätzt werden. Die Datenbanken zu den TLRs und deren SNPs befinden sich in Kapitel 3.1.

## 2.2 Patienten und Kontrollen

Für diese Fall-Kontroll-Studie wurden 206 TB Patienten und 239 Gesunde Kontrollen aus Hyderabad, Andhra-Pradesh / Telangana State, Indien, untersucht. Alle Patienten und Kontrollen waren Inder aus dem Großraum Hyderabad. Die TB-Diagnose wurde klinisch mittels Sputummikroskopie für säurebeständige Bakterien (AFBs) und mittels Röntgenaufnahme des Brustraums oder mittels Histopathologie nach den Richtlinien des Revised National Tuberculosis Control Program (RNTCP) an der Free Chest TB Clinic PPM DOTS des Mahavir Hospital and Research Centre, Hyderabad, bestätigt. Zusätzlich wurde ein Tuberkulintest [Tuberculin skin test] (TST) durch einen Arzt am Mahavir Hospital durchgeführt. Für den TST wurden 5 Tuberkulin Einheiten [Tuberculin units] (TUs) von gereinigtem *MTB* Proteinderivat [Purified protein derivate of whole *MTB*] (PPD) subkutan in den linken Arm gespritzt. Da die Individuen durch ihren Wohnort zu einer Risikogruppe gehören, wurde eine Induration von >10mm nach 48 bis 72 Stunden als positiv gewertet. Personen aus demselben Haushalt und gesunde Kontrollen derselben Region, jeweils ohne Tuberkulosevorgeschichte, wurden auch in die Studie einbezogen. Alle Teilnehmer waren zum Testzeitpunkt HIV-negativ. Die Prozeduren dieser Studie sind mit den Prinzipien der Deklaration von Helsinki konform (Subjects, 2013). Für alle entnommenen Proben wurde eine schriftliche Einverständniserklärung der Teilnehmer eingeholt. Der Studienplan wurde von der wissenschaftlichen Ethikkommission der Central University of Hyderabad akzeptiert und bewilligt. Die verwendete deutsche Kontrollkohorte, wurde im Betreuerlabor erstellt und bereits von Oh et al. beschrieben (Uciechowski et al., 2011).

## 2.3 DNS Präparation / Sequenzierung / PCR

Die Zugriffsnummern (accession numbers) für DNS Sequenzen und Polymorphismen in dieser Arbeit lauten: TLR1: NM\_003263.3 und NP\_003254.2;

für TLR2 NM\_003264.3 und NP\_003255.2; für TLR4: NM\_003266.3 und NP\_003257.1; für TLR7: NM\_016562.3 und NP\_057646.1 und für TLR8: NM\_138636.4 und NP\_619542.1. Blutproben oder Wangenabstriche wurden von TB Patienten und gesunden Kontrollen aus Hyderabad, Andhra-Pradesh, Indien, genommen und daraus DNS Proben mit Hilfe eines DNA Blood mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, Cat. No.: 51104) für die Blutproben und mit einem DNA kit (Qiagen) für Wangenabstriche gewonnen. Die Primer für die PCR-Amplifikation und für das Sequenzieren sind in Anhang A beschrieben (Eurofins Genomics, India Pvt. Ltd). Die Polymerase Kettenreaktion [Polymerase chain reaction] (PCR)-Amplifikation lief für 34 Zyklen mit einem Mastermix, welcher 7,5  $\mu\text{l}$  „Go-Taq Hot Start Green Master Mix“ (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland, Cat. No.: M5123), 0,5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O, 0,5  $\mu\text{l}$  Vorwärtsprimer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 0,5  $\mu\text{l}$  Rückwärtsprimer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) und 6  $\mu\text{l}$  genomische DNS (10 ng/ $\mu\text{l}$ ) beinhaltete. Die Proben wurden auf einem 1% Agarosegel überprüft und anschließend mit einem „Qiaquick PCR purification kit“ (Qiagen, Cat. No.: 28106) gereinigt. Für die SNP Erkennung wurden die DNS Proben mittels Sanger Sequenzierung (Sequenzierer: Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) und den identischen Primern wie für die PCR Amplifizierung sequenziert (Ocimum Biosolutions Ltd., Hyderabad, Indien). Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit Lasergene 11 (DNASar Inc, Madison, WI, USA), Consed 24.0 (Gordon, 2003; Gordon et al., 1998; Gordon and Green, 2013), Phred built 071220 und Phrap 1.09 (Ewing and Green, 1998; Ewing et al., 1998) ausgewertet. Haplotypenanalyse und LD Berechnungen wurde mit Hilfe von Haploview (Barrett et al., 2005) durchgeführt.

## 2.4 Funktionelle Analysen

### 2.4.1 PBMC Stimulation von gesunden Kontrollen

Um die Reaktion von mononukleären Zellen des peripheren Blutes [peripheral blood mononuclear cells] (PBMCs) auf bestimmte Zytokine zu messen und nachzuweisen wurde das antikörperbasierte Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Verfahren angewendet. Freiwillige gesunde Kontrollen aus ei-

ner in den letzten Jahren gesammelten Kohorte (Oh et al., 2008), welche auf die entsprechenden TLR SNPs genotypisiert worden sind, wurden paarweise ('wildtyp' / 'mutant') oder in Gruppen ('wildtyp' / 'heterozygot' / 'mutant') einbestellt und ihnen wurde etwa 100ml Vollblut durch Venenpunktion in EDTA-Röhrchen (BD GmbH, Heidelberg, Deutschland, Cat. No.: 366643) abgenommen. PBMCs wurden mit Ficoll (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland, Cat. No.: 17-1440-02) separiert, zentrifugiert ( $1200 \times g$ , 20 min,  $20^\circ\text{C}$ ) und dreifach mit RPMI Medium (Life Technologies GmbH, Cat. No.: 31870-082) gewaschen. Die hierfür verwendeten Materialien und Reagenzien sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

**Tabelle 2.1** – Material und Reagenzien Zellisolation

Produkt	Hersteller / Zusammensetzung / Bemerkungen
Heparin Röhrchen	
RPMI-1640 Medium	Ohne L-Glutamin
FCS	Fetales Kälberserum
Ficoll	Lymphozyten-Trenn-Medium
PBS	PBS DULBECCO w/o $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ ; Biochrom AG, Cat.No.: L 182-50
EDTA	2mM, gefiltert, sterilisiert

In einer 96-Well Flachboden-Zellkulturplatte wurden  $2 \times 10^5$  Zellen mit Pam<sub>3</sub>Cys (EMC microcollections GmbH, Cat. No.: bLP002, bLP MPT83, bLP MT P27), LPS und H37Rv Whole Cell Lysate Mycobacterium tuberculosis (BEI resources, Manassas, VA, USA, Cat. No.: NR-14822) und alternativ mit H37Rv  $\gamma$ -irradiated whole cells *M.tb* (BEI resources, Cat. No.: NR-14819), welche für die stimulation mit Ultraschall lysiert wurden, für 4 Stunden stimuliert und TNF im Überstand mittels ELISA (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gemessen. Dafür wurden die Platten höchstens Woche vor dem Blockieren beschichtet. Für eine Platte wurde  $20 \mu\text{l}$  TNF mit 5ml Coating-Puffer (0.1 M  $\text{NaHCO}_2$ , pH 8.2) gemischt (1:250 Verdünnung),  $50 \mu\text{l}$  der Mischung in jedes Well der NUNC-ELISA Platte gegeben und bei  $4^\circ\text{C}$  mindestens über Nacht inkubiert. Zum Blockieren wurde der Coating-Puffer aus der ELISA Platte verworfen, die Platte 3 Mal mit Waschpuffer (Phosphatgepufferte Salzlösung [phosphate buffered saline] (PBS) + 0,05% Tween) gewaschen und auf

einem Papierhandtuch ausgeklopft. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  Blockierpuffer (10% Fötale Kalbsserum [Fetal calf serum] (FCS) in PBS) in jedes Well gegeben und bei Raumtemperatur für etwa eine Stunde inkubiert. Für die Standardreihe wurde der TNF Stock (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) erst 1:5000 auf 200  $\text{pg}/\text{ml}$  und anschließend sieben mal in jeweils einem Reaktionsgefäß in Blockierpuffer 1:2 verdünnt. Der Blockierpuffer wurde mit Waschpuffer aus der Platte gewaschen. Von der jeweiligen Verdünnung des Standards und den Proben wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  in Duplikaten auf die Platte gegeben und bei Raumtemperatur ein bis zwei Stunden inkubiert. In der Zwischenzeit wurde 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  biotinylierter anti-human Detektionsantikörper in Blockierpuffer gemischt (pro Platte 5 ml Blockierpuffer + 10  $\mu\text{l}$  Detektionsantikörper (Stock: 0,5mg/ml)). Die Platte wurde drei mal mit Waschpuffer ausgewaschen, mit 50  $\mu\text{l}$  der Detektionsantikörpermischung befüllt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. 5  $\mu\text{l}$  Streptavidin Peroxidase (1 mg/ml) wurde in 5 ml Blockierpuffer gegeben und nach viermaligem Waschen wurden 50  $\mu\text{l}$  pro Well in die Platte pipettiert und für 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte vier Mal mit Waschpuffer gewaschen und mit 50  $\mu\text{l}$  TMB Substrat (Raumtemperatur) pro Well befüllt und im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Sobald die blaue Färbung entstand, wurde die Reaktion mit 50  $\mu\text{l}$  pro Well  $\text{H}_2\text{SO}_4$  abgestoppt und bei 450 nm im ELISA-Leser gemessen. Alle hierfür verwendeten Materialien sind in Tabelle 2.2 aufgelistet. Die Einbestellungen der gesunden Kontrollen erfolgte gepaart nach Alter und Geschlecht aber mit unterschiedlichem Genotyp und Vergleichbarkeit zu gewährleisten und Störfaktoren wie Alter oder Geschlecht ausschließen zu können.

### 2.4.2 Transformation der Plasmide

TLR1 PEF6V5 Plasmide wurden freundlicherweise von Prof. Thomas Hawn<sup>3</sup> als DNS auf Filterpapier zur Verfügung gestellt. Die Filterpapiere wurden für 30 Minuten in 50  $\mu\text{l}$  Qiagen Elution Buffer eingeweicht. Die resultierenden Lösungen wurden in NEB 10-beta kompetente *E. coli* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA, Cat. No.: C3019I) laut Herstellerprotokoll transformiert.

---

<sup>3</sup>Thomas Hawn, MD, PhD; Associate Professor of Medicine, University of Washington; Adjunct Associate Professor, Department of Global Health, University of Washington; 750 Republican St.; Box 358061; Seattle, WA 98195, USA; thawn@u.washington.edu

**Tabelle 2.2** – Material und Reagenzien ELISA

Produkt	Hersteller / Zusammensetzung / Bemerkungen
ELISA-Platten 96-Well	NUNC maxisorp Cat. No 437958
PBS-Pulver	PBS DULBECCO w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> Biochrom AG, Cat.No.: L 182-50
H2SO4	Schwefelsäure 95-97%ig Merck, Cat.No.: 1.00731.2500
Tween	Tween®20; ROTH, Cat.No. 9127.1
BSA	Albumin bovine Fraction V Serva, Cat.No. 11926
Streptavidin-POD	Streptavidin-Peroxidase Sigma, Cat.No. S-5512
Substrat	BM Blue POD Substrate Roche, Cat.NO. 11484281001
NaHCO3	Merck, Cat.No. 6329
Coating Puffer	4.2 g NaHCO3 in 500ml H <sub>2</sub> O, pH 8,3
Waschpuffer	PBS + 0,05% Tween
Blockierpuffer	2,5 ml FCS in 97,5 ml Waschpuffer

Dafür wurde ein Röhrchen NEB Zellen auf Eis für 10 Minuten aufgetaut. Anschließend wurde 5  $\mu$ l der gelösten Plasmid DNS in den Zell-Mix gegeben und vorsichtig 5 mal gegen das Reaktionsgefäß "geschnipst", um Zellen und DNS zu mischen. Das Gemisch wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend 30 Sekunden auf 42 °C erhitzt und wieder 5 Minuten auf Eis gelegt. 950  $\mu$ l SOC Medium (Invitrogen, Cat. No.: 15544-034) wurden in die Mischung bei Raumtemperatur pipettiert, um sie dann bei 37 °C für 60 Minuten bei starkem Schütteln (250 rpm) zu inkubieren. Anschließend wurden die Zellen erneut gemischt und 100  $\mu$ l auf eine Selektionsplatte<sup>4</sup> gestrichen, um sie dann bei 37 °C über Nacht zu inkubieren. Die resultierenden Kolonien wurden am folgenden Tag von den Platten geerntet und über Nacht bei 37 °C in 5 ml LB-medium + 5  $\mu$ l Ampizillin inkubiert. Nachdem das LB-Medium milchig trüb war, wurde 1 ml von jedem Reaktionsgefäß in ein Mikrozentrifugengefäß gegeben und bei  $> 10.000 \times g$  für 2 Minuten zentrifugiert.

Anschließend wurden die bakteriellen Plasmide mit Hilfe eines Qiagen Miniprep Kits laut Herstellerprotokoll extrahiert. Dazu wurde das Zellpellet in 250  $\mu$ l Puffer P1 durch Schütteln resuspendiert. Das Gemisch wurde dann in

<sup>4</sup>Agar-LB-Selektionsplatte (25 Stück): 5g NaCL, 5g Tryptone, 2,5g Hefeextrakt, 7,5g Agar, A.dest (auf 500mL auffüllen), 500 $\mu$ g Ampicillin



250  $\mu\text{l}$  Puffer P2 durch Invertieren vermennt bis es klar wurde. Nach Zugabe von 350  $\mu\text{l}$  Puffer N3 und erneutem Invertieren wurde die Suspension für 10 Minuten bei  $18.000 * g$  zentrifugiert und der Überstand in die QIAprep Säule gegeben, die dann 60 Sekunden bei  $> 10.000 * g$  zentrifugiert wurde. Die Säule wurde anschließend durch Zugabe von 750  $\mu\text{l}$  Puffer PE und 60s Zentrifugation bei  $> 10.000 * g$  gewaschen. Durch erneutes Zentrifugieren für eine Minute nach Entfernen des Durchflusses wurde Restethanol aus der Säule entfernt. Nach Auftragen von 50  $\mu\text{l}$  Puffer EB und Inkubieren für eine Minute wurde die Säule erneut für eine Minute bei  $> 10.000 * g$  zentrifugiert, um die DNS in ein sauberes Mikrozentrifugengefäß zu eluieren. Die DNS-Konzentrationen wurden mit einem ScanDrop 250 (Analytic Jena AG, Jena, Deutschland) gemessen und ein Restriktionsverdau durchgeführt. Für den Restriktionsverdau wurden folgende Ansätze hergestellt:

- 4  $\mu\text{l}$  DNA (1  $\mu\text{g}$ ) + 1  $\mu\text{l}$  HINDIII + 3  $\mu\text{l}$  NEB Puffer 2 + 22  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O
- 4  $\mu\text{l}$  DNA + 1  $\mu\text{l}$  PSTI + 3  $\mu\text{l}$  NEB Puffer 4 + 22  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O
- 4  $\mu\text{l}$  DNA + 1  $\mu\text{l}$  BglIII + 3  $\mu\text{l}$  NEB Puffer 3 + 22  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

welche für eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden durch 20-minütige Erhitzung auf 80 °C die Restriktionsenzyme denaturiert um die Reaktion zu stoppen und die Gemische auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen um die Größen der geschnittenen DNS zu überprüfen und festzustellen, ob es sich um die korrekten Plasmide handelt. Bakterienkulturen, die die gewünschten Plasmide enthielten, wurden anschließend über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in LB-Medium + 0.1% Ampicillin schüttelnd inkubiert. Am folgenden Tag wurde ein Maxiprep durchgeführt um die Plasmid-DNS zu reinigen (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland).

### 2.4.3 HEK NF- $\kappa$ B Reportergergen-Untersuchung

HEK-Blue Null1 Zellen (Invivogen, Toulouse, Frankreich) wurden in Dulbecco-MEM Medium (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) kultiviert und am darauffolgenden Tag mit X-tremeGENE 9 (Roche)  $\beta$ -gal, ELAM, TLR1 (248N-602I, 248N-602S, 248S-602I und 248S-602S) und TLR2 (Wildtyp) Plasmiden transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gewaschen

und  $2,8 * 10^5$  Zellen wurden in einer 96-Well Flachboden-Zellkulturplatte mit Pam<sub>3</sub>Cys (EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland), LPS und H37Rv Whole Cell Lysate Mycobacterium tuberculosis (zur Verfügung gestellt von BEI resouces, Manassas, VA, USA) stimuliert. NF- $\kappa$ B Stimulation wurde mittels HEK-Blue detection (Invivogen) nach Herstellerprotokoll gemessen.

## 2.5 Statistik

Statistische Analysen wurden mit SPSS Statistics Version 20 für Mac (IBM, New York, NY, USA), Prism Version 5 für Mac (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA) and R (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) durchgeführt. Allel- und Genotypfrequenzen wurden durch direktes Zählen ermittelt und der  $\chi^2$ -Test wurde verwendet. Die einfaktorielle ANOVA und der Mann-Whitney-U-Test wurden zur Analyse der HEK-Zell Versuche verwendet und mit dem t-Test wurden die Ergebnisse der PBMC Versuche ermittelt. Die dargestellten P-Werte wurden mittels  $\chi^2$ -Test oder exaktem Fisher-Test (two-tailed), wenn angegeben, berechnet. Die angepassten P-Werte wurden mittels binärer logistischer Regression in SPSS berechnet.

### 2.5.1 R-Code

Der erstellte R-Quellcode ermöglicht die Berechnung von P-Werten, Odds-Ratio und Konfidenzintervallen der gemessenen SNPs. Dafür werden zuerst benötigte Pakete geladen und die Variablen deklariert. Anschließend wird die SPSS-Datenbank eingelesen und, wenn vom Anwender gewünscht, in Untergruppen, wie etwa männlich / weiblich, unterteilt. Für die statistische Berechnung werden zuerst die gemessenen Basenpaare der Patienten und der Kontrollen eingelesen und jeweils in einer Matrix gespeichert, wobei leere Angaben ignoriert werden und ungültige Werte mit einer Fehlermeldung angezeigt werden. Für die Berechnung des P-Wertes, der Odds-Ratios und des Konfidenzintervalls wird eine Kontingenztabelle benötigt, die im nächsten Schritt jeweils für die möglichen Basen A, C, G und T bei Patienten und Kontrollen erstellt wird. Je nach Eingabe des Anwenders kann anschließend der P-Wert, die Odds-Ratio und das Konfidenzintervall nach verschiedenen Methoden, z.B. Fisher, berechnet werden. Dies alles geschieht in einer Schleife, wodurch nacheinander

jeder SNP der anfangs eingelesenen Datenbank statistisch berechnet wird. Der komplette Quellcode befindet sich in Anhang B und C.

## 2.6 Modellierung der TLR Strukturen

Die dreidimensionale Proteinstruktur der TLR1-248S Variante wurde mittels Homologiemodellierung mit MODELLER 9.12 (Mac Version) (Šali and Blundell, 1993) auf Grundlage seiner Ausrichtung und Homologie mit der Kristallstruktur von TLR1 (PDB ID: 2Z7X) generiert. Um die fehlerhaften, schlechten Sektoren zwischen den Atomen zu eliminieren und schließlich potentiell auftretende Probleme zu verhindern, wurde das grobe Modell mittels Energieminimierung in Swiss PDB Viewer 4.1 (Mac Version) (Kaplan and Littlejohn, 2001) optimiert. Die Methoden ‚Steepest Descent‘ und ‚Conjugate Gradient‘ wurden mit GROMOS96 43B1 (van Gunsteren et al., 1996) Kraftfeldparametern angewendet. Das endgültige Modell wurde mit SAVES<sup>5</sup> und den Methoden PROCHECK, WHATCHECK, ERRAT und PROVE evaluiert. ProSA (Wiederstein and Sippl, 2007) wurde verwendet um die stereochemische Qualität und Verlässlichkeit der Modellstruktur zu bestimmen. RMSD Berechnungen mit Swiss PDB Viewer ergaben die Differenz zwischen den beiden Varianten. ProFunc (Laskowski et al., 2005) wurden genutzt um funktionelle Nester, Klüfte und Höhlen vorherzusagen. Potentielle Taschen in den Strukturen wurden mit CASTp (Dundas et al., 2006) berechnet. Die Visualisierungen der Modelle wurden mit PyMOL v1.6.0.0 Enhanced für Mac OS X ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)) erstellt.

---

<sup>5</sup><http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/> (August 2014)



# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 SNP Datenbanken

Aus den erstellten Datenbanken für TLR1 (Tabelle 2), -2 (Tabelle 3), -4 (Tabelle 4), -7 (Tabelle 5) und -8 (Tabelle 6) in Anhang D ergeben sich Bereiche von jeweils maximal 1.000 Basenpaaren zur Sequenzierung, die möglichst viele relevante SNPs enthalten. Der Bereich TLR1-A beinhaltet mRNA Positionen 802-1483 und 5 bisher bekannte SNPs, Bereich TLR1-B beinhaltet mRNA Positionen 1403-2083 und 9 bekannte SNPs und TLR1-C erstreckt sich von mRNA Position 2005-2473 und beinhaltet 9 bekannte SNPs. TLR2-A reicht von mRNA Position 1288 bis 1967 mit 6 bekannten SNPs und TLR2-B von mRNA Position 1898 bis 2664 mit 10 bekannten SNPs. Bei TLR4 ergab die optimale Verteilung der zu Sequenzierenden Bereiche folgende Konstellation: TLR4-A mRNA Position 499-1210 mit 10 bekannten SNPs und TLR4-B mRNA Position 1143-1871 mit 14 bekannten SNPs. Die optimalen, zu sequenzierenden Bereiche lagen in TLR7 bei mRNA Positionen 1-668 (TLR7-A), 690-1294 (TLR7-B), 1328-1980 (TLR7-C) und 1922-2621 (TLR7-D) mit insgesamt 32 bekannten SNPs und bei TLR8 bei mRNA Positionen 1-610 (TLR8-A), 544-1253 (TLR8-B), 1819-2518 (TLR8-C) und 2464-3192 (TLR8-D) mit insgesamt 23 vorher beschriebenen SNPs. Somit werden durch das optimale Primer Design 118 bekannte SNPs durch die Sequenzierung abgedeckt.

## 3.2 Kohorten

554 Individuen wurden in Hyderabad für diese Studie akquiriert, wovon 206 TB Patienten und 239 Kontrollen, alle HIV negativ, in die Studie aufgenommen wurden. Gründe für das Ausschließen waren: fehlende Daten, Alter (Patienten jünger als 18 Jahre wurde ausgeschlossen, Kontrollen nur rekrutiert, wenn sie volljährig waren), nachträglich festgestellte Parallelerkrankungen und schlechte DNS-Qualität. Allgemeine Charakteristika wurden in Tabelle 3.1 aufgenommen: Das mittlere Alter der Patienten und Kontrollen betrug 29,5 und 34,1 Jahre ( $P < 0,001$ ). Das Verhältnis von Frauen zu Männern war 57,8 : 42,2 (1,37) bei den Patienten und 50,2 : 49,8 (1,01) bei den Kontrollen (OR 1,36, 95% CI 0,93-1,97,  $P = 0,11$ ). Die Patienten hatten einen deutlich niedrigeren Body-Mass-Index (BMI) (18,8) als die Kontrollen (24,6) ( $P < 0,001$ ), was aufgrund der Erkrankung zu erwarten war. Signifikant mehr Personen in der gesunden Kontrollgruppe hatten eine *BCG* Impfnarbe (83,3%) verglichen mit den Patienten (52,4%,  $P < 0,001$ ). Niedriges Einkommen und Trink- / Rauchverhalten sind Risikofaktoren für TB und diese Faktoren waren höher in der Patientengruppe (Einkommen:  $P < 0,001$ , Rauchen:  $P < 0,001$ , Trinken:  $P < 0,001$ ). Außerdem gab es mehr alleinstehende Personen in der Patientengruppe ( $P < 0,001$ ), was auf erschwerte Heiratsaussichten durch TB Infektion oder die dadurch bedingte schwierigere soziale Situation schließen lassen könnte. Statistisch spielt auch die Religion eine Rolle, so sind in der hier betrachteten Kohorte Hindus häufiger von TB betroffen als Moslems (OR 1.60, 95% CI 1.09-2.37,  $P = 0.017$ ). Die Anzahl der Personen im Haushalt lag bei durchschnittlich 6 bei den Patienten und 5,5 bei den Kontrollen und war statistisch nicht relevant.

## 3.3 SNPs in der Indischen Bevölkerung

SNPs in den TLRs können zu einem unterschiedlichen Verhalten des Immunsystems bei verschiedenen Individuen führen. Vermutlich ist nur ein sehr kleiner Teil der großen Anzahl an genetischen Variationen funktionell für die Infektion und den Verlauf von TB relevant. Um das Finden relevanter SNPs zu vereinfachen wurde eine Datenbank entwickelt, die die Entscheidung darüber erleichtern soll, welche SNPs überhaupt untersucht werden sollen. Diese

**Tabelle 3.1** – Demographie und klinische Charakteristiken der TB Patienten und Kontrollen in Hyderabad, Indien

Variable	TB Patient (n = 206)	Kontrolle (n = 239)	P-Wert
Geschlecht n (%)			
männlich	87 (42,2)	119 (49,8)	0,11
weiblich	119 (57,8)	120 (50,2)	
Alter [Jahre]	29,5 ( $\pm 9,8$ )	34,1 ( $\pm 8,9$ )	< <b>0,001</b>
BMI [ $\frac{kg}{m^2}$ ]	18,8 ( $\pm 4,5$ )	24,6 ( $\pm 4,9$ )	< <b>0,001</b>
BCG Narbe n (%)	108 (52,4)	199 (83,3)	< <b>0,001</b>
Trinkt n (%)	31 (15,0)	1 (0,4)	< <b>0,001</b>
Raucht n (%)	46 (22,3)	18 (7,5)	< <b>0,001</b>
Einkommen [ $\frac{IRS}{Monat}$ ]	7387 ( $\pm 5170$ )	16381 ( $\pm 22870$ )	< <b>0,001</b>
Verheiratet n (%)	69 (33,5)	150 (62,8)	< <b>0,001</b>
Religion n (%)			
Hindu	88 (42,7)	75 (31,8)	<b>0,017</b>
Moslem	117 (56,8)	160 (67,8)	
Personen im Haushalt	6,0 ( $\pm 3,5$ )	5,5 ( $\pm 2,7$ )	0,074

Daten sind als  $\bar{x} \pm \sigma$  (arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung) oder in % angegeben.

Datenbank wurde im Abschnitt 2.1 näher erläutert.

Anhand dieser Datenbank konnten die Sequenzierungsprimer so erstellt werden, dass möglichst viele SNPs in den zu sequenzierenden Bereichen liegen. Ein Sequenzierungslauf liest zwischen 500 und 1000 Basenpaare, je nach Abschnitt und Qualität der DNS. Für diese Studie wurden die Primer so ausgelegt, dass jeweils höchstens 1000 Basenpaare zwischen den Vorwärts- und Rückwärtsprimern liegen.

Um TLR SNPs zu untersuchen wurden insgesamt 10.200 Basen der kodierenden Regionen von TLR1 (1.800 Bp), -2 (1.450), -4 (1430), -7 2710 und -8 (2810) von sämtlichen Individuen mittels PCR amplifiziert und sequenziert (Tabellen 3.2 3.3, 3.4, 3.5 und 3.6), was zu insgesamt über 4,5 Millionen sequenzierter und ausgewerteter Basen geführt hat.

### 3.3.1 Neue SNPs

Von den bisher beschriebenen Polymorphismen in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) waren 26 aus TLR1, zehn aus

**Tabelle 3.2** – Anzahl der Sequenzierten Basen und SNPs

	Insgesamt	TLR1	TLR2	TLR4	TLR7	TLR8
Bekannte SNPs	118	23	16	24	32	23
Neue SNPs	4	4	0	0	0	0
Basen je Probe	10.200	1800	1450	1430	2710	2810
Basen insgesamt	4,5 Mb	0,8 Mb	0,6 Mb	0,6 Mb	1,2 Mb	1,23 Mb

TLR2, 28 aus TLR4, 25 aus TLR7 und 12 aus TLR8 nicht in den indischen Kohorten vorhanden. Es wurden jedoch vier neue TLR1 SNPs identifiziert (Tabelle 3.3). Sie wurden bei NCBI eingereicht und ihr potentieller Einfluss mit PolyPhen2 berechnet:

- TLR1-Q266Q (ss981600212); PolyPhen2 Prognose: - (synonym)
- TLR1-E472K (ss981600235); PolyPhen2 Prognose: benign (0,177)
- TLR1-V502I (ss981600253); PolyPhen2 Prognose: benign (0,001)
- TLR1-M516K (ss981600272); PolyPhen2 Prognose: benign (0,138)

### 3.3.2 TLR1

In TLR1 trat das A-Allel des nicht synonymen SNP 248N (rs4833095) 183 mal bei den Patienten und 256 mal bei den Kontrollen auf, wogegen das G-Allel 229 mal bei den Patienten und 222 mal bei den Kontrollen vor kam, womit der Unterschied signifikant und das A-Allel einen Schutzfaktor gegen TB darstellt ( $P = 0,007$ ; OR 0,69; 95% CI 0,53 – 9,0). Ein weiterer signifikant unterschiedlich verteilter SNP ist der synonyme und neu entdeckte Q266Q (ss981600212) (A-Allel Patienten / Kontrollen: 1/17; G-Allel Patienten/Kohorten: 115/137). Das neu entdeckte A-Allel ist hier ebenfalls ein Schutzfaktor gegen TB ( $P < 0,001$ ; OR 0,05; 95% CI 0,009 – 0,53). In unseren Kohorten nicht vorhanden waren die Polymorphismen S313G (rs5743613), X/S324L (rs143619350), A335G (rs141091142), H352H (rs76796448), T361S (rs189308820), T363M (rs184548723), K386E/X (rs150011580), I390M (rs192055114), M397V (rs111596029), G417V (rs184834731), T565S (rs149065118), H571R (rs112542063), A584 (rs150358789), V587G (rs5743617), A597V (rs111807776), S599F (rs143576765), D605Y (rs148537628), R631L (rs5743619),



N658H (rs140268578), N677K (rs148014858), N685T (rs187624160), K689R (rs143548463), S697L (rs41311402), X706W (rs143251194) und H720P (rs113706342) nicht vorhanden.

Vorhanden, aber nicht signifikant waren A469T (rs201964388) (C Patienten / Kontrollen: 7/10; G Patienten / Kontrollen: 49/64), S506S (rs5743614) (A Patienten / Kontrollen: 24/37; G Patienten / Kontrollen: 25/38; T Patienten / Kontrollen: 5/5), N578T/S (rs138016555) (A Patienten / Kontrollen: 53/73; C Patienten / Kontrollen: 1/1; G Patienten / Kontrollen: 0/0), I602S (rs5743618) (G Patienten / Kontrollen: 27/38, T Patienten / Kontrollen: 340/429), T610T (rs148537628) (C Patienten / Kontrollen: 164/228; T Patienten / Kontrollen: 0/2), W616R (rs142855687) (A Patienten / Kontrollen: 0/2; T Patienten / Kontrollen: 44/64) und I679T (rs56205407) (C Patienten / Kontrollen: 0/3; T Patienten / Kontrollen: 172/224).

Die neuen SNPs waren folgendermaßen verteilt: E472K (ss981600235) (A Patienten / Kontrollen: 11/15; G Patienten / Kontrollen: 59/45) ( $P = 0,187$ ; OR 0,56; 95% CI 0,23 – 1,33), V502I (ss981600253) (A Patienten / Kontrollen: 10/15; G Patienten / Kontrollen: 64/46) ( $P = 0,092$ ; OR 0,47; 95% CI 0,19 – 1,14) und M516K (ss981600272) (A Patienten / Kontrollen: 4/4; T Patienten / Kontrollen: 50/67) ( $P = 0,47$ ; OR 0,77; 95% CI 0,216 – 2,7).

**Tabelle 3.3** – Allel-Frequenzen der TLR1 SNPs in Indien

AS	mRNA	rs#	Patienten n (%)	Kontrollen n (%)	P	OR	95% CI
N248S	1017A	rs4833095	183 (44,4)	256 (53,6)	<b>0,007<sup>a</sup></b>	<b>0,69</b>	<b>0,53</b>
	G		229 (55,6)	222 (46,4)			
Q266Q	1072A <sup>b</sup>	ss981600212	1 (0,86)	17 (11)	<b>&lt;0,001<sup>a</sup></b>	<b>0,05</b>	<b>0,009</b>
	G		115 (99,14)	137 (89)			
H305L	1188A	rs3923647	192 (100)	229 (98,7)	0,25 <sup>c</sup>		
	T		0 (0)	3 (1,3)			
S313G	1211A	rs150985008	0 (0)	0 (0)	1		
	G		276 (100)	256 (100)			
P315L	1218C	rs5743613	276 (100)	256 (100)	1		
	T		0 (0)	0 (0)			
X <sup>d</sup> /S324L	1245A	rs143619350	0 (0)	0 (0)	1		

<sup>a</sup>Pearson-Chi-Square, <sup>b</sup>neue Polymorphismen, <sup>c</sup>Fisher Exact two tailed, <sup>d</sup>Nonsens

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 3.3** – Allel-Frequenzen der TLR1 SNPs in Indien

Fortsetzung von vorheriger Seite

AS	mRNA	rs#	Patienten n (%)	Kontrollen n (%)	P	OR	95% CI
	C		276 (100)	256 (100)			
	T		0 (0)	0 (0)			
A335G	1278C	rs141091142	0 (0)	0 (0)	1		
	G		276 (100)	256 (100)			
H352H	1328A	rs76796448	0 (0)	0 (0)	1		
	C		276 (100)	256 (100)			
T361S	1355A	rs189308820	276 (100)	256 (100)	1		
	T		0 (0)	0 (0)			
T363M	1362C	rs184548723	276 (100)	256 (100)	1		
	T		0 (0)	0 (0)			
K386E/X <sup>d</sup>	1430A	rs150011580	0 (0)	0 (0)	1		
	G		276 (100)	256 (100)			
	T		0 (0)	0 (0)			
I390M	1444A	rs192055114	276 (100)	256 (100)	1		
	G		0 (0)	0 (0)			
M397V	1463A	rs111596029	276 (100)	256 (100)	1		
	G		0 (0)	0 (0)			
G417V	1524G	rs184834731	48 (100)	36 (100)	1		
	T		0 (0)	0 (0)			
A469T	1679C	rs201964388	7 (12,5)	10 (13,5)	0,86 <sup>a</sup>	0,91	0,32
	G		49 (87,5)	64 (86,5)			-2,57
E472K	1688A <sup>b</sup>	ss981600235	11 (15,7)	15 (25)	0,187 <sup>a</sup>	0,56	0,23
	G		59 (84,3)	45 (75)			-1,33
V502I	1778A <sup>b</sup>	ss981600253	10 (13,3)	15 (21,1)	0,092 <sup>a</sup>	0,47	0,19
	G		65 (86,7)	46 (78,9)			-1,14
S506S	1792A	rs5743614	24 (44,4)	37 (46,25)	0,84 <sup>a</sup>	0,93	0,46
	G		25 (46,3)	38 (47,5)			-1,86
	T <sup>b</sup>		5 (9,3)	5 (6,25)			
M516K	1821A <sup>b</sup>	ss981600272	4 (7,4)	7 (9,5)	0,47 <sup>a</sup>	0,77	0,216
	T		50 (92,6)	67 (90,5)			-2,7

<sup>a</sup>Pearson-Chi-Square, <sup>b</sup>neue Polymorphismen, <sup>c</sup>Fisher Exact two tailed, <sup>d</sup>Nonsens

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 3.3** – Allel-Frequenzen der TLR1 SNPs in Indien

Fortsetzung von vorheriger Seite

AS	mRNA	rs#	Patienten n (%)	Kontrollen n (%)	P	OR	95% CI
G522R	1838C	rs187823248	3 (5,6)	7 (9,7)	0,31 <sup>a</sup>	0,55	0,13
	G		51 (94,4)	65 (90,3)			
T565S	1968C	rs149065118	82 (100)	80 (100)	1		
	G		0 (0)	0 (0)			
H571R	1986A	rs112542063	82 (100)	80 (100)	1		
	G		0 (0)	0 (0)			
N578T/S	2007A	rs138016555	53 (98,1)	73 (98,6)	1 <sup>c</sup>		
	C		1 (1,9)	1 (1,4)			
	G		0 (0)	0 (0)			
A584V	2025C	rs150358789	0 (0)	0 (0)	1		
	T		82 (100)	80 (100)			
V587 G	2034G	rs5743617	0 (0)	0 (0)	1		
	T		82 (100)	80 (100)			
A597V	2064C	rs111807776	0 (0)	0 (0)	1		
	T		82 (100)	80 (100)			
S599F	2070C	rs143576765	82 (100)	80 (100)	1		
	T		0 (0)	0 (0)			
I602S	2079G	rs5743618	27 (7,4)	38 (8,1)	0,68 <sup>a</sup>	0,9	0,54
	T		340 (92,6)	429 (91,9)			
D605Y	2087G	rs151036585	82 (100)	82 (100)	1		
	T		0 (0)	0 (0)			
T610T	2131C	rs148537628	164 (100)	228 (99,1)	0,51 <sup>c</sup>		
	T		0 (0)	2 (0,9)			
W616R	2120A	rs142855687	0 (0)	2 (3)	0,52 <sup>c</sup>		
	T		44 (100)	64 (97)			
R631L	2166G	rs5743619	0 (0)	0 (0)	1		
	T		74 (100)	88 (100)			
N658H	2246A	rs140268578	78 (100)	88 (100)	1		
	C		0 (0)	0 (0)			
N677K	2305C	rs148014858	0 (0)	0 (0)	1		

<sup>a</sup>Pearson-Chi-Square, <sup>b</sup>neue Polymorphismen, <sup>c</sup>Fisher Exact two tailed, <sup>d</sup>Nonsens

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 3.3** – Allel-Frequenzen der TLR1 SNPs in Indien

Fortsetzung von vorheriger Seite

AS	mRNA	rs#	Patienten n (%)	Kontrollen n (%)	P	OR	95% CI
			78 (100)	88 (100)			
I679T	2310C	rs56205407	0 (0)	3 (1,3)	0,26 <sup>c</sup>		
			172 (100)	224 (98,7)			
N685T	2328A	rs187624160	0 (0)	0 (0)	1		
			78 (100)	88 (100)			
K689R	2340A	rs143548463	78 (100)	88 (100)	1		
			0 (0)	0 (0)			
S697L	2364C	rs41311402	0 (0)	0 (0)	1		
			78 (100)	88 (100)			
X <sup>d</sup> 706W	2391A	rs143251194	0 (0)	0 (0)	1		
			78 (100)	88 (100)			
H720P	2433A	rs113706342	78 (100)	88 (100)	1		
			0 (0)	0 (0)			

<sup>a</sup>Pearson-Chi-Square, <sup>b</sup>neue Polymorphismen, <sup>c</sup>Fisher Exact two tailed, <sup>d</sup>Nonsens

### 3.3.3 TLR2

In TLR2 wurden folgende SNPs in den indischen Kohorten nicht gefunden: T411I (rs5743699), R477X (rs62323857), T556I (rs5743702), H571R (rs61735277), H579R (rs5743703), H631P (rs5743704), R677W (rs121917864), N729S (rs61735278) und Q753R (rs5743708).

Die Variationen S450S (rs3804100) (C Patienten / Kontrollen: 10/7; T Patienten / Kontrollen 32/53), N715Y (rs5743706) (A Patienten / Kontrollen: 1/1; G Patienten / Kontrollen: 82/90) und D768E (rs1804965) (A Patienten / Kontrollen: 1/1; G Patienten / Kontrollen: 53/79) kamen vor, waren aber nicht signifikant (Tabelle 3.4).

### 3.3.4 TLR4

Von den bisher beschriebenen SNPs in TLR4 waren folgende nicht in unseren Kohorten vorhanden: Q188R (rs5030713), C246S (rs5030714), L260P (rs55799839), E287G (rs76014534), C306W (rs2770145), V310G (rs2770144), N329S (rs5030715), F342Y

**Tabelle 3.4** – Allel-Frequenzen der TLR2 SNPs in Indien

AS	mRNA	rs#	Patienten n (%)	Kontrollen n (%)	P	OR	95% CI
T411I	1451C	rs5743699	62 (100)	60 (100)	1		
	T		0 (0)	0 (0)			
R447X <sup>d</sup>	1558C	rs62323857	66 (100)	66 (100)	1		
	T		0 (0)	0 (0)			
S450S	1569C	rs3804100	10 (23,8)	7 (11,7)	0,11 <sup>a</sup>	2,34	0,82
	T		32 (76,2)	53 (83,3)			-6,84
T556I	1886C	rs5743702	0 (0)	0 (0)	1		
	T		82 (100)	80 (100)			
H571R	1931A	rs61735277	0 (0)	0 (0)	1		
	G		82 (100)	80 (100)			
H579R	1955A	rs5743703	0 (0)	0 (0)	1		
	G		82 (100)	80 (100)			
H631P	2111A	rs5743704	0 (0)	0 (0)	1		
	C		82 (100)	90 (100)			
R677W	2248C	rs121917864	82 (100)	90 (100)	1		
	T		0 (0)	0 (0)			
N715Y	2362A	rs5743706	1 (1,9)	1 (1,2)	1 <sup>c</sup>		
	T		53 (98,1)	79 (98,8)			
N729S	2405A	rs61735278	82 (100)	90 (100)	1		
	G		0 (0)	0 (0)			
Q753R	2477A	rs5743708	0 (0)	0 (0)	1		
	G		82 (100)	90 (100)			
D768E	2523A	rs1804965	1 (1,9)	1 (1,2)	1 <sup>c</sup>		
	G		53 (98,1)	79 (98,8)			

<sup>a</sup>Pearson-Chi-Square, <sup>b</sup>neue Polymorphismen, <sup>c</sup>Fisher Exact two tailed, <sup>d</sup>Nonsens

(rs5031050), N361D (rs61734367), L385F (rs11536884), D395V (rs79802422), S400N (rs4987233) und L470F (rs80197996).

Vorhanden, aber in der Gesamtkohorte nicht signifikant waren: D181Y (rs77214890) (G Patienten / Kontrollen: 17/22; T Patienten / Kontrollen: 3/0), D299G (rs4986790) (A Patienten / Kontrollen: 89/158; G Patienten / Kontrollen: 25/26), T399I (rs4986791) (C Patienten / Kontrollen: 37/68; T Patienten / Kontrollen: 9/8), L443F (rs5030716) (A Patienten / Kontrollen: 12 / 20; C Patienten / Kontrollen: 36/58) und K474E (rs5030718) (A Patienten / Kontrollen: 15/29; G Patienten / Kontrollen: 33/49).

**Tabelle 3.5** – Allel-Frequenzen der TLR4 SNPs in Indien

AS	mRNA	rs#	Patienten n (%)	Kontrollen n (%)	P	OR	95% CI
D181Y	832G	rs77214890	17 (85)	22(100)	0,0594		
	T		3(15)	0(0)			
D299G	1187A	rs4986790	89(78)	158(86)	0,0823	0,59	0,32
	G		25(22)	26(14)			-1,08
T399I	1487C	rs4986791	37(80)	68(89)	0,1623	0,48	0,17
	T		9(20)	8(11)			-1,36
L443F	1620A	rs5030716	12(25)	20(26)	0,936	0,97	0,42
	C		36(75)	58(74)			-2,21
K474E	1711A	rs5030718	15(31)	29(37)	0,4978	0,77	0,36
	G		33(69)	49(63)			-1,65

<sup>a</sup>Pearson-Chi-Square, <sup>b</sup>neue Polymorphismen, <sup>c</sup>Fisher Exact two tailed, <sup>d</sup>Nonsens

### 3.3.5 TLR7

Außer Q11L (rs179008) (A Patienten / Kontrollen: 116/140; C Patienten / Kontrollen: 0/0; T Patienten / Kontrollen: 8/10) und T801T (rs864058) (A Patienten / Kontrollen: 3/2; G Patienten / Kontrollen: 53/80), welche beide nicht signifikant unterschiedlich vertreten waren kamen folgende, zuvor beschriebene SNPs in unseren Kohorten nicht vor: V49M (rs141847327), A83V (rs143823510), T127I (rs150313957), G145D (rs137927123), S192L (rs144771387), F200L (rs138717086), V219I (rs149314023), V222D (rs55907843), A271V (rs141848808), S415N (rs190564296), A448V (rs5743781), E489A (rs150054181), N576D (rs34501186), F580S (rs35160120), K596Q (rs149227205), Q599H (rs36076482), M603I (rs55835602), S610C (rs36110053), S620T (rs34729893), R627I (rs34014664), L634X (rs34557368), R636T (rs35337229), N640K (rs187685386), T703I (rs146437735) und I759V (rs140890736) (Tabelle 3.6).

### 3.3.6 TLR8

Das A-Allel von M1V (rs3764880) trat in unseren Kohorten signifikant häufiger bei Patienten als bei Kontrollen auf (A Patienten / Kontrollen: 181/156; G Patienten / Kontrollen: 223/268) ( $P = 0,019$ ; OR 1,39; 95% CI 1,06-1,84).

Außerdem aufgetreten, aber nicht signifikant waren: Y25C (rs143939946) (A Patienten / Kontrollen: 109 / 138; G Patienten / Kontrollen: 1/1), K27E (rs144647258) (A Patienten / Kontrollen: 2/2; G Patienten / Kontrollen: 42/68), H215H (rs5744080) (C Patienten / Kontrollen: 33/41; T Patienten / Kontrollen: 73/111), L651L

**Tabelle 3.6** – Allel-Frequenzen der TLR7 und TLR8 SNPs in Indien

AS	mRNA	rs#	Patienten n (%)	Kontrollen n (%)	P	OR	95% CI
TLR7							
Q11L	171A	rs179008	116(94)	140(93)	0,943	1,04	0,4
	T		8(6)	10(7)			-2,71
T801T	A	rs864058	3(5)	2(2)	0,3677	2,26	0,37
	G		53(95)	80(98)			-14,01
TLR8							
M1V	88A	rs3764880	148(44)	113(36)	<b>0,019</b>	<b>1,39</b>	<b>1,06</b>
	G		191(56)	200(64)			<b>-1,84</b>
Y25C	161A	rs143939946	109(99)	138(99)	0,7081	1,58	0,14
	G		1(1)	2(1)			-17,65
K27E	166A	rs144647258	2(5)	2(3)	0,6334	1,62	0,22
	G		42(95)	68(97)			-11,93
H215H	732C	rs5744080	33(31)	41(27)	0,4675	1,22	0,71
	T		73(69)	111(77)			-2,11
L651L	2040C	rs2407992	41(79)	58(78)	0,9498	1,03	0,43
	G		11(21)	16(22)			-2,44
I751I	2340A	rs3747414	42(78)	58(74)	0,6522	1,21	0,53
	C		12(22)	20(26)			

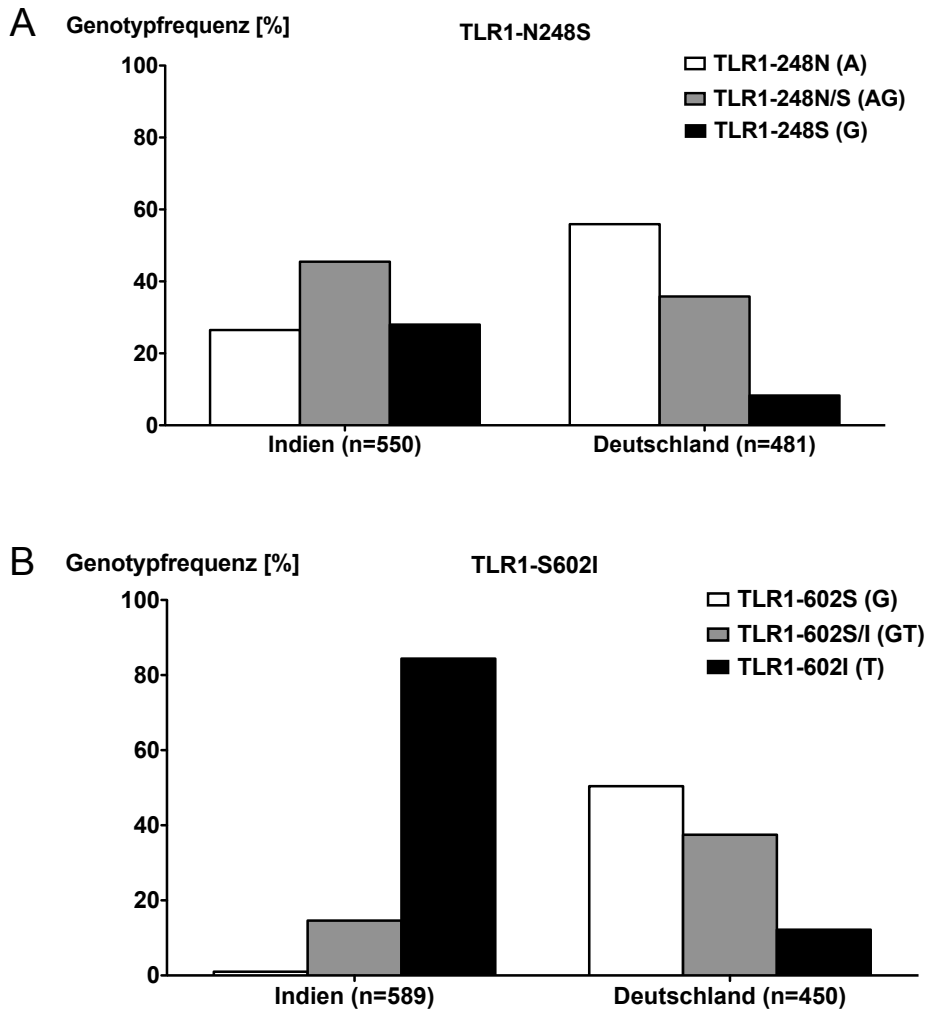
<sup>a</sup>Pearson-Chi-Square, <sup>b</sup>neue Polymorphismen, <sup>c</sup>Fisher Exact two tailed, <sup>d</sup>Nonsens

(rs2407992) (C Patienten / Kontrollen: 41/58, G Patienten / Kontrollen: 11/16) und I751I (rs3747414) (A Patienten / Kontrollen: 42/58; C Patienten / Kontrollen: 12/20).

Folgende SNPs sind in unseren Kohorten gar nicht aufgetreten: M10V (rs5744077), I18V (rs151096932), E48Q (rs191299747), T60M (rs57166818), H96Y (rs146700498), E164D (rs183801068), A508T (rs147465988), D645Y (rs184806389), A664V (rs148772263), R715Q (rs5744082), G730D (rs190078518) und K749K (rs5744083) (Tabelle 3.6).

### 3.3.7 Die Verteilung wichtiger TLR SNPs unterscheidet sich in Indien und Deutschland

Es existiert eine deutliche genetische Verschiebung von einer Gleichverteilung der Genotypen TLR1-248S (28%) und -248N (26,5%), hin zu TLR1-248N, dem mit 55,9% häufigsten TLR1-248 Genotyp in Deutschland, wo 248S nur in 8,3% der Bevölkerung vorkommt. Der heterozygote 248NS kommt in Indien in 45,5% und in Deutschland in 35,8% der Mitglieder der betrachteten Kohorten vor (Abbildung 3.1A).



**Abbildung 3.1** – Vergleich der Genotypfrequenzen von TLR1-S248N und I602S zeigt genetische Verschiebung Indien nach Deutschland.

A) Die TLR1-248N Variante kommt gleich verteilt mit der 248S Variante in Indien aber überwiegend in Deutschland vor. B) Bezüglich TLR1-I602S verändert sich die Verteilung zwischen Indien und Deutschland. In diesem Fall ist die 602S Variante seltener in Indien als in Deutschland.



Die Variation TLR1-602I wird mit TB-Risiko bei Afro-Amerikanern assoziiert (Ma et al., 2007) und hat eine sehr unterschiedliche Verteilung in Indien und Deutschland. In der indischen Kohorte trat die homozygote 602I Variante mit 84,4% fast ausschließlich, 602SI in 14,6% und 602S in nur 1% auf, wogegen 602S (50%) und die heterozygote 602S/I Variante (37,5%) in Deutschland dominieren und 602I mit 12,2% eher unterrepräsentiert ist (Abbildung 3.1B).

Die Verteilung zweier TLR4 SNPs (D299G und T399I) sind tendenziell ähnlich in Indien und Deutschland (Indien: 299D 66,3%; 299G 6%; 399T 77%; 399I 4,1%; Deutschland: 299D 92,1%; 299G 0,8% und 399T 90,4%; 399I 0,8%). Es fällt jedoch auf, dass es in beiden Fällen mehr Individuen mit heterozygotem Genotyp in Indien (27,7% bei 299DI und 18,9% bei 399TI) als in Deutschland (7,1% bei 299DG und 8,8% bei 399TI) gibt (Abbildung 3.2).

Ein weiterer wichtiger Polymorphismus, der eine unterschiedliche Genotypfrequenz in Indien und Deutschland aufweist ist TLR8-M1V. In Indien trägt 46,3% der betrachteten Kohorten den 1V (29% 1M; 24,7% 1MV) Genotyp wogegen in Deutschland mit 64,2% die 1M Variante der deutlich häufigere Genotyp ist (14,3% 1V; 21,5% 1MV) (Abbildung 3.3).

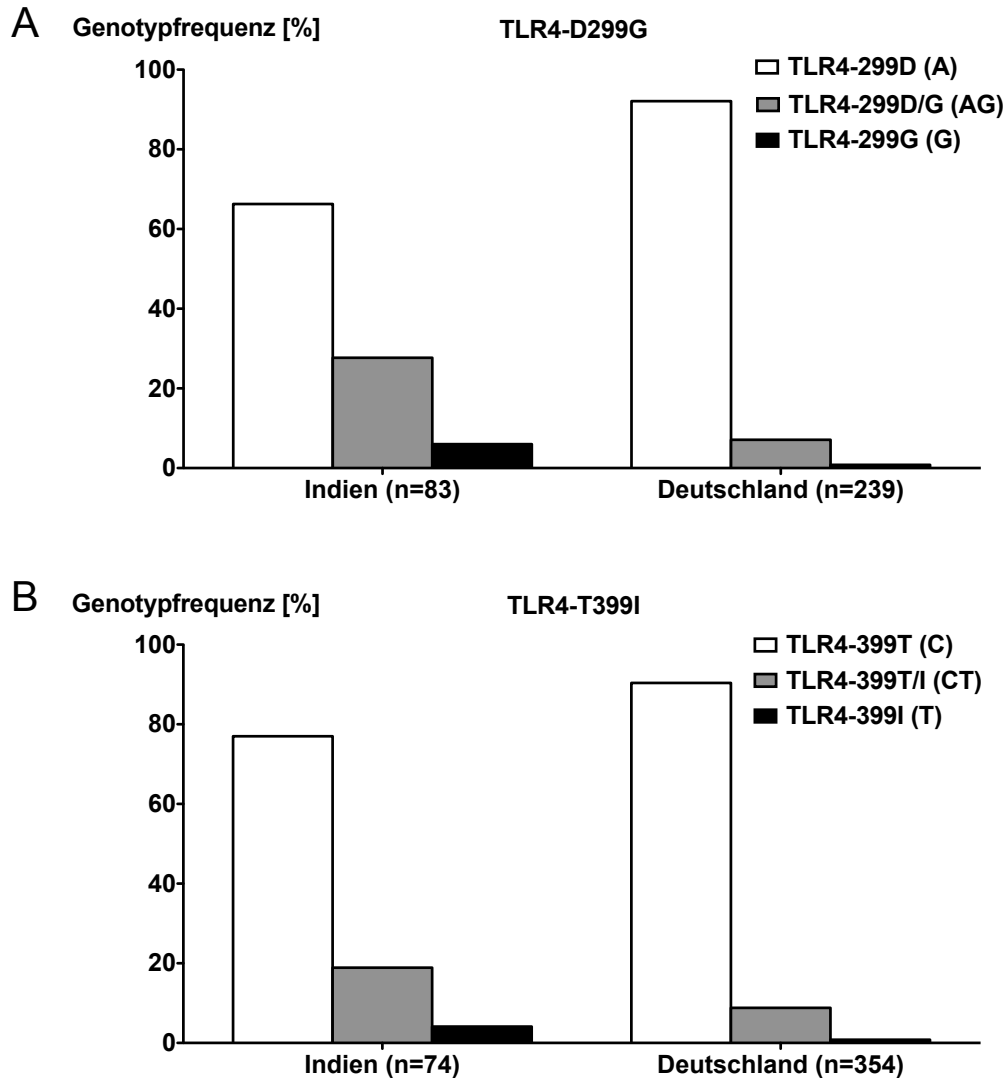
### 3.3.8 Linkage Disequilibrium

In einigen Fällen stehen Polymorphismen untereinander im sogenannten LD, das heißt sie treten mit einer gegebenen Häufigkeit gemeinsam in einem Individuum auf. An allen hier gemessenen SNPs wurden LD-Berechnungen durchgeführt um diese Kopplungen darzustellen.

Der LD Plot in Abbildung 3.4 zeigt, dass TLR1-N248S und TLR1-I602S in der indischen Kohorte nicht gekoppelt sind ( $r^2 = 0,8$ ), wogegen diese beiden Polymorphismen in der deutschen Kontrollkohorte starke Kopplung zeigen ( $r^2 = 0,82$ ). Die stärkste Kopplung zeigen hier M516K mit A469T ( $r^2 = 0,58$ ), G522R mit M516K ( $r^2 = 0,57$ ) und A469T mit G522R ( $r^2 = 0,52$ ).

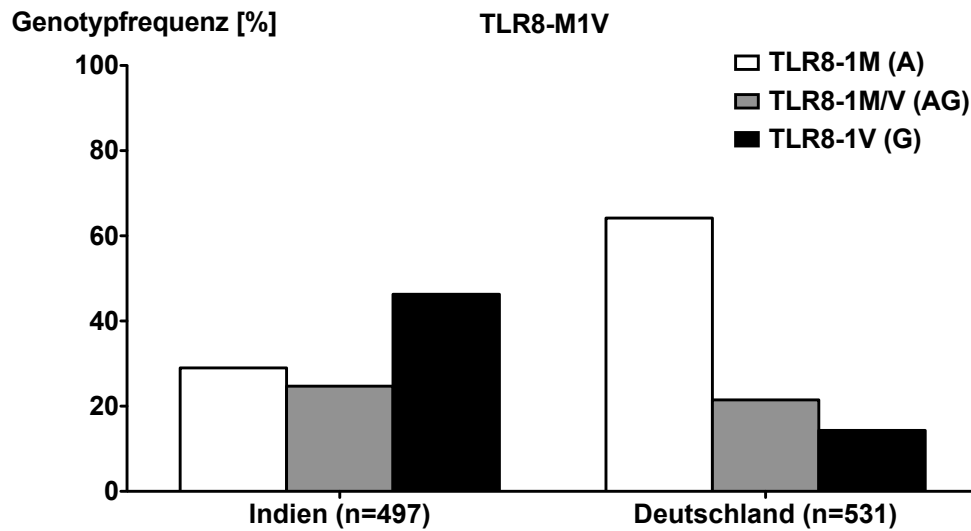
Die in Deutschland stark gekoppelten SNPs TLR4-D299G und -T399I weisen in den indischen Kohorten eine schwächere Bindung auf ( $r^2 = 49$ ). Ebenfalls in einem leichten LD stehen TLR4-L443F und -K474E ( $r^2 = 0,29$ ) (Abbildung 3.5A).

Bei TLR8 stehen Y25C und K27E mit  $r^2 = 32$  und die synonymen Polymorphismen L651L und I751I mit  $r^2 = 0,50$  im LD (Abbildung 3.5B).



**Abbildung 3.2** – Vergleich der Genotypfrequenzen von TLR4-D299G und T399I zeigt geringe Verschiebung von Indien nach Deutschland.

A) Genotypfrequenzen von TLR4-D299G in Indien und Deutschland. B) Genotypfrequenzen von TLR4-T399I in Indien und Deutschland. Die beiden SNPs sind in Deutschland beinahe komplett gekoppelt, wogegen sie in Indien auch getrennt voneinander auftreten.



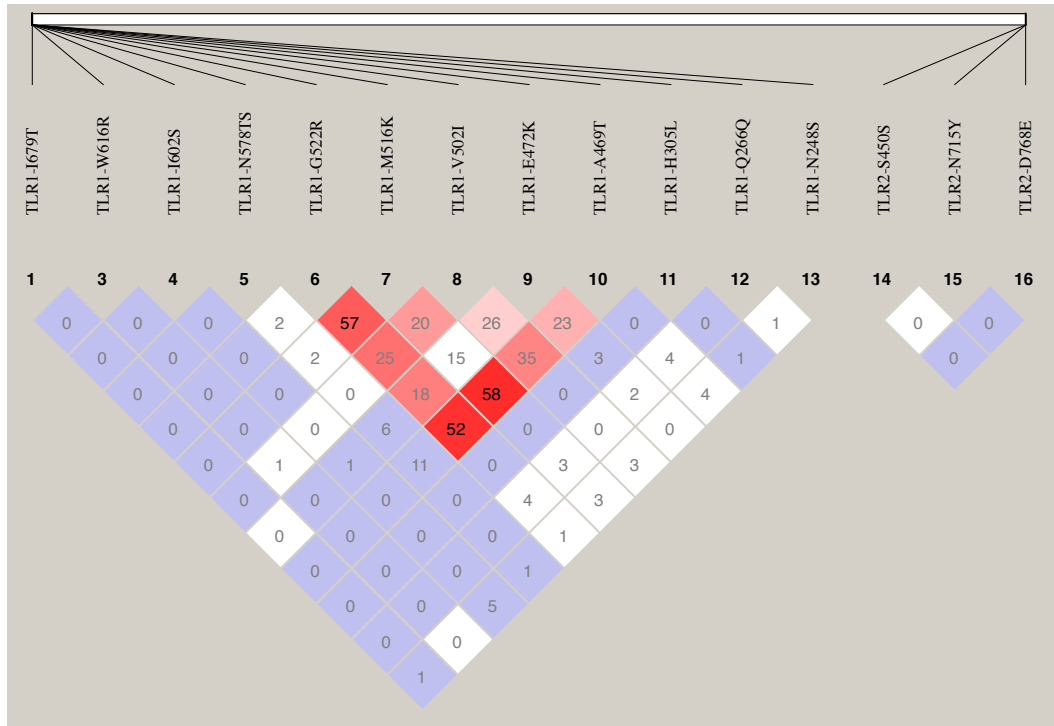
**Abbildung 3.3** – Vergleich der Genotypfrequenzen von TLR8-M1V zeigt genetische Verschiebung von Indien nach Deutschland.

Die in Indien am häufigsten vertretene TLR8-1V Variante ist in Deutschland die seltenste, wogegen TLR8-1M hier der häufigste Genotyp ist.

## 3.4 Assoziation von TLR SNPs mit TB

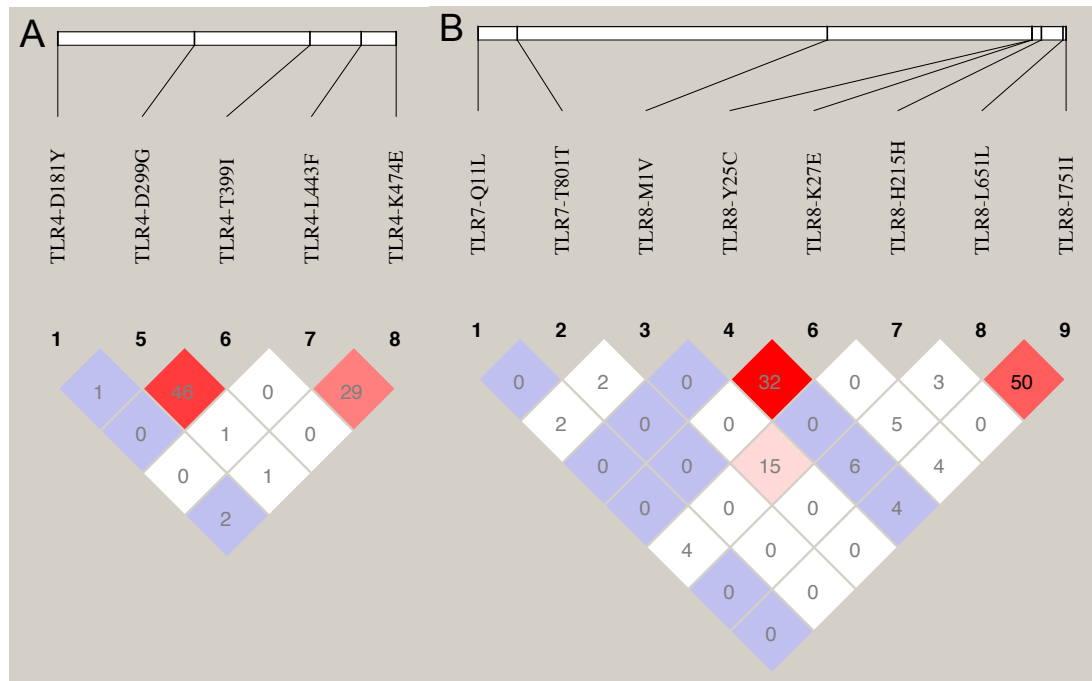
### 3.4.1 TLR1-248N ist mit Schutz gegen TB assoziiert

Analysen der Fälle und der Kontrollen haben gezeigt, dass das Auftreten des TLR1-248N SNPs (rs4833095) mit verringerter TB-Suszeptibilität assoziiert ist (G Patienten / Kontrollen: 229/222; A Patienten / Kontrollen: 183/256) (Tabelle 3.7) (OR 0,69; 95% CI 0,53 – 0,9;  $P = 0,036$ ; korrigiert für Störfaktoren Alter, BMI, BCG Impfstatus und Trink- / Rauchverhalten). Allel- und Genotyp-Frequenzen waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Genotyp-Frequenzen des SNP-N248S wurden weiter analysiert um herauszufinden, ob das TB Risiko mit homogenen (742AA oder 742GG) oder heterogenen (742AG) Individuen assoziiert ist. Die Häufigkeit der homozygoten Variante 742AA (248N) war signifikant mit verringertem TB-Risiko assoziiert (Patienten / Kontrollen: 42/72) (OR 0,57; 95%CI 0,37 – 0,88;  $P = 0,011$ ). 742GG (Patienten / Kontrollen: 65/57) und 742AG (Patienten / Kontrollen: 99/108) waren beide nicht signifikant mit der Krankheit verknüpft. Allel 1805G (TLR1-602), das zuvor mit Schutz vor TB in anderen Bevölkerungen assoziiert wurde (Kleinnijenhuis et al., 2011; Ma et al., 2007), konnte nur in 8% der Kontrollen und 7% der Patienten gefunden werden und hatte keinen Einfluss in dieser Kohorte.



**Abbildung 3.4** – Kein Linkage-Disequilibrium zwischen TLR1-N248S, S602I oder Q266Q.

Linkage-Disequilibrium Analysen von TLR1 SNPs ( $r^2$ ). Es kann keine Korrelation zwischen N248S und S602I hergestellt werden (5% Korrelation). Der neue TLR1 Polymorphismus Q266Q ist mit keinem anderen SNP in dem sequenzierten Bereich assoziiert. Eine starke Assoziation wird durch höheres  $r^2$  veranschaulicht. Blaue Kästchen: ( $\frac{highD'}{lowLOD}$ ), weiß:  $lowD'$  bis dunkelrot:  $highD'$ .



**Abbildung 3.5** – Linkage-Disequilibrium zwischen TLR4-D299G und T399I aber nicht zwischen TLR8-M1V und anderen TLR8 SNPs. Linkage-Disequilibrium Analysen von TLR4 SNPs ( $r^2$ ). A) Es kann eine Korrelation zwischen D299G und T399I hergestellt werden. B) Es kann eine Korrelation zwischen Y25C und K27E sowie zwischen L651L und I751H, jedoch nicht zwischen M1V anderen TLR7 oder -8 SNPs hergestellt werden. Eine starke Assoziation wird durch höheres  $r^2$  veranschaulicht. Blaue Kästchen: ( $\frac{highD'}{lowLOD}$ ), weiß:  $lowD'$  bis dunkelrot:  $highD'$ .

**Tabelle 3.7** – Genotypfrequenzen des TLR1-N248S SNP in TB Patienten und gesunden Kontrollen

TLR1 N248S	Patienten n (%)	Kontrollen n (%)	P-Wert	OR	95% CI
<b>Allel</b>					
G [248S]	229 (55,6)	222 (46,4)			
A [248N]	183 (44,4)	256 (53,6)	<b>0,0066</b>	<b>0,69</b>	<b>0,53-0,9</b>
248N			<b>0,036<sup>a</sup></b>		
<b>Genotyp</b>					
AA	42 (20,4)	74 (31,0)	<b>0,011</b>	<b>0,57</b>	<b>0,37-0,88</b>
AG	99 (48,1)	108 (45,2)	0,69	1,47	0,97-2,24
GG	65 (31,6)	57 (23,8)	0,54	1,12	0,77-1,63

<sup>a</sup> korrigiert für Alter, BCG, BMI, Trink-/Rauchverhalten;

P: Pearson  $\chi^2$  P-Wert; OR: Odds Ratio; CI: Konfidenzintervall

### 3.4.2 Ein synonymer SNP, TLR1-Q266Q ist mit TB Risiko assoziiert

Einer der synonymen SNPs, TLR1-Q266Q, fand sich mit TB-Risiko assoziiert (OR 0,05; 95% CI 0,009 – 0,53;  $P < 0,001$ ). LD-Berechnungen haben jedoch keine Kopplung mit anderen TLR1 SNPs in den sequenzierten Regionen zeigen können. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass eine Kopplung mit einem SNP besteht, der nicht in dem hier sequenzierten Bereich liegt.

### 3.4.3 Das G-Allel von TLR4-D299G ist mit erhöhtem TB Risiko bei Frauen verknüpft.

Weitere Analysen der Kohorten hat gezeigt, dass der Polymorphismus 299G des TLR4 in Indien isoliert auftritt kann (Abbildung 3.5A), wogegen er in Deutschland ausschließlich gekoppelt mit TLR4-T399I auftritt. Eine Assoziation dieses Polymorphismus mit TB in der gesamten Kohorte konnte nicht festgestellt werden, jedoch, dass er häufiger bei mit TB erkrankten Frauen in Indien auftritt, verglichen mit gesunden Frauen (Patienten / Kontrollen: 29/10; 299A Patienten / Kontrollen: 69/68) (OR 2,86; 95% CI 1,29 – 6,32;  $P = 0,0078$ ). Diese Assoziation wurde weder bei den Männern (OR 0,69; 95% CI 0,27 – 1,69;  $P = 0,41$ ) noch bei der

gesamten Kohorte gefunden (OR 0,631; 95% CI 0,97~2,91;  $P = 0,0631$ ). Allel- und Genotyp-Frequenzen waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Genotyp-Frequenzen des SNP D299G wurden weiter analysiert um herauszufinden, ob das TB-Risiko mit homozygoten (1187AA oder 1187GG) oder heterozygoten (1187AG) Individuen assoziiert ist. Weder die Häufigkeit der homozygoten Variante 1187AA (299G) (Patienten / Kontrollen: 15/29) oder 1187GG (299G) (Patienten / Kontrollen: 3/0) noch die Häufigkeit der heterozygoten Variante 1187AG (Patienten / Kontrollen: 12/10) war signifikant mit einem Einfluss auf das TB-Risiko assoziiert.

**Tabelle 3.8** – Allel- und Genotypfrequenzen des TLR4-D299G SNP in TB Patientinnen und gesunden Frauen

TLR4 <b>D299G</b>	Patienten n (%)	Kontrollen n (%)	P-Wert	OR	95% CI
<b>Allel</b>					
G [299G]	29 (29,6)	10 (12,8)	<b>0.0078</b>	<b>2,86</b>	<b>1,29-6,32</b>
A [299D]	69 (70,4)	68 (87,2)			
<b>Genotyp</b>					
AA	15 (50)	29 (72,5)	0,19	2	0,71-5,68
AG	12 (40)	10 (17,5)	0,21	0,52	0,19-1,44
GG	3 (10)	0 (0)	0,08		

P: Pearson  $\chi^2$  P-Wert; OR: Odds Ratio; CI: Konfidenzintervall

### 3.4.4 Das G Allel des Polymorphismus M1V von TLR8 ist mit verminderter TB-Suszeptibilität assoziiert

In TLR8 zeigte sich ebenfalls eine signifikante Assoziation eines Polymorphismus bezogen auf TB-Suszeptibilität. Deutlich mehr gesunde Kontrollen als TB Patienten sind Träger des G-Allels von TLR8-1 (OR 0,67; 95% CI 0,52 – 0,87;  $P = 0,0024$ ). Allel- und Genotyp-Frequenzen waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Auch hier wurden Genotyp-Frequenzen des SNP M1V weiter analysiert um herauszufinden, ob das TB Risiko mit homogenen (88AA oder 88GG) oder heterogenen (88AG) Individuen assoziiert ist. Die Häufigkeit von 88GG (1V) (OR 0,59; 95%CI 0,37~0,93;  $P = 0,02$ ) war signifikant mit einem Einfluss auf das TB-Risiko assoziiert.

Da TLR8 auf dem X-Chromosom liegt sind alle Männer bezüglich TLR8 SNPs homozygot und nur Frauen können einen heterozygoten Genotyp den heterozygoten Genotyp 88AG tragen (OR 2,65; 95%CI 1,72~4,08;  $P < 0.0001$ ).

**Tabelle 3.9** – Allel- und Genotypfrequenzen des TLR8-M1V SNP in TB Patienten und gesunden Kontrollen

TLR8 M1V	Patienten n (%)	Kontrollen n (%)	P-Wert	OR	95% CI
<b>Allel</b>					
G [1V]	191 (44)	200 (36)	<b>0,002</b>	<b>0,67</b>	<b>0,52-0,87</b>
A [1M]	148 (56)	113 (64)			
<b>Genotyp</b>					
AA	68 (32)	55 (25,5)	0,24	1,28	0,8 - 1,96
AG	54 (25)	40 (22,6)	0,15	1,41	0,9-1,8
GG	92 (43)	112 (51,9)	<b>0,02</b>	<b>0,64</b>	<b>0,65 - 0,97</b>

P: Pearson  $\chi^2$  P-Wert; OR: Odds Ratio; CI: Konfidenzintervall

### 3.4.5 Sonstige Assoziationen

Um weitere Faktoren zu finden, die bei TB-Suszeptibilität eine Rolle spielen wurden die Kohorten unterteilt in Gruppen wie weiblich/männlich oder Hindu/Moslem und auf Zusammenhänge der gemessenen SNPs mit TB getestet. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst. Die Ergebnisse von TLR4 wurden bereits in Abschnitt 3.4.3 zusammengefasst.

Der auf dem X-Chromosom befindliche Polymorphismus TLR8-1V ist in beinahe jeder Sub-Kohorte signifikant mit Schutz vor TB assoziiert (Frauen: M Patienten / Kontrollen: 157/78; V Patienten / Kontrollen: 193/140;  $P = 0,0327$ ; OR 0,68; 95% CI 0,48 – 0,96; Männer: M Patienten / Kontrollen: 102/74; V Patienten / Kontrollen: 118/132;  $P = 0,0287$ ; OR 0,65; 95% CI 0,44 – 0,96) (Tabelle 3.10).

Des Weiteren haben Moslems mit dem G-Allel des synonymen TLR1-Q266Q Polymorphismus ein höheres Risiko an TB zu erkranken ( $P < 0,001$ ; OR 9,53; 95% CI 2,14 – 42,54) (G Patienten / Kontrollen: 112/94; A Patienten / Kontrollen: 2/16) (Tabelle 3.10).

## 3.5 Funktionelle Analysen

### 3.5.1 Das TLR1-248N Allel steuert zu einer erhöhten PBMC TNF Produktion bei

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine im Betreuerlabor entstandene Kohorte mit gesunden Kontrollen erweitert und nach einer Initialblutspende für SNPs von Interesse genotypisiert. Um herauszufinden, ob das TLR1-248N Allel die Reaktivität von



**Tabelle 3.10** – Assoziationen der Allelfrequenzen von SNPs mit TB-Suszeptibilität in Sub-Kohorten

Kohorte	SNP	Patienten n (%)	Kontrollen n (%)	P	OR	95% CI
<b>Frauen</b>						
TLR4-299	D	69 (70,4)	68 (87,2)	0,0078	0,35	0,16-0,77
	G	29 (29,6)	10 (12,8)	0,0078	2,86	1,29-6,32
TLR8-1	M	148 (44,9)	76 (35,8)	0,0327	1,46	1,03-2,07
	V	191 (55,1)	136 (64,2)	0,0327	0,68	0,48-0,97
<b>Männer</b>						
TLR8-1	M	42 (46,4)	37 (35,9)	0,0287	1,54	1,05-2,27
	V	47 (53,6)	64 (64,1)	0,0287	0,65	0,44-0,96
<b>Moslems</b>						
TLR1-266	Q (A)	2 (1,8)	16(14,5)	<0,001	0,1	0,02-0,47
	Q (G)	112 (98,2)	94 (85,5)	<0,001	9,53	2,14-42,52

P: Pearson  $\chi^2$  P-Wert; OR: Odds Ratio; CI: Konfidenzintervall

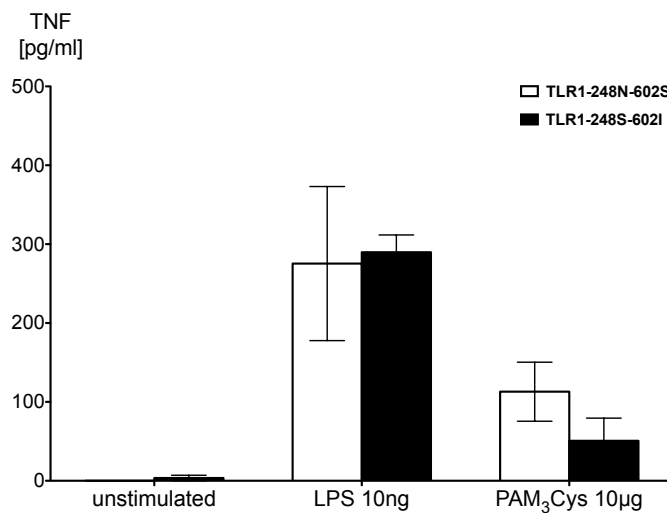
PBMCs durch das TLR1-248N Allel beeinflusst wurden für ex vivo Experimente Personen mit entsprechenden Genotypen nach Alter und Geschlecht gepaart aus dieser Kohorte einbestellt. Ihnen wurde etwa 100 ml Vollblut entnommen, woraus parallel PBMCs isoliert. Die Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit bakteriellen Liganden stimuliert und deren TNF Produktion im Überstand mittels ELISA gemessen und die Ergebnisse miteinander verglichen (Abbildung 3.6 - 3.9).

Da die Genotyp-Kombination von TLR1-248S-602S und TLR1-248N-602I in der deutschen Kontrollgruppe sehr selten vorkommt wurden die PBMC Versuche auf die Analyse von TLR1-248S-602I und TLR1-248N-602S beschränkt.

Wie erwartet zeigte die LPS-Kontrolle keinen Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 3.6). Bei Individuen mit dem TLR1-248N Phänotyp resultierte die Stimulation der PBMCs mit Pam<sub>3</sub>Cys in einer erhöhten TNF-Produktion, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abbildung 3.6).

Es folgte eine Stimulation mit unterschiedlichen HR37v *M.tb* Lysat Konzentrationen um eine Dosis-Wirkungskurve zu generieren. Dabei wurde nach Herstellerangaben mit Konzentrationen zwischen 1  $\frac{\mu g}{ml}$  und 100  $\frac{\mu g}{ml}$  stimuliert (Abbildung 3.7A). Eine toxische Wirkung wurde mit diesen Konzentrationen nicht erzielt. Da 100  $\frac{\mu g}{ml}$  die höchste TNF-Antwort erzeugte wurde im folgenden mit dieser Konzentration weiter stimuliert. Durch die Stimulation mit dem *M.tb*-Lysat produzierten PBMCs von TLR1-248N Trägern signifikant mehr TNF als PBMCs von TLR1-248S Trägern ( $P = 0,0136$ ) (Abbildung 3.7B).

Die PBMCs der gesunden Kontrollen wurde ebenfalls mit verschiedenen myko-

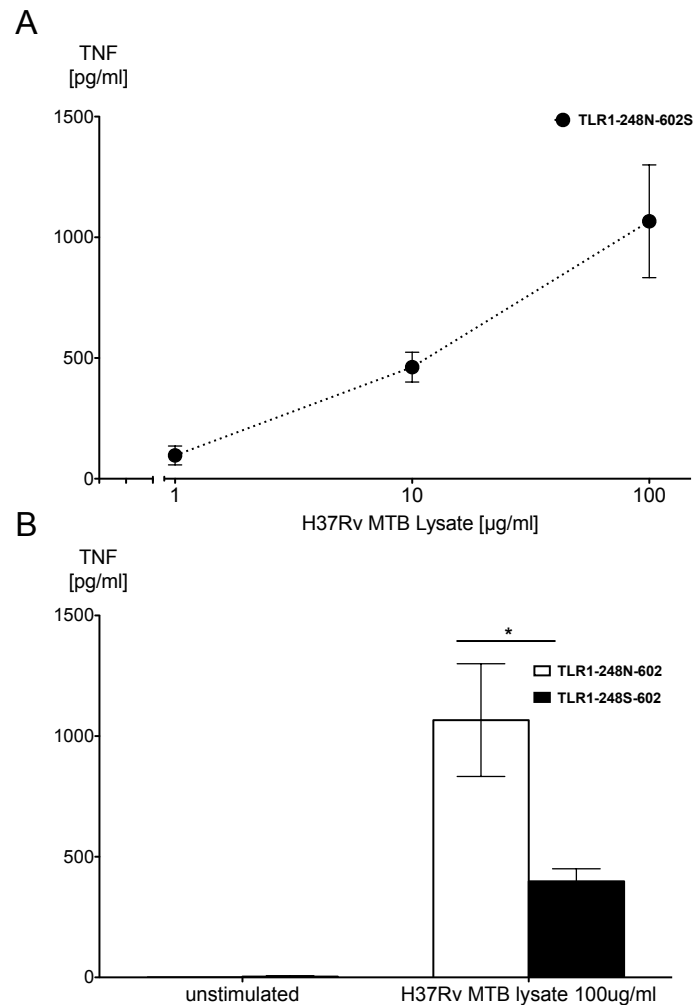


**Abbildung 3.6** – PBMCs von Individuen mit dem TLR1-248N Genotyp zeigen eine höhere TNF Produktion nach Pam<sub>3</sub>Cys Stimulation.

PBMCs wurden vom Vollblut gesunder Deutscher Kontrollen isoliert. Vergleich der TNF-Antwort zwischen 248N und 248S Genotypen; gemessen mittels ELISA des Zellkulturüberstands nach Stimulation mit LPS oder Pam<sub>3</sub>Cys. Die Ergebnisse repräsentieren eines von vier unabhängig durchgeführten Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen (n=2 pro Gruppe). Mittelwert  $\pm$  SEM sind dargestellt.

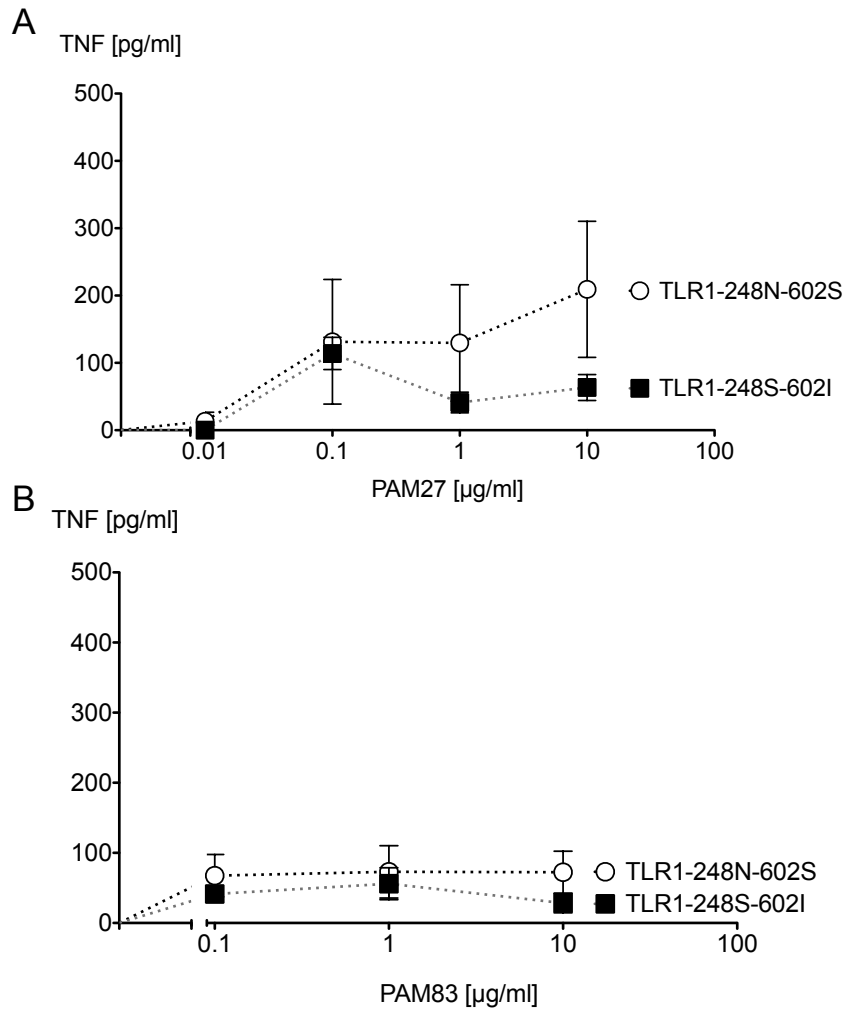
bakteriell abgeleiteten Pam<sub>3</sub> Varianten stimuliert (EMC microcollections GmbH, Cat. No.: bLP MPT83 (PAM83) und bLP MT P27 (PAM27)) (Herstellerangabe:  $0.01 - 10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ). Tendenziell reagierten PBMCs von Trägern des TLR1-248N-602S Genotyps mit stärkerer TNF Ausschüttung, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant und mit höchstens  $200-300 \frac{\text{pg}}{\text{ml}}$  bei PAM27 und höchstens  $100 \frac{\text{pg}}{\text{ml}}$  bei PAM83 eher schwach (Abbildung 3.8).

Neben der Stimulation mit H37Rv *M.tb* Lysat wurden die PBMCs auch mit ganzen *M.tbs* stimuliert, welche vor der Stimulation mit Ultraschall lysiert wurden. Bei dieser Stimulation haben die Zellen mit  $1.000 - 1500 \frac{\text{pg}}{\text{ml}}$  TNF-Ausschüttung bei einer Multiplicity of Infection (MOI) von 100 stark reagiert, es war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen messbar (Abbildung 3.9). Denkbar ist, dass Proteine, die zur Unterschiedlichen Aktivierung führen durch die Ultraschalllyse zerstört wurden.



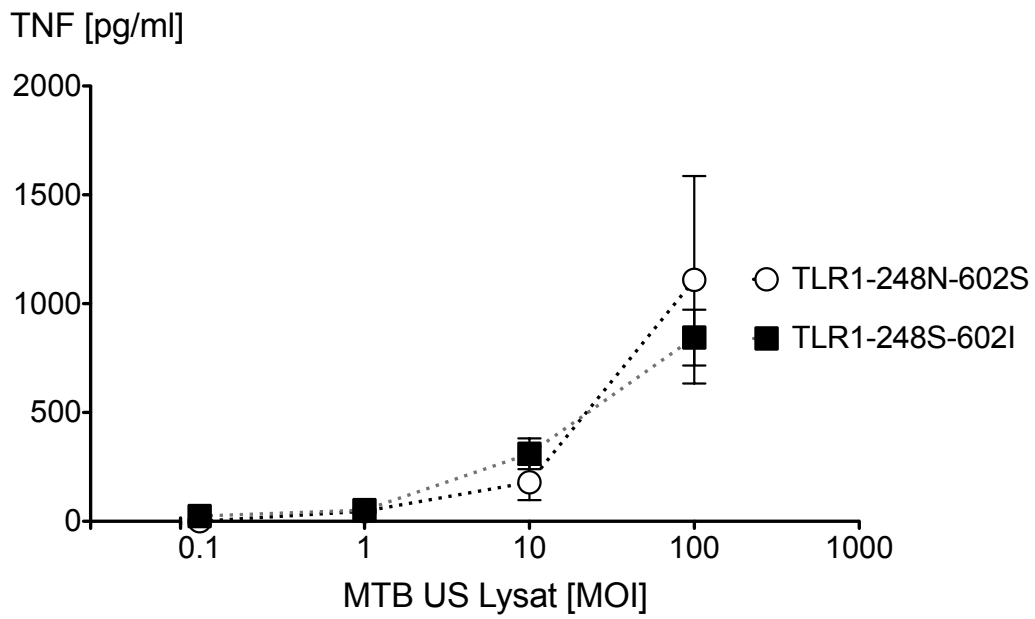
**Abbildung 3.7** – PBMCs von Individuen mit dem TLR1-248N Genotyp zeigen eine höhere TNF Produktion nach H37Rv Stimulation.

PBMCs wurden vom Vollblut gesunder Deutscher Kontrollen isoliert. A) Dosis-Antwort-Kurve der TNF-Produktion nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von H37Rv *M.tb* Lysat. B) TNF-Antwort nach Stimulation der verschiedenen Genotypen mit 100  $\mu\text{g/ml}$  des HR37v *M.tb* Lysats. TLR1-248N weist verstärkte TNF-Produktion im Vergleich zu TLR1-248S auf. Die Ergebnisse repräsentieren eines von vier unabhängig durchgeführten Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen (n=2 pro Gruppe). Mittelwert  $\pm$  SEM sind dargestellt. \*,  $P < 0.05$ .



**Abbildung 3.8** – PBMCs von Individuen mit dem TLR1-248N Genotyp zeigen eine tendenziell höhere TNF Produktion nach mykobakterieller Pam<sub>3</sub> Stimulation.

PBMCs wurden vom Vollblut gesunder Deutscher Kontrollen isoliert. Vergleich der TNF-Antwort zwischen 248N und 248S Genotypen; gemessen mittels ELISA des Zellkulturüberstands nach Stimulation mit mykobakteriell abgeleitetem Pam<sub>3</sub>. n = 5 pro Gruppe. Mittelwert  $\pm$  SEM sind dargestellt.



**Abbildung 3.9** – PBMCs von Individuen mit unterschiedlichem TLR1 Genotyp zeigen keinen Unterschied der TNF Produktion nach Stimulation mit Ultraschall-lysierten *M.tbs*.

PBMCs wurden vom Vollblut gesunder Deutscher Kontrollen isoliert. Vergleich der TNF-Antwort zwischen 248N und 248S Genotypen; gemessen mittels ELISA des Zellkulturüberstands nach Stimulation mit UV-lysierten *M.tbs*. n = 5 pro Gruppe. Mittelwert  $\pm$  SEM sind dargestellt. MOI: Multiplicity of Infection

### 3.5.2 Die TLR1-248N Variante resultiert in erhöhter NF- $\kappa$ B Expression in HEK Zellen

Wegen der Assoziation von TLR1-248N mit TB-Schutz wurden HEK-Zellen mit ELAM den TLR-Varianten TLR1-248N, -248S, -602I, -602S und TLR2 transfiziert. Hierzu wurden mehrere Vorversuche durchgeführt um die optimalen Plasmidkonzentrationen für die die Transfektion zu finden.

Die transfizierten HEK-Zellen wurden mit mykobakteriellen Liganden, sowie als Positivkontrolle mit dem mykobakteriell abgeleiteten TLR2/1 Agonisten Pam<sub>3</sub> und als Negativkontrolle mit dem TLR4-Agonist LPS stimuliert.

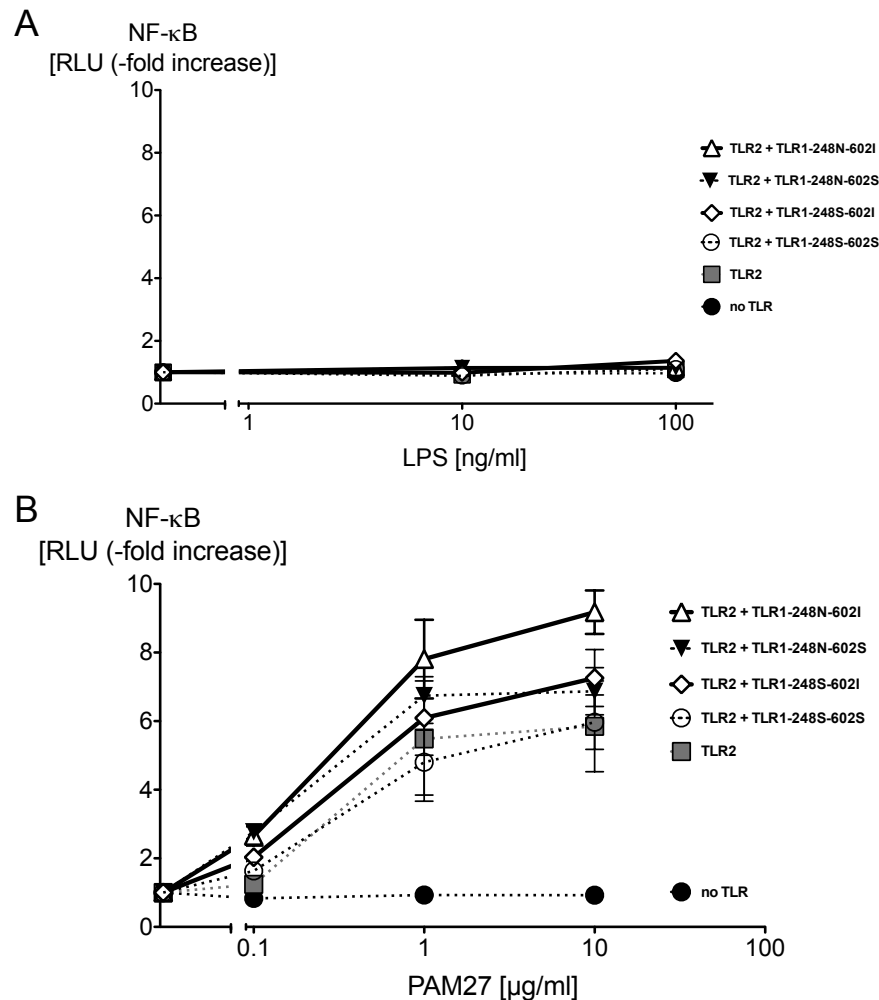
Wie erwartet unterschied sich die LPS-Negativkontrolle nicht von den unstimulierten Kontrollen (Abbildung 3.10A). Keine der Transfektionskombinationen zeigte einen Anstieg der NF- $\kappa$ B-Ausschüttung bei LPS-Stimulation.

Die Pam<sub>3</sub>Cys-Positivkontrolle zeigte eine Heraufregulierung der NF- $\kappa$ B Expression (Abbildung 3.10B), welche am stärksten bei mit TLR2 + TLR1-248N-248I transfizierten HEK-Zellen war. Die Steigerung der NF- $\kappa$ B-Ausschüttung bei Zellen, die mit TLR2 + TLR1-248S-602S transfiziert wurden war ähnlich schwach wie die Steigerung bei Zellen, die lediglich mit TLR2 transfiziert wurden, was darauf schließen lässt, dass mit dieser Kombination von SNPs TLR1 bei Pam<sub>3</sub>Cys Stimulation keinen Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-Ausschüttung hat. Zellen, die mit keinem TLR transfiziert wurden zeigten keinen Anstieg der NF- $\kappa$ B-Ausschüttung bei Pam<sub>3</sub>Cys stimulation.

Auch für die HEK-Zell-Versuche wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve generiert um eine geeignete HR37v *M.tb* Lysat-Konzentration zu bestimmen (Empfehlung des Herstellers: 0,1-100  $\mu$ g/ml) (Abbildung 3.11A). Es wurde keine toxische Wirkung in diesem Konzentrationsbereich festgestellt. Die mit den TLR-Varianten TLR1-248N, -248S, und TLR2 transfizierten HEK-Zellen wurden mit dem *M.tb*-Lysat ebenfalls in einer Dosis-Wirkungs-Kurve stimuliert. Durch die Stimulation wurde die NF- $\kappa$ B Expression von TLR1-248N im Vergleich zu TLR1-248S signifikant erhöht. HEK-Zellen ohne transfizierte TLRs zeigten keine Reaktion auf die *M.tb*-Lysat Stimulation (Abbildung 3.11B).

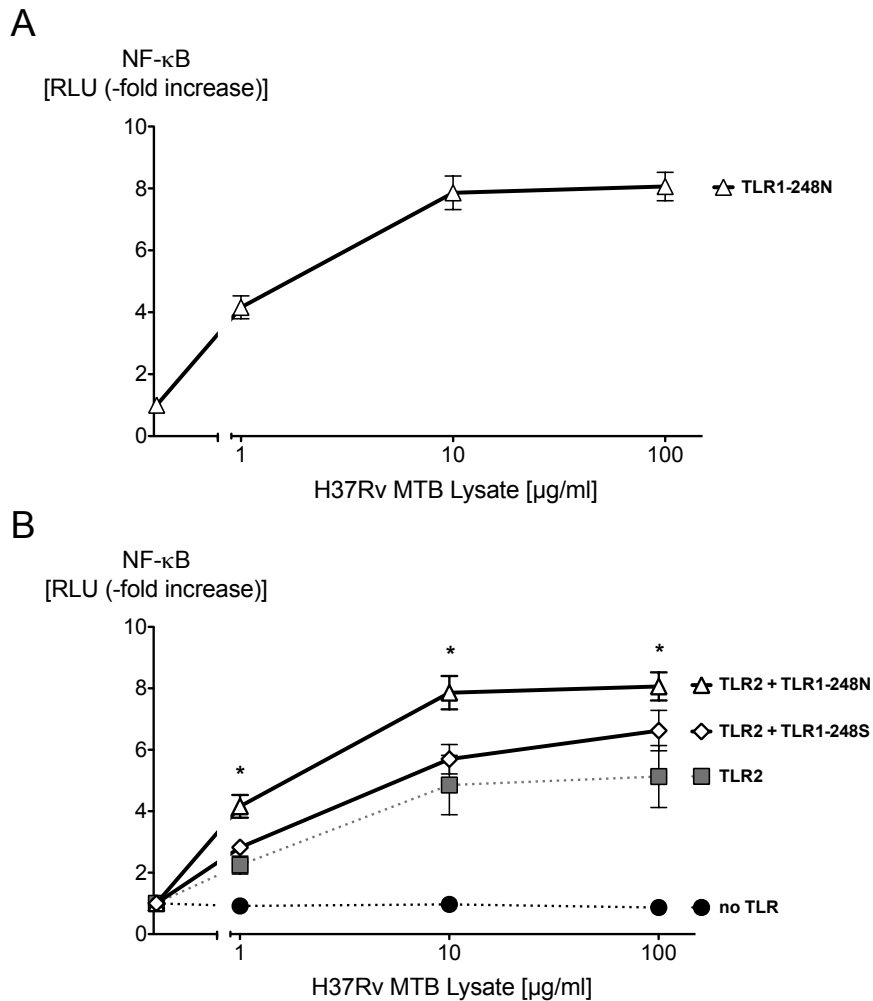
Die Steigerung der NF- $\kappa$ B-Ausschüttung war am stärksten, wenn die TLR1-248N und TLR1-602I Varianten zusammen transfiziert wurden. Während die Kombinationen TLR2 + TLR1-248N-602S und TLR2 + TLR1-248S-602I ähnliches Verhalten zeigten war die Reaktion von TLR2 + TLR1-248S-602S transfizierter HEK-Zellen erneut ähnlich der Reaktion von HEK-Zellen, welche nur mit TLR2 transfiziert wurden (Abbildung 3.12A).

Die HEK-Zellen wurden ebenfalls mit ganzen *M.tbs* stimuliert, welche zuvor mit-



**Abbildung 3.10** – Der TLR1 Polymorphismus 248N verursacht eine Heraufregulierung der NF- $\kappa$ B Expression in transfizierten HEK293 Zellen nach mykobakterieller Pam<sub>3</sub> Stimulation.

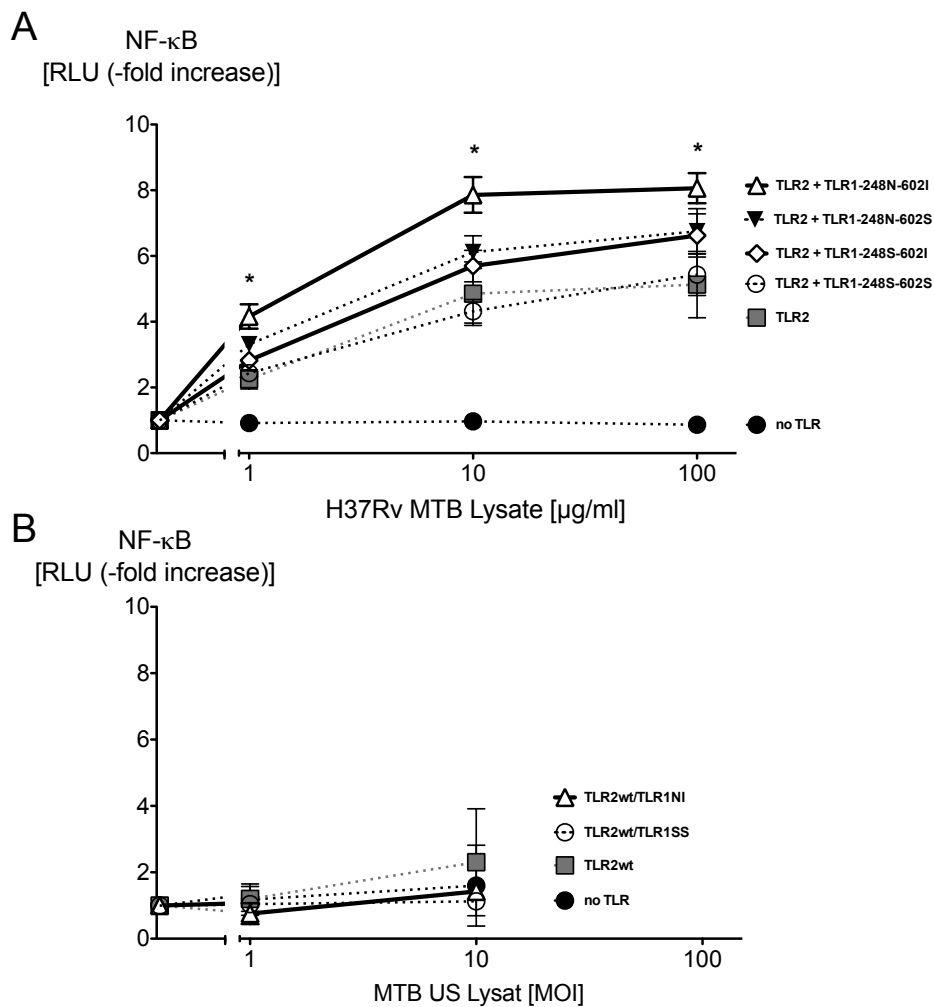
HEK Zellen wurden mit TLR2, TLR1-248N, -248S, -602S und -602I Varianten transfiziert. A) Die NF- $\kappa$ B Antwort der transfizierten Zellen wurde nach LPS (Negativkontrolle) Stimulation gemessen. B) NF- $\kappa$ B Antwort der HEK-Zellen nach Stimulation mit mykobakteriell abgeleitetem Pam<sub>3</sub>. Werte sind normalisiert auf ihren jeweiligen unstimulierten Wert und als n-fache Erhöhung des unstimulierten Wertes dargestellt.  $n = 6$  pro Gruppe. Mittelwert  $\pm$  SEM wird dargestellt.



**Abbildung 3.11** – Der TLR1 Polymorphismus 248N verursacht eine signifikante Heraufregulierung der NF- $\kappa$ B Expression in transfizierten HEK293 Zellen nach H37Rv Stimulation.

HEK Zellen wurden mit TLR2, TLR1-248N und TLR1-248S Varianten transfiziert. A) Dosis-Wirkungs-Kurve für die TLR1-248N Variante, nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von H37Rv *M.tb* Lysat. B) Dosis-Wirkungs-Kurve der TLR1-248N und -248S Variationen der transfizierten Zellen nach H37Rv Stimulation. Die TLR1-248N Variante zeigt eine signifikant höhere NF- $\kappa$ B Antwort als TLR1-248S. Alle TLR1 Transfektionen beinhalteten TLR1-602I. Werte sind normalisiert auf ihren jeweiligen unstimulierten Wert und als n-fache Erhöhung des unstimulierten Wertes dargestellt. Die Ergebnisse repräsentieren einen von vier unabhängig durchgeführten Versuchen mit ähnlichem Ergebnis (n=2 pro Gruppe). Mittelwert  $\pm$  SEM wird dargestellt. \*, P<0.05; \*\*, P<0.01, \*\*\*, P<0.001.





**Abbildung 3.12** – Der TLR1 Polymorphismus 248N jedoch nicht 602I/S verursacht eine signifikante Heraufregulierung der NF- $\kappa$ B Expression in transfizierten HEK293 Zellen nach H37Rv Stimulation.

HEK Zellen wurden mit TLR2, TLR1-248N, -248S,-602I und 602S Varianten transfiziert. A) Dosis-Wirkungs-Kurve aller Variationen der transfizierten Zellen nach H37Rv Stimulation. Die TLR1-248N Variante zeigt eine signifikant höhere NF- $\kappa$ B Antwort als TLR1-248S. ( $n = 6$  pro Gruppe) B) Die NF- $\kappa$ B Antwort der transfizierten Zellen wurde nach Stimulation mit UV lysierten *M. tbs* als Dosis-Wirkungs-Kurve gemessen ( $n = 2$ ). Werte sind normalisiert auf ihren jeweiligen unstimulierten Wert und als n-fache Erhöhung des unstimulierten Wertes dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM wird dargestellt. \*,  $P < 0.05$

**Tabelle 3.11** – Vergleich der Kluftvolumina der TLR1 Varianten

Kluft	Volumen in 248N	Volumen in 248S
1	3305.39	2189.11
2	836.58	1372.36
3	1067.77	1314.56
4	851.77	969.47

tels Ultraschall lysiert wurden. Dies führte zu einem geringen Anstieg und keinem signifikanten Unterschied der NF- $\kappa$ B Ausschüttung bei unterschiedlich transfizierten Zellen (Abbildung 3.12B).

## 3.6 Modellierung der Proteinstrukturen

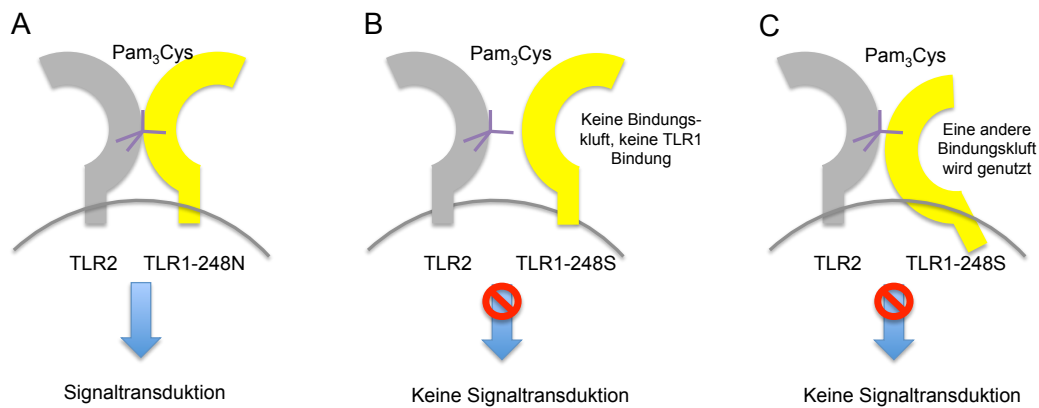
### 3.6.1 Der Einfluss von N248S auf die Proteinstruktur von TLR1

Um zu entschlüsseln, welche strukturellen Konsequenzen die hier gefundenen genetisch bedingten Proteinvarianten haben könnten wurden im Rahmen dieser Arbeit in silico Modellierungen durchgeführt. Besonderes Interesse lag dabei auf dem Einfluss des TLR1-N248S SNPs auf die Proteinstruktur.

Root mean square deviation (RMSD) Berechnungen zeigten, dass die 248S Variante eine Abweichung von 2.12Å in den C-alpha Residuen und 2.09Å in den Backbone Atomen, verglichen mit der Vorlage 248N, aufweist. Vergleiche von CASTp Ergebnissen von 248N und 248S zeigten die Anwesenheit von 84 funktionellen Taschen für die erstere, und 85 für die letztere, mit variierenden Flächen und Volumen.

Die Formierung des TLR2/1-Heterodimers ermöglicht es, Pam<sub>3</sub>Cys zu binden und mit der TLR1-248N Variante mit nachfolgender Signaltransduktion erkannt zu werden (Abbildung 3.13A). Durch die nicht vorhandene Kluft in TLR1-248S kann Pam<sub>3</sub>Cys vermutlich nicht binden was zur Wirkung haben könnte, dass die Signaltransduktion nicht zu Stande kommt (Abbildung 3.13B). Außerdem könnte die physische Struktur des Heterodimers verändert sein, falls die Kluft in der TLR1-248S Variante an eine andere Position verlagert ist, was die TLR2/1 Signaltransduktion beeinträchtigen könnte (Abbildung 3.13C).

Die Aminosäure 248N liegt in einer kleinen Kluft (Abbildung 3.14A), während die 248S Variante diese Kluft nicht aufweist (Abbildung 3.14B). Dies



**Abbildung 3.13** – Mögliche Folgen für die Signaltransduktion der TLR1-248S Variante.

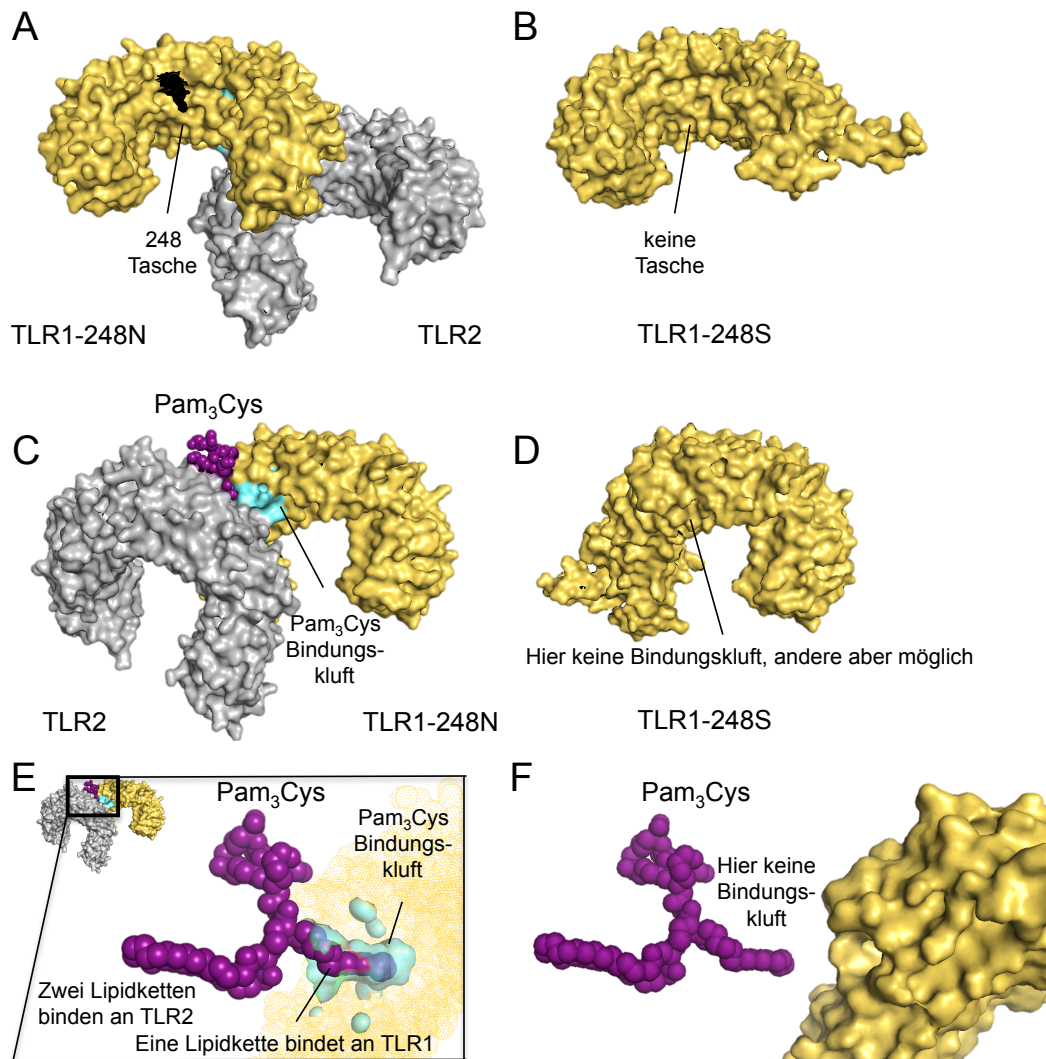
A) Illustration des TLR2/1 Heterodimers auf der Zelloberfläche mit gebundenem Pam<sub>3</sub>Cys. B) Illustration der Situation wie die geschlossene Aushöhlung bei TLR1-248S die Pam<sub>3</sub>Cys Bindung und die anschließende Signaltransduktion beeinträchtigen könnte. C) Illustration wie eine verschobene Pam<sub>3</sub>Cys Bindungstasche bei TLR1-248S die TLR2/1 Heterodimerformation und nachfolgende Signaltransduktion beeinflussen könnte.

ist zwar nicht der Bereich, in dem Pam<sub>3</sub>Cys bindet, jedoch kann eine solche Veränderung Einfluss auf das gesamte Protein haben.

Weitere Analysen deckten die Anwesenheit von 2 Nestern in 248N und 3 in 248S auf. Diese konkaven Nester sind funktionell relevant, da sie wichtige Motive aufnehmen können (Watson and Milner-White, 2002). Jedoch wurden keine dieser Nester in der Nähe von Aminosäure 248 gefunden.

Es konnte aber gezeigt werden, dass sich Variante 248S von 248N deutlich hinsichtlich der Oberflächenstruktur der größten Klüften und Aushöhlungen unterscheidet (Tabelle 3.11). Eine dieser Klüfte ist in der 248N Variante vorhanden (Abbildung 3.14C), scheint jedoch in der 248S Variante nicht existent oder verschoben zu sein (Abbildung 3.14D).

Diese Kluft kann einen Teil einer Lipidkette des TLR1 Agonisten Pam<sub>3</sub>Cys aufnehmen (Abbildung 3.14E). Durch das Fehlen dieser Kluft in 248S kann Pam<sub>3</sub>Cys vermutlich nicht mehr in das TLR1 Protein gleiten und somit wird hier postuliert, dass die Pam<sub>3</sub>Cys Erkennung bei Individuen mit diesem Genotyp beeinträchtigt sein kann (Abbildung 3.14F).



**Abbildung 3.14** – Eine mögliche Bindungstasche und eine funktionelle Bindungstasche der 248N Variation von TLR1, welche mit Schutz vor TB assoziiert wird, ist in der 248S Variante nicht existent.

A) Das von der Kristallstruktur des TLR2/1-Heterodimers erzeugte Modell zeigt eine potentielle Bindungstasche, welche Aminosäure Position 248 in dem TLR1-Teil des Heterodimers beinhaltet (TLR1 – gelb, TLR2 – grau, Pam<sub>3</sub>Cys – lila). B) Berechnetes Modell, das die 248S Variante beinhaltet. Die mögliche Bindungstasche ist hier abwesend. C) Die andere Seite des Modells A zeigt die Aushöhlung in blau, wo der Ligand Pam<sub>3</sub>Cys (lila) in die Bindungstasche in TLR1 gleiten kann. D) In der mutierten (248S) Version scheint die Aushöhlung geschlossen oder verschoben zu sein. E) Großaufnahme von Pam<sub>3</sub>Cys (lila), welches in der Bindungstasche (blau) von TLR1-248N liegt. F) Großaufnahme von TLR1-248S und Pam<sub>3</sub>Cys (lila), das keine Möglichkeit hat, in die geschlossene Aushöhlung zu gleiten.

# Kapitel 4

## Diskussion

Diese Arbeit stellte die Gelegenheit dar, nach möglichen genetischen Ursachen für eine Erkrankung zu suchen, die in Deutschland und anderen 'Erste-Welt'-Ländern sehr selten geworden ist. Durch eine internationale Kooperation mit Wissenschaftlern in Hyderabad und Berlin war es möglich, eine Patientenkohorte von TB-Patienten und eine Kohorte von gesunden Kontrollen zu generieren und Untersuchungen zu genetischen Variationen durchzuführen. Dabei ging es um genetische Variationen der TLRs, wichtigen Wirtsproteinen für die Abwehr von Mikroorganismen.

Diese Studie bezieht sich auf TLR-Variationen bezüglich TB-Erkrankung in Südindien, genauer in der Region Hyderabad. Somit können unsere Ergebnisse eventuell nicht allgemein auf alle TB-Patienten zutreffen. Studien zeigen, dass es erhebliche Unterschiede der Suszeptibilität von TB z. B. bei Mäusen und Menschen gibt (Bellamy, 2003; Casanova and Abel, 2002; Kramnik and Boyartchuk, 2002). Im Falle von Menschen könnte dieser Unterschied durch verschiedene Ethnien, Umwelteinflüsse wie Ernährung und die Exposition mit anderen Bakterien verursacht sein. Obwohl die Stämme von *M.tb* normalerweise genetisch sehr nahe beieinander liegen könnten Stämme von *M.tb*, welche in unterschiedlichen geographischen Regionen auftreten, theoretisch eine weitere Variable dafür sein (Filliol et al., 2002; Gutacker et al., 2006; Musser et al., 2000; Sreevatsan et al., 1997).

## 4.1 Vorhersage der Relevanz von Genmutationen

Die SNP Datenbanken in Abschnitt 3.1 sollen einen Überblick über den möglichen Einfluss von Aminosäureänderungen an den Positionen der bekannten TLR Polymorphismen bieten. Diese Vorhersagen basieren auf Methoden, welche die Sequenz, und die phylogenetischen und strukturellen Informationen der Aminosäuresubstitution zusammenfassen und charakterisieren. Dafür wird ein naiver Bayes'scher Algorithmus und überwacht maschinelles Lernen verwendet. Um die Vorhersage zu treffen, wird die naive Bayes'sche posterior Wahrscheinlichkeit, ob diese Mutation schadhaft ist, berechnet und die falsch-positiv- und falsch-negativ-Raten ausgewertet. Eine Mutation wird als 'benign', 'possibly damaging' oder 'probably damaging' basierend auf Grenzwerten für die falsch-positiv-Raten eingestuft (Adzhubei et al., 2010). Bei der Berechnung handelt es sich lediglich um eine Wahrscheinlichkeit, welche in dieser Studie genutzt wurde um zu sequenzierende Bereiche einzugrenzen. Wie später in den Kohorten-, funktionellen und in silico Analysen zu sehen ist können so selbst als 'benign' oder gutartig eingeschätzte Aminosäurevariationen drastische Folgen für das resultierende Protein haben.

## 4.2 Kohortengenerierung und -analyse

Die Generierung der Patienten- und Kontrollkohorte in Hyderabad erstreckte sich über einen Zeitraum von zwei Jahren, in denen kontinuierlich Individuen zur Entnahme von DNS-Proben per Wangenabstrich oder Blutprobe akquiriert wurden. Somit konnte nach etwa einem Jahr eine Pilotstudie mit 50 Patienten und 50 Kontrollen durchgeführt werden, bei der die Proben sequenziert und ausgewertet wurden, um die zu sequenzierenden Bereiche auf den TLRs evtl. weiter einzugrenzen. Dies ist, zusammen mit der schwankenden DNS-Qualität, ein Grund für die variierenden Zahlen der ausgewerteten Individuen je SNP.

Bei den hier betrachteten Kohorten wurde nicht geprüft, mit welchem *M.tb*-Stamm die Patienten infiziert sind. Es ist jedoch davon aus zu gehen, dass es sich um den selben Stamm handelt, da Individuen ausschließlich aus dem Großraum Hyderabad akquiriert wurden. Weiterführende Studien an den Pati-

entenproben in Kooperation mit der Mahavir DOTS Research Clinic könnten der Fragestellung nachgehen, ob es sich tatsächlich um ausschließlich einen Stamm handelt.

Patienten und gesunde Kontrollen wurden im Rahmen des Möglichen während des Klinikalltags einer Tuberkulosestation auf sonstige Krankheiten befragt und untersucht. Es liegen uns keine Ergebnisse von Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)-Tests vor. Da die Patienten jedoch alle am Directly Observed Treatment, Short-Course (DOTS) Programm der WHO teilnehmen und somit in regelmäßigen Abständen in der Klinik erscheinen müssen wurden nachträglich HIV positiv getestete Patienten aus der Kohorte genommen. Es gibt Hinweise, dass HIV ist eine Störvariable und Risikofaktor für TB ist (Suchindran et al., 2009), weshalb HIV positive Individuen aus der Studie ausgeschlossen wurden.

Da der Verlauf einer TB-Erkrankung mit starkem Gewichtsverlust einhergeht, war ein signifikanter Unterschied des BMI zwischen Patienten und Kontrollen zu erwarten, der hier festgestellt wurde (Tabelle 3.1).

Zwar wird die Wirksamkeit der *BCG*-Impfung immer wieder diskutiert (Colditz et al., 1994; Mangtani et al., 2014), jedoch ist sie die bis heute einzige nachgewiesen (zumindest teilweise) wirksame und zugelassene Impfung gegen TB. Deshalb war zu erwarten, dass es hier ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen gibt. Um festzustellen, ob eine Person geimpft war, wurde die charakteristische *BCG*-Impfnarbe gesichtet (Abbildung 4.1). Auch hier konnten wir daher ein zu erwartendes positives Ergebnis erzielen.

Alkohol- und Zigarettenkonsum gehören ebenfalls zu Risikofaktoren für TB (Patra et al., 2014), was sich in den Ergebnissen dieser Studie widerspiegelt. Die Angaben hierzu wurde von den Teilnehmern lediglich erfragt und nicht überprüft. Hier besteht die Möglichkeit, dass besonders die gesunden Kontrollen eher zu Untertreibungen bezüglich ihres Konsums neigen, da rauchen und trinken in Indien oft verpönt wird und somit die Statistik diesbezüglich verfälscht haben könnten. Dieser Verdacht liegt nahe, wenn man betrachtet, dass etwa 20% der Bevölkerung weltweit Zigaretten raucht, was sich innerhalb der TB-Kohorte bestätigt, bei den Kontrollen jedoch deutlich unterrepräsentiert ist. Ähnlich verhält es sich mit dem Trinkverhalten, wo 0,4% der Kontrollen,



**Abbildung 4.1** – Charakteristische Impfnarbe nach *BCG* Impfung.

*BCG* Impfstoff enthält einen abgemilderte *BCG*-Strang von *M. bovis* und wird gespritzt um das Immunsystem zu stimulieren und einen Schutz vor *M.tb* aufzubauen. Die Impfung hinterlässt eine Charakteristische Narbe.

die angeben Alkohol zu trinken, wohl keine realistische Repräsentation der Gesellschaft darstellt.

Nachvollziehbar wiederum ist, dass TB-Infizierte verminderte Heiratsaussichten haben, wie aus Analysen der Kohorten dieser Studie hervorgeht.

Der Einfluss der Religion auf TB-Suszeptibilität ist ohne tieferegehende Studien nicht nachzuvollziehen. Denkbar wären mit der Religion zusammenhängende Gründe wie Diät, soziales Umfeld oder sonstige Lebensumstände als Gründe für den signifikanten Zusammenhang zwischen TB-Erkrankung und Religion.

Die gesunde Kontrollkohorte besteht zu einem Teil aus Familienmitgliedern und Personen, die mit den rekrutierten Patienten in einem Haushalt wohnen und zum anderen Teil aus unabhängig akquirierten, gesunden Kontrollen.

### 4.3 Sequenzierung

In dieser Studie wurde die Methode des Sanger-Sequenzierens benutzt um kosteneffektiv eine möglichst große Anzahl an SNPs in der DNS vieler Individuen



untersuchen zu können. Ein Vorteil gegenüber den ansonsten im Betreuerlabor etablierten Light-Cycler-Assays besteht darin, neben den bekannten auch potentiell neue Polymorphismen zu entdecken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden tatsächlich vier neue, seltene TLR1 SNPs gefunden und bei NCBI eingereicht, um die Details für jeden öffentlich zugänglich zu machen. Die neu entdeckten Polymorphismen tragen bis zu ihrer Veröffentlichung auf dbSNP<sup>1</sup> eine 'ss-Nummer' (siehe Tabelle 3.3) und werden voraussichtlich ab Herbst 2014 auch mit einer ordentlichen 'rs-Nummer' online zu finden sein. Um den potentiellen Einfluss vorher zu sagen wurde ebenfalls eine PolyPhen2 Prognose errechnet, welche für alle vier SNPs mit 'benign', also gutartig, prognostiziert. Weitere Analysen an diesen Polymorphismen wären jedoch nötig um deren eventuelle funktionelle Relevanz zu klären.

### **SNP-Frequenzen in Indien und Deutschland**

Auffallend war, dass die Verteilung wichtiger TLR-Variationen in den indischen Kohorten verschieden zu deren Verteilung in der deutschen Kontrollkohorte ist (Kapitel 3.3.7). Diese genetische Verschiebung beruht vermutlich auf selektivem Druck, dem die Menschen bei der Migration von Afrika über Indien nach Europa standhalten mussten (Casanova et al., 2011b). Da einige Genotypen bestimmte Krankheiten begünstigen, wurden Träger dieser Genotypen vermutlich krank und verstarben noch bevor sie im zeugungsfähigen Alter waren, wodurch sich die Frequenz dieses Genotyps über die Generationen hinweg veränderte.

### **Linkage Disequilibrium**

In Kapitel 3.3.8 wird vereinfacht von 'Linkage Disequilibrium' gesprochen. Dabei handelt es sich um ein gametisches Disequilibrium, welches von Faktoren wie genetischer Kopplung, Rekombinations- und Mutationsrate, genetischer Verschiebung und Populationsstruktur abhängt. Von Interesse ist in diesem Fall, wie häufig zwei oder mehr Variationen gemeinsam im selben Individuum auftreten.

---

<sup>1</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> (August 2014)

## 4.4 TLR-SNPs und TB

Bei der Analyse von 40 TLR1 SNPs wurde eine signifikante Assoziation bei einem neuen, synonymen Polymorphismus TLR1-Q266Q zu TB Risiko gefunden (OR = 0,05; 95% CI = 0,0092 – 0,53;  $P < 0.001$ ). LD Tests haben keine Verbindung von Q266Q zu einem anderen TLR1 SNP in dieser Kohorte herstellen können, sie wurden jedoch nur mit SNPs durchgeführt werden, die in den hier sequenzierten Bereichen lagen. Ein Zusammenhang mit Polymorphismen außerhalb dieser Bereiche ist nicht ausgeschlossen und im Fall von TLR1-Q266Q sogar sehr wahrscheinlich. Extensivere Studien oder Whole-Genome-Sequencing an einer ausreichend großen Kohorte könnten hier weitere Aufschlüsse geben. Weiterhin können auch synonyme SNPs funktionell von Bedeutung sein, etwa durch Auswirkungen auf Splicing oder Epigenetik.

Ein in einer anderen indischen Population mit TB in Verbindung gebrachter Polymorphismus, TLR4-D299G (Najmi et al., 2010) wurde in den hier betrachteten Kohorten nur bei Frauen mit TB-Suszeptibilität in Verbindung gebracht (siehe Kapitel 3.4.3). Jedoch muss beachtet werden, dass durch die Betrachtung ausschließlich weiblicher Patienten und Kontrollen die Anzahl der Individuen deutlich sinkt. Durch Akquise weiterer Studienteilnehmer könnte dieser Zusammenhang bekräftigt werden. Dass der Genotyp von TLR4 – D299G keinen Einfluss auf die Suszeptibilität für Tuberkulose in den Gesamtkohorte hat, steht im Einklang einer Studie mit einer ghanaischen Kohorte (Newport et al., 2004).

Der zweite, in der Studie von Najmi et al. genannte TLR4 SNP T399I war in der hier betrachteten Bevölkerung nicht auffällig.

Mit den funktionellen Folgen von TLR4-D299G beschäftigt sich ein Folgeprojekt im Betreuerlabor.

Der auf dem X-Chromosom befindliche TLR8-1MV Polymorphismus M1V befindet sich im Startkodon, verschiebt somit den Translationsstart des TLR8 Gens und wurde zuvor unter anderem mit HIV (Oh et al., 2008) und mit TB bei Jungen (Dalgic et al., 2011b) in Verbindung gebracht. Dieses Ergebnis steht ebenfalls in Einklang mit einer Studie an einer indonesischen und einer russischen TB Kohorte (Davila et al., 2008).

Ein weiteres, aus dieser Arbeit im Betreuerlabor hervorgegangenes Forschungsprojekt beschäftigt sich intensiv mit den funktionellen Konsequenzen dieser Genvariation.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Studie ist, dass ein Polymorphismus in TLR1 (248N) mit Schutz vor Tuberkulose (TB) in Südindien assoziiert ist (OR 0,69; 95%CI 0.53-0.9; P=0.007). Die Ergebnisse stimmen mit Studien überein, die TLR1-248S mit TB-Suszeptibilität bei Afro-Amerikanern in Verbindung bringen (Marques et al., 2013). Obwohl einige Studien eine Assoziation von TLR1-I602S mit TB in verschiedenen Afrikanischen, Asiatischen, Europäischen und Lateinamerikanischen Bevölkerungen zeigen (Ma et al., 2007; Randhawa et al., 2011; Zhang et al., 2013), wurde im Rahmen dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen diesem SNP und TB in Südindien hergestellt, was vermutlich an der geringen Häufigkeit der TLR1-602S Variante (5%) in dieser indischen Population liegt. Diese Studie bestätigt außerdem die Ergebnisse einer Lepra-Studie aus Bangladesch, in der der TLR1-602S SNP ebenfalls fast nicht gefunden wurde (Schuring et al., 2009). In letztgenannter Studie wurde ein Zusammenhang zwischen TLR1-248S und Lepra-Suszeptibilität gezeigt, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt, da *M. leprae* ein naher Verwandter von *M. tuberculosis* ist. Die Ergebnisse aus Bangladesch wurden durch eine brasilianische Studie bestätigt, bei der TLR1-248S ebenfalls mit Lepra-Risiko assoziiert wurde (Schuring et al., 2009). Weltweite Haplotypanalysen von Heffelfinger et al. haben TLR1-N248S im LD mit keinem anderen Polymorphismus (abgesehen von TLR1-I602S im Mittleren Osten) gezeigt (Heffelfinger et al., 2013). Die Relevanz von TLR1-N248S auch für andere Krankheiten zeigen aktuelle Studien. Seok et al. bringen diesen Polymorphismus mit der Autoimmunerkrankung Alopecia areata in Verbindung (Seok et al., 2014).

## 4.5 Funktionelle Analysen

Die funktionellen Konsequenzen einer Aminosäuremodifikation bei TLR1-N248S nach Exposition mit mykobakteriellen Bestandteilen sind bisher nicht geklärt. 248S wird mit Risiko für Malaria (Hart and Tapping, 2012), IgA-Nephritis bei koreanischen Kindern (Lee et al., 2011) und Mortalität bei Grampositiver Sepsis (Thompson et al., 2013) assoziiert; andererseits wird es auch

verringertem Prostatakrebsrisiko in Verbindung gebracht (Stevens et al., 2008). Um die Rolle dieses SNP bei der TB-Pathogenese besser zu verstehen wurden zwei Zellkultursysteme genutzt und damit spezifisch die Immunantwort auf *M.tb* Lysat zu beobachten. In einem ersten Satz Experimente zeigten PBMCs von TLR1-248N genotypisierten Spendern, die mit *M.tb*-Lysat stimuliert wurden, eine höhere TNF-Antwort als die Zellen von TLR1-248S Spendern. In einem zweiten Satz Experimente wurde gezeigt, dass TLR1-248N exprimierende HEK293-Zellen mit einer erhöhten NF- $\kappa$ B Antwort auf *M.tb* Stimulation reagieren. Die Genvariante TLR1-248N wurde hier mit Schutz vor TB assoziiert. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei Zellen gemacht werden, die mit der in anderen Populationen mit TB-Schutz assoziierten TLR1-602I Variante transfiziert wurden. Johnson et. al haben gezeigt, dass TLR1-602S exprimierende Zellen unfähig waren, TLR1 auf der Zellmembran zu exprimieren (Johnson et al., 2007). Der Stärkste Effekt trat auf, wenn 248N und 602I zusammen transfiziert wurden.

Obwohl der wahrscheinlichste und einzig einstimmig bewiesene Ligand für den TLR2/1 Komplex die triazylierten Lipopeptide sind, waren die Ergebnisse mit gereinigten Lipopeptiden weniger klar, verglichen mit den Ergebnissen, die durch mykobakterielles Lysat entstanden. Dies könnte auf weitere, zur Zeit unbekannte TLR2/1 Liganden in dem Lysat hindeuten, welche das Potential haben, Wirtszellen über TLR2/1 zu stimulieren. Andere Arbeitsgruppen, interessanterweise beide aus Indien, haben kürzlich Ergebnisse vorgestellt, die mykobakterielle Proteine als Stimulatoren des TLR2/1 Komplexes vorschlagen; dies sind die Antigene Rv1196, Zelloberflächenproteine der PPE Familie (Nair et al., 2009) und die Proteine RV0978 und RV0754 (Mitglieder der Zelloberflächen PE-PGRS Familie) (Mukhopadhyay and Balaji, 2011). Normalerweise wurden diese Proteine jedoch rekombinant in bakteriellen Systemen exprimiert, was die Gefahr einer Lipopeptid-Kontamination birgt (Zähringer et al., 2008).

## **TNF und TB**

TNF ist ein wichtiges Zytokin bei der Immunantwort auf TB, wie in Maus-Modellen (OGarra et al., 2013) und klinischen Studien (Dorhoi and Kaufmann, 2014) gezeigt wurde. Von Makrophagen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und NK Zellen (Cha-

kravarty et al., 2008) ausgeschüttet, spielt TNF eine entscheidende Rolle bei der Formierung und Instandhaltung von Granulomen, welche die Mykobakterien umgeben und die Infektion kontrollieren. TNF, welches von T-Zellen stammt und andere Zytokine bewirken die Akkumulation von mononuklearen Zellen wie Makrophagen, die dann zusammen mit Langerhanszellen und Lymphozyten das Granulom bilden (Dorhoi and Kaufmann, 2014). Die wichtige Rolle von TNF bei TB-Erkrankung wurde durch die Assoziation von anti-TNF-Behandlungen bei Menschen mit versehentlicher Aktivierung von ruhender TB gezeigt (Harris and Keane, 2010; Reichmann et al., 2014).

### ***M.tb*-Stämme**

Für die funktionellen Analysen wurde die Stimulation auf einen *M.tb*-Stamm (H37Rv) limitiert. Camona et al. haben jedoch kürzlich gezeigt, dass verschiedene Stämme (H37Rv, HN878 und 03-265) unterschiedliche TLRs aktivieren können (Carmona et al., 2013), woraus sich schließen lässt, dass SNPs unterschiedliche Einflüsse auf die individuelle Suszeptibilität haben, je nach dem mit welchem *M.tb*-Stamm sich das Immunsystem auseinandersetzen muss. Auch Sequeira et al. gehen auf den variierenden Effekt verschiedener *M.tb*-Stämme ein. Sie verglichen den Einfluss vom Wildtyp (H37Rv) mit einer Variante, die freie Mykolsäuren an seiner Zellwand akkumuliert ( $\Delta mce1$ ) (Sequeira et al., 2014), deren Einfluss auf Chemokinexpression bei humanen Epithelzellen und auf TLR2. In dieser Studie wird postuliert, dass die unterschiedliche Menge der Mykolsäuren in der *M.tb*-Zellwand einen Einfluss auf die von TLR2 gesteuerte, proinflammatorische Antwort in Epithelzellen und Makrophagen hat. Rahman et al. haben gezeigt, dass virulente Stränge von H37Rv durch Einwirken auf den TLR2-MyD88-Signalweg aus dem Phagolysosom ausbrechen können. Außerdem wurde gezeigt, dass H37Rv, *BCG* und die mutierten H37Rv-Stränge bei TLR2- und MyD88-knockout-Mäusen in das Zytosol der Makrophagen translozieren können (Rahman et al., 2014).

### **Weitere Rezeptoren für *M.tb***

NOD2 ist ein intrazellulärer Rezeptor, der die proinflammatorische Zytokinproduktion durch *M.tb* beeinflusst. NOD2 ist ein Rezeptor für bakterielle Peptidoglykane (Girardin et al., 2003), dessen Rolle beim Erkennen von Myko-

bakterien nachgewiesen wurde (Ferwerda et al., 2005, 2007b). C-Typ-Lektine sind eine Familie von PRRs, die in der Erkennung von polysacchariden Strukturen von Pathogenen eine Rolle spielen. Der Mannoserezeptor (MR) ist auf alveolaren Makrophagen stark exprimiert und führt bei mykobakterieller Stimulation zu Produktion der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13, zur Hemmung der IL-12 Produktion und zu einem Ausbleiben der Aktivierung oxidativer Reaktionen (Kleinnijenhuis et al., 2011). Da genetische Variationen dieser Rezeptoren hier nicht untersucht werden konnten, sollten künftige Studien überprüfen, ob auch sie hier keine Rolle spielen. Auch eine Wechselwirkung von TLRs mit den genannten anderen Rezeptoren ist denkbar.

## 4.6 Modellierung *in silico*

Zusätzlich wurde *in silico* Modellierung genutzt, um herauszufinden, wie Aminosäureänderungen bei Position TLR1-248 die Proteinstruktur beeinflussen können. Aus diesen Ergebnissen wird klar, dass 248N und 248S deutlich die TLR1 Struktur verändern. Bioinformatische Analysen zeigen eine potentielle funktionelle Tasche bei 248N, welche bei der 248S Variante verloren geht. Eine solche zusätzliche Bindungstasche könnte eine stärkere Liganden-Rezeptor-Bindung erlauben; in der Tat zeigen 248N exprimierende Zellen eine stärkere Aktivierung als 248S exprimierende Zellen in den funktionellen Untersuchungen. Eine ähnliche Tendenz gibt es für die vorhergesagte Kluft an Position 248. Interessanterweise ist die Kluft, die durch den 248N SNP erzeugt wird, deutlich größer als die 248S Kluft. Da Klüfte biologisch von Bedeutung sind und größere Klüfte mehr Bindungsregionen und aktive Orte beinhalten können (Laskowski et al., 1996), könnte eine größere Kluft bei 248N auch stärkere Rezeptor-Liganden-Bindung und somit eine stärkere Aktivierung der Immunzellen bedeuten. Modelle, die die Bindung des triazylierten Lipopeptids Pam<sub>3</sub>3Cys darstellen, haben auch gezeigt, dass die etablierte Kluft und Bindungstasche von TLR1-248N zu einem anderen Ort in der TLR1-248S Variante wandert. Diese verschobene Kluft indiziert strukturelle Veränderungen, welche entweder die TLR2/1 Heterodimerbildung oder die Signaltransduktion z. B. durch eine sterische Veränderung des Heterodimerkomplexes beeinflussen könnten.

## 4.7 Zusammenfassung

Zusammenfassend wurde eine indische TB Kohorte und eine Kohorte mit gesunden indischen Freiwilligen generiert, deren DNS in Teilen von TLR1, -2, -4, -7 und -8 sequenziert und deren funktionelle Signifikanz untersucht wurde. Der Polymorphismus TLR1-N248S unterschied sich deutlich zwischen Patienten und Kontrollen. Dieser offensichtlich schützende Effekt der 248N Variante wurde anschließend in funktionellen Experimenten an HEK Zellen geprüft und bestätigt, indem gezeigt werden konnte, dass die Ligand-induzierte Zytokinexpression durch die beschriebene Genmutation deutlich beeinflusst wird. Außerdem haben Versuche an PBMCs von gesunden deutschen Kontrollen diese Ergebnisse bestätigt. Schließlich wurde *in silico* Modellierung genutzt um die strukturellen Unterschiede zwischen der 248N und der 248S Variante zu visualisieren. Diese Modelle geben außerdem Indikationen, dass die mutierte 248S Variante beeinträchtigte Möglichkeiten zur Ligandenbindung besitzt. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse eine wichtige Rolle für den TLR1-N248S Polymorphismus bei der TB Infektion an und könnten helfen die Immunantwort auf diese Krankheit besser zu verstehen.

Die Aktualität dieser Studie zeigt sich auch durch die Vielzahl aktueller Arbeiten an Populationen auf jedem Kontinent im Bereich SNPs, TLRs und TB. So haben Torres-Garcia et al. erst kürzlich einen SNP (rs352139) in TLR9 beschrieben, welcher einen Einfluss auf die Suszeptibilität für TB in Oaxaca, Mexiko hat (Torres-García et al., 2013). In einer Nordindischen Kohorte aus Agra haben Sinha et al. ebenfalls die Variation TLR1-N248S untersucht. Sie fanden eine signifikante Differenz zwischen heterogenen Genotypen (AG) bei TB-Patienten und gesunden Kontrollen, was in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden kann. Im Einklang steht jedoch, dass in beiden Studien bei TLR1-S602I kein signifikanter Unterschied gefunden werden konnte (Sinha et al., 2014). In Spanien wurde jedoch TLR1-S602I mit variierender Suszeptibilität für PTB in Verbindung gebracht (Ocejo-Vinyals et al., 2013).

## 4.8 Ausblick

Die in dieser Studie beschriebenen Variationen innerhalb der TLR-Familie bewirken weder eine Immunität noch ein drastisch erhöhtes Risiko an TB zu erkranken. Sie sind jedoch ein weiterer Hinweis auf die komplexen genetischen und funktionellen Zusammenhänge, die bei Infektion mit *M.tb* eine Rolle spielen. Je besser diese Zusammenhänge verstanden werden, desto individueller und zielgerichteter können Therapien und Präventionsmaßnahmen geplant und realisiert werden. Medikamente, und im Fall von TB monatelange Antibiotikatherapien, die starke und oft unangenehme Nebenwirkungen mit sich bringen könnten somit in Zukunft durch personalisierte, zielgerichtete Präparate ersetzt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten einen weiteren Grundbaustein für diese Entwicklung.

Große, Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) bieten mittlerweile einen großartigen Überblick über Genvariationen in vielen Populationen. Diese Studien sind jedoch noch immer sehr kostspielig und oft zu breit gefächert, um den Einfluss einzelner Mutationen darstellen zu können. Es werden Fallzahlen von oft über 1.000 Individuen mit vergleichbaren Charakteristika, wie Gesundheitsstatus und Herkunft benötigt, damit SNPs, welche oft nur in unter 5% der Individuen vorkommen, nicht im Rauschen der Ergebnisse untergehen. Aktuelle GWAS der TLRs beziehen sich auf Krankheiten wie Brustkrebs (Resler et al., 2013) und *Helicobacter pylori* Infektion (El-Omar, 2013), jedoch zur Zeit noch nicht auf TB. Die sehr aufwändigen und zeitintensiven funktionellen Untersuchungen bleiben bei diesen Studien zumeist aussen vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Relevanz einer Genvariation im TLR2/1-Komplex statistisch und funktionell dargestellt. Zusätzlich wurden weitere, statistisch relevante SNPs in TLR4 und TLR8 vorgestellt. Auf Grund dieser Erkenntnisse wurden zwei weitere Studien im Betreuerlabor gestartet um die Funktionalität dieser SNP zu untersuchen und darzustellen.



# Abstract

*Background:* Tuberculosis, a disease caused by *Mycobacterium Tuberculosis* infection, is still a global public health problem. TB susceptibility varies substantially in infected individuals, and mycobacterial recognition by the innate immune system may likely affect disease course and outcome. This research describes SNPs in the TB genes that functionally alter the innate immune response to *MTB* and are associated with TB susceptibility in India.

*Methods:* A SNP database with information regarding the polymorphisms and their potential influence on protein structure was created. In Hyderabad, India, cohorts of TB patients and healthy controls were generated. 206 patients and 239 controls from Hyderabad, India were analyzed for SNPs in the TLRs 1, 2, 4, 7 and 8. The frequency of the genetic variations subsequently was correlated with TB susceptibility. To test individual responses to MTB lysates, we stimulated human embryonic kidney (HEK) cells transfected with TLR1 variants, as well as PBMCs from genotyped, healthy German individuals. NF- $\kappa$ B activation and TNF production were assessed respectively after stimulation of the cells. For statistical analysis of the cohorts, a computer software was programmed and potential consequences of the TLR1 SNP on protein structure were modeled in silico.

*Results:* Cohort analysis revealed an association of a TLR1 SNP (248N, rs4833095) and of a TLR8 SNP (1M, rs3764880) with TB protection and an association of a TLR4 SNP (299D, rs4986790) with TB risk in females. Functional studies using HEK cell lines transfected with TLR1-248N and stimulated with MTB showed an increased NF- $\kappa$ B activation of this genetic variant. In addition to this, TLR1-248N expressing PBMCs from healthy controls exhibited an increased TNF response to MTB lysates. The in silico modeling gave evidence of changes in protein structure of TLR1 when the mutation was present potentially explaining the functional consequences.

*Conclusion:* The TLR1-248N SNP is associated with TB protection in an Indian population, leads to an increased immune response to MTB lysate, and potentially to a structural change of this receptor.

Toll-like receptor, Tuberculosis, Mycobacterium, Single nucleotide polymorphism, India

# Zusammenfassung

*Hintergrund:* Die Tuberkulose, eine durch *Mycobacterium tuberculosis* hervorgerufene Infektion, ist auch heute noch ein globales Gesundheitsproblem. Die Tuberkulose Suszeptibilität variiert stark unter infizierten Individuen und das Erkennen der Mykobakterien durch das angeborene Immunsystem beeinflusst wahrscheinlich den Krankheitsverlauf und -ausgang. Diese Arbeit beschreibt SNPs in den Toll-like Rezeptoren, welche die angeborene Immunantwort auf *Mycobacterium tuberculosis* verändern und die mit Tuberkulose in Südindien assoziiert sind.

*Methoden:* Eine SNP Datenbank mit Informationen zu den jeweiligen Toll-like Rezeptor Polymorphismen und deren potentielltem Einfluss auf die Proteinstruktur wurde angelegt. In Hyderabad, Indien wurden eine Kohorte mit Tuberkulosepatienten und eine mit gesunden Kontrollen generiert. 206 Tuberkulose Patienten und 236 gesunde Kontrollen wurden auf SNPs in den Toll-like Rezeptoren 1, 2, 4, 7 und 8 hin untersucht. Das Vorhandensein dieser genetischen Variationen wurde anschließend mit Tuberkulose Suszeptibilität korreliert. Um individuelle Reaktionen auf *Mycobacterium tuberculosis* Lysate zu untersuchen wurden HEK293 Zellen mit Varianten eines Toll-like Rezeptor 1 SNPs transfiziert und PBMCs von genotypisierten, gesunden deutschen Individuen mit den entsprechenden Liganden in vitro stimuliert. Nach Stimulation wurden die NF- $\kappa$ B-Aktivierung bzw. TNF - Produktion gemessen. Zur statistischen Auswertung der Kohorten wurde ein Computerprogramm entwickelt und potentielle Auswirkungen des Toll-like Rezeptor 1 SNPs wurden in silico modelliert.

*Ergebnisse:* Die Kohorten-Analyse ergab die Assoziation eines Toll-like Rezeptor 1 SNPs (248N, rs4833095) und eines Toll-like Rezeptor 8 SNPs (1M, rs3764880) mit Schutz vor TB und die Assoziation eines TLR4 SNPs (299D, rs4986790) mit erhöhtem Tuberkulose-Risiko bei Frauen. Funktionelle Untersuchungen an HEK Zellen, die mit Toll-like Rezeptor 1-248N transfiziert und mit *Mycobacterium tuberculosis* stimuliert wurden, zeigten eine erhöhte NF- $\kappa$ B Aktivierung bei dieser Toll-like Rezeptor 1 Genvariante. Zusätzlich wiesen Toll-like Rezeptor 1-248N exprimierende PBMCs von gesunden Kontrollen eine erhöhte TNFs Antwort auf *Mycobacterium tuberculosis* Lysate auf. Die in silico Modellierung zeigte eine deutliche Veränderung der Proteinstruktur von Toll-

like Rezeptor1 durch die Mutation der Aminosäure 248, die die funktionellen Veränderungen erklären könnte.

*Fazit:* Der SNP Toll-like Rezeptor 1-248N ist mit Schutz vor Tuberkulose in einer indischen Bevölkerung assoziiert, führt zu einer erhöhten Immunantwort auf *Mycobacterium tuberculosis* Lysate und vermutlich zu einer strukturellen Veränderung dieses Rezeptors.

Toll-like Rezeptor, Tuberkulose, Mycobacterium, Einzelnukleotid - Polymorphismus, Indien

# Literaturverzeichnis

- Abel, L., El-Baghdadi, J., Bousfiha, A. A., Casanova, J.-L., and Schurr, E. (2014). Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1645):20130428.
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., and Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*, 7(4):248–249.
- Akira, S. (2003). Toll-like receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*, 278(40):38105–8.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*, 2(8):675–80.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4):783–801.
- Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P., and Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5428):736–9.
- Ameziane, N., Beillat, T., Verpillat, P., Chollet-Martin, S., Aumont, M.-C. C., Seknadji, P., Lamotte, M., Lebret, D., Ollivier, V., and de Prost, D. (2003). Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(12):e61–4.
- Bafica, A., Scanga, C. A., Feng, C. G., Leifer, C., Cheever, A., and Sher, A. (2005). TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in

- mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of experimental medicine*, 202(12):1715–1724.
- Balcewicz-Sablinska, M. K., Keane, J., Kornfeld, H., and Remold, H. G. (1998). Pathogenic mycobacterium tuberculosis evades apoptosis of host macrophages by release of *tnf-r2*, resulting in inactivation of *tnf- $\alpha$* . *The journal of Immunology*, 161(5):2636–2641.
- Barreiro, L. B., Ben-Ali, M., Quach, H., Laval, G., Patin, E., Pickrell, J. K., Bouchier, C., Tichit, M., Neyrolles, O., Gicquel, B., Kidd, J. R., Kidd, K. K., Alcais, A., Ragimbeau, J., Pellegrini, S., Abel, L., Casanova, J. L., and Quintana-Murci, L. (2009). Evolutionary dynamics of human Toll-like receptors and their different contributions to host defense. *PLoS Genet*, 5(7):e1000562.
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., and Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(2):263–5.
- Basu, S., Pathak, S. K., Banerjee, A., Pathak, S., Bhattacharyya, A., Yang, Z., Talarico, S., Kundu, M., and Basu, J. (2007). Execution of macrophage apoptosis by *pe\_pgrs33* of mycobacterium tuberculosis is mediated by toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 282(2):1039–1050.
- Bean, A. G., Roach, D. R., Briscoe, H., France, M. P., Korner, H., Sedgwick, J. D., and Britton, W. J. (1999). Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *Journal of immunology*, 162(6):3504–3511.
- Beery, T. A. (2003). Sex differences in infection and sepsis. *Critical care nursing clinics of North America*, 15(1):55–62.
- Bellamy, R. (2003). Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. *Genes and immunity*, 4(1):4–11.

- Belvin, M. P. and Anderson, K. V. (1996). A conserved signaling pathway: the drosophila toll-dorsal pathway. *Annual review of cell and developmental biology*, 12(1):393–416.
- Ben-Ali, M., Barbouche, M. R., Bousnina, S., Chabbou, A., and Dellagi, K. (2004). Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 11(3):625–626.
- Bermudez, L. E., Sangari, F. J., Kolonoski, P., Petrofsky, M., and Goodman, J. (2002). The efficiency of the translocation of mycobacterium tuberculosis across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infection and immunity*, 70(1):140–146.
- Beutler, B. (2009). Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunological reviews*, 227(1):248–263.
- Blasius, A. L. and Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32(3):305–315.
- Bochud, P.-Y., Hawn, T. R., and Aderem, A. (2003). Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(7):3451–4.
- Brennan, P. J. and Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry*, 64(1):29–63.
- Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R.-B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., et al. (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, 285(5428):732–736.
- Briken, V., Porcelli, S. A., Besra, G. S., and Kremer, L. (2004). Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular microbiology*, 53(2):391–403.

- Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O., and Arditi, M. (2001). Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 s. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(2):987–94.
- Bulut, Y., Michelsen, K. S., Hayrapetian, L., Naiki, Y., Spallek, R., Singh, M., and Arditi, M. (2005). Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *The Journal of biological chemistry*, 280(22):20961–7.
- Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R., and Tschopp, J. (2003). Inhibition of Interleukin 1 Receptor/Toll-like Receptor Signaling through the Alternatively Spliced, Short Form of MyD88 Is Due to Its Failure to Recruit IRAK-4. *Journal of Experimental Medicine*, 197(2):263–268.
- Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmüller, K.-H., Jung, G., Brock, R., and Ulmer, A. J. (2005). Lipopeptide structure determines TLR2 dependent cell activation level. *The FEBS journal*, 272(24):6354–64.
- Carmona, J., Cruz, A., Moreira-Teixeira, L., Sousa, C., Sousa, J., Osorio, N. S., Saraiva, A. L., Svenson, S., Kallenius, G., Pedrosa, J., et al. (2013). Mycobacterium tuberculosis strains are differentially recognized by tlrs with an impact on the immune response. *PloS one*, 8(6):e67277.
- Casanova, J.-L. and Abel, L. (2002). Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annual review of immunology*, 20(1):581–620.
- Casanova, J. L., Abel, L., and Quintana-Murci, L. (2011a). Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annual review of immunology*, 29:447–491.
- Casanova, J.-L., Abel, L., and Quintana-Murci, L. (2011b). Human tlrs and il-1rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annual review of immunology*, 29:447–491.
- 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., and Farrar, J. (2008). The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*, 4(3):e1000034.
- Chackerian, A. A., Alt, J. M., Perera, T. V., Dascher, C. C., and Behar, S. M. (2002). Dissemination of mycobacterium tuberculosis is influenced by host factors and precedes the initiation of t-cell immunity. *Infection and immunity*, 70(8):4501–4509.
- Chakravarty, S. D., Zhu, G., Tsai, M. C., Mohan, V. P., Marino, S., Kirschner, D. E., Huang, L., Flynn, J., and Chan, J. (2008). Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs. *Infection and immunity*, 76(3):916–926.
- Colditz, G. A., Brewer, T. F., Berkey, C. S., Wilson, M. E., Burdick, E., Fineberg, H. V., and Mosteller, F. (1994). Efficacy of bcg vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. *Jama*, 271(9):698–702.
- Coll, R. C. and O'Neill, L. a. J. (2010). New insights into the regulation of signalling by toll-like receptors and nod-like receptors. *Journal of innate immunity*, 2(5):406–21.
- Comstock, G. W. (1978). Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *The American review of respiratory disease*, 117(4):621–624.
- Corr, S. C. and O'Neill, L. A. (2009). Genetic variation in Toll-like receptor signalling and the risk of inflammatory and immune diseases. *Journal of innate immunity*, 1(4):350–357.
- Covert, M. W., Leung, T. H., Gaston, J. E., and Baltimore, D. (2005). Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5742):1854–7.



- Dalgic, N., Tekin, D., Kayaalti, Z., Cakir, E., Soylemezoglu, T., and Sancar, M. (2011a). Relationship between toll-like receptor 8 gene polymorphisms and pediatric pulmonary tuberculosis. *Disease markers*, 31(1):33–38.
- Dalgic, N., Tekin, D., Kayaalti, Z., Cakir, E., Soylemezoglu, T., and Sancar, M. (2011b). Relationship between toll-like receptor 8 gene polymorphisms and pediatric pulmonary tuberculosis. *Disease markers*, 31(1):33–38.
- Davila, S., Hibberd, M. L., Hari Dass, R., Wong, H. E. E., Sahiratmadja, E., Bonnard, C., Alisjahbana, B., Szeszko, J. S., Balabanova, Y., Drobniowski, F., van Crevel, R., van de Vosse, E., Nejentsev, S., Ottenhoff, T. H. M., and Seielstad, M. (2008). Genetic association and expression studies indicate a role of toll-like receptor 8 in pulmonary tuberculosis. *PLoS genetics*, 4(10):e1000218.
- Dorhoi, A. and Kaufmann, S. H. (2014). Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection. In *Seminars in immunology*. Elsevier.
- Doyle, S., Vaidya, S., OConnell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P., Wu, T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M., Modlin, R., and Cheng, G. (2002). IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity*, 17(3):251–63.
- Drennan, M. B., Nicolle, D., Quesniaux, V. J. F., Jacobs, M., Allie, N., Mpagi, J., Frémond, C., Wagner, H., Kirschning, C., and Ryffel, B. (2004). Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to Mycobacterium tuberculosis infection. *The American journal of pathology*, 164(1):49–57.
- Du, X., Poltorak, A., Wei, Y., and Beutler, B. (2000). Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *European cytokine network*, 11(3):362–71.
- Dubos, J. (1987). *The white plague: tuberculosis, man, and society*. Rutgers University Press.
- Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y., and Liang, J. (2006). Castp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic acids research*, 34(suppl 2):W116–W118.

- Dye, C. and Williams, B. G. (2010). The population dynamics and control of tuberculosis. *Science*, 328(5980):856–861.
- El-Omar, E. M. (2013). Helicobacter pylori susceptibility in the gwas era. *JAMA*, 309(18):1939–1940.
- Esin, S., Counoupas, C., Aulicino, a., Brancatisano, F. L., Maisetta, G., Bottai, D., Di Luca, M., Florio, W., Campa, M., and Batoni, G. (2013). Interaction of Mycobacterium tuberculosis Cell Wall Components with the Human Natural Killer Cell Receptors NKp44 and Toll-Like Receptor 2. *Scandinavian journal of immunology*, 77(6):460–9.
- Ewing, B. and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research*, 8(3):186–94.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., and Green, P. (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, 8(3):175–185.
- Ferwerda, B., Alonso, S., Banahan, K., McCall, M. B., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Ramakers, B. P., Mouktaroudi, M., Fain, P. R., Izagirre, N., Syafruddin, D., Cristea, T., Mockenhaupt, F. P., Troye-Blomberg, M., Kumpf, O., Maiga, B., Dolo, A., Doumbo, O., Sundaresan, S., Bedu-Addo, G., van Crevel, R., Hamann, L., Oh, D. Y., Schumann, R. R., Joosten, L. A., de la Rua, C., Sauerwein, R., Drenth, J. P., Kullberg, B. J., van der Ven, A. J., Hill, A. V., Pickkers, P., van der Meer, J. W., O'Neill, L. A., and Netea, M. G. (2009). Functional and genetic evidence that the Mal/TIRAP allele variant 180L has been selected by providing protection against septic shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(25):10272–10277.
- Ferwerda, B., McCall, M. B., Alonso, S., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Mouktaroudi, M., Izagirre, N., Syafruddin, D., Kibiki, G., Cristea, T., Hijmans, A., Hamann, L., Israel, S., ElGhazali, G., Troye-Blomberg, M., Kumpf, O., Maiga, B., Dolo, A., Doumbo, O., Hermsen, C. C., Stalenhoef, A. F., van Crevel, R., Brunner, H. G., Oh, D. Y., Schumann, R. R., de la Rua, C., Sauerwein, R., Kullberg, B. J., van der Ven, A. J., van der Meer, J. W., and Netea,

- M. G. (2007a). TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(42):16645–16650.
- Ferwerda, G., Girardin, S. E., Kullberg, B.-J., Le Bourhis, L., de Jong, D. J., Langenberg, D. M. L., van Crevel, R., Adema, G. J., Ottenhoff, T. H. M., Van der Meer, J. W. M., and Netea, M. G. (2005). NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*, 1(3):279–85.
- Ferwerda, G., Kullberg, B. J., de Jong, D. J., Girardin, S. E., Langenberg, D. M. L., van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. M., Van der Meer, J. W. M., and Netea, M. G. (2007b). *Mycobacterium paratuberculosis* is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *Journal of leukocyte biology*, 82(4):1011–8.
- Filliol, I., Driscoll, J. R., Van Soolingen, D., Kreiswirth, B. N., Kremer, K., Valetudie, G., Anh, D. D., Barlow, R., Banerjee, D., Bifani, P. J., Brudey, K., Cataldi, A., Cooksey, R. C., Cousins, D. V., Dale, J. W., Dellagostin, O. A., Drobniewski, F., Engelmann, G., Ferdinand, S., Gascoyne-Binzi, D., Gordon, M., Gutierrez, M. C., Haas, W. H., Heersma, H., Kallenius, G., Kassa-Kelembho, E., Koivula, T., Ly, H. M., Makristathis, A., Mammina, C., Martin, G., Mstrom, P., Mokrousov, I., Narbonne, V., Narvskaya, O., Nastasi, A., Niobe-Eyangoh, S. N., Pape, J. W., Rasolofo-Razanamparany, V., Ridell, M., Rossetti, M. L., Stauffer, F., Suffys, P. N., Takiff, H., Texier-Maugein, J., Vincent, V., De Waard, J. H., Sola, C., and Rastogi, N. (2002). Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerging infectious diseases*, 8(11):1347–1349.
- Fitzgerald, K. a., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M., and Golenbock, D. T. (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *The Journal of experimental medicine*, 198(7):1043–55.
- Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Chan, J., Triebold, K. J., Pfeffer, K., Lowenstein, C. J., Schrelber, R., Mak, T. W., and Bloom, B. R. (1995). Tumor necrosis factor- $\alpha$  is required in the protective immune response against *mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*, 2(6):561–572.

- Fremont, C. M., Togbe, D., Doz, E., Rose, S., Vasseur, V., Maillet, I., Jacobs, M., Ryffel, B., and Quesniaux, V. F. J. (2007). IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(2):1178–89.
- Fricke, I., Mitchell, D., Mittelstädt, J., Lehan, N., Heine, H., Goldmann, T., Böhle, A., and Brandau, S. (2006). Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(9):5173–82.
- Fulton, S. A., Reba, S. M., Pai, R. K., Pennini, M., Torres, M., Harding, C. V., and Boom, W. H. (2004). Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by *Mycobacterium bovis* BCG and the 19-kilodalton mycobacterial lipoprotein. *Infection and immunity*, 72(4):2101–10.
- Gantier, M. P., Irving, A. T., Kaparakis-Liaskos, M., Xu, D., Evans, V. A., Cameron, P. U., Bourne, J. A., Ferrero, R. L., John, M., Behlke, M. A., and Williams, B. R. (2010). Genetic modulation of TLR8 response following bacterial phagocytosis. *Human mutation*, 31(9):1069–1079.
- Garcia, I., Miyazaki, Y., Marchal, G., Lesslauer, W., and Vassalli, P. (1997). High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to mycobacterial infections: synergistic action of TNF and IFN-gamma in the differentiation of protective granulomas. *European journal of immunology*, 27(12):3182–3190.
- Gardam, M. A., Keystone, E. C., Menzies, R., Manners, S., Skamene, E., Long, R., and Vinh, D. C. (2003). Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect Dis*, 3(3):148–155.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J., and Sansonetti, P. J. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal of biological chemistry*, 278(11):8869–72.

- Gordon, D. (2003). Viewing and editing assembled sequences using Consed. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*, Chapter 11:Unit11.2.
- Gordon, D., Abajian, C., and Green, P. (1998). Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Research*, 8(3):195–202.
- Gordon, D. and Green, P. (2013). Consed: a graphical editor for next-generation sequencing. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(22):2936–7.
- Guan, Y., Ranoa, D. R. E., Jiang, S., Mutha, S. K., Li, X., Baudry, J., and Tapping, R. I. (2010). Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(9):5094–103.
- Gutacker, M. M., Mathema, B., Soini, H., Shashkina, E., Kreiswirth, B. N., Graviss, E. A., and Musser, J. M. (2006). Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *The Journal of infectious diseases*, 193(1):121–128.
- Hailman, E., Lichenstein, H. S., Wurfel, M. M., Miller, D. S., Johnson, D. A., Kelley, M., Busse, L. A., Zukowski, M. M., and Wright, S. D. (1994). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *The Journal of experimental medicine*, 179(1):269–277.
- Hamann, L., Bedu-Addo, G., Eggelte, T. A., Schumann, R. R., and Mockenhaupt, F. P. (2010). The toll-like receptor 1 variant S248N influences placental malaria. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 10(6):785–789.
- Harris, J. and Keane, J. (2010). How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clinical & Experimental Immunology*, 161(1):1–9.
- Hart, B. E. and Tapping, R. I. (2012). Genetic Diversity of Toll-Like Receptors and Immunity to *M. leprae* Infection. *Journal of tropical medicine*, 2012:415057.

- Hawn, T. R., Misch, E. A., Dunstan, S. J., Thwaites, G. E., Lan, N. T., Quy, H. T., Chau, T. T., Rodrigues, S., Nachman, A., Janer, M., Hien, T. T., Farrar, J. J., and Aderem, A. (2007). A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *European journal of immunology*, 37(8):2280–2289.
- Hawn, T. R., Verbon, A., Janer, M., Zhao, L. P., Beutler, B., and Aderem, A. (2005). Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7):2487–2489.
- Heffelfinger, C., Pakstis, A. J., Speed, W. C., Clark, A. P., Haigh, E., Fang, R., Furtado, M. R., Kidd, K. K., and Snyder, M. P. (2013). Haplotype structure and positive selection at TLR1. *European journal of human genetics : EJHG*, (February):1–7.
- Hershkovitz, I., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., Besra, G. S., Lee, O. Y., Gernaey, A. M., Galili, E., Eshed, V., Greenblatt, C. L., Lemma, E., et al. (2008). Detection and molecular characterization of 9000-year-old mycobacterium tuberculosis from a neolithic settlement in the eastern mediterranean. *PloS one*, 3(10):e3426.
- Hingley-Wilson, S. M., Sambandamurthy, V. K., and Jacobs, W. R. (2003). Survival perspectives from the world's most successful pathogen, mycobacterium tuberculosis. *Nature immunology*, 4(10):949–955.
- Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2002). Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *International immunology*, 14(10):1225–31.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*, 5(10):987–995.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 327(5963):291–295.
- Janeway Jr., C. A. and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20:197–216.

- Jo, E. K. (2008). Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Current opinion in infectious diseases*, 21(3):279–286.
- Jo, E.-K., Yang, C.-S., Choi, C. H., and Harding, C. V. (2007). Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cellular microbiology*, 9(5):1087–98.
- Johnson, C. M., Lyle, E. A., Omuetti, K. O., Stepensky, V. A., Yegin, O., Alpsy, E., Hamann, L., Schumann, R. R., and Tapping, R. I. (2007). Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *Journal of immunology*, 178(12):7520–7524.
- Jung, S.-B., Yang, C.-S., Lee, J.-S., Shin, A.-R., Jung, S.-S., Son, J. W., Harding, C. V., Kim, H.-J., Park, J.-K., Paik, T.-H., et al. (2006). The mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. *Infection and immunity*, 74(5):2686–2696.
- Kagan, J. C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nature immunology*, 9(4):361–8.
- Kaneko, H., Yamada, H., Mizuno, S., Udagawa, T., Kazumi, Y., Sekikawa, K., and Sugawara, I. (1999). Role of tumor necrosis factor-alpha in Mycobacterium-induced granuloma formation in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Lab Invest*, 79(4):379–386.
- Kang, J. Y., Nan, X., Jin, M. S., Youn, S.-J., Ryu, Y. H., Mah, S., Han, S. H., Lee, H., Paik, S.-G., and Lee, J.-O. (2009). Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*, 31(6):873–84.
- Kang, T. J. and Chae, G. T. (2001). Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS immunology and medical microbiology*, 31(1):53–8.

- Kang, T. J., Lee, S. B., and Chae, G. T. (2002). A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine*, 20(2):56–62.
- Kaplan, W. and Littlejohn, T. G. (2001). Swiss-pdb viewer (deep view). *Briefings in Bioinformatics*, 2(2):195–197.
- Kawai, T. and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5):373–384.
- Kawai, T. and Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5):637–650.
- Keane, J., Gershon, S., Wise, R. P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwiertman, W. D., Siegel, J. N., and Braun, M. M. (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England journal of medicine*, 345(15):1098–1104.
- Kesh, S., Mensah, N. Y., Peterlongo, P., Jaffe, D., Hsu, K., M, V. D. B., O'Reilly, R., Pamer, E., Satagopan, J., and Papanicolaou, G. A. (2005). TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1062:95–103.
- Kim, Y. S., Hwang, Y. J., Kim, S. Y., Yang, S. M., Lee, K. Y., and Park Ie, B. (2008). Rarity of TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in the Korean population. *Yonsei Med J*, 49(1):58–62.
- Kindler, V., Sappino, A. P., Grau, G. E., Piguet, P. F., and Vassalli, P. (1989). The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*, 56(5):731–740.
- Kirschning, C. J., Wesche, H., Merrill Ayres, T., and Rothe, M. (1998). Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine*, 188(11):2091–7.



- Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A., Netea, M. G., and Van Crevel, R. (2011). Innate immune recognition of mycobacterium tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011.
- Kramnik, I. and Boyartchuk, V. (2002). Immunity to intracellular pathogens as a complex genetic trait. *Current opinion in microbiology*, 5(1):111–117.
- Krutzik, S. R. and Modlin, R. L. (2004). The role of toll-like receptors in combating mycobacteria. In *Seminars in immunology*, volume 16, pages 35–41. Elsevier.
- Krutzik, S. R., Ochoa, M. T., Sieling, P. A., Uematsu, S., Ng, Y. W., Legaspi, A., Liu, P. T., Cole, S. T., Godowski, P. J., Maeda, Y., et al. (2003). Activation and regulation of toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nature medicine*, 9(5):525–532.
- Kumagai, Y. and Akira, S. (2010). Identification and functions of pattern-recognition receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(5):985–992.
- Lamb, J. R., Rees, A. D., Bal, V., Ikeda, H., Wilkinson, D., De Vries, R. R., and Rothbard, J. B. (1988). Prediction and identification of an hla-dr-restricted t cell determinant in the 19-kda protein of mycobacterium tuberculosis. *European journal of immunology*, 18(6):973–976.
- Laskowski, R. A., Luscombe, N. M., Swindells, M. B., and Thornton, J. M. (1996). Protein clefts in molecular recognition and function. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 5(12):2438.
- Laskowski, R. A., Watson, J. D., and Thornton, J. M. (2005). Profunc: a server for predicting protein function from 3d structure. *Nucleic acids research*, 33(suppl 2):W89–W93.
- Lee, J. S., Park, H.-K., Suh, J.-S., Hahn, W.-H., Kang, S. W., Park, H. J., Kim, M. J., Chung, J.-H., and Cho, B.-S. (2011). Toll-like receptor 1 gene polymorphisms in childhood IgA nephropathy: a case-control study in the Korean population. *International Journal of Immunogenetics*, 38:133–138.

- Leemans, J. C., Thepen, T., Weijer, S., Florquin, S., Van Rooijen, N., Van de Winkel, J. G., and Van der Poll, T. (2005). Macrophages play a dual role during pulmonary tuberculosis in mice. *Journal of Infectious Diseases*, 191(1):65–74.
- Leoratti, F. M. S., Farias, L., Alves, F. P., Suarez-Múti, M. C., Coura, J. R., Kalil, J., Camargo, E. P., Moraes, S. L., and Ramasawmy, R. (2008). Variants in the toll-like receptor signaling pathway and clinical outcomes of malaria. *The Journal of infectious diseases*, 198(5):772–80.
- Li, J., Lee, D. S. W., and Madrenas, J. (2013). Evolving bacterial envelopes and plasticity of tlr2-dependent responses: basic research and translational opportunities. *Frontiers in immunology*, 4.
- Lin, P. L., Plessner, H. L., Voitenok, N. N., and Flynn, J. L. (2007). Tumor necrosis factor and tuberculosis. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, volume 12, pages 22–25. Nature Publishing Group.
- Liu, G., Zhang, L., and Zhao, Y. (2010). Modulation of immune responses through direct activation of toll-like receptors to t cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 160(2):168–175.
- Lopez, M., Sly, L. M., Luu, Y., Young, D., Cooper, H., and Reiner, N. E. (2003). The 19-kDa Mycobacterium tuberculosis protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *Journal of immunology*, 170(5):2409–2416.
- Lorenz, E., Mira, J. P., Frees, K. L., and Schwartz, D. A. (2002). Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*, 162(9):1028–1032.
- Ma, X., Liu, Y., Gowen, B. B., Graviss, E. A., Clark, A. G., and Musser, J. M. (2007). Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PloS one*, 2(12):e1318.
- Mahasirimongkol, S., Yanai, H., Mushiroda, T., Promphittayarat, W., Wattanapokayakit, S., Phromjai, J., Yuliwulandari, R., Wichukchinda, N., Yowang, A., Yamada, N., Kantipong, P., Takahashi, A., Kubo, M., Sawanpanyalert, P., Kamatani, N., Nakamura, Y., and Tokunaga, K. (2012). Genome-

- wide association studies of tuberculosis in Asians identify distinct at-risk locus for young tuberculosis. *J Hum Genet*, 57(6):363–367.
- Mangtani, P., Abubakar, I., Ariti, C., Beynon, R., Pimpin, L., Fine, P. E., Rodrigues, L. C., Smith, P. G., Lipman, M., Whiting, P. F., et al. (2014). Protection by bcg vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clinical infectious diseases*, 58(4):470–480.
- Marcenaro, E., Ferranti, B., Falco, M., Moretta, L., and Moretta, A. (2008). Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. *International immunology*, 20(9):1155–67.
- Marques, C. D. S., Brito-de Souza, V. N., Guerreiro, L. T. A., Martins, J. H., Amaral, E. P., Cardoso, C. C., Dias-Batista, I. M. F., Silva, W. L. D., Nery, J. A. C., Medeiros, P., Gigliotti, P., Campanelli, A. P., Virmond, M., Sarno, E. N., Mira, M. T., Lana, F. C. F., Caffarena, E. R., Pacheco, A. G., Pereira, A. C., and Moraes, M. O. (2013). Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *The Journal of infectious diseases*, 208(1):120–9.
- Means, T. K., Jones, B. W., Schromm, a. B., Shurtleff, B. a., Smith, J. a., Keane, J., Golenbock, D. T., Vogel, S. N., and Fenton, M. J. (2001). Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(6):4074–82.
- Means, T. K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D. T., and Fenton, M. J. (1999). Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(7):3920–3927.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1(2):135–145.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A. (1997). A human

- homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640):394–397.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, a., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C. a. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular cell*, 2(2):253–8.
- Mockenhaupt, F. P., Cramer, J. P., Hamann, L., Stegemann, M. S., Eckert, J., Oh, N. R., Otchwemah, R. N., Dietz, E., Ehrhardt, S., Schroder, N. W., Bienzle, U., and Schumann, R. R. (2006). Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(1):177–182.
- Mohan, A. K., Cote, T. R., Block, J. A., Manadan, A. M., Siegel, J. N., and Braun, M. M. (2004). Tuberculosis following the use of etanercept, a tumor necrosis factor inhibitor. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 39(3):295–299.
- Möller, M., de Wit, E., and Hoal, E. G. (2010). Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis. *FEMS immunology and medical microbiology*, 58(1):3–26.
- Morell, V. (1995). Zeroing in on how hormones affect the immune system. *Science*, 269(5225):773–775.
- Mukhopadhyay, S. and Balaji, K. N. (2011). The pe and ppe proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 91(5):441–447.
- Musser, J. M., Amin, A., and Ramaswamy, S. (2000). Negligible genetic diversity of mycobacterium tuberculosis host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. *Genetics*, 155(1):7–16.
- Muzio, M. (1997). IRAK (Pelle) Family Member IRAK-2 and MyD88 as Proximal Mediators of IL-1 Signaling. *Science*, 278(5343):1612–1615.
- Nair, S., Ramaswamy, P. A., Ghosh, S., Joshi, D. C., Pathak, N., Siddiqui, I., Sharma, P., Hasnain, S. E., Mande, S. C., and Mukhopadhyay, S. (2009). The ppe18 of mycobacterium tuberculosis interacts with tlr2 and activates

- il-10 induction in macrophage. *The Journal of Immunology*, 183(10):6269–6281.
- Najmi, N., Kaur, G., Sharma, S. K., and Mehra, N. K. (2010). Human Toll-like receptor 4 polymorphisms TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile influence susceptibility and severity of pulmonary tuberculosis in the Asian Indian population. *Tissue antigens*, 76(2):102–109.
- Nakada, T. A., Hirasawa, H., Oda, S., Shiga, H., Matsuda, K., Nakamura, M., Watanabe, E., Abe, R., Hatano, M., and Tokuhisa, T. (2005). Influence of toll-like receptor 4, CD14, tumor necrosis factor, and interleukine-10 gene polymorphisms on clinical outcome in Japanese critically ill patients. *J Surg Res*, 129(2):322–328.
- Nalbandian, G. and Kovats, S. (2005). Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. *Immunologic research*, 31(2):91–106.
- Netea, M. G., Wijmenga, C., and O'Neill, L. A. (2012). Genetic variation in toll-like receptors and disease susceptibility. *Nature immunology*, 13(6):535–542.
- Newport, M. J., Allen, A., Awomoyi, A. A., Dunstan, S. J., McKinney, E., Marchant, A., and Sirugo, G. (2004). The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant: no influence on LPS responsiveness or susceptibility to pulmonary tuberculosis in The Gambia. *Tuberculosis*, 84(6):347–352.
- Nishiya, T., Kajita, E., and Miwa, S. (2006). Ligand-independent oligomerization of TLR4 regulated by a short hydrophobic region adjacent to the transmembrane domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 341(4):1128–1134.
- Noss, E. H., Pai, R. K., Sellati, T. J., Radolf, J. D., Belisle, J., Golenbock, D. T., Boom, W. H., and Harding, C. V. (2001). Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class ii mhc expression and antigen processing by 19-kda lipoprotein of mycobacterium tuberculosis. *The Journal of immunology*, 167(2):910–918.
- Ocejo-Vinyals, J., Puente de Mateo, E., Ausin, F., Agüero, R., Arroyo, J., Gutierrez-Cuadra, M., and Farinas, M. (2013). Human toll-like receptor 1

- t1805g polymorphism and susceptibility to pulmonary tuberculosis in northern Spain [short communication]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 17(5):652–654.
- OGarra, A., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J., and Berry, M. P. R. (2013). The immune response in tuberculosis. *Annual review of immunology*, 31:475–527.
- Oh, D.-Y., Taube, S., Hamouda, O., Kücherer, C., Poggensee, G., Jessen, H., Eckert, J. K., Neumann, K., Storek, a., Pouliot, M., Borgeat, P., Oh, N., Schreier, E., Pruss, a., Hattermann, K., and Schumann, R. R. (2008). A functional toll-like receptor 8 variant is associated with HIV disease restriction. *The Journal of infectious diseases*, 198(5):701–9.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S., and Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(2):558–61.
- Olsen, N. J. and Kovacs, W. J. (1996). Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev*, 17(4):369–384.
- Omueti, K. O., Mazur, D. J., Thompson, K. S., Lyle, E. A., and Tapping, R. I. (2007). The polymorphism P315L of human toll-like receptor 1 impairs innate immune sensing of microbial cell wall components. *Journal of immunology*, 178(10):6387–6394.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., and Adorem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25):13766–13771.
- Pai, R. K., Pennini, M. E., Tobian, A. A. R., Canaday, D. H., Boom, W. H., and Harding, C. V. (2004). Prolonged toll-like receptor signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages. *Infection and immunity*, 72(11):6603–14.

- Papadopoulos, A. I., Ferwerda, B., Antoniadou, A., Sakka, V., Galani, L., Kavatha, D., Panagopoulos, P., Poulakou, G., Kanellakopoulou, K., van der Meer, J. W., Giamarellos-Bourboulis, E. J., and Netea, M. G. (2010). Association of toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with increased infection risk in patients with advanced HIV-1 infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 51(2):242–247.
- Parker, L. C., Whyte, M. K., Dower, S. K., and Sabroe, I. (2005). The expression and roles of toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *Journal of leukocyte biology*, 77(6):886–892.
- Pasche, B., Kalaydjiev, S., Franz, T. J., Kremmer, E., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Hrabé de Angelis, M., Lengeling, A., and Busch, D. H. (2005). Sex-dependent susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection is mediated by differential interleukin-10 production. *Infection and immunity*, 73(9):5952–60.
- Patra, J., Jha, P., Rehm, J., and Suraweera, W. (2014). Tobacco smoking, alcohol drinking, diabetes, low body mass index and the risk of self-reported symptoms of active tuberculosis: Individual participant data (ipd) meta-analyses of 72,684 individuals in 14 high tuberculosis burden countries. *PloS one*, 9(5):e96433.
- Pennini, M. E., Pai, R. K., Schultz, D. C., Boom, W. H., and Harding, C. V. (2006). Mycobacterium tuberculosis 19-kda lipoprotein inhibits ifn- $\gamma$ -induced chromatin remodeling of mhc2ta by tlr2 and mapk signaling. *The Journal of Immunology*, 176(7):4323–4330.
- Pierik, M., Joossens, S., Van Steen, K., Van Schuerbeek, N., Vlietinck, R., Rutgeerts, P., and Vermeire, S. (2006). Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 12(1):1–8.
- Png, E., Alisjahbana, B., Sahiratmadja, E., Marzuki, S., Nelwan, R., Balabanova, Y., Nikolayevskyy, V., Drobniewski, F., Nejentsev, S., Adnan, I., van de Vosse, E., Hibberd, M. L., van Crevel, R., Ottenhoff, T. H., and Seielstad,

- M. (2012). A genome wide association study of pulmonary tuberculosis susceptibility in Indonesians. *BMC medical genetics*, 13:5.
- Rahman, M. A., Sobia, P., Gupta, N., Van Kaer, L., and Das, G. (2014). Mycobacterium tuberculosis subverts the tlr-2-myd88 pathway to facilitate its translocation into the cytosol. *PloS one*, 9(1):e86886.
- Rallabhandi, P., Bell, J., Boukhvalova, M. S., Medvedev, A., Lorenz, E., Arditi, M., Hemming, V. G., Blanco, J. C. G., Segal, D. M., and Vogel, S. N. (2006). Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(1):322–32.
- Randhawa, A. K., Shey, M. S., Keyser, A., Peixoto, B., Wells, R. D., Kock, M. D., Lerumo, L., Hughes, J., Hussey, G., Hawkrige, A., Kaplan, G., Willem, A., Hawn, T. R., Tuberculosis, A., and Initiative, V. (2011). Association of Human TLR1 and TLR6 Deficiency with Altered Immune Responses to BCG Vaccination in South African Infants. 7(8).
- Reichmann, M. T., Marshall, B. G., Cummings, F., and Elkington, P. T. (2014). Tuberculosis and tnf-inhibitors: history of exposure should outweigh investigations. *BMJ case reports*, 2014:bcr2013202127.
- Reiling, N., Hölscher, C., Fehrenbach, A., Kröger, S., Kirschning, C. J., Goyert, S., and Ehlers, S. (2002). Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with Mycobacterium tuberculosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(7):3480–4.
- Resler, A. J., Malone, K. E., Johnson, L. G., Malkki, M., Petersdorf, E. W., McKnight, B., and Madeleine, M. M. (2013). Genetic variation in tlr or nfkappab pathways and the risk of breast cancer: a case-control study. *BMC cancer*, 13(1):219.
- Roach, D. R., Bean, A. G., Demangel, C., France, M. P., Briscoe, H., and Britton, W. J. (2002). TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *Journal of immunology*, 168(9):4620–4627.



- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., and Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2):588–93.
- Rojas, M., Olivier, M., Gros, P., Barrera, L. F., and García, L. F. (1999). Tnf- $\alpha$  and il-10 modulate the induction of apoptosis by virulent mycobacterium tuberculosis in murine macrophages. *The Journal of Immunology*, 162(10):6122–6131.
- Rosas-Taraco, A. G., Revol, A., Salinas-Carmona, M. C., Rendon, A., Caballero-Olin, G., and Arce-Mendoza, A. Y. (2007). CD14 C(-159)T polymorphism is a risk factor for development of pulmonary tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*, 196(11):1698–1706.
- Salem, M. L. (2004). Estrogen, a double-edged sword: modulation of TH1- and TH2-mediated inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 3(1):97–104.
- Šali, A. and Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of molecular biology*, 234(3):779–815.
- Schröder, N. W. J. and Schumann, R. R. (2005). Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *The Lancet infectious diseases*, 5(3):156–64.
- Schromm, A. B., Reiling, N., Howe, J., Wiesmüller, K.-H., Roessle, M., and Brandenburg, K. (2009). Influence of serum on the immune recognition of a synthetic lipopeptide mimetic of the 19-kda lipoprotein from mycobacterium tuberculosis. *Innate immunity*.
- Schumann, R. R. and Tapping, R. I. (2007). Genomic variants of TLR1—it takes (TLR-)two to tango. *European journal of immunology*, 37(8):2059–2062.
- Schuring, R. P., Hamann, L., Faber, W. R., Pahan, D., Richardus, J. H., Schumann, R. R., and Oskam, L. (2009). Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *The Journal of infectious diseases*, 199(12):1816–1819.

- Selvaraj, P., Harishankar, M., Singh, B., Jawahar, M. S., and Banurekha, V. V. (2010). Toll-like receptor and TIRAP gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of South India. *Tuberculosis*, 90(5):306–310.
- Seok, H., Suh, D. W., Jo, B., Lee, H.-B., Jang, H. M., Park, H. K., Lew, B.-L., Chung, J.-H., and Sim, W.-Y. (2014). Association between tlr1 polymorphisms and alopecia areata. *Autoimmunity*, (0):1–6.
- Sequeira, P. C., Senaratne, R. H., and Riley, L. W. (2014). Inhibition of toll-like receptor 2 (tlr-2)-mediated response in human alveolar epithelial cells by mycolic acids and mycobacterium tuberculosis mce1 operon mutant. *Pathogens and disease*, 70(2):132–140.
- Shibata, K., Hasebe, A., Into, T., Yamada, M., and Watanabe, T. (2000). The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *Journal of immunology*, 165(11):6538–6544.
- Sinha, E., Biswas, S. K., Mittal, M., Bajaj, B., Singh, V., Arela, N., Katoch, V. M., and Mohanty, K. K. (2014). Toll-like receptor1 743 a> g, 1805t> g & toll-like receptor6 745 c> t gene polymorphism and tuberculosis: A case control study of north indian population from agra (india). *Human immunology*.
- Sorensen, T. I., Nielsen, G. G., Andersen, P. K., and Teasdale, T. W. (1988). Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *The New England journal of medicine*, 318(12):727–732.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Connell, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S., and Musser, J. M. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(18):9869–9874.
- Stein, D., Roth, S., Vogelsang, E., et al. (1991). The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell*, 65(5):725–735.

- Stenger, S. (2005). Immunological control of tuberculosis: role of tumour necrosis factor and more. *Ann Rheum Dis*, 64 Suppl 4:iv24–8.
- Stevens, V. L., Hsing, A. W., Talbot, J. T., Zheng, S. L., Sun, J., Chen, J., Thun, M. J., Xu, J., Calle, E. E., and Rodriguez, C. (2008). Genetic variation in the Toll-like receptor gene cluster (TLR10-TLR1-TLR6) influences disease course in sarcoidosis. *Tissue Antigens*, 79:25–32.
- Subjects, I. H. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 310(20):2191–4.
- Suchindran, S., Brouwer, E. S., and Van Rie, A. (2009). Is hiv infection a risk factor for multi-drug resistant tuberculosis? a systematic review. *PloS one*, 4(5):e5561.
- Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G. S., Millar, D. G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., Penninger, J. M., Wesche, H., Ohashi, P. S., Mak, T. W., and Yeh, W.-C. (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature*, 416(6882):750–6.
- Takeda, K. and Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, 16(1):3–9.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annual review of immunology*, 21:335–376.
- Takeda, K., Takeuchi, O., and Akira, S. (2002). Recognition of lipopeptides by toll-like receptors. *Journal of endotoxin research*, 8(6):459–463.
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2002). Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 4(9):887–895.
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6):805–820.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International immunology*, 13(7):933–940.

- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S. (2002). Cutting edge: role of toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *The Journal of Immunology*, 169(1):10–14.
- Teitelbaum, R., Schubert, W., Gunther, L., Kress, Y., Macaluso, F., Pollard, J. W., McMurray, D. N., and Bloom, B. R. (1999). The m cell as a portal of entry to the lung for the bacterial pathogen mycobacterium tuberculosis. *Immunity*, 10(6):641–650.
- Terres, G., Morrison, S. L., and Habicht, G. S. (1968). A quantitative difference in the immune response between male and female mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 127(3):664–667.
- Texereau, J., Chiche, J.-D. D., Taylor, W., Choukroun, G., Comba, B., and Mira, J.-P. P. (2005). The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41 Suppl 7(Suppl 7):S408–15.
- Thada, S., Valluri, V., and Gaddam, S. (2013). Influence of toll-like receptor gene polymorphisms to tuberculosis susceptibility in humans. *Scandinavian journal of immunology*, 78(3):221–229.
- Thompson, C. M., Holden, T. D., Rona, G., Laxmanan, B., Black, R. A., O’Keefe, G. E., and Wurfel, M. M. (2013). Toll-Like Receptor 1 Polymorphisms and Associated Outcomes in Sepsis After Traumatic Injury: A Candidate Gene Association Study. *Annals of surgery*, 00(00):1–7.
- Thye, T., Owusu-Dabo, E., Vannberg, F. O., van Crevel, R., Curtis, J., Sahiratmadja, E., Balabanova, Y., Ehmen, C., Muntau, B., Ruge, G., Sievertsen, J., Gyapong, J., Nikolayevskyy, V., Hill, P. C., Sirugo, G., Drobniowski, F., van de Vosse, E., Newport, M., Alisjahbana, B., Nejentsev, S., Ottenhoff, T. H., Hill, A. V., Horstmann, R. D., and Meyer, C. G. (2012). Common variants at 11p13 are associated with susceptibility to tuberculosis. *Nature genetics*, 44(3):257–259.
- 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., Warn-

- dorff, 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., and Hill, A. V. S. (2010). Genome-wide association analyses identifies a susceptibility locus for tuberculosis on chromosome 18q11.2. *Nature genetics*, 42(9):739–41.
- Tobias, P. S., Soldau, K., Gegner, J. A., Mintz, D., and Ulevitch, R. J. (1995). Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *The Journal of biological chemistry*, 270(18):10482–10488.
- Tobin, D. M., Roca, F. J., Oh, S. F., McFarland, R., Vickery, T. W., Ray, J. P., Ko, D. C., Zou, Y., Bang, N. D., Chau, T. T., et al. (2012). Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell*, 148(3):434–446.
- Tobin, D. M., Vary Jr, J. C., Ray, J. P., Walsh, G. S., Dunstan, S. J., Bang, N. D., Hagge, D. A., Khadge, S., King, M.-C., Hawn, T. R., et al. (2010). The *Ita4h* locus modulates susceptibility to mycobacterial infection in zebrafish and humans. *Cell*, 140(5):717–730.
- Torrelles, J. B. and Schlesinger, L. S. (2010). Diversity in mycobacterium tuberculosis mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis*, 90(2):84–93.
- Torres-García, D., Cruz-Lagunas, A., Figueroa, M. C. G.-S., Fernández-Plata, R., Baez-Saldaña, R., Mendoza-Milla, C., Barquera, R., Carrera-Eusebio, A., Ramírez-Bravo, S., Campos, L., et al. (2013). Variants in toll-like receptor 9 gene influence susceptibility to tuberculosis in a mexican population. *Journal of translational medicine*, 11(1):220.
- Toshchakov, V., Jones, B. W., Perera, P.-Y., Thomas, K., Cody, M. J., Zhang, S., Williams, B. R. G., Major, J., Hamilton, T. a., Fenton, M. J., and Vogel, S. N. (2002). TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nature immunology*, 3(4):392–8.

- Uciechowski, P., Imhoff, H., Lange, C., Meyer, C. G., Browne, E. N., Kirsten, D. K., Schroder, A. K., Schaaf, B., Al-Lahham, A., Reinert, R. R., Reiling, N., Haase, H., Hatzmann, A., Fleischer, D., Heussen, N., Kleines, M., and Rink, L. (2011). Susceptibility to tuberculosis is associated with TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. *Journal of leukocyte biology*.
- Uciechowski, P., Oellig, E. M., Mariani, E., Malavolta, M., Mocchegiani, E., and Rink, L. (2013). Effects of human toll-like receptor 1 polymorphisms on ageing. *Immunity & Ageing*, 10(1):4.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., and Aderem, A. (1999a). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 401(6755):811–815.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Smith, K. D., and Aderem, A. (1999b). Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(25):14459–14463.
- Unterholzner, L., Keating, S. E., Baran, M., Horan, K. A., Jensen, S. B., Sharma, S., Sirois, C. M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T. S., et al. (2010). Ifi16 is an innate immune sensor for intracellular dna. *Nature immunology*, 11(11):997–1004.
- Van Crevel, R., Ottenhoff, T. H., and van der Meer, J. W. (2002). Innate immunity to mycobacterium tuberculosis. *Clinical microbiology reviews*, 15(2):294–309.
- van Gunsteren, W. F., Billeter, S., Eising, A., Hünenberger, P. H., Krüger, P., Mark, A. E., Scott, W., and Tironi, I. G. (1996). Biomolecular simulation: The {GROMOS96} manual and user guide.
- Verbon, A., Kuijper, S., Jansen, H. M., Speelman, P., and Kolk, A. H. (1990). Antigens in culture supernatant of mycobacterium tuberculosis: epitopes defined by monoclonal and human antibodies. *Journal of general microbiology*, 136(5):955–964.

- Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. H., Wyllie, D. H., Dower, S. K., and Segal, D. M. (2001). Regulation of toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 166(1):249–255.
- Watson, J. D. and Milner-White, E. J. (2002). The conformations of polypeptide chains where the main-chain parts of successive residues are enantiomeric. their occurrence in cation and anion-binding regions of proteins. *Journal of molecular biology*, 315(2):183–191.
- Weiss, K. M. and Terwilliger, J. D. (2000). How many diseases does it take to map a gene with SNPs? *Nature genetics*, 26(2):151–157.
- Wellcome Trust Case Control, C. and Consortium, T. W. T. C. C. (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447(7145):661–678.
- Whitacre, C. C., Reingold, S. C., and OLooney, P. A. (1999). A gender gap in autoimmunity. *Science*, 283(5406):1277–1278.
- WHO (2013). *Global tuberculosis report 2013*. WHO.
- Wiederstein, M. and Sippl, M. J. (2007). Prosa-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl 2):W407–W410.
- Wiesmuller, K. H., Jung, G., and Hess, G. (1989). Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator. *Vaccine*, 7(1):29–33.
- Wright, A. F. and Hastie, N. D. (2001). Complex genetic diseases: controversy over the Croesus code. *Genome biology*, 2(8):COMMENT2007.
- Wyllie, D. H., Kiss-Toth, E., Visintin, a., Smith, S. C., Boussouf, S., Segal, D. M., Duff, G. W., and Dower, S. K. (2000). Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(12):7125–32.
- Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X.-D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejaska, K. E., and Eissa, N. T. (2007). Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*, 27(1):135–44.

- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. (2003a). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301(5633):640–643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2003b). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*, 4(11):1144–1150.
- Yang, C. A., Scheibenbogen, C., Bauer, S., Kleinle, C., Wex, T., Bornschein, J., Malfertheiner, P., Hellmig, S., Schumann, R. R., and Hamann, L. (2013). A frequent Toll-like receptor 1 gene polymorphism affects NK- and T-cell IFN-gamma production and is associated with Helicobacter pylori-induced gastric disease. *Helicobacter*, 18(1):13–21.
- Young, D., Kaufmann, S., Hermans, P., and Thole, J. (1992). Mycobacterial protein antigens: a compilation. *Molecular microbiology*, 6(2):133–145.
- Zähringer, U., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H., and Alexander, C. (2008). Tlr2—promiscuous or specific? a critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology*, 213(3):205–224.
- Zarembek, K. A. and Godowski, P. J. (2002). Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(2):554–61.
- Zhang, Y., Jiang, T., Yang, X., Xue, Y., Wang, C., Liu, J., Zhang, X., Chen, Z., Zhao, M., and Li, J.-C. (2013). Toll-like receptor-1,-2, and-6 polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 8(5):e63357.



# Anhang A

## PCR- und Sequenzierungsprimer

**Tabelle 1** – PCR- und Sequenzierungs-Primer

Name	Sequenz 5' zu 3'	Größe ( $\mu\text{mol}$ )	Purifikation	Basen
TLR1-Af	TGGTCTTAGGAGA GACTTATGGG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	23
TLR1-Ar	GCTTACAGAATTC TGGCTAATATCC	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	25
TLR1-Bf	GCACCTTACTGAG TTGGAGACAC	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	23
TLR1-Br	GAGATACCAGGGC AGATCCAAG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	22
TLR1-Cf	CAACATAACTCTGC TGATCGTCAC	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	24
TLR1-Cr	AGGAATGGAGTACT GCGGAATG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	22
TLR2-Af	TTCTGGTTCCTTGT TTACTTTCAC	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	24
TLR2-Ar	GCTGTCCTGTGAC ATTCCG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	19
TLR2-Bf	TCTTGATTGATTGG CCAGC	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	19
TLR2-Br	AAATGACGGTACAT CCACGTAG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	22
TLR4-Af	AGTTTAGCCCTGGG AGCCTTTTC	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	23
TLR4-Ar	AGCATTCACCTT TGTTGG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	20
TLR4-Bf	CGGATGGCAACATT TAGAATTAG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	23
TLR4-Br	TGGTGTTCAACAAGT	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	24

Fortsetzung auf nächster Seite

Name	Sequenz 5' zu 3'	Größe ( $\mu\text{mol}$ )	Purifikation	Basen
	ACAAGCAAAG			
TLR7-Af	ACAGTCATGGGGTT GGGGATG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	21
TLR7-Ar	TAACAGTTTTGGCC CAGGTAGAG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	23
TLR7-Bf	ACAGCTTCTCAGCC TTGAGG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	20
TLR7-Br	GGCGAGAGGTTAAA GCTTTTC	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	21
TLR7-Cf	AACCTCTCGCCATTA CATAATCTTC	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	25
TLR7-Cr	TAAGAGACTCACTCT CCATGGTCC	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	24
TLR7-Df	CATATGCTAAACTTTA CCAAGAACC	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	25
TLR7-Dr	TAACTCACAGGTGTA CAGATCCAG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	24
TLR8-Af	AGCACCATGAAGCTG AACATAG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	22
TLR8-Ar	GCAGTTCAGGCC AAATAGAG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	21
TLR8-Bf	CCAGAGTCTTTGA CAGAACTTAGTC	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	25
TLR8-Br	TTTGGAAGCTGCA TCAGGG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	19
TLR8-Cf	GCAGGCGTAACAC ATCATCTAG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	22
TLR8-Cr	TCCAGACTCACAAT ACTCTTCCC	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	23
TLR8-Df	GATGGATGGATGAA CATCTGAATG	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	24
TLR8-Dr	CAGTTAGTATTGCTT	0.05 $\mu\text{mol}$	HPSF	25

Fortsetzung auf nächster Seite

Name	Sequenz 5' zu 3'	Größe ( $\mu\text{mol}$ )	Purifikation	Basen
	AATGGAATCG			

## Anhang B

### ImportCohort.R

```
# *****  
**  
# Sept. 2012 Nickel Dittrich  
# import cohort data, clean up and bring to correct  
# format  
#  
#  
# This code sets the working directory, loads the  
# epitools  
# library for oddsratio calculation, imports the cohort  
# in  
# hopefully the correct format and calls the functions  
# defined in CohortFunctions.R for the actual OddsRatio  
# and p-value calculations.  
# Then it saves the output to the specified file  
# containing  
# the region, OddsRatio, confidence interval, p-value  
# and  
# counts of significant SNPs ( $p < 0.05$  or confidence  
# interval  
# not including 1)  
# Currently it does multivariate analysis for  
# - TB vs Not TB (TB)  
# - Extrapulmonary TB vs everybody else (EPTB)  
# - Extrapulmonary TB vs controls only (EPCTB)  
# - Pulmonary TB vs everybody else (PTB)  
# - Pulmonary TB vs controls only (PCTB)  
#  
# Usage:  
# under "multivariate analysis", you can specify your  
# sub-
```

```

# cohort and the filename under which the results are
  saved
# then just run the whole script. All existing variables
  in
# the workspace will be deleted when starting the script
  .
#
# Update 20.09.12
# The code can now handle errors during file import in
  case
# a comma instead of a dot was used as decimal delimiter
# and it checks for values other than the bases A, C, G,
  T
# in the regions by comparing the counted bases with
  number
# of objects other than "NA"
# *****
  **

# set working directory
setwd("~/Dropbox/Mahavir-Charite/India_cohort/Analysis/R
  ")

# load epitools package for oddsratio calculation
library("epitools")

# clear all variables from workspace
rm(list=ls(all=TRUE))

# set the correct variable classes to import the cohort
variableclasses <- c("character", "numeric", "factor", "
  factor", "numeric", "factor", "character", "factor",
  "factor", "numeric",
  "character", "factor", "numeric", "

```

```

character", "numeric", "numeric"
, "factor", "factor", "numeric",
"factor",
"factor", "factor", "factor", "
numeric", "numeric", "character"
, "factor", "factor", "factor",
"factor",
"factor", "factor", "factor", "
factor", "factor", "factor", "
factor", "factor", "factor", "
factor",
"factor", "factor", "factor", "
factor", "factor", "factor", "
factor", "factor", "factor", "
factor",
"factor", "factor", "factor", "
factor", "factor", "factor", "
factor", "factor", "factor", "
factor",
"factor")

```

```
cohortfile <- "CohortIndia2013short.dat"
```

```

# import the cohort, catch the error if there is a comma
instead of a dot as a delimiter
cohort.df <- read.delim(cohortfile, colClasses =
variableclasses, na.strings = c("999", "999.0")) #try
(read.delim(cohortfile, colClasses = variableclasses,
na.strings = c("999", "999.0")), silent = TRUE)
# if(inherits(cohort.df, "try-error")) cohort.df <- read
.delim2(cohortfile, colClasses = variableclasses, na.
strings = c("999", "999,0"))
rm("variableclasses")

```

```

# *****
# ***
# statistics
# *****
# **

# load file with functions for statistical calculations
source("CohortFunctions.R")

# *****
# multivariate analysis
# *****

# set subcohort if applicable
# e.g. Male/Female, Hindu/Muslim, etc
cohort.df <- subset(cohort.df, cohort.df$Sex == 0) # 0
# female, 1 male
cohort.df <- subset(cohort.df, cohort.df$Religion == 2)
# 1 hindu, 2 muslim, 3 christian (almost no cases)
# cohort.df <- subset(cohort.df, cohort.df$Age > 18) #
# individuals over a certain age
filenamesignificant <- "FemaleMuslim130717.txt"

ORparam <- 4 # for now only use 3: fisher or 4: wald (
# standard) as the other functions cause problems with
# values < 5
# for documentation of oddsratio methods type ?oddsratio

# create structure for significance matrix which will
# later be saved in the file
significant <- c("Variants", "SNP", "p-value", "OR", "
# lower", "upper",
# "nNotNucCont", "%NotNucCont", "nNucCont
# ", "%NucCont",

```

```

      "nNotNucCases", "%NotNucCases", "
      nNucCases", "%NucCases", "nTotal") #
      just for making it easier to show
      the significant variants later on

# TB or not
# create subsets TB and NotTB
TB <- subset(cohort.df, cohort.df$TB == 1)
NotTB <- subset(cohort.df, cohort.df$TB != 1)
ORTB <- ORAll(TB, NotTB, ORparam)
significant <- signimat(ORTB, significant, "TB")
rm(TB, NotTB)

# Extrapulmonary TB or not, all samples
# create subsets EPTB and NotEPTB
EPTB <- subset(cohort.df, cohort.df$TBStatus == 3)
NotEPTB <- subset(cohort.df, cohort.df$TBStatus != 3)
OREPTB <- ORAll(EPTB, NotEPTB, ORparam)
significant <- signimat(OREPTB, significant, "EPTB")
rm(EPTB, NotEPTB)

# Extrapulmonary TB or not, only controls = controls
# create subsets EPCTB and NotEPCTB
EPCTB <- subset(cohort.df, cohort.df$TBStatus == 3)
NotEPCTB <- subset(cohort.df, cohort.df$TBStatus == 0 |
  cohort.df$TBStatus == 1)
OREPCTB <- ORAll(EPCTB, NotEPCTB, ORparam)
significant <- signimat(OREPCTB, significant, "EPCTB")
rm(EPCTB, NotEPCTB)

# Pulmonary TB or not
# create subsets PTB and NotPTB
PTB <- subset(cohort.df, cohort.df$TBStatus == 4)
NotPTB <- subset(cohort.df, cohort.df$TBStatus != 4)

```



```

ORPTB <- ORAll(PTB, NotPTB, ORparam)
significant <- signimat(ORPTB, significant, "PTB")
rm(PTB, NotPTB)

# Pulmonary TB or not, only controls = controls
PCTB <- subset(cohort.df, cohort.df$TBStatus == 4)
NotPCTB <- subset(cohort.df, cohort.df$TBStatus == 0 |
  cohort.df$TBStatus == 1)
ORPCTB <- ORAll(PCTB, NotPCTB, ORparam)
significant <- signimat(ORPCTB, significant, "PCTB")
rm(PCTB, NotPCTB)

# save significance matrix to the filename specified
  above
write(t(significant), file = filename$significant,
  ncolumns = dim(significant)[2], append = FALSE, sep =
  "\t")

```

## Anhang C

### Cohort Functions.R

```
# *****  
# 2014 Nickel Dittrich  
# Necessary functions for ImportCohort.R  
# includes CalcOddsRatio  
# *****  
  
CalcOddsRatio <- function(Case.df, Control.df, calcparam  
= 4){  
  # create the values for the contingency matrix by  
  # adding all alleles of the given nucleic acid for  
  # cases and controls, while ignoring the "NAs")  
  CaseA <- colSums(Case.df == "AA", na.rm = TRUE) * 2 +  
    colSums(Case.df == "A", na.rm = TRUE) * 2 + colSums  
    (Case.df == "AC", na.rm = TRUE) + colSums(Case.df  
    == "AG", na.rm = TRUE) + colSums(Case.df == "AT",  
    na.rm = TRUE)  
  ControlA <- colSums(Control.df == "AA", na.rm = TRUE)  
    * 2 + colSums(Control.df == "A", na.rm = TRUE) * 2  
    + colSums(Control.df == "AC", na.rm = TRUE) +  
    colSums(Control.df == "AG", na.rm = TRUE) + colSums  
    (Control.df == "AT", na.rm = TRUE)  
  CaseC <- colSums(Case.df == "CC", na.rm = TRUE) * 2 +  
    colSums(Case.df == "C", na.rm = TRUE) * 2 + colSums  
    (Case.df == "AC", na.rm = TRUE) + colSums(Case.df  
    == "CG", na.rm = TRUE) + colSums(Case.df == "CT",  
    na.rm = TRUE)  
  ControlC <- colSums(Control.df == "CC", na.rm = TRUE)  
    * 2 + colSums(Control.df == "C", na.rm = TRUE) * 2  
    + colSums(Control.df == "AC", na.rm = TRUE) +  
    colSums(Control.df == "CG", na.rm = TRUE) + colSums  
    (Control.df == "CT", na.rm = TRUE)
```

```

CaseG <- colSums(Case.df == "GG", na.rm = TRUE) * 2 +
  colSums(Case.df == "G", na.rm = TRUE) * 2 + colSums
  (Case.df == "AG", na.rm = TRUE) + colSums(Case.df
  == "CG", na.rm = TRUE) + colSums(Case.df == "GT",
  na.rm = TRUE)
ControlG <- colSums(Control.df == "GG", na.rm = TRUE)
  * 2 + colSums(Control.df == "G", na.rm = TRUE) * 2
  + colSums(Control.df == "AG", na.rm = TRUE) +
  colSums(Control.df == "CG", na.rm = TRUE) + colSums
  (Control.df == "GT", na.rm = TRUE)
CaseT <- colSums(Case.df == "TT", na.rm = TRUE) * 2 +
  colSums(Case.df == "T", na.rm = TRUE) * 2 + colSums
  (Case.df == "AT", na.rm = TRUE) + colSums(Case.df
  == "CT", na.rm = TRUE) + colSums(Case.df == "GT",
  na.rm = TRUE)
ControlT <- colSums(Control.df == "TT", na.rm = TRUE)
  * 2 + colSums(Control.df == "T", na.rm = TRUE) * 2
  + colSums(Control.df == "AT", na.rm = TRUE) +
  colSums(Control.df == "CT", na.rm = TRUE) + colSums
  (Control.df == "GT", na.rm = TRUE)
ContVal.df <- data.frame(cbind(CaseA, CaseC, CaseG,
  CaseT, ControlA, ControlC, ControlG, ControlT))
# hier noch ueberpruefen ob auch alle gezaehlt wurden,
  sowas wie summe von CaseA:T / 2 = summe von werten
  != NA
# colSums(Case.df != "NA", na.rm = TRUE) == sum(
  ContVal.df[1:4]/2)
if ((colSums(Case.df != "NA", na.rm = TRUE) + colSums(
  Control.df != "NA", na.rm = TRUE) != sum(ContVal.df
  /2)))
  print(paste("Warning!!_Undefined_basecalls_in_region
  ", rownames(ContVal.df)))

# create the actual contingency matrix and calculate

```

```

    odds ratio, .95 confidence interval and p-values
outc <- c("Control", "Case") # column labels for
    contingency matrix
# calculate for A
cont <- matrix(c(ContVal.df$ControlC + ContVal.df$
    ControlG + ContVal.df$ControlT,
                ContVal.df$CaseC + ContVal.df$CaseG +
                ContVal.df$CaseT,
                ContVal.df$ControlA,
                ContVal.df$CaseA), 2, 2, byrow = TRUE
    ) # muss 2x2 sein, oben unaffected
    , unten affected, links controls,
    rechts cases
allele <- c("Not_A", "A")
dimnames(cont) <- list("Allele_Frequency" = allele, "
    Outcome" = outc)

if ((cont[2] >= 5 | cont[4] >= 5) & (cont[1] >= 5 |
    cont[3] >= 5)){ # catch the case that the
    allele isn't present
if (calcpam == 1) ORA <- oddsratio(cont)
if (calcpam == 2) ORA <- oddsratio.midp(cont)
if (calcpam == 3) ORA <- oddsratio.fisher(cont)
if (calcpam == 4) ORA <- oddsratio.wald(cont)
if (calcpam != 1 & calcpam != 2 & calcpam != 3
    & calcpam != 4) ORA <- oddsratio.small(cont)
} else suppressWarnings(ORA <- oddsratio.wald(cont)) #
    run without warnings to output 0 / NaN in final
    results

# calculate for C
cont <- matrix(c(ContVal.df$ControlA + ContVal.df$
    ControlG + ContVal.df$ControlT,
                ContVal.df$CaseA + ContVal.df$CaseG +

```

```

        ContVal.df$CaseT,
        ContVal.df$ControlC,
        ContVal.df$CaseC), 2, 2, byrow = TRUE
        ) # muss 2x2 sein, oben unaffected
        , unten affected, links controls,
        rechts cases
allele <- c("Not_C", "C")
dimnames(cont) <- list("Allele_Frequency" = allele, "
    Outcome" = outc)

if ((cont[2] >= 5 | cont[4] >= 5) & (cont[1] >= 5 |
    cont[3] >= 5)){ # catch the case that the
    allele isn't present
    if (calcpam == 1) ORC <- oddsratio(cont)
    if (calcpam == 2) ORC<- oddsratio.midp(cont)
    if (calcpam == 3) ORC <- oddsratio.fisher(cont)
    if (calcpam == 4) ORC <- oddsratio.wald(cont)
    if (calcpam != 1 & calcpam != 2 & calcpam != 3
        & calcpam != 4) ORC <- oddsratio.small(cont)
} else suppressWarnings(ORC <- oddsratio.wald(cont)) #
    run without warnings to output 0 / NaN in final
    results

# calculate for G
cont <- matrix(c(ContVal.df$ControlA + ContVal.df$
    ControlC + ContVal.df$ControlT,
        ContVal.df$CaseA + ContVal.df$CaseC +
        ContVal.df$CaseT,
        ContVal.df$ControlG,
        ContVal.df$CaseG), 2, 2, byrow = TRUE
        ) # muss 2x2 sein, oben unaffected
        , unten affected, links controls,
        rechts cases
allele <- c("Not_G", "G")

```

```

dimnames(cont) <- list("Allele_Frequency" = allele, "
  Outcome" = outc)

if ((cont[2] >= 5 | cont[4] >= 5) & (cont[1] >= 5 |
  cont[3] >= 5)){      # catch the case that the
  allele isn't present
  if (calcpam == 1) ORG <- oddsratio(cont)
  if (calcpam == 2) ORG <- oddsratio.midp(cont)
  if (calcpam == 3) ORG <- oddsratio.fisher(cont)
  if (calcpam == 4) ORG <- oddsratio.wald(cont)
  if (calcpam != 1 & calcpam != 2 & calcpam != 3
    & calcpam != 4) ORG <- oddsratio.small(cont)
} else suppressWarnings(ORG <- oddsratio.wald(cont)) #
  run without warnings to output 0 / NaN in final
  results

# calculate for T
cont <- matrix(c(ContVal.df$ControlA + ContVal.df$
  ControlC + ContVal.df$ControlG,
                ContVal.df$CaseA + ContVal.df$CaseC +
                ContVal.df$CaseG,
                ContVal.df$ControlT,
                ContVal.df$CaseT), 2, 2, byrow = TRUE
  ) # muss 2x2 sein, oben unaffected
  , unten affected, links controls,
  rechts cases

allele <- c("Not_T", "T")
dimnames(cont) <- list("Allele_Frequency" = allele, "
  Outcome" = outc)

if ((cont[2] >= 5 | cont[4] >= 5) & (cont[1] >= 5 |
  cont[3] >= 5)){      # catch the case that the
  allele isn't present
  if (calcpam == 1) ORT <- oddsratio(cont)

```

```

if (calcp $\text{param}$  == 2) ORT <- oddsratio.midp(cont)
if (calcp $\text{param}$  == 3) ORT <- oddsratio.fisher(cont)
if (calcp $\text{param}$  == 4) ORT <- oddsratio.wald(cont)
if (calcp $\text{param}$  != 1 & calcp $\text{param}$  != 2 & calcp $\text{param}$  != 3
    & calcp $\text{param}$  != 4) ORT <- oddsratio.small(cont)
} else suppressWarnings(ORT <- oddsratio.wald(cont)) #
    run without warnings to output 0 / NaN in final
    results

OR <- matrix(c(ORA$measure[2], ORA$measure[4], ORA$
measure[6], ORA$p.value[6], ORA$data[1], ORA$data
[2], ORA$data[4], ORA$data[5],
    ORC$measure[2], ORC$measure[4], ORC$
measure[6], ORC$p.value[6], ORC$data
[1], ORC$data[2], ORC$data[4], ORC$
data[5],
    ORG$measure[2], ORG$measure[4], ORG$
measure[6], ORG$p.value[6], ORG$data
[1], ORG$data[2], ORG$data[4], ORG$
data[5],
    ORT$measure[2], ORT$measure[4], ORT$
measure[6], ORT$p.value[6], ORT$data
[1], ORT$data[2], ORT$data[4], ORT$
data[5]),
4, 8, byrow = TRUE, dimnames = list(c(
paste(names(Case.df), "A"), paste(
names(Case.df), "C"), paste(names(
Case.df), "G"), paste(names(Case.df)
, "T")), c("Odds_Ratio", "lower", "
upper", "chi2_p-value", "nNotNucCont
", "nNucCont", "nNotNucCases", "
nNucCases"))))

return(OR)
}

```

```

# *****
# run CalcOddsRatio for every SNP
# *****

ORAll <- function(Case, Control, ORp = 4){
  for (i in 26:(dim(Case)[2])) {
    ORmattmp <- CalcOddsRatio(Case[i], Control[i], ORp)
    if (i == 26)
      ORmat <- ORmattmp
    else
      ORmat <- rbind(ORmat, ORmattmp)
  }
  return(ORmat)
}

# *****
# create significance matrix
# *****

signimat <- function(ORmat, significant, subname){
  for (j in 1:dim(ORmat)[1]) {
#   if ((ORmat[j,4] != "NaN" & ORmat[j,4] < 0.05) |
#       ((ORmat[j,2] != "NaN" & ORmat[j,3] != "NaN") & ((
ORmat[j,2] < 1 & ORmat[j,3] < 1) | (ORmat[j,2] > 1 &
ORmat[j,3] > 1))))
    if (ORmat[j,4] != "NaN" | ORmat[j,2] != "NaN")
      {total <- (ORmat[j,5] + ORmat[j,6] + ORmat[j,7] +
ORmat[j,8])
      significant <- rbind(significant,
                           c(subname, dimnames(ORmat)
                              [[1]][j], round(ORmat[j
,4], digits = 4), round(

```



```

ORmat[j,1], digits = 2),
  round(ORmat[j,2], digits
= 2), round(ORmat[j,3],
  digits = 2),
ORmat[j,5], round(ORmat[j
  ,5] * 100 / total),
  ORmat[j,6], round(ORmat
  [j,6] * 100 / total),
ORmat[j,7], round(ORmat[j
  ,7] * 100 / total),
  ORmat[j,8], round(ORmat
  [j,8] * 100 / total),
  total/2))
}
}
return(significant)
}

```

# Anhang D

## SNP Datenbanken

**Tabelle 2** – SNP Datenbank TLR1

rs#	mRNA Pos.	Basenpaar- änderung	AS- Pos.	AS- änderung	PP2 Prog.	PP2 Wert
rs76600635	404	TCC ⇒ CCC	44	S ⇒ P	+	0
rs5743611	513	AGA ⇒ ACA	80	R ⇒ T	+	0,132
rs5743612	626	CAC ⇒ TAC	118	H ⇒ Y	-	0,541
rs13152776	675	GAG ⇒ GTG	134	E ⇒ V	-	0,928
rs117033348	705	CTG ⇒ CCG	144	L ⇒ P	-	1
rs4833095	1017	AAT ⇒ AGT	248	N ⇒ S	+	0,001
rs3923647	1188	CAC ⇒ CTC	305	H ⇒ L	+	0,017
rs5743613	1218	CCG ⇒ CTG	315	P ⇒ L	+	0,028
rs76796448	1328	CAT ⇒ AAT	352	H ⇒ N	-	0,239
rs111596029	1463	ATG ⇒ GTG	397	M ⇒ V	-	0,92
rs5743817	1679	GCT ⇒ ACT	469	A ⇒ T	+	0
rs61733077	1743	AGC ⇒ ACC	490	S ⇒ T	+	0,001
rs55812771	1821	ATG ⇒ AAG	516	M ⇒ K	-	0,318
rs112542063	1986	CAC ⇒ CGC	571	H ⇒ R	+	0,005
rs5743617	2034	GTT ⇒ GGT	587	V ⇒ G	+	0
rs111807776	2064	GTG ⇒ GCG	597	V ⇒ A	+	0,038
rs5743618	2079	AGC ⇒ ATC	602	S ⇒ I	+	0
rs76798247	2079	AGC ⇒ ATC	602	S ⇒ I	+	0
rs5743619	2166	CTC ⇒ CGC	631	L ⇒ R	+	0,001
rs56205407	2310	ATT ⇒ ACT	679	I ⇒ T	-	0,825
rs41311402	2364	TTG ⇒ TCG	697	L ⇒ S	-	1
rs113706342	2433	CAT ⇒ CCT	720	H ⇒ P	+	0,204
rs5743621	2472	CCC ⇒ CTC	733	P ⇒ L	-	0,995
rs41305843	2492	CCT ⇒ TCT	740	P ⇒ S	-	0,998

PolyPhen2 Prognose: + benign; - possibly damaging; - probably damaging

**Tabelle 3** – SNP Datenbank TLR2

rs#	mRNA Pos.	Basenpaar- änderung	AS- Pos	AS- änderung	PP2 Prog.	PP2 Wert
rs112806599	239	ATG ⇒ ACG	7	M ⇒ T	+	0
rs56303479	461	CTG ⇒ CCG	81	L ⇒ P	-	1
rs116232047	490	ATA ⇒ GTA	91	I ⇒ V	-	0,565
rs5743699	1451	ACT ⇒ ATT	411	T ⇒ I	-	0,956
rs62323857	1558	CGA ⇒ TGA	447	R ⇒ X	X	
rs112840932	1820	AAC ⇒ AGC	534	N ⇒ S	+	0,004
rs5743702	1886	ATT ⇒ ACT	556	I ⇒ T	+	0
rs61735277	1931	CGT ⇒ CAT	571	R ⇒ H	+	0,118
rs5743703	1955	CGC ⇒ CAC	579	R ⇒ H	+	0,001
rs5743704	2111	CCC ⇒ CAC	631	P ⇒ H	-	0,999
rs121917864	2248	CGG ⇒ TGG	677	R ⇒ W	-	1
rs5743706	2362	TAT ⇒ AAT	715	Y ⇒ N	-	1
rs5743707	2364	TAT ⇒ TAG	715	Y ⇒ X	X	
rs113775303	2364	TAT ⇒ TAG	715	Y ⇒ X	X	
rs61735278	2405	AAT ⇒ AGT	729	N ⇒ S	+	0,013
rs5743708	2477	CGG ⇒ CAG	753	R ⇒ Q	-	1
rs1804965	2523	GAG ⇒ GAT	768	E ⇒ D	+	0,002

PolyPhen2 Prognose: + benign; - possibly damaging; - probably damaging; X nonsense

**Tabelle 4** – SNP Datenbank TLR4

rs#	mRNA Pos.	Basenpaar- änderung	AS- Pos.	AS- änderung	PP2 Prog.	PP2 Wert
rs112840323	352	GTG ⇒ ATG	21	V ⇒ M	-	0,979
rs78848399	428	TAC ⇒ TGC	46	Y ⇒ C	-	0,989
rs56302444	568	ATT ⇒ GTT	93	I ⇒ V	-	0,998
rs111301110	587	CAG ⇒ CGG	99	Q ⇒ R	+	0,009
rs16906079	814	ACC ⇒ GCC	175	T ⇒ A	+	0,019
rs77214890	832	GAC ⇒ TAC	181	D ⇒ Y	-	1
rs5030713	854	CAA ⇒ CGA	188	Q ⇒ R	+	0,003
rs5030714	1028	TGT ⇒ TCT	246	C ⇒ S	+	0,116
rs55799839	1070	CTG ⇒ CCG	260	L ⇒ P	-	1
rs76014534	1151	GAA ⇒ GGA	287	E ⇒ G	-	0,997
rs4986790	1187	GAT ⇒ GGT	299	D ⇒ G	+	0,026
rs2770145	1209	TGT ⇒ TGG	306	C ⇒ W	-	1
rs2770144	1220	GTT ⇒ GGT	310	V ⇒ G	-	0,996
rs5030715	1277	AAT ⇒ AGT	329	N ⇒ S	+	0,055
rs5031050	1316	TTT ⇒ TAT	342	F ⇒ Y	-	0,971
rs61734367	1372	AAC ⇒ GAC	361	N ⇒ D	-	0,999
rs11536884	1446	TTG ⇒ TTT	385	L ⇒ F	-	0,895
rs79802422	1475	GAT ⇒ GTT	395	D ⇒ V	-	0,860
rs4986791	1487	ACC ⇒ ATC	399	T ⇒ I	+	0,177
rs4987233	1490	AGC ⇒ AAC	400	S ⇒ N	+	0
rs80197996	1701	TTG ⇒ TTT	470	L ⇒ F	-	1
rs5030718	1711	GAA ⇒ AAA	474	E ⇒ K	+	0,001
rs5030719	1821	CAG ⇒ CAT	510	Q ⇒ H	+	0,003
rs34953464	1887	TTC ⇒ TTA	532	F ⇒ L	+	0,001
rs5030720	2070	TGG ⇒ TGA	593	W ⇒ X	X	
rs55905951	2318	GCC ⇒ GGC	676	A ⇒ G	-	1
rs5030722	2372	AAG ⇒ AGG	694	K ⇒ R	-	0,987
rs56101219	2455	ATC ⇒ GTC	722	I ⇒ V	-	0,994
rs5030723	2579	CGT ⇒ CAT	763	R ⇒ H	+	0,048
rs55786277	2701	CGG ⇒ TGG	804	R ⇒ W	-	0,999
rs55751501	2731	GCC ⇒ ACC	814	A ⇒ T	-	1
rs56380595	2758	CCA ⇒ ACA	823	P ⇒ T	-	0,999
rs5030724	2791	CAG ⇒ AAG	834	Q ⇒ K	+	0,001

PolyPhen2 Prognose: + benign; - possibly damaging; - probably damaging; X nonsense

**Tabelle 5** – SNP Datenbank TLR7

rs#	mRNA Pos.	Basenpaar- änderung	AS- Pos.	AS- änderung	PP2 Prog.	PP2 Wert
rs179008	171	CAA ⇒ CTA	11	Q ⇒ L	+	0
rs179008	171	CAA ⇒ CCA	11	Q ⇒ P	+	0,001
rs141847327	284	GTG ⇒ ATG	49	V ⇒ M	-	1
rs143823510	387	GCG ⇒ GTG	83	A ⇒ V	+	0,032
rs150313957	519	ACT ⇒ ATT	127	T ⇒ I	+	0,278
rs137927123	573	GGC ⇒ GAC	145	G ⇒ D	+	0,005
rs144771387	714	TCA ⇒ TTA	192	S ⇒ L	+	0,204
rs138717086	737	TTC ⇒ CTC	200	F ⇒ L	-	0,968
rs149314023	794	GTC ⇒ ATC	219	V ⇒ I	+	0,009
rs55907843	804	GTT ⇒ GAT	222	V ⇒ D	+	0
rs141848808	951	GCG ⇒ GTG	271	A ⇒ V	+	0
rs190564296	1383	AGC ⇒ AAC	415	S ⇒ N	+	0,001
rs5743781	1482	GCC ⇒ GTC	448	A ⇒ V	+	0,023
rs150054181	1605	GAA ⇒ GCA	489	E ⇒ A	+	0
rs34501186	1865	AAT ⇒ GAT	576	N ⇒ D	-	1
rs35160120	1878	TTT ⇒ TCT	580	F ⇒ S	-	1
rs149227205	1925	AAG ⇒ CAG	596	K ⇒ Q	+	0,001
rs36076482	1936	CAG ⇒ CAT	599	Q ⇒ H	+	0
rs55835602	1948	ATG ⇒ ATT	603	M ⇒ I	-	0,970
rs36110053	1968	TCC ⇒ TGC	610	S ⇒ C	-	0,836
rs34729893	1997	TCT ⇒ ACT	620	S ⇒ T	-	0,969
rs34014664	2019	AGA ⇒ ATA	627	R ⇒ I	-	0,964
rs34557368	2040	TTA ⇒ TGA	634	L ⇒ X	X	
rs35337229	2046	AGA ⇒ ACA	636	R ⇒ T	+	0,167
rs187685386	2059	AAC ⇒ AAA	640	N ⇒ K	+	0,002
rs146437735	2247	ACT ⇒ ATT	703	T ⇒ I	+	0
rs140890736	2414	ATC ⇒ GTC	759	I ⇒ V	-	0,708
rs145797092	2805	TGT ⇒ TAT	889	C ⇒ Y	+	0,001
rs189681811	2898	AGA ⇒ AAA	920	R ⇒ K	+	0,001
rs181600414	3149	CGG ⇒ TGG	1004	R ⇒ W	-	1
rs138079334	3195	CCG ⇒ CTG	1019	P ⇒ L	-	1
rs147244662	3233	GCC ⇒ ACC	1032	A ⇒ T	-	0,991
rs184706894	3234	GCC ⇒ GTC	1032	A ⇒ V	+	0,069

PolyPhen2 Prognose: + benign; - possibly damaging; - probably damaging; X nonsense

**Tabelle 6** – SNP Datenbank TLR8

rs/#	mRNA Pos.	Basenpaar- änderung	AS- Pos.	AS- änderung	PP2 Prog.	PP2 Wert
rs3764880	88	ATG ⇒ GTG	1	M ⇒ V	+	0
rs5744077	115	ATG ⇒ GTG	10	M ⇒ V	+	0
rs151096932	139	ATA ⇒ GTA	18	I ⇒ V	+	0,004
rs143939946	161	TGC ⇒ TAC	25	C ⇒ Y	+	0
rs144647258	166	GAA ⇒ AAA	27	E ⇒ K	+	0,017
rs191299747	229	GAG ⇒ CAG	48	E ⇒ Q	+	0,0139
rs57166818	266	ACG ⇒ ATG	60	T ⇒ M	-	0,928
rs146700498	373	CAC ⇒ TAC	96	H ⇒ Y	-	0,839
rs183801068	579	GAG ⇒ GAC	164	E ⇒ D	+	0,001
rs5744080	732	CAC ⇒ CAT	215	H ⇒ H		
rs147465988	1609	GCC ⇒ ACC	508	A ⇒ T	+	0,065
rs184806389	2020	GAT ⇒ TAT	645	D ⇒ Y	-	0,999
rs2407992	2040	CTG ⇒ CTC	651	L ⇒ L	0	
rs148772263	2078	GCG ⇒ GTG	664	A ⇒ V	-	0,608
rs5744082	2231	CGG ⇒ CAG	715	R ⇒ Q	+	0
rs190078518	2276	GGC ⇒ GAC	730	G ⇒ D	+	0,033
rs5744083	2334	AAA ⇒ AAG	749	K ⇒ K		
rs3747414	2340	ATC ⇒ ATA	751	I ⇒ I		
rs149915624	2518	GGG ⇒ CGG	811	G ⇒ R	-	0,687
rs144975896	2519	GGG ⇒ GAG	811	G ⇒ E	-	0,995
rs149091458	2629	GCT ⇒ ACT	848	A ⇒ T	-	0,839
rs113404862	3083	AGC ⇒ AAC	999	S ⇒ N	-	1
rs141586578	3185	ATG ⇒ AAG	1033	M ⇒ K	+	0,195

PolyPhen2 Prognose: + benign; - possibly damaging; - probably damaging; | synonymous