

Aus dem Institut für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

**Bedeutung genetischer Varianten von Toll-like-Rezeptoren (TLR) bei  
der schweren Malaria und Untersuchung zum TLR-Liganden  
Glykosylphosphatidylinositol (GPI)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Miriam Songa Stegemann  
aus Stuttgart

Datum der Promotion: 05.12.2014

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin



---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>Abstrakt</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1	Vorbemerkung	4
2.2	Grundlagen	5
2.2.1	Malaria	5
2.2.2	Das angeborene Immunsystem	8
2.2.3	Toll-like Rezeptoren (TLR)	9
2.2.4	Polymorphismen der <i>TLR-2</i> und <i>TLR-4</i>	15
2.2.5	Glycosylphosphatidylinositol (GPI)	18
2.3	Fragestellung und Zielsetzung	21
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1	Genetische Analyse von <i>TLR-4</i> und <i>TLR-2/TIR</i>	23
3.1.1	Patienten und Kontrollen	23
3.1.2	Genotypisierung von <i>TLR-4</i> und <i>TLR-2</i>	25
3.1.3	Genotypisierung – Suche nach neuen <i>TLR-2</i> -SNP	27
3.1.4	Funktionelle Analyse	33
3.2	Untersuchungen zum potentiellen TLR-Liganden <i>P. falciparum</i> -GPI	34
3.2.1	Reagenzien und Plasmide	34
3.2.2	Zellkulturkonditionen	34
3.2.3	Synthetisches <i>Plasmodium falciparum</i> -GPI	34
3.2.4	Zellkultur der RAW264.7-Zellen	35
3.2.5	Bestimmung der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Konzentration in RAW264.7-Zellüberständen	35
3.2.6	Gewinnung, Zellkultur und Stimulation humaner peripherer mononukleärer Zellen ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> , PBMC)	37
3.2.7	HEK293-Zell-Überexpressions-Experimente	39
3.3	Vermeidung von Kontamination	42
3.4	Statistische Auswertung	43

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>44</b>
4.1 Charakteristika der Malariapatienten und der gesunden Kontrollgruppe	44
4.2 Verteilung von TLR-Polymorphismen bei Kindern mit schwerer Malaria und Kontrollen	46
4.2.1 <i>TLR-4</i> Asp299Gly und <i>TLR-4</i> Thr399Ile	46
4.2.2 <i>TLR-2</i> Arg677Trp und <i>TLR-2</i> Arg753Gln	49
4.2.3 <i>TLR-2</i> Leu658Pro	49
4.2.4 Funktionelle Analyse der gefundenen Neumutation <i>TLR-2</i> Leu658Pro	51
4.3 Zellstimulation mit synthetischem <i>Plasmodium falciparum</i> - GPI	52
4.3.1 Stimulation mit <i>Plasmodium falciparum</i> – GPI ohne Lipidanker	52
4.3.2 Stimulation mit <i>Plasmodium falciparum</i> – GPI mit Lipidanker	54
<b>5 Diskussion</b>	<b>58</b>
5.1 Methodenkritik	58
5.1.1 Studiendesign der Fall-Kontroll-Studie zu schwerer Malaria in Tamale	58
5.1.2 Nachweis der <i>Plasmodium falciparum</i> -Infektion und der Parasitendichte	59
5.1.3 Diagnosestellung einer schweren Malaria	59
5.1.4 Vor- und Nachteile der angewendeten Labormethoden	60
5.1.5 Zellstimulation mit synthetischem <i>Plasmodium falciparum</i> - GPI	60
5.2 Genetische Wirtsfaktoren und ihre Relevanz bei <i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i> -Infektion	63
5.3 TLR und Malaria	65
5.3.1 Genotypisierung der <i>TLR-2/TIR</i> -Domäne	66

5.3.2	Neue Mutation in hochkonservierter Region der <i>TLR-2/TIR</i> - Domäne, die zu Funktionsverlust des TLR-2 führt	68
5.3.3	Bedeutung von <i>TLR-4</i> -Polymorphismen bei schwerer Malaria	68
5.3.4	Bedeutung der Befunde zu <i>TLR</i> -Polymorphismen und Malaria	72
6	Abkürzungsverzeichnis	75
7	Abbildungsverzeichnis	80
8	Tabellenverzeichnis	81
9	Literaturverzeichnis	81
10	Eidesstattliche Versicherung	91
11	Lebenslauf	92
12	Danksagung	94

### 1 Abstrakt

Genetische Wirtsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle für die Anfälligkeit gegenüber der Malaria und für den Schweregrad der Erkrankung. Die Malaria tropica infolge der Infektion mit *Plasmodium falciparum* verursacht jährlich eine Millionen Todesfälle. Toll-Like-Rezeptoren (TLR) sind *in vitro* an der Erkennung von *P. falciparum* beteiligt; der Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker des Parasiten induziert über TLR-2 und TLR-4 den Signalweg in den Wirtszellen. Dabei induziert die Interaktion von mikrobiellen Liganden mit dem jeweiligen TLR die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen über die TLR/IL-2-Rezeptor-Domäne. Die TLR sind damit mutmaßlich zentrale Vermittler der Wirtsantwort im Sinne von Zytokinproduktion und Fieber bei der Malaria. Der parasitäre TLR-Ligand GPI induziert im Mausmodell die Symptome einer schweren Malaria. Die Wirkung des *P. falciparum*-GPI auf humane Immunzellen ist dagegen unklar.

Im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie bei 870 ghanaischen Kindern wurde die Bedeutung von *TLR-2*- und *-4*-Polymorphismen hinsichtlich der Anfälligkeit für die schwere Malaria untersucht. Zudem wurden *in vitro* Stimulationsassays mit murinen und humanen Zelllinien durchgeführt, um die Rolle von synthetischem *P. falciparum*-GPI bei der pro-inflammatorischen Antwort zu untersuchen.

Bei Europäern und Asiaten häufige *TLR-2*-Polymorphismen konnten bei den ghanaischen Kindern nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde eine seltene, bisher nicht vorbeschriebene Mutation (Leu658Pro) detektiert, die die Signaltransduktion via TLR-2 beeinträchtigt. Der *TLR-4*-Polymorphismus Asp299Gly fand sich dagegen deutlich häufiger als bei Europäern. In der gesunden Kontrollgruppe wiesen 17.6% diese Variante auf; bei Patienten mit schwerer Malaria lag eine signifikante Häufung dieses Polymorphismus vor (24.1%,  $P < 0.05$ ). In ähnlicher Weise wurde der Polymorphismus *TLR-4*-Thr399Ile bei 2.4% der gesunden Kontrollen und bei 6.2% der Patienten mit schwerer Malaria beobachtet ( $P = 0.02$ ). Das Risiko (Odds), an schwerer Malaria zu erkranken, war bei Trägern der Polymorphismen *TLR-4*-Asp299Gly und *TLR-4*-Thr399Ile 1,5- bzw. 2,6-fach erhöht. Synthetisches *P. falciparum*-GPI induzierte allerdings keinerlei Zytokinproduktion in den untersuchten Zelllinien.

Diese Ergebnisse verweisen erstmals auf die Bedeutung des TLR-Systems für die Manifestation der Malaria *in vivo* und somit auf die prinzipielle Möglichkeit, den

Krankheitsverlauf dementsprechend zu beeinflussen. Insbesondere erhöhen in Afrika häufige *TLR-4*-Varianten das Risiko einer schweren Malaria. Die ausbleibende pro-inflammatorische Antwort bei Stimulation mit synthetischem *P. falciparum*-GPI spricht nicht zwingend gegen die Erkennung dieses Moleküls durch das TLR-System und eine Rolle bei der Pathophysiologie der Malaria, sondern ist wahrscheinlich auf strukturelle Abweichungen des synthetischen vom natürlich vorkommenden GPI zurückzuführen.



Genetic host factors play a critical role in susceptibility to malaria and its severity. Malaria tropica caused by *Plasmodium falciparum* results in over one million deaths annually. Toll-like-receptors have been shown *in vitro* to be involved in recognition of *P. falciparum*. The glycosylphosphatidylinositol anchor of *P. falciparum* induces signaling in host cells via TLR-2 und TLR-4.

The interaction of the microbial ligand and the respective TLR results in the release of proinflammatory cytokines via the TLR/IL-2-receptor (TIR) domain. Thus, TLR may contribute as key host molecules to inflammatory responses including cytokine production and fever in malaria. In mice, *P. falciparum* GPI induces the symptoms of severe malaria while the effect of *P. falciparum* GPI on human immune cells remains unknown.

In a case-control study among 870 Ghanaian children we examined the influence of *TLR-2*- and *-4* polymorphisms in susceptibility to severe malaria. Additionally we examined the role of synthetic *P. falciparum* GPI in the proinflammatory immune response in *in vitro* stimulation assays using murine and human cell lines.

*TLR-2* polymorphisms frequently seen in Caucasians and Asians were completely absent in all Ghanaian children. However, we detected a rare and previously undescribed mutation (Leu658Pro) which impairs signaling via TLR-2 *in vitro*. On the contrary, the *TLR-4* polymorphism Asp299Gly was observed at an extraordinarily higher rate than in Europeans. In healthy controls it was found in 17.6%; in severe malaria patients it occurred at a significantly higher frequency (24.1%,  $P < 0.05$ ). The *TLR-4* polymorphism Thr399Ile was found at similarly high rates, in 2.4% of healthy children and in 6.2% of patients with severe malaria ( $P = 0.02$ ). The polymorphisms *TLR-4* Asp299Gly and *TLR-4* Thr399Ile conferred an 1.5- and 2.6-fold risk of severe malaria. Synthetic *P. falciparum* GPI did not induce cytokine production in the stimulated cells.

These findings suggest an important role of TLR in malaria susceptibility *in vivo* and their potential influence on the progression of the disease. Especially in Africa common *TLR-4* variants predispose to severe malaria. The absence of a proinflammatory immune response to stimulation with synthetic *P. falciparum* GPI observed here does not mean necessarily that TLR do not recognize *P. falciparum* GPI or that it does not play a role in the pathogenesis of malaria. This is more likely explained by structural differences between the synthetic *P. falciparum* GPI and natural GPI.

## 2 Einleitung

### 2.1 Vorbemerkung

Die Malaria stellt eines der wichtigsten Infektionsprobleme der Menschheit dar. Jährlich erkranken 300-500 Millionen Menschen an Malaria. Bei einem Teil der Patienten ist ein schwerer Krankheitsverlauf bis hin zum letalen Ausgang zu verzeichnen. Bis heute verursacht die schwere Malaria jährlich mehr als eine Millionen Todesfälle. Am häufigsten sind afrikanische Kinder unter fünf Jahren im Gebiet südlich der Sahara betroffen [1].

Viele Aspekte der Molekularbiologie, Immunologie und Epidemiologie dieser Erkrankung sind ungeklärt. So versterben nur einige der erkrankten Kinder und andere nicht-immune Patienten, während andere asymptomatisch bleiben oder lediglich eine unkomplizierte Erkrankung entwickeln. Jüngste Forschungsergebnisse zeigen, dass genetische Varianten von Wirtsfaktoren eine zentrale Stellung in der Anfälligkeit für Krankheiten einnehmen [2]. Das bedeutendste Beispiel für einen Polymorphismus, der gegen die schwere Malaria schützt, ist die Sichelzellanämie [3].

Das angeborene Immunsystem nimmt eine wichtige Stellung in der Pathogenese der schweren Malaria ein [4]. Toll-like Rezeptoren (TLR), die als Teil des angeborenen Immunsystems konservierte Antigenstrukturen erkennen, sind maßgeblich an der Erkennung des ätiologischen Organismus *Plasmodium (P.)* beteiligt [5]. Auch bei einer Reihe anderer parasitärer Erkrankungen spielen TLR eine wichtige Rolle, wobei der parasitäre Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker für die Aktivierung des Signalweges in Wirtszellen via TLR verantwortlich zu sein scheint [6], [7], [8], [9].

Polymorphismen der *TLR*-Gene sind assoziiert mit der Anfälligkeit für unterschiedliche Krankheiten. Über das GPI von *P. falciparum* und seine Interaktion mit TLR ist bisher wenig bekannt, wie auch die Frage, welche Rolle *TLR*-Polymorphismen in der Pathogenese der Malaria spielen. Dies wird in dieser Arbeit näher untersucht.

Versteht man die biologische Komplexität der Pathogenese der Malaria, könnte dies der Schlüssel zur Entwicklung eines Impfstoffes und der Produktion neuer Antimalariamedikamente sein.

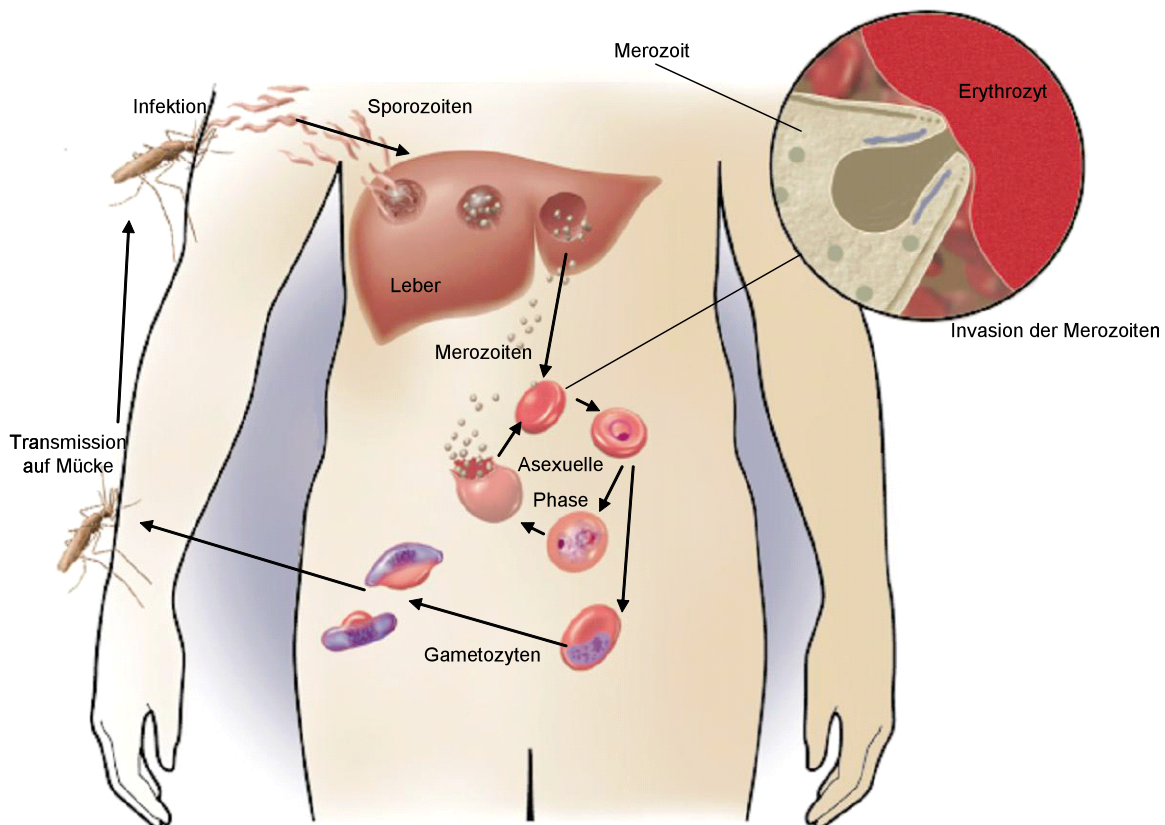
### 2.2 Grundlagen

#### 2.2.1 Malaria

Die Malaria ist neben AIDS und der Tuberkulose eine der Haupttodesursachen durch eine Infektionskrankheit. Sie stellt mit einer geschätzten Morbidität von 300-500 Millionen Erkrankten jährlich nach wie vor eine besonders große Belastung global dar. Etwa 90% der fast eine Millionen (Mio.) Todesfälle aufgrund von Malaria betreffen den afrikanischen Kontinent südlich der Sahara. Ursächlich hierfür ist unter anderem die Tatsache, dass dort der Großteil der Infektionen durch den gefährlichsten der vier humanpathogenen Malariaerreger, *P. falciparum*, verursacht wird [10]. Außerdem ist der effektivste Malariavektor, die Überträgermücke *Anopheles gambiae*, die am weitesten verbreitete Mücke in Afrika. Zudem spielen soziale und ökonomische Faktoren eine große Rolle. Rund eine Mio. Menschen in Afrika sterben jährlich an Malaria, am meisten betroffen sind Kinder unter fünf Jahren und schwangere Frauen [1], [11].

Die Malaria wird hervorgerufen durch parasitische Einzeller der Gattung *Plasmodium*. Neben der lebensbedrohlichen Form der Malaria (*Malaria tropica*), die durch *P. falciparum* verursacht wird, gibt es vier weitere, meist milder verlaufende Krankheitsformen, die durch die Plasmodienspezies *P. vivax*, *P. ovale* (*Malaria tertiana*) und *P. malariae* (*Malaria quartana*) sowie *P. knowlesi* (der Erreger der beim Menschen in Südostasien vorkommenden Affen-Malaria) hervorgerufen werden. Der Lebenszyklus der Plasmodien findet zum einen als Phase der sexuellen Vermehrung in der Überträgermücke statt, was durch Sir Ronald Ross im Jahre 1897 erstbeschrieben wurde [12]. Zum anderen vermehrt sich der Parasit asexuell in humanen Geweben (s. Abbildung 1). Durch einen Mückenstich werden infektiöse Parasitenstadien (Sporozoiten) in die Blutbahn des Wirts übertragen, die hämatogen in dessen Leber gelangen, wo sie sich in den Hepatozyten durch ungeschlechtliche Vielteilung (Schizogonie) zu Merozoiten entwickeln (präerythrozytäre Schizogonie). Bis zu diesem Punkt verläuft die Infektion klinisch asymptomatisch. Nach ca. ein bis drei Wochen bringen die Merozoiten die infizierten Hepatozyten zum Rupturieren und gelangen in die Blutbahn, befallen Erythrozyten und vermehren sich durch erythrozytäre Schizogonie. Es bilden sich intraerythrozytär über die Vermehrungsstadien Trophozoiten und

Schizonten schließlich erneut Merozoiten. Die befallenen Erythrozyten werden zerstört, und die Merozoiten gelangen in den Blutstrom, so dass sie weitere Erythrozyten befallen können. In diesem Stadium kommt es zu klinischen Symptomen wie Fieber, Schüttelfrost und Schweißausbrüchen. Speziesabhängig entwickeln sich nach 5-23 Tagen einige Merozoiten in den Erythrozyten zu sexuellen Stadien, den weiblichen Makro- und männlichen Mikrogametozyten (Geschlechtsstadien). Die Gametozyten werden beim Stich von der Mücke aufgenommen, wandeln sich in der Mücke durch geschlechtliche und anschließend ungeschlechtliche Vermehrung zu Sporozoiten um, die in die Speicheldrüsen der Mücke einwandern. Durch Injektion der Sporozoiten in die Blutbahn eines anderen Menschen schließt sich der Zyklus. [11]



**Abbildung 1. Lebenszyklus der *P. falciparum*-Parasiten**

(modifiziert nach [13])

Der Verlauf von Infektionen wird durch Reaktionen zwischen Erreger- und Wirtsstrukturen bestimmt. Moleküle des Erregers reagieren dabei selektiv mit Zielmolekülen des Wirts, meist um Invasion, Vermehrung und Persistenz des Erregers

zu vermitteln. Zu den Pathogenitätsfaktoren der Plasmodien gehört das GPI (s. Kapitel 1.2.5). Gleichmaßen von Interesse sind Moleküle des Wirts, die für die Entwicklung der Infektionserreger und Ausbildung der Krankheit von essentieller Bedeutung sind. Sie bedingen häufig als Bestandteile des Immunsystems Unterschiede in der Suszeptibilität für Infektionskrankheiten durch die Variabilität ihrer Menge und Struktur. Beispielsweise spielt die unterschiedlich ausgeprägte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine eine Rolle im Verlauf der Malaria [14]. Kommt es durch das GPI der Plasmodien zu einer überschießenden Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF-)  $\alpha$ -Freisetzung, kann dies zur Manifestation einer schweren Malaria führen. Ist dieser Mechanismus mit einer effizienten Parasiteneliminierung ausbalanciert, kann der Verlauf der Erkrankung aber auch abgemildert werden [4].

Wird ein Individuum lebenslang wiederholten Infektionen mit *P. falciparum* ausgesetzt, ist es möglich, eine klinische Teilimmunität gegen Malaria zu entwickeln. Das erworbene Immunsystem reagiert durch die Bildung von Antikörpern, die an verschiedenen spezifischen Entwicklungsstadien angreifen können. Die Abwehrmechanismen des angeborenen und erworbenen Immunsystems können eine Parasitämie einschränken, einem schweren klinischen Verlauf vorbeugen und die Anzahl zirkulierender infizierter Zellen reduzieren. Dies reicht in der Regel jedoch nicht aus, die Infektion vollständig zu eliminieren [15].

Die Ruptur der erythrozytären Schizonten äußert sich durch Fieberschübe, Übelkeit, Kopfschmerzen und andere Symptome einer systemischen proinflammatorischen Zytokinantwort, die durch das angeborene Immunsystem ausgelöst wird. Inter-individuelle Unterschiede in der Krankheitsanfälligkeit und Manifestation der Malaria können teilweise auf angeborene genetische Varianten der Wirtsfaktoren wie die Sichelzellanämie, Hämoglobinopathien und Antigenvarianten von Blutgruppen zurückgeführt werden [3]. Dennoch ist bei weitem noch nicht geklärt, warum einige mit *P. falciparum*-infizierte Kinder lebensgefährlich an schwerer Malaria mit Ausbildung von v. a. schwerer Anämie, metabolischer Azidose und Multiorganversagen erkranken, während andere klinisch lediglich einen fiebrigen Infekt erleiden bzw. asymptomatisch bleiben [13].

### 2.2.2 Das angeborene Immunsystem

Infizieren pathogene Mikroorganismen den Menschen, müssen sie sich zunächst mit seinen konstitutiven Abwehrmechanismen auseinandersetzen. Zu dieser frühen Verteidigungslinie bei Infektionen gehören z. B. die Defensine der Haut, das Komplementsystem und die phagozytotisch aktiven Granulozyten und Makrophagen. Anschließend werden erregerspezifische Abwehrmechanismen aktiviert, die an die klonale Expansion und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten gebunden sind.

Während man bisher das Immunsystem in ein angeborenes, unspezifisches und ein erworbenes, spezifisches unterteilte, zeigen neuere Erkenntnisse, dass auch das angeborene Immunsystem über ein differenziertes Erkennungsrepertoire verfügt und entscheidend an der Induktion der spezifischen Immunantworten auf Antigene und der Differenzierung der Effektormechanismen wie Lymphozytenaktivierung beteiligt ist [16], [17].

Im Rahmen der natürlichen Immunabwehr spielt es eine zentrale Rolle, dass die Zellen des angeborenen Immunsystems Krankheitserreger erkennen und deutlich von körpereigenem Gewebe unterscheiden können. Makrophagen und Monozyten sind mit einer Vielzahl von Rezeptorproteinen, z. B. den TLR, ausgestattet, die dazu fähig sind, Strukturen und molekulare Muster fremder Organismen gruppenspezifisch früh zu erkennen [18]. Die dadurch ausgelöste Sekretion von Botenstoffen wie TNF- $\alpha$  unterstützt die für eine koordinierte Immunantwort notwendige interzelluläre Kommunikation [19].

Bisher war in Zusammenhang mit der Malaria insbesondere das erworbene Immunsystem Gegenstand der Forschung. Besonders im Bereich der Impfstoffentwicklung, deren Ziel es ist, die hohe Malariamorbidity und -mortality zu senken, konzentrierte man sich bisher vorrangig auf das erworbene Immunsystem [13]. Das Potential der angeborenen Immunität, einen schnellen Schutz gegen Malaria auszuüben, wurde bisher weniger beachtet oder untersucht.

Der Mechanismus der Immunreaktion des angeborenen Immunsystems auf eine Plasmodieninfektion ist unzureichend bekannt. Einerseits ist es dem Körper in der Initialphase einer Infektion durch die schnelle Freisetzung proinflammatorischer Zytokine möglich, die Infektion bis zum Einsetzen erworbener Immunmechanismen zu kontrollieren. Das von Makrophagen und dendritischen Zellen sezernierte Interleukin (IL)-12 ist entscheidend für die T-Helferzellen-Typ-1 (TH1)-Zelldifferenzierung, die

ihrerseits Interferon (IFN)- $\gamma$  produzieren. Andererseits ist es möglich, dass durch einen schnellen starken angeborenen Abwehrmechanismus die Pathogenese einer schweren Malaria gefördert wird [4]. Die Freisetzung vieler proinflammatorischer Zytokine wird über den Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor (NF)- $\kappa$ B reguliert. TLR vermitteln als wichtige Transmembranproteine den Zellen des angeborenen Immunsystems eine gewisse Spezifität gegenüber Pathogenen. Die durch sie vermittelte frühe Abwehrlinie ist zum größten Teil NF- $\kappa$ B-abhängig [20].

Als Aktivator des angeborenen Immunsystems im Rahmen verschiedener Infektionen nimmt GPI, das als Oberflächenantigen bei vielen Parasiten vorkommt, eine wichtige Stellung ein. Verschiedene Studien haben GPI-Anker als TLR-Agonisten identifiziert [6], [7], [21].

Für die Entwicklung neuer Strategien im Kampf gegen die Erkrankung, beispielsweise durch eine frühe Parasiteneliminierung oder die Entwicklung eines Malariatoxin-basierten Impfstoffes, der die Infektion blande verlaufen lässt, ist die Erkenntnis entscheidend, ob die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems gegen Malariaerreger auch für den Wirt selbst schädlich sein können und welche Effektormechanismen die Widerstandsfähigkeit gegen eine Infektion fördern.

### 2.2.3 Toll-like Rezeptoren (TLR)

Zu Beginn einer Invasion von Krankheitserregern reagiert der Wirtsorganismus durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems, das die Mikroorganismen angreift und die adaptive Immunreaktion einleitet. Das evolutionär gesehen ältere angeborene Immunsystem ist während der ersten Tage entscheidend für die Abwehr einer Infektion, indem es eine unkontrollierte Ausbreitung verhindert [16].

Wenn Pathogene in den Organismus von Säugern eindringen, kommt es im Rahmen der angeborenen Immunabwehr zur Aktivierung von Endothelzellen, Lymphozyten sowie Monozyten und Makrophagen. Letztere spielen bei der Erkennung und Beseitigung der eingedrungenen Pathogene eine übergeordnete Rolle. Verschiedene Liganden, wie Lipopolysaccharide (LPS), die entzündungsfördernden Endotoxine gramnegativer Bakterien, oder Membranbestandteile grampositiver Bakterien wie Lipoteichonsäure (*lipoteichoic acid*, LTA), Lipopeptide (LP) und

Peptidoglycan (PG) werden unter dem Begriff *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) zusammengefasst. Durch diese PAMP werden immunkompetente Zellen angeregt, Botenstoffe freizusetzen. Zu diesen Mediatoren gehören vor allem Zytokine und Interleukine, insbesondere IL-1 und IL-6, daneben Stickoxid (NO) und der Plättchen-Aktivierende Faktor (PAF) [22]. Damit diese Zellaktivierung nur gezielt durch Pathogen-assoziierte körperfremde Substanzen erfolgt, ist es notwendig, dass die Zielzellen, z. B. mononukleäre Zellen (MNC) wie Monozyten und Makrophagen, diese schädlichen Strukturen von unschädlichen unterscheiden können. Auf der Zielzellmembran müssen sich folglich Proteine oder Proteinkomplexe befinden, die virulente von nicht virulenten Substanzen unterscheiden und davon abhängig ein Signal durch die Zellmembran ins Zellinnere generieren können, das über intrazelluläre Signalkaskaden schließlich zur Produktion und Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und anderen Botenstoffen führt, die auch als kostimulierende Moleküle für die Induktion adaptiver Immunantworten unerlässlich sind [17].

Eine wichtige Rolle bei der Erkennung von PAMP und der Signaltransduktion spielen die TLR. Das Protein Toll wurde erstmals als transmembraner Rezeptor bei der Fruchtfliege *Drosophila spec.* entdeckt [23]. Es stellt eine wichtige Komponente der dorsoventralen Polarisierung während der Embryogenese dar und steuert in adulten Fliegen die Infektabwehr gegen Pilze [24]. Als Reaktion auf Pilzinfektionen vermittelt der Toll-Rezeptor die Produktion fungizider Peptide. Das humane Homologon des *Drosophila*-Toll wurde erstmals von Medzhitov et al. im Jahre 1997 beschrieben [25]. Bei Menschen wurden in allen lymphatischen Geweben (u.a. Monozyten, Makrophagen, Leukozyten) homologe Proteine gefunden, die zur Familie der TLR zusammengefasst werden. Es sind bisher zehn unterschiedliche humane sowie zwölf in Mäusen vertretene TLR beschrieben, die als Rezeptoren für unterschiedliche Pathogene dienen und abhängig vom Liganden unterschiedliche Antworten auf diesen in den Wirtszellen bewirken können. TLR-1 bis TLR-9 kommen sowohl bei Menschen wie auch in Mäusen vor [26]. Die Familie der TLR zählt zu den Schlüsselmolekülen für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems bei der Abwehr von Mikroorganismen [16].



### 2.2.3.1 Aufbau der TLR

TLR sind Transmembranrezeptoren, die eine extrazelluläre Domäne, eine transmembrane Helixdomäne und eine intrazelluläre Domäne aufweisen. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Rezeptor-Tyrosinkinasen. Alle Mitglieder dieser Rezeptorfamilie weisen eine N-terminale, leucinreiche extrazelluläre Domäne auf, die Liganden bindet. Sie besteht aus 600 bis 1000 Aminosäuren und weist je nach TLR 18 bis 31 leucinreiche Sequenzabschnitte (*leucine rich repeats*, LRR) auf. Die zytoplasmatische signalweitergebende Domäne ist homolog zur Zytoplasmadomäne der IL-1-Rezeptoren bei Säugern und wird daher als Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Homologie-Domäne bezeichnet. TLR und IL-1-Rezeptoren aktivieren über ähnliche intrazelluläre Signalwege den universellen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. Die TIR-Domäne besteht als hochkonservierte Region aus etwa 200 Aminosäuren. Sie enthält drei konservierte Bereiche, die für die Signalgebung entscheidend sind [27].

### 2.2.3.2 Die intrazelluläre Signaltransduktion der TLR

Die intrazellulären Signalwege, die durch die Aktivierung über TLR getriggert werden, verlaufen im wesentlichen nach dem gleichen Schema: Durch die Bindung eines Liganden dimerisieren die Monomere dieses Rezeptortyps, und es findet eine Tyrosin-Autophosphorylierung an der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptordimers statt, welche daraufhin enzymatisch aktiv wird. Die TIR-Domäne wird durch Bindung eines Liganden an den extrazellulären Anteil des TLR dazu veranlasst, an das zytoplasmatische Adapterprotein *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) zu binden und es zu aktivieren. MyD88 besitzt am Carboxyl-Ende ebenfalls eine TIR-Domäne, über die es mit der TIR-Domäne des TLR in Wechselwirkung tritt. Am Amino-Ende enthält MyD88 eine Todesdomäne, über die es mit der Todesdomäne der Serinkinase *IL-1 receptor associated kinase* (IRAK) interagiert. IRAK bildet anschließend mit einem weiteren Adapterprotein, dem Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Assoziierten Faktor 6 (TRAF6), einen Komplex. Dieser vermittelt durch Oligomerisierung die Aktivierung einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK). Diese löst nachfolgend eine Kinase-Aktivierungskaskade des Inhibitor-der-NF- $\kappa$ B-Kinasen-Komplexes (IKK) aus, die durch Dimerisierung I- $\kappa$ B, den NF- $\kappa$ B-Inhibitor, phosphorylieren. I- $\kappa$ B ist im Zytosol in einem Komplex mit dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B gebunden und hemmt so dessen Wirkung.

Durch die Phosphorylierung dissoziiert I- $\kappa$ B aus dem Komplex und wird durch Proteasomen abgebaut, sodass NF- $\kappa$ B freigesetzt wird. Es folgt die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus und die Bindung an verschiedene Promotoren, wodurch die Transkription zahlreicher proinflammatorischer Gene aktiviert wird. Die so induzierte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen umfasst TNF- $\alpha$  und verschiedene Interleukine (z. B. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12), die an der Infektabwehr beteiligt sind [17], [20].

Neben den oben genannten Molekülen, die bei der beschriebenen Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen, werden für alternative Aktivierungswege weitere Adapterproteine beschrieben. Hierzu gehört das *TIR domain containing adaptor protein* (TIRAP), welches für einen MyD88-unabhängigen Signalübertragungsweg bei TLR-4 verantwortlich ist [28].

### 2.2.3.3 TLR und ihre Liganden

Den meisten der bisher beschriebenen TLR konnten Liganden zugeordnet werden. Unbekannt sind bisher Verbindungen, die durch TLR-10 und TLR-11 erkannt werden. (s. Tabelle 1, Abbildung 2).

TLR-4 stellt das am besten untersuchte Mitglied der TLR-Familie dar. TLR-4 erkennt CD14-vermittelt LPS aus der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, das eine Rolle in der Genese eines septischen Schocks spielt. Eine direkte Bindung von LPS an TLR-4 ist bisher nicht nachgewiesen. LPS wird im Serum an LPS-Bindendes Protein (LBP) gebunden, welches das LPS dem CD14 präsentiert. Neben löslichem sLBP spielt möglicherweise in die Zellmembran eingebautes mLBP eine Rolle. Versuche mit TLR-4-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass das Vorhandensein von CD14 essentiell für die Zellaktivierung durch LPS ist. Für die TLR-4-abhängige Aktivierung ist zudem die Anwesenheit des Proteins MD-2 notwendig, ohne dessen Bindung an TLR-4 keine LPS-Aktivierung erfolgen kann [29]. Untersuchungen an C3H/HeJ-Mäusen, die eine Punktmutation (Prolin zu Histidin) in der intrazellulären TIR-Domäne von TLR-4 aufweisen, die zu einem dysfunktionalen TLR-4 führt, wie auch an Mäusen mit gezielt eliminierten TLR-4-Gen ergaben, dass die genetischen Varianten eine fehlerhafte LPS-Signaltransduktion zur Folge haben [16], [30]. Hierdurch erhöht sich für die Bakterien die Möglichkeit, sich im Wirt zu vermehren und das Immunsystem

zu schwächen. Andererseits kann eine überschießende Reaktion auf LPS zu einer unkontrollierten Sekretion inflammatorischer Moleküle führen, die ihrerseits für einige Symptome einer Sepsis verantwortlich sind. Neben der Aktivierung von TLR-4 durch bakterielle Lipopeptide konnten virale Proteine [31], [32] und Strukturen von Mykobakterien [33] und Pilzen [34] als Liganden von TLR-4 identifiziert werden.

Für TLR-2 ist bisher die größte Vielfalt an Liganden beschrieben. TLR-2 ist in der Lage, verschiedene bakterielle Produkte wie PG [35], LTA [36] oder LP [37] aus der Zellwand grampositiver Bakterien zu erkennen, wie auch Komponenten von Mykobakterien, Pilzen und dem Masernvirus [20], [38]. Weitere Liganden, insbesondere für TLR-2 und TLR-4, sind beschrieben worden, insbesondere andere bakterielle und virale Moleküle sowie endogene Proteine, z. B. die intrinsischen Mediatoren Hitzeschockproteine (*heat shock proteins*, hsp) [20], [22], [31], [32]. Außerdem zählt GPI des einzelligen Parasiten *Trypanosoma cruzi* zu seinen Liganden [6].

Im Jahre 2005 wurde beschrieben, dass aus *P. falciparum* isoliertes GPI ebenfalls über TLR-2 eine proinflammatorische Immunantwort in Makrophagen auslöst [5]. TLR-2 bildet normalerweise Heterodimere mit TLR-1 oder TLR-6, wodurch eine weitere Diversifizierung der Ligandenspezifität möglich ist [39]. Neben der Aktivierung via TLR-2 konnte auch TLR-4 als Mediator der *P. falciparum*-GPI-induzierten Zellantwort dargestellt werden [5].

DNA von *P. falciparum*, die an das Hämoglobin-Abbauprodukt Hämозoin gebunden ist, aktiviert das angeborene Immunsystem über TLR-9 [40], [41].

Der Ligand für TLR-5 ist das Flagellin aus der Geißel gramnegativer und -positiver Bakterien [42]. Dies konnte mit gereinigten Proteinpräparationen aus Kulturüberständen von *Listeria monocytogenes* gezeigt werden. Nicht-methylierte Cytosin-Guanosin-Dinukleotide (CpG) aus der DNA von Bakterien aktivieren TLR-9 [43].

Für TLR-3 wurde virale doppelsträngige RNA (dsRNA) als Ligand identifiziert [44], für TLR-7 und TLR-8 virale einzelsträngige RNA (ssRNA) [45]. Im Gegensatz zu TLR-2 und TLR-4, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, gehören die vier letzteren, TLR-9 (CpG-DNA), TLR-3 (dsRNA) und TLR-7/8 (ssRNA), zu den TLR, die in Endosomen lokalisiert sind [20].

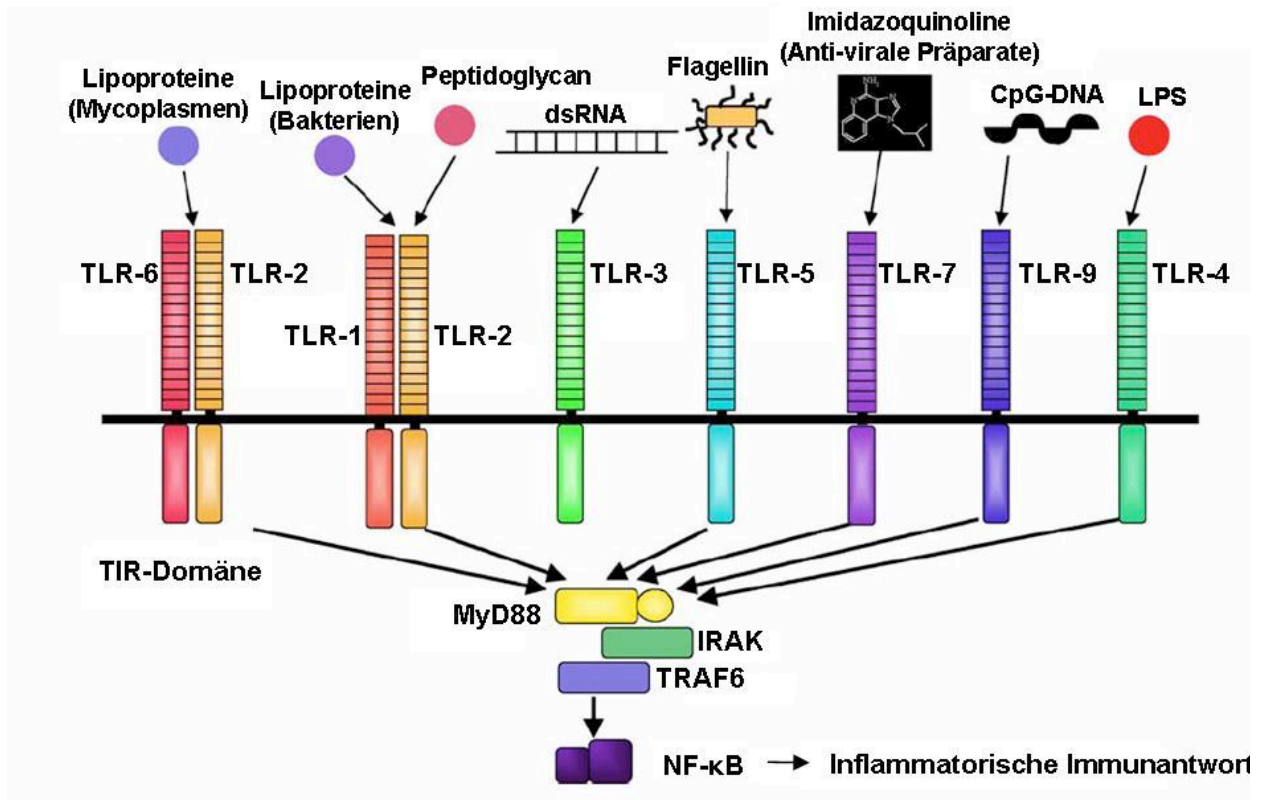


Abbildung 2. Schematische Darstellung der TLR und einiger Liganden

Erkennung von spezifischen Strukturen durch TLR zur Aktivierung von Genen über den NF-κB-Signalweg zur Abwehr von Krankheitserregern.

TLR	Ligand	Ursprung des Liganden
TLR-1	Triacyl-Lipopeptide	Bakterien, Mykobakterien
TLR-2	Peptidoglykane Lipoproteine/Lipopeptide Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Phenol-lösliches Modulin Glycosylphosphatidylinositol Glycosylphosphatidylinositol Glycolipide Porine Zymosan <i>heat shock protein 70</i>	Gram-positive Bakterien Bakterien, andere Pathogene Gram-positive Bakterien Mykobakterien <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>P. falciparum</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> Pilze Wirt
TLR-3	Doppelsträngige RNA	Viren
TLR-4	Lipopolysaccharid Taxol Glycosylphosphatidylinositol Fusionsprotein Hüllprotein <i>heat shock protein 60</i> <i>heat shock protein 70</i>	Gram-negative Bakterien Pflanzen <i>P. falciparum</i> <i>Respiratory Syncytial Virus</i> <i>Mouse Mammary-Tumor Virus</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> Wirt
TLR-5	Flagellin	Bakterien
TLR-6	Diacyl-Lipopeptide Lipoteichonsäure Zymosan	<i>Mycoplasma</i> Gram-positive Bakterien Pilze
TLR-7	Einzelstrang-RNA	Viren (Influenza, HIV)
TLR-8	Einzelstrang-RNA	Viren (Influenza, HIV)
TLR-9	CpG-DNA Haemozoin	Bakterien, Viren <i>P. falciparum</i>
TLR-10	Nicht näher beschrieben	Nicht näher beschrieben
TLR-11	<i>profilin-like molecule</i>	<i>Toxoplasma gondii</i> Uropathogene <i>Escherichia (E.) coli</i>

**Tabelle 1 Liganden der TLR**

(modifiziert nach [20])

### 2.2.4 Polymorphismen der TLR-2 und TLR-4

Wenn ein einzelnes Nukleotid (Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) oder Guanin (G)) des Genoms so verändert ist, dass die DNA-Sequenz modifiziert wird, spricht man von einem SNP (*Single nucleotide polymorphism*), vorausgesetzt, die Variation der einzelnen Basenpaare der DNA kommt bei mindestens 1% der untersuchten Population vor. Viele SNP wirken sich nicht auf die Zellfunktion aus. Einige allerdings könnten sich prädisponierend für die Entwicklung von Krankheiten auswirken [2]. Es konnte gezeigt

werden, dass genetische Varianten sowohl des *TLR-2*, insbesondere der intrazellulären TIR-Domäne, wie auch des *TLR-4* entscheidende Modulatoren während einer Infektion darstellen [18].

Das Gen, das für TLR-2 codiert, befindet sich auf dem Chromosom 4 (*gene map locus* 4q32). Der *TLR-2*-SNP Arg753Gln (R753Q; SNP rs5743708; G2408A, entsprechend der *GenBank acc. no.* NM003264) wurde von Lorenz et al. im Jahre 2000 erstmals beschrieben. Er bewirkt den Austausch von Arginin (Arg, R) zu Glutamin (Gln, Q) an der Position 753 des *TLR-2*-Gens und befindet sich in einer hochkonservierten Region am Ende des C-Terminus von TLR-2. Daher beeinflusst er vermutlich eher die Signalfunktion des Rezeptors als das Binden eines Ligandens [46]. Mit hoher Wahrscheinlichkeit dient der C-Terminus von TLR-2 der Bindung zu Homo- oder Heterodimeren mit Molekülen der Signaltransduktion wie dem MyD88. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass durch diesen Polymorphismus die Signaltransduktion über TLR-2 beeinträchtigt ist [46], [47], [48]. Eine Assoziation des Arg753Gln Polymorphismus mit einer erhöhten Anfälligkeit für Tuberkulose wurde in einem türkischen Studienkollektiv gezeigt. Im Kollektiv der Tuberkulosepatienten trat der SNP 6,04 mal häufiger auf [49]. Weiterhin wurde dieser Polymorphismus in Verbindung mit der Entwicklung atopischer Krankheiten wie Asthma bei Kindern gebracht [50]. Zwischen dem Auftreten des Polymorphismus und der Inzidenz von Sepsis, die durch grampositive Bakterien hervorgerufen wird, gibt es eine positive Korrelation [46]. Einen Schutz scheint dieser Polymorphismus vor der Entwicklung klinischer Symptome des Spätstadiums der Lyme-Borreliose durch *Borrelia (B.) burgdorferi* zu bieten [51]. Andererseits scheint die Anwesenheit eines funktionstüchtigen TLR-2 (Wildtyp, wt) Patienten davor zu schützen, nach erfolgter Herzkranzgefäß-Erweiterung (*percutaneous transluminal coronary angioplasty*, PTCA) eine koronare Restenose zu entwickeln, für deren Ursache entzündliche Prozesse diskutiert werden [52]. In kaukasischen Populationen wurde eine Allelfrequenz von 1% bis zu 14% festgestellt [47], [51], [53].

Ein zweiter klinisch relevanter Polymorphismus des TLR-2 befindet sich innerhalb der TIR-Domäne an Codon 677. Die Basen-Substitution Cytosin→Thymin an der Position 2180 hat zur Folge, dass die hochkonservierte Aminosäure Arginin gegen Tryptophan (Trp, W) ausgetauscht wird (Arg677Trp, R677W; OMIM: 603028.0001; C2180T). Der Polymorphismus konnte in Verbindung mit einer erhöhten Anfälligkeit für lepromatöse Lepra bei Asiaten gebracht werden [54]. Außerdem wurde beschrieben,

dass der Polymorphismus das Risiko erhöht, an Tuberkulose zu erkranken. Unter tunesischen Tuberkulosepatienten wurde eine Allelfrequenz von 47% beobachtet [55]. Auch hier konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Mutation Arg677Trp die Aktivierung von NF- $\kappa$ B über TLR-2 verhindert [48]. Bei Kaukasiern scheint diese nicht-synonyme Mutation eher selten bzw. gar nicht vorzukommen [47], [53]. In einem spanischen Studienkollektiv, das Patienten mit den Autoimmunkrankheiten Rheumatoide Arthritis (RA) und Systemischer Lupus Erythematosus (SLE) und gesunde Kontrollen einschloss, wurde der SNP Arg677Trp ebenfalls gar nicht detektiert (n=545); der oben beschriebene SNP Arg753Gln wurde bei 1-2% gefunden [53]. Die gefundenen hohen Allelfrequenzen des SNP Arg677Trp einiger Studien wurden rückblickend in Frage gestellt, da die Existenz eines Pseudogens unter Umständen zu falsch positiven Ergebnissen geführt hat. Ein Duplikat des Exon 3 von *TLR-2*, das die Variante enthält, liegt etwa 23 Kilo-Basenpaare (kb) aufwärts des *TLR-2*-Gens [56].

Ein weiterer SNP, Pro681His, befindet sich in der zytoplasmatischen Domäne des TLR-2 und inaktiviert als dominant-negative Mutation ebenfalls den Signalweg über TLR-2 [48]. Die Positionen der beiden Mutationen Arg677Trp und Pro681His befinden sich nur wenige Basenpaare voneinander entfernt.

Die klinische Signifikanz für die Anfälligkeit und Manifestation der Malaria ist bei *TLR-2*-Genvarianten mit veränderter Pathogenerkennung und Signaltransduktion nicht bekannt.

Auf dem Gen, das den TLR-4 codiert, gibt es zwei bekannte nicht-synonyme Mutationen, die häufig kombiniert gefunden werden (*gene map locus* 9q32-q33). Sie sind auf dem Exon 4 des *TLR-4*-Gens lokalisiert. Sie befinden sich innerhalb der extrazellulären Domäne des Rezeptors und haben daher eher einen Einfluss auf die Ligandenerkennung [57]. Der *TLR-4*-SNP Asp299Gly (D299G; A896G; rs4986790; OMIM: 603030.0001; A12874G entsprechend der *GenBank acc. no.* AF177765) hat den Austausch des konservierten Aspartats (Asp, D) durch Glycin (Gly, G) zur Folge. *In vitro* zeigt sich eine unterbrochene Signaltransduktion über TLR-4 aufgrund des SNP [58]. Der *TLR-4*-SNP Thr399Ile (T399I; C1196T; rs4986791; OMIM: 603030.0002) bewirkt eine Substitution des nichtkonservierten Threonins (Thr, C) durch Isoleucin (Ile, T). Diese beiden Polymorphismen – Asp299Gly und Thr399Ile – stehen in Zusammenhang mit einer reduzierten Reagibilität auf inhaliertes LPS [58]. Unter Kaukasiern findet man sie mit einer Frequenz von 10% [51]. Es wurde gezeigt, dass

Träger der SNP Asp299Gly und Thr399Ile ein erhöhtes Risiko haben, einen septischen Schock durch gramnegative Mikroorganismen zu erleiden [59], [60]. Auch die Anfälligkeit für eine Infektion durch das gramnegative Bakterium *Gardnerella spp.* und Anaerobier ist erhöht bei Patienten, die diese Polymorphismen tragen [61]. Das Risiko, eine diseminierete Candidiasis zu erleiden, ist ebenfalls durch die Anwesenheit dieser Polymorphismen erhöht [62]. Im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen, die darauf hinweisen, dass die SNP einen eher negativen Einfluss auf den Verlauf von Infektionskrankheiten haben, gibt es Studien, die zeigen, dass der SNP Asp299Gly möglicherweise einen Schutz vor Arteriosklerose bietet [63], [64]. Auch in Bezug auf nicht-allergisches Asthma haben die Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile einen nutzbringenden Effekt [65]. Da viele Studien, die das Vorkommen dieser Polymorphismen untersuchen, mit kleinen Studienkollektiven durchgeführt worden sind, wurden teilweise widersprüchliche Beobachtungen gemacht [18], [66]. Während man in einer großen Studie keine Assoziation zwischen den *TLR-4*-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile und einer Meningokokken-Meningitis finden konnte, war es möglich, die Summe anderer, sehr seltener Mutationen auf dem *TLR-4*-Gen in Zusammenhang mit einer erhöhten Anfälligkeit zu bringen [67], [68].

### 2.2.5 Glycosylphosphatidylinositol (GPI)

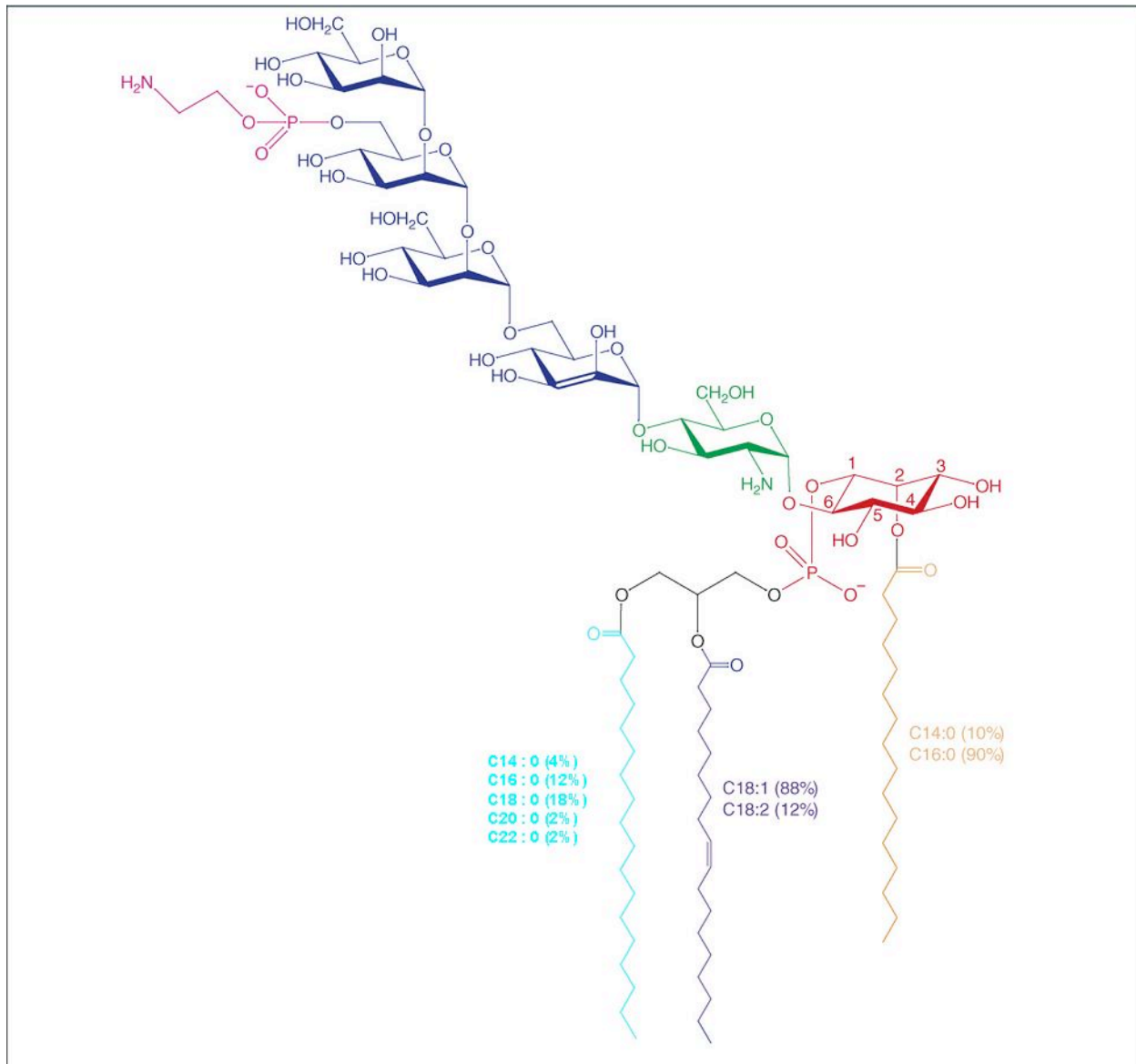
Im Rahmen einer Infektion durch Parasiten wird das angeborene Immunsystem aktiviert. GPI, ein Oberflächenantigen der Parasiten, wurde als TLR-Agonist beschrieben und aktiviert das angeborene Immunsystem [8].

GPI von *Trypanosoma cruzi* [6], *Leishmania spec.* [7] und *Toxoplasma gondii* [8], [9] wurden als TLR-Agonisten identifiziert, wobei TLR-2 und TLR-4 die wichtigste Rolle spielen. GPI der Parasiten induziert in Makrophagen die Produktion proinflammatorischer Zytokine. Man geht davon aus, dass das GPI von *P. falciparum* an der Pathogenese von Malaria mitverantwortlich ist. Es wurde gezeigt, dass das GPI von *P. falciparum* den Signalweg über TLR-2 und zu geringerem Ausmaß über TLR-4 induziert [5].

GPI ist ein evolutionär hochkonserviertes Glycolipid. Die Glykolipidanker der parasitischen Protozoen weisen ein gemeinsames Grundgerüst auf, dessen entgeltige Feinstruktur von der Zellart abhängt [69]. Sie sind strukturell mit Phosphatidylinositol,



einem Membranphospholipid, verwandt. Sie haben funktionelle Bedeutung für die Verankerung von Proteinen in Zellmembranen, ihren Transport und bei intrazellulären Signaltransduktionsvorgängen sowie als Pathogenitätsfaktoren. Bei Parasiten kommt GPI auch als freies Lipid vor. Das GPI von *P. falciparum* unterscheidet sich strukturell vom GPI anderer Parasiten (s. Abbildung 3). Plasmodien bilden während ihrer asexuellen Entwicklungsphase im Menschen Oberflächenproteine wie die Merozoitenoberflächenproteine MSP-1 (*merozoite surface protein 1*), MSP-2, MSP-4, MSP-5 und MSP-10 sowie das *rhoptry-associated membrane antigen* (RAMA). Diese sind durch einen GPI-Membran-Anker in der Parasitenmembran verankert [70]. Da die meisten der GPI-verankerten Proteine für die Invasion von Erythrozyten eine wichtige Rolle spielen, ist das GPI unentbehrlich für das Überleben des Parasiten [71]. Vor diesem Hintergrund stellt das GPI der Plasmodien eine evolutionär gesehen hochkonservierte Struktur dar. Es wird angenommen, dass das angeborene Immunsystem des Wirtes diese konservierten Strukturen erkennen kann und mit einer proinflammatorischen Immunantwort darauf reagiert [72].



**Abbildung 3. Struktur des *P. falciparum*-GPI**

(modifiziert nach [73]) Das GPI des Parasiten setzt sich aus vier Mannose-Ringen (dunkelblau), Glucosamin (grün) und Inositol (rot) zusammen. Der Tetramannosylglucosaminyl-Pentasaccharid-Kern ist mit dem Phosphatidylinositol verbunden. Die drei inneren Mannose-Ringe, der Ethanolamin-Phosphat-Substituent (pupurrot) am dritten Mannose-Ring und das Glucosamin bilden die hochkonservierte Glykan-Grundstruktur. Die Zusammensetzung der Lipidsäureketten des *P. falciparum*-GPI ist sehr heterogen (Vorkommen in Prozentangabe in Klammern). Typischerweise befinden sich an der *sn*-1-Position eine gesättigte Fettsäure, an der *sn*-2-Position eine ungesättigte Fettsäure und an C-2 des Inositols eine weitere gesättigte Fettsäure.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen das *P. falciparum*-GPI die Symptome einer schweren Malaria induziert, was durch eine vorangehende Impfung

verhindert werden konnte. Die Impfung der Mäuse wurde mit synthetischen Oligosacchariden durchgeführt, die der „nicht-toxischen“ Glykanstruktur des *P. falciparum*-GPI-Ankers gleichen, und trotzdem eine immunogene Wirkung haben [74]. Man geht davon aus, dass beim Menschen eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von anti-GPI-Antikörpern und einem Schutz vor klinischer Malaria besteht [75]. Das GPI von *P. falciparum*, das aus dem Hauptoberflächeneiweiß der Merozoiten (MSP1 und MSP2) gewonnen wurde, induziert *in vitro* in Makrophagen die Expression inflammatorischer Zytokine wie IL-1 und TNF- $\alpha$  [76], [77], wie auch über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B die Expression von Adhäsionsmolekülen (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1; *vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1; E-Selektin) [78] und NO [74], [78], [79]. Für die Aktivierung der Makrophagen durch GPI müssen offenbar der Kohlenhydrat- und der Lipidanteil des Moleküls in einer kovalent gebundenen Form vorliegen [80].

### 2.3 Fragestellung und Zielsetzung

Die schwere Form der Malaria tropica verursacht in Afrika südlich der Sahara jährlich mindestens eine Millionen Tote, am schwersten betroffen sind hierbei Kinder im Alter unter fünf Jahren [1]. Das angeborene Immunsystem spielt in der Abwehrreaktion auf den Erreger *P. falciparum* eine entscheidende Rolle. GPI, ein Oberflächenantigen von *P. falciparum* und anderen Protozoen, aktiviert das angeborene Immunsystem des Wirtes über TLR-2 sowie TLR-4 [5], [17], [73]. Über den TLR-Signalweg wird so eine proinflammatorische Zytokinfreisetzung induziert, wodurch die typischen Symptome einer Malaria wie Fieber entstehen. Genetische *TLR*-Varianten spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer Infektion und in der Manifestation der Krankheit [18]. Das Auftreten von Polymorphismen in den Genen für *TLR-2* und *TLR-4* könnte einen Einfluß auf das Risiko einer Infektion sowie auf die Schwere der Malaria haben. Bisher gibt es keine Daten zur Auswirkung von bekannten *TLR-2*-SNP Arg753Gln und Arg677Trp sowie der bekannten *TLR-4*-SNP Asp299Gly und Thr399Ile auf das Risiko oder die Manifestation der Malaria.

Bei Mäusen wurde gezeigt, dass *P. falciparum*-GPI die Symptome einer schweren Malaria induziert, was durch eine vorangehende Impfung mit synthetischem

GPI verhindert werden konnte [74]. Der genaue Mechanismus einer Immunantwort mit GPI-Antikörperbildung beim Menschen ist bisher unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, in einer Fall-Kontroll-Studie die Auswirkungen der bekannten *TLR-2*- und *-4*-Polymorphismen auf das Risiko und die Manifestation der Malaria bei Kindern in Ghana zu untersuchen. Zusätzlich wurde die *TIR*-Domäne des *TLR-2* auf noch unbekannte Polymorphismen untersucht und ihre Relevanz für die Manifestation der schweren Malaria überprüft. Ziel war hier, zur Entschlüsselung des komplexen Signaltransduktionsweges über *TLR-2* und *TLR-4* und seiner Bedeutung im Rahmen der Malaria einen Beitrag zu leisten.

Ferner sollte die Interaktion von synthetischem *P. falciparum*-GPI und *TLR-2* und *TLR-4* untersucht werden, um einen Zusammenhang mit der Expression von proinflammatorischen Zytokinen nach Stimulation mit GPI zu erfassen.

Zusammengefaßt sollen in dieser Arbeit die Bedeutung genetischer Varianten von *TLR* bei der schweren Malaria sowie der *TLR*-Ligand GPI unter folgenden Fragestellungen untersucht werden:

- Besteht bei ghanaischen Kindern zwischen den bekannten *TLR-2*-SNP Arg753Gln und Arg677Trp sowie den bekannten *TLR-4*-SNP Asp299Gly und Thr399Ile ein Zusammenhang mit dem Risiko und der Manifestation einer Malaria?
- Lassen sich bisher unbekannte Polymorphismen in der *TIR*-Domäne des *TLR-2* nachweisen und haben sie eine Relevanz für das Risiko einer Malaria oder die Schwere der Erkrankung?
- Läßt sich durch die Stimulation von *TLR-2* und *TLR-4* durch synthetisches *P. falciparum*-GPI ein eine proinflammatorische Immunantwort induzieren?

### 3 Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben der Studiengruppe wurden nach einem Studienaufenthalt der Verfasserin dieser Arbeit in Tamale, Ghana, vom Institut für Tropenmedizin in Berlin zur genetischen Analyse im Institut für Mikrobiologie und Hygiene zur Verfügung gestellt. Die Verfahren zur Genotypisierung und Suche nach neuen Polymorphismen wurden durch die Verfasserin dieser Arbeit für alle Proben durchgeführt. Die Daten zu bekannten *TLR-2*- und *TLR-4*-Polymorphismen wurden von PD L. Hamann zur Verfügung gestellt; die Methoden wurden exemplarisch für einzelne Proben selbständig von der Verfasserin durchgeführt. Die beschriebenen Experimente zum potentiellen TLR-Liganden GPI wurden ebenfalls von der Verfasserin selbständig durchgeführt.

Soweit nicht in den einzelnen Kapiteln anders angegeben, wurden folgende allgemeine Materialien verwendet:

- Chemikalien (Sigma, Deisenhofen; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe)
- Materialien:
  - Pipetten (Eppendorf® Multipette®, Gilson® Pipetman®)
  - Mikrotiterplatten(96-Loch), MaxiSorp-ELISA-Platte (NUNC, Wiesbaden), Zellkulturplatten (12-Loch), Zellkulturflaschen
  - Reaktionsgefäße-Gefäße (Eppendorf, Hamburg; Biozym, Hess. Oldenburg; Carl Roth, Karlsruhe)
- Geräte:
  - Zentrifugen: Tischzentrifuge Centrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)
  - Avanti™30 Centrifuge (Beckmann, München)
  - CS-15 R Centrifuge (Beckmann, München)
  - Kühlzentrifuge Centrifuge 5403 (Eppendorf, Hamburg)
  - Vortexer (Rüttler): VortexGenie 2 (Scientific Industries, New York, USA)
  - Neubauerzählkammer
  - Mikroskop
  - Inkubator: Mini Oven MK II (MWG-Biotech, Ebersberg)
  - Schüttler: Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
  - S411 (MLW, Medingen)
  - Multifunktions-Spektrometer SPECTRA Fluor Plus (Tecan, Crailsheim)

### 3.1 Genetische Analyse von TLR-4 und TLR-2/TIR

#### 3.1.1 Patienten und Kontrollen

Die Studiengruppe setzte sich aus 290 Kindern mit schwerer Malaria, 290 Kindern, die infiziert, jedoch asymptomatisch waren, und 290 gesunden Kontrollen, die passend in

Hinblick auf Alter und Geschlecht ausgesucht wurden, im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie zusammen. Für die Genotypisierung der *TLR-2/TIR*-Domäne wurden aus dieser Gruppe 100 Kinder mit schwerer Malaria und 100 gesunde Kontrollen eingeschlossen. Die Proben stammen aus Tamale und seiner Umgebung in der *Northern Region* in Ghana. Tamale ist die Hauptstadt der Region mit etwa 350000 Einwohnern und besitzt ländlichen Charakter. Das Klima und die Vegetation der Studiengegend sind durch die westafrikanische Savanne geprägt. Die Malaria kommt hyperendemisch (>75% Parasitämierate bei Kindern zwischen 2 und 9 Jahren) und ganzjährig vor [81].

Bei der Auswahl der erkrankten Kinder wurden die Kriterien der WHO (2000) für die schwere Malaria berücksichtigt [82]. Nach diesen Kriterien leidet ein Patient mit einer *P. falciparum*-Infektion und keiner anderen nachweisbaren Ursache für die Symptome an einer schweren Malaria, wenn er mindestens eines der folgenden Symptome aufweist: Prostration (definiert als die Unfähigkeit eines Kindes, zu sitzen, obwohl es ansonsten dazu in der Lage ist, für jüngere Kinder gilt analog die Unfähigkeit zu trinken), Bewusstseinsbeeinträchtigung (gemäß der Blantyre-Koma-Skala [83]), schwere Anämie (Hämoglobin (Hb) < 5 g/dl), respiratorische Insuffizienz (definiert durch Kussmaulsche Atmung, anhaltendes Nasenflügeln und tiefe, subcostale Einziehungen), generalisierte Krampfanfälle ( $\geq 2/24$  h), Kreislaufkollaps (festgelegt durch einen systolischen Blutdruck < 60 mm Hg bei Kindern jünger als fünf Jahre bzw. < 80 mm Hg bei Kindern älter als fünf Jahren in Kombination mit klinischen Zeichen verminderter Perfusion (unterkühlte Extremitäten, fehlende periphere Pulse), Lungenödem, abnorme Blutungsneigung, Ikterus und Hämoglobinurie).

Die Fallgruppe wurde zum Ende der Regenzeit 2002 (August bis November) im Referenzkrankenhaus der Region, dem Teaching-Hospital in Tamale, rekrutiert. Die rektal gemessene Temperatur, Kreislaufparameter und die Atemfrequenz wurden dokumentiert.

Die Kontrollen wurden nach Alter und Geschlecht gematched aus einer größeren Querschnittsstudie mit 2107 Kindern aus der Gegend von Tamale [84] ausgesucht. Die klinischen Daten [85] der Patienten sowie das Studiendesign [81] sind veröffentlicht.

Die DNA wurde bei den Patienten und der Kontrollpopulation aus Blut gewonnen, das aus einer peripheren Vene entnommen und mit EDTA stabilisiert wurde. Mittels kommerzieller Kits und entsprechend deren Protokollen (AS1 und QIAmp, Qiagen, Hilden) wurde die DNA extrahiert.

Die Plasmodien wurden mikroskopisch mittels Giemsa-gefärbten Dicken Tropfen pro 500 Leukozyten ausgezählt [81], [85]. Durch eine spezifische Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde verifiziert, dass es sich um eine Infektion mit *P. falciparum* handelt [86]. Eine Parasitendichte von >250000 Parasiten/μl Blut wurde als Hyperparasitämie definiert. Die Hb-Konzentrationen wurden mit einem HemoCue Hb-Photometer (HemoCue, Angelholm, Schweden) gemessen, die Blutspiegel von Glukose und Laktat wurden photometrisch mit einem Vario Photometer (Diaglobal, Berlin) bestimmt. Eine schwere Anämie wurde als Hb < 5 g/dl, eine Hypoglykämie als Glukose < 40 mg/dl [ $< 2,2$  mmol/l], und eine Hyperlaktatämie als Laktat  $\geq 5$  mmol/l definiert.

Die Patienten mit schwerer Malaria erhielten als Therapie Artesunat (Plasmotrim, Mepha, Schweiz) in einer Dosis von 5 mg/kg KG über fünf Tage mit doppelter Dosis am ersten Tag. Waren weitere, supportive Maßnahmen indiziert, wurden diese durchgeführt.

Die Eltern der Studienteilnehmer wurden ausführlich aufgeklärt und gaben schriftlich ihre informierte Einverständniserklärung ab. Die datenschutzrechtlichen Bestimmungen wurden eingehalten. Prüfung und Freigabe des Studienprotokolls erfolgte durch das Ethikkomitee der *University for Development Studies*, Tamale.

#### 3.1.2 Genotypisierung von *TLR-4* und *TLR-2*

Für die schnelle Genotypisierung der bekannten *TLR-2*-Polymorphismen Arg677Trp und Arg753Gln wurde eine etablierte Methode einer allel-spezifischen PCR durchgeführt [47]. Die *TLR-4*-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile wurden mittels Real-Time-PCR detektiert [87].

Die allel-spezifische PCR wurde nach der von Schröder *et al.* publizierten Methode zur Detektion der zwei *TLR-2*-Polymorphismen Arg677Trp und Arg753Gln durchgeführt [47]. Hierbei wurden zwei Primer eingesetzt, die eine Region der *TLR-2/TIR*-Domäne umspannen, die beide *TLR-2*-Polymorphismen beinhaltet (sense 5'-GCCTACTGGGTGGAGAACCT-3' und antisense 5'-GGCCACTCCAGGTAGGTCTT-3'). Ein weiterer Primer wurde eingesetzt, der nur den einen SNP Arg753Gln ermittelt (sense 5'-GGGACTTCATT-CCTGGCAAGT-3'). Die PCR wurde mittels Quiagen *Taq* Polymerase durchgeführt. Der PCR-Ansatz mit einem Volumen von 25 μl setzte sich

zusammen aus 2,5 µl 10x Pufferlösung, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µl Desoxyribonukleosid-Triphosphat-Mix (Clontech, Heidelberg, 200 µM) und je 25 pmol pro Primer. Dem Reaktionsansatz wurde etwa 40 ng DNA hinzugefügt. Die allelspezifische PCR wurde nach folgendem Programm im Hybaid OmniGene Thermocycler durchgeführt (s. Tabelle 2):

Hitzenaturierung (Strangtrennung)	10 min	95 °C
30 Syntheszyklen		
1. Strangtrennung	30 s	95 °C
2. Primeranlagerung (annealing)	30 s	58 °C
3. Strangsynthese	25 s	72 °C
Terminale Elongation (final extension)	5 min	72 °C

**Tabelle 2. Programm der PCR-Zyklen der allel-spezifischen PCR**  
anschließende Kühlung bei 4 °C

Anschließend wurden 3 µl des PCR-Produktes für 2 h mit 0,5 U *Acil* (New England Biolabs, Braunschweig) in einem Gesamtvolumen von 10 µl bei 36 °C über Nacht inkubiert. Durch RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) ließen sich die TLR-2 wt bzw die SNP Arg677Trp und Arg753Gln identifizieren. Die Proben wurden zur darauffolgenden Elektrophorese auf ein Gel gegeben, das aus 1,5% Agarose (Roth, Braunschweig) und 0,75% NuSieve (Biozym, Hessisch Oldendorf) bestand. Für 1,5 h wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 70V durchgeführt.

Zur Untersuchung der TLR-4-Polymorphismen Asp299Gly (A12874G) und Thr399Ile (C13174T) wurde die von Hamann *et al.* etablierte Methode einer Real-Time-PCR am *LightCycler* eingesetzt [87]. Der schnelle Nachweis beider *TLR-4*-SNPs gelang durch eine Reaktion mittels fluoreszenzmarkierter Hybridisierungssonden. Die PCR erfolgt bei dieser Methode in Glaskapillaren, die lichtdurchlässig sind und durch eine große Oberfläche schnelle Temperaturwechsel ermöglichen und dadurch die Dauer der Reaktion verkürzen. Die Quantifizierung des PCR-Produktes erfolgt in Echtzeit („quantitative Real-Time-PCR“).

Zunächst wurde die DNA wie in der Standard-PCR mit dem Einsatz von Primern und Polymerase amplifiziert. Der PCR-Reaktionsansatz (20 µl) bestand neben 2 µl FastStartHybridization-Sonden-Mix (Roche Diagnostics) aus 5 µl DNA (2 – 10 ng/µl), je 0,5 µM Primern (TLR-4-sense und TLR-4-antisense) (TIB MOLBIOL, Berlin), 4 mM MgCl<sub>2</sub> und je 0,2 µM einer Hybridisierungssonde (TLR-4-Sensorsonde und TLR-4-



Ankersonde). Die Sensorsonde war für den SNP A12874G mit Fluoreszein am 3'-Ende markiert, die Ankersonde mit LightCycler Red 640 bzw. LightCycler Red 705 am 5'-Ende. Für den anderen SNP war die Markierung umgekehrt. Die Real-Time-PCR wurde unter den in Tabelle 3 beschriebenen Konditionen durchgeführt:

Hitzenaturierung (Strangtrennung)	10 min	95 °C	
50 Syntheszyklen			
1. Strangtrennung	0 s	95 °C	20 °C/sec
2. Primeranlagerung (annealing)	10 s	54 °C	
3. Strangsynthese	25 s	72 °C	

**Tabelle 3. Programm der Real-Time PCR am *LightCycler***

Im Anschluß an die PCR wurde eine Schmelzkurve erstellt: Ein Zyklus bei 95 °C für 0 s, 52 °C für 40 s, gefolgt von einer kontinuierlichen Erhöhung der Temperatur (0,05 °C/s) bis 80 °C. Die Sensorsonden umspannen die SNPs und besitzen verschiedene Schmelztemperaturen, je nach dem, ob sie an einen Wildtypstrang oder einen mutiertes Allel binden. Die Ankersonden wurden so entworfen, dass sie eine signifikant höhere Schmelztemperatur besitzen als die entsprechende Sensorsonde. Um zu vermeiden, dass es durch die gleichzeitige Genotypisierung zweier SNPs zu Störungen der verschiedenen Fluoreszenzkanäle kommt, wurde das LightCycler color compensation set (Roche Diagnostics) eingesetzt. Bei Überschreiten der Schmelztemperatur während der Temperaturerhöhung lösten sich die Sonden, was zu einem Abbruch des Fluoreszenzsignals führte. Jede Sonde und Reaktion hatte einen charakteristischen Schmelzpunkt. Anhand der Schmelzpunkte und des Kurvenverlaufs erfolgte die Genotypisierung.

#### 3.1.3 Genotypisierung – Suche nach neuen *TLR-2*-SNP

##### 3.1.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation definierter DNA-Sequenzen aus cDNA-Ansätzen erfolgte mittels der PCR, einer konventionellen *in vitro* Methode, um DNA zu vervielfältigen [88]. Es wurden 100 Proben von Kindern mit schwerer Malaria und 100 Proben von gesunden, aparasitämischen Kontrollen untersucht. Der Ablauf der Reaktionszyklen der PCR

erfolgte vollautomatisch und temperaturgesteuert im Thermocycler (T3 Thermocycler (Biometra®, Göttingen)).

Lösungen:

- DNA-Lösung
- H<sub>2</sub>O
- MgCl<sub>2</sub>-Lösung: 50 mM-Lösung (Rapidozym, Berlin)
- Puffer: 10x PCR-Puffer (Rapidozym)
- Primer: 10 µM-Lösungen (TipMolbiol / MWG, Berlin), Beschreibung s. Text
- Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs) der Basen Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin; 1 ml Lösung: 2,5 mM (Rapidozym)
- Taq-DNA-Polymerase: 5 Units / µl (Rapidozym, Berlin)

Die Primer für die DNA-Amplifikation haben die Sequenzen sense 5'-CTCGGTGTCGGAATGTACAG-3' und antisense 5'-CTAGGACTTTATCGCAGCTCTC3', die die Region des C-Terminus 616-Basenpaares inklusive der *TLR2/TIR*-Domäne umspannen (Gen-Bank-Zugangsnummer: U88878). Sie wurden so gewählt, dass sie weder zu anderen genomischen Sequenzabschnitten noch zu sich selbst komplementär sind. Die vom Primer abhängige optimale MgCl<sub>2</sub>-Konzentration wurde empirisch ermittelt. Die Anlagerungstemperatur ergibt sich näherungsweise aus der Schmelztemperatur  $TM = 2 * [AT] + 4 * [GC]$  der Oligonucleotide.

Für den PCR-Ansatz wurde zunächst ein Mastermix aus H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>, Puffer, Primern und dNTPs für alle Proben zusammenpipettiert. Anschließend wurde die Proben-DNA in die PCR-Gefäße vorgelegt. Aufgrund ihrer Empfindlichkeit wurde erst jetzt die tiefgekühlte Taq-DNA-Polymerase dem Mastermix hinzugefügt und dieser auf die Röhrchen verteilt. Um selbst geringe Kontamination des Reaktionsansatzes auszuschließen, wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt, welche aus dem gleichen Reaktionsansatz ohne DNA bestand. Die PCR-Röhrchen wurden nun in das PCR-Gerät (*Cycler*) gestellt, das bereits auf 94 °C vorgewärmt war, und durchliefen dort die Amplifikationsreaktion nach folgendem Schema (s. Tabelle 4):

Hitzenaturierung (Strangtrennung)	10 min	95 °C
40 Syntheszyklen		
1. Strangtrennung	30 s	95 °C
2. Primeranlagerung ( <i>annealing</i> )	30 s	58 °C
3. Strangsynthese	25 s	72 °C
Terminale Elongation ( <i>final extension</i> )	10 s	72 °C

**Tabelle 4. Programm der PCR-Zyklen**

anschließende Kühlung bei 4 °C

### 3.1.3.2 Aufreinigung des PCR-Produktes

Die Aufreinigung diente dazu, nicht-inkorporierte Primer, dNTPs und die Polymerase von dem PCR-Produkt zu trennen. Zur Aufreinigung des PCR-Produktes wurde zunächst die DNA an eine Silica-Matrix mithilfe eines chaotropen Salzes gebunden. Es folgte ein Waschschrift mit ethanolhaltigem Waschpuffer. Anschließend wurde die DNA mit H<sub>2</sub>O eluiert, und durch den Einsatz von Filtereinsätzen in die Röhrchen in einem Zentrifugationsschritt vom Silicamaterial getrennt (Filtrationssäule: Spin module (QBiogene, Heidelberg)).

#### Lösungen:

- 25 µl PCR-Produkt
- 6 M NaI
- Silica-Matrix: Silica (Sigma, Deisenhofen) gelöst in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline, PBS), pH 7,5  
3 M NaI
- Waschpuffer: 50 mM NaCl  
10mM Tris (Merck, Darmstadt), pH 7,5  
2,5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)  
50 % v/v Ethanol
- H<sub>2</sub>O

Das PCR-Produkt wurde mit 50 µl 6 M Natriumjodid und 3 µl Silica-Matrix zusammenpipettiert und gemischt. Nun ließ man die Lösung bei Raumtemperatur (RT) zehn Minuten inkubieren, zwischendurch musste sie immer wieder gemischt werden. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert, das Pellet in 50 µl Waschpuffer resuspendiert, zentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNA in 20 bis 25 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Min bei 37 °C wurde das Eluat auf die Filter pipettiert. Durch einen abschließenden Zentrifugationsschritt (16000 x g, 2 min, 20°C) wurde die DNA-Lösung von den Silicapartikeln getrennt.

### 3.1.3.3 Agarosegel

In der Agarosegelelektrophorese wurde nach erfolgter PCR und Aufreinigung das Amplifikat kontrolliert und die DNA-Menge geschätzt [89]. Für die anschließende Sequenzierung ist es notwendig, dass die PCR-Produkte in ihrer Größe homogen sind. Das pflanzliche Polysaccharid Agarose bildet im Gel „netzähnliche“ Strukturen, durch die die entstandenen DNA-Fragmente während der Elektrophorese ihrer Größe

entsprechend im elektrischen Feld wandern. Durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid konnte die DNA im UV-Licht visualisiert werden (Gel-Elektrophoresekammer: Quick Screening Horizontal Gel Electrophoresis Unit, Model QSH (International Biotechnologies, New Haven, USA), Spannungsgerät: ST 305 Electrophoresis Power Supply (Gibco BRL, Life technologies, Karlsruhe)).

#### Lösungen:

- Agarosegel: 1% Agarose (Agarose GTQ (Carl Roth, Karlsruhe)) in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA (Carl Roth, Karlsruhe))
- Ethidiumbromid (Carl Roth, Karlsruhe)
- Ladepuffer: Bromphenolblau, Laufpuffer: Loading Dye (Eppendorf, Hamburg)
- DNA-Größenmarker: 2log DNA Ladder (New England Biolabs, Frankfurt)

Nachdem die 1%ige Lösung aus Agarose und Puffer aufgeköcht worden war, wurde Ethidiumbromid zugesetzt und die abgekühlte Lösung in eine Kammer gegossen, wo sie zum Gel erstarrte. In die Geltaschen wurden anschließend je 2,5 µl der DNA-Proben, versetzt mit farbstoffenthaltendem Ladepuffer, gegeben, außerdem in eine Tasche der DNA-Größenmarker. Der Farbstoff diente der Kontrolle der Laufweite der Proben während der Auftrennung. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer genommen und unter einer UV-Lichtquelle photographisch dokumentiert. Ein Vergleich mit dem gleichzeitig aufgetragenen Größenmarker erlaubte eine Größenabschätzung der DNA-Fragmente.

#### **3.1.3.4 Sequenzierreaktion (Cycle Sequencing)**

Entsprechend dem Protokoll des Herstellers wurde die Sequenzierreaktion unter Anwendung des CEQ™ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kits (Beckman Coulter™, Fullerton, USA) durchgeführt. Bei dieser Methode werden vier mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelte 2',3'-Dideoxynucleosidtriphosphate (ddNTPs), die bei unterschiedlicher Wellenlänge fluoreszieren, mit nicht-markierten dNTPs, Sequenzierungspuffer, DNA-Amplifikat, Sequenzierprimer und DNA-Polymerase gemischt und eine PCR durchgeführt [90]. Der Sequenzierprimer für die TLR2/TIR-Domäne hatte die Sequenz sense 5'-CTCGGTGTCGGAATGTACACAG-3'.

#### Lösungen:

- H<sub>2</sub>O

- Aufgereinigtes PCR-Produkt
- Sequenzierprimer: 1,6 pmol/µl (TLR2/TIR sense-Primer)
- CEQ™ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Master Mix (Beckman Coulter™, Fullerton, USA), bestehend aus DNA-Polymerase, CEQ™ Dye Terminatoren (ddTTP, ddGTP, ddCTP, ddATP), dNTP-Lösung und Sequenzierungspuffer

Die Reagenzien wurden in der oben angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert und gemischt. Jedes Reaktionsröhrchen enthielt je nach DNA-Menge 8-10 µl H<sub>2</sub>O, 4-6 µl DNA-Amplifikat, 2 µl Sequenzierprimer und 4 µl Mastermix, insgesamt 20 µl Sequenzieransatz pro Röhrchen. Anschließend wurden die Reaktionsröhrchen in den vorgewärmten *Cycler* (T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen)) gesetzt und durchliefen dort folgend Zyklen (Tabelle 5):

Hitzenaturierung (Strangtrennung)	10 min	95 °C
30 Synthesezyklen		
1. Strangtrennung	20 s	96 °C
2. Primeranlagerung / Strangsynthese	20 s	50 °C
Terminale Elongation	4 min	60 °C

**Tabelle 5: Programm der Sequenzierreaktion**

anschließende Kühlung: bei 4 °C

Da bei diesem Verfahren nur ein Primer eingesetzt wird, wird nur der dazu komplementäre Strang immer wieder abgeschrieben. Der zufällige Einbau der farbmarkierten ddNTPs führt statistisch nach unterschiedlich langer Polymerase-Reaktion zum Kettenabbruch, da ihnen das 3'-Hydroxylende fehlt, um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. Es entstehen am 3'-Ende mit basenspezifischen Farbstoffen markierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, diese werden denaturiert, im Kapillarelektrophorese-DNA-Sequenziergerät elektrophoretisch aufgetrennt und durch ihre Fluoreszenz im Gel nachgewiesen.

#### 3.1.3.5 Ethanol-fällung

Um die DNA nach der Sequenzierreaktion für die Sequenzanalyse vorzubereiten, musste das Produkt der Sequenzierreaktion zunächst noch mit Ethanol gefällt werden. Es wurde nach dem Protokoll des CEQ™ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit (Beckman Coulter, Fullerton, USA) vorgegangen.

#### Lösungen:

- Sequenzierreaktionsprodukt

- Glykogen (20 mg/ml) (im Kit enthalten)
- 3 M Natriumacetat, pH 5,2: 4 °C
- 100 mM EDTA, pH 8,0: RT
- 95% (v/v) Ethanol: -20 °C
- 70% (v/v) Ethanol: -20 °C
- Sample loading solution (SLS): -20 °C (im Kit enthalten)
- Mineralöl (im Kit enthalten)

Zunächst wurde die Fällungslösung angesetzt. Pro Probe wurden hierfür 2 µl 3 M Natriumacetat, 2 µl 100 mM EDTA und 1 µl Glykogen (20 mg/ml) zusammenpipettiert, auf die Röhrchen verteilt und je 20 µl Sequenzierreaktionsprodukt dazugegeben. Nach gründlicher Durchmischung der Reagenzien wurden 60 µl kaltes 95% Ethanol dazugegeben und nach weiterem gründlichen Mischen 15 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, zu dem Pellet 100 µl kaltes 70% Ethanol hinzugegeben und zwei Minuten bei 4 °C und 14000 x rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zehn Minuten in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac Univapo 100 H (Uniequip, Martinsried)) getrocknet. Jedes präzipitierte Pellet wurde nun in 25 µl SLS 15 Min bei 37 °C resuspendiert und zur Sequenzieranalyse auf eine 96-well-Mikrotiterplatte gegeben. Jeder Sequenzieransatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

#### 3.1.3.6 Sequenzieranalyse

Die Sequenzierung der TLR2/TIR-Domäne wurde mit einem Kapillarelektrophorese-DNA-Sequenziergerät (CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter™, Fullerton, USA) durchgeführt.

##### Lösungen:

- CEQ™ Trenngel I, eine Kartusche bestehend aus 10 ml gepufferter Polyacrylamid-Siebmatrix mit Harnstoff
- CEQ™ Trennpuffer, bestehend aus < 10% organischen Puffersalzen

Die DNA-Proben wurden nach der Fällung im DNA-Sequenzierer denaturiert und auf das Trenngel innerhalb der Kapillaren aufgetragen. Die Polynukleotide wurden elektrophoretisch der Größe nach im Gel aufgetrennt. Die vier unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffgruppen, die jeweils an ein bestimmtes Nukleotid gekoppelt waren, wurden durch einen Infrarot-Diodenlaser angeregt, und die vier

Fluoreszenzwellenlängen wurden durch ein Detektorsystem des DNA-Sequenzierers anhand ihrer unterschiedlichen Emissionswellenlänge identifiziert und quantifiziert.

### 3.1.4 Funktionelle Analyse

Um die funktionelle Relevanz einer Mutation zu überprüfen, wurde das entsprechende Gen gezielt mutiert, in ein Expressions-Plasmid für humane Zellen eingeführt (2.1.4.1) und im Zellsystem untersucht (2.1.4.2).

#### 3.1.4.1 Mutagenese

Für die Mutagenese eines Expressions-Plasmids für *TLR-2* mit einer *TLR-2*-Mutation wurde das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, LaJolla, USA) verwendet, mit dem eine Base gezielt mutiert werden kann.

#### Lösungen:

- Primer: Beschreibung s. Text
- *PfuUltra*<sup>™</sup> High-Fidelity DNA polymerase (2,5 U/μl)
- dNTP-Mix
- *Dpn* I-Restriktionsenzym (10 U/μl)
- Kompetente Zellen: *Escherichia (E.) coli*
- Invisorb<sup>®</sup> Spin Plasmid Mini Kit (Invitex, Berlin)

Diese Methode wurde in drei Schritten durchgeführt (T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen):

1. Die Synthese des Stranges mit der Mutation: Während weniger PCR-Zyklen wurde zunächst die Ausgangs-DNA denaturiert. Daraufhin wurden die Mutagenese-Primer angelagert, die die Mutation enthalten. Anschließend wurden diese durch die *Proofreading-(PfuUltra)*-DNA-Polymerase verlängert.

2. *Dpn* I-Verdau der Ausgangs-DNA: Das *Dpn* I-Restriktionsenzym schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, nicht aber unmethylierte. So wurde im zweiten Schritt die methylierte Ausgangs-DNA verdaut.

3. Transformation: Im dritten Schritt wurde das mutierte Molekül in kompetente Zellen (*E. coli*-Bakterien) transformiert.

Die zwei verwendeten Primer hatten folgende, die Mutation enthaltende Sequenzen: sense 5'-TGGGTGGAGAACCCTATGGTCCAGGACC-3' und antisense 5'-GCTCCTGGACCATAGGGTTCTCCACCCA-3'. Der Erfolg der Insertion der Mutation

wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Plasmide wurden mithilfe des Invisorb® Spin Plasmid Mini Kit (Invitek, Berlin) aus *E. coli* aufgereinigt. Das mutierte Plasmid wurde danach parallel zum unmutierten in Zelltransfektionsexperimenten (s. Kap. 2.2.7) verwendet.

#### **3.2 Untersuchungen zum potentiellen TLR-Liganden *P. falciparum*-GPI**

In biologischen Stimulationsassays wurden verschiedene Zelltypen zur Bestimmung der Aktivierung der Zellen durch GPI eingesetzt. Es sollte untersucht werden, ob die synthetischen *P. falciparum*-GPI-Varianten über TLR die Zytokinproduktion aktivieren.

##### **3.2.1 Reagenzien und Plasmide**

Triacylierte (Pam<sub>3</sub>CysSerLys<sub>4</sub>; LP3) und diacylierte Lipopeptide (Pam<sub>3</sub>CysSerLys<sub>4</sub>; LP2) als TLR-2-Stimulanzen, erstmals von Mühlradt et al. beschrieben [91], wurden von der Firma EMC microcollections (Tübingen) erworben. Das für TLR-4 bekannte Positivstimulanz LPS aus *Salmonella minnesota* Re595 stammte von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Die für humanen TLR4 (hTLR4), humanen CD14 (hCD14) und humanen TLR2 (hTLR2) kodierenden Plasmide, wie auch die  $\beta$ -Galaktosidase und das ELAM NF- $\kappa$ B Reporter-Plasmid wurden freundlicherweise von C. J. Kirschning (Universität München) zur Verfügung gestellt. Das für humanen MD-2 kodierende Plasmid wurde freundlicherweise von K. Miyake (Universität Tokio, Japan) und O. Takeuchi (Universität Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt.

##### **3.2.2 Zellkulturkonditionen**

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von etwa 95% kultiviert und unter stets sterilen Bedingungen gehalten.

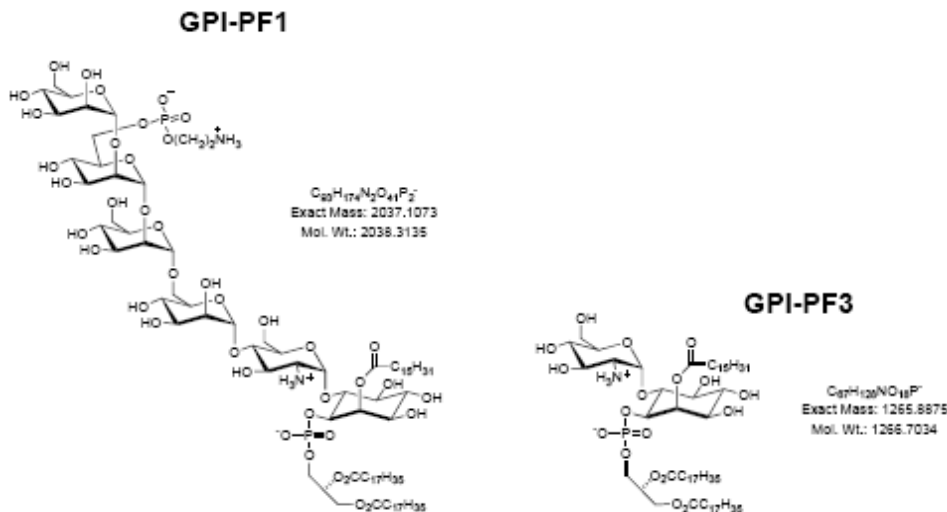
##### **3.2.3 Synthetisches *Plasmodium falciparum*-GPI**

Die *P. falciparum*-GPI-Varianten, die untersucht wurden, sind in den Laboren der ETH Zürich, AG Prof. Seeberger, synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden [92].



Folgende *P. falciparum*-GPI-Varianten wurden untersucht (s. Abbildung 4):

- Hexasaccharid (ohne Lipidanteil)
- Disaccharid mit Lipidanteil (Pf3):  $C_{67} H_{128} NO_{18} P^-$   
Molekulargewicht: 1266,7034; Exact Mass: 1265,8875
- Hexasaccharid mit Lipidanteil (Pf1):  $C_{93} H_{174} N_2 O_{41} P_2^-$   
Molekulargewicht: 2038,3135; Exact Mass: 2037,1073



**Abbildung 4. Synthetisches *P. falciparum*-GPI**

GPI-PF1 (Hexasaccharid mit Lipidanteil)

GPI-PF3 (Disaccharid mit Lipidanteil)

#### 3.2.4 Zellkultur der RAW264.7-Zellen

Die murine Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 wurde in Kulturflaschen (NUNC, Wiesbaden) in RPMI 1640-Medium (PAA, Pasching, Österreich) mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 200 mM L-Glutamin und Sodumpyruvat (PAA) im Brutschrank kultiviert.

#### 3.2.5 Bestimmung der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Konzentration in RAW264.7-Zellüberständen

##### 3.2.5.1 Stimulation der RAW264.7-Zellen

Lösungen/Materialien:

- Murine RAW264.7-Zellen
- RPMI 1640-Medium (GIBCO Invitrogen, Karlsruhe)
- RPMI-Medium, 10% fötales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) (Biochrom, Berlin)
- Stimulanzen: synthetisches *P. falciparum*-GPI (ETH Zürich, AG Prof. Seeberger)  
Pam<sub>2</sub>Cys-Ser-Lys<sub>4</sub> (Pam<sub>2</sub>Cys) (EMC microcollections, Tübingen)  
LPS

Für die Bestimmung der Zytokinproduktion wurden zunächst die RAW264.7-Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen je Vertiefung in einer 96-Loch-Zellkulturflachbodenplatte (TPP, Schweiz) ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit RPMI 1640-Medium gewaschen und in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen synthetischem GPI in RPMI-Medium, 10% FCS stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Zytokinausschüttung (mTNF- $\alpha$ -Konzentration) im ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) bestimmt. Als Positivkontrolle wurden die zwei bekannten TLR-Liganden Pam<sub>2</sub>Cys und LPS verwendet.

#### 3.2.5.2 Bestimmung von murinem TNF- $\alpha$ (mTNF- $\alpha$ )

Die mTNF- $\alpha$ -Konzentration in den Überständen stimulierter RAW264.7-Zellen wurde mittels eines Sandwich-ELISA gemessen. Dabei werden zwei Antikörper verwendet, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen (hier: mTNF- $\alpha$ ) binden. Nachdem der erste Antikörper (Beschichtungs-Antikörper) an eine feste Phase gebunden wurde, wird die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen mit dem ersten Antikörper inkubiert (Mikrotiterplatten (MaxiSorp-ELISA-Platten, NUNC, Wiesbaden)). Nach jedem Inkubationsschritt werden ungebundene Agenzien durch Waschen entfernt, so dass nur das am Antikörper gebundene Antigen auf der Platte verbleibt. Anschließend wird ein zweiter Antikörper (Detektions-Antikörper) zugegeben, an dessen Ende in einem weiteren Inkubationsschritt ein Enzym gebunden wird. Es entstehen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach erneutem Waschen und Zugabe des entsprechenden Substrats, wird durch das Enzym eine Farbreaktion ausgelöst, die mit dem Photometer detektiert werden kann.

#### Lösungen:

- *Coating*-Antikörper: anti-mTNF- $\alpha$  monoklonaler Antikörper (BD PharMingen, Heidelberg)
- 100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,0
- Waschpuffer: PBS (GIBCO Invitrogen, Karlsruhe), 0,05% Tween20
- Blockierungs- und Verdünnungspuffer: PBS, 0,05% Tween20, 10% FCS

- Standard: rekombinantes m-TNF- $\alpha$  (BD PharMingen)
- Detektions-Antikörper: Biotin-konjugierter monoklonaler anti-mTNF- $\alpha$ -Antikörper (PharMingen, Heidelberg)
- Streptavidin-Peroxidase (Sigma, Deisenhofen)
- Farbreaktionslösung: Pufferlösung, Ortho-Phenol-Diphosphat (Sigma, Deisenhofen)
- 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Eine Mikrotiterplatte (96-Loch-Immunomaxi-Platte) wurde mit 3  $\mu$ g/ml monoklonalem anti-mTNF- $\alpha$ -Antikörper in 100 mM NaH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,0, beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer die freien Protein-Bindungsstellen auf der Platte mit Blockierungspuffer für eine Stunde bei RT blockiert. Vor jedem der folgenden Schritte wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die seriell verdünnte Standardreihe (rekombinantes murines TNF- $\alpha$ ) und je 50  $\mu$ l RAW264.7-Zellkulturüberstand in einer 1:2-Verdünnung mit Verdünnungspuffer wurden auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und mit den immobilisierten Antikörpern zwei Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Detektions-Antikörper (0,5  $\mu$ g/ml Biotin-konjugierter monoklonaler anti-mTNF- $\alpha$ -Antikörper) in Verdünnungspuffer aufgetragen und für eine Stunde bei RT inkubiert. Freie Antikörper wurden durch einen weiteren Waschschrift entfernt. Das Peroxidase-Konjugat (1  $\mu$ g/ml Streptavidin-Peroxidase in Verdünnungspuffer) wurde auf die Platte gegeben, und eine weitere Stunde inkubiert. Durch Zugabe der Substratlösung aus Ortho-Phenyl-Diphosphat gelöst in Pufferlösung wurde die Farbreaktion, bei der das Substrat enzymatisch gespalten wurde, gestartet. Nach 15-30 min wurde die Farbreaktion mit 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Extinktion des Produktes der Farbreaktion wurde photometrisch mit dem Multifunktions-Spektrometer bei 490 nm gemessen. Die jeweilige mTNF- $\alpha$ -Konzentration wurde anhand der Standardkurve ermittelt.

#### **3.2.6 Gewinnung, Zellkultur und Stimulation humaner peripherer mononukleärer Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC)**

##### **3.2.6.1 Aufreinigung humaner PBMC**

Aus dem Vollblut gesunder Spender (Heparin-beschichtete Spritzen (5 U/ml Liquemin, Roche Diagnostics, Mannheim) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen extrahiert.

#### Lösungen:

- Vollblut gesunder Spender
- Minimalmedium: RPMI 1640, versetzt mit 100 U/ml Penicillin (PAA, Pasching, Österreich), 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA, Pasching), 200 mM L-Glutamin (GIBCO Invitrogen, Karlsruhe)
- Pancoll (Pan Biotech, Aidenbach)
- Nährmedium: RPMI 1640, 2% Humanalbumin (Sigma, Deisenhofen)

Das mit Heparin versetzte Vollblut wurde 1:2 mit Minimalmedium verdünnt. 30 ml wurden vorsichtig auf 15 ml Pancoll gegeben (Überschichtung) und bei 400 x g, 21 °C für 45 min ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildeten alle Leukozyten oberhalb des Trennmediums eine Schicht, während sich die Erythrozyten unterhalb dessen befanden. Die Leukozyten wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit RPMI-Medium bei 400 x g, 21 °C, 10 min gewaschen. Die Thrombozyten wurden durch Zentrifugation (100 x g, 15 min) entfernt. Die extrahierten Leukozyten wurden in Nährmedium in einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen / Loch in 96-Loch-Platten ausgesät und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit adhärten die Monozyten im Gegensatz zu den Lymphozyten am Boden der Lochplatte. Die nicht adhärten Zellen wurden anschließend durch zweimaliges Wechseln des Mediums entfernt.

#### **3.2.6.2 Stimulation humaner PBMC**

Die Stimulation erfolgte mit synthetischem GPI in verschiedenen Konzentrationen in RPMI-Medium und Serum des Spenders der Monozyten über vier Stunden. Pam2Cys und LPS wurden als Positivkontrollen mitgeführt.

#### **3.2.6.3 Humaner TNF- $\alpha$ (hTNF- $\alpha$ )-ELISA**

Der Zytokingehalt in den Überständen der humanen Zellen wurde analog dem Protokoll des mTNF- $\alpha$ -ELISA gemessen (s. Kapitel 2.2.5.2). Es wurde eine 96-Loch-Immunomaxi-Platte (TPP, Schweiz) mit 3,3  $\mu$ g/ml Erst/*Capture*-Antikörper (anti-human-TNF- $\alpha$ , BD Pharmingen, Hamburg) in Carbonatpuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2) beschichtet. Zwischen jedem Schritt wurden die Zellen mindestens dreimal mit PBS 0,05% Tween20 (TPBS) gewaschen. Die Platten wurden mit TPBS, 10% FCS zwei Stunden bei RT blockiert. Die TNF- $\alpha$ -Standardreihe und die Proben wurden in

TPBS/10% FCS (TPBS/FCS) verdünnt. Mit rekombinantem Human-TNF- $\alpha$  (BD Pharmingen) wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt. Jeweils 100  $\mu$ l pro Loch wurden von Standard und Proben eingesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit dem sekundären Antikörper (2  $\mu$ g/ml biotinylierter anti-human-TNF- $\alpha$  monoklonaler Antikörper (BD Pharmingen)) für 45 min inkubiert. Daraufhin folgte die Inkubation mit 1  $\mu$ g/ml Peroxidase-gebundenem Streptavidin (Sigma, Deisenhofen) für mindestens 30 min. Durch die Umwandlung von Ortho-Phenylen-Dihydrochlorid (OPD (Sigma, Deisenhofen)), die durch die Streptavidin-Peroxidase katalysiert wird, entsteht ein photochemisch quantifizierbarer Farbstoff. Die Bestimmung der hTNF- $\alpha$ -Produktion erfolgte photometrisch bei 492 nm. Zur Auswertung der gemessenen Zytokinproduktion der Proben und Kontrollen wurden die Ergebnisse mit der TNF- $\alpha$ -Standardreihe verglichen. Die Ergebnisse zeigen den +/-SD-Mittelwert doppelter Messungen. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt.

#### 3.2.7 HEK293-Zell-Überexpressions-Experimente

Die humane Zelllinie HEK293 (*human embryonic kidney cells 293*, Humane Embryonale Nierenzellen 293) wurde als Transfektionssystem für TLR benutzt.

Die DNA der TLR wurde in eukaryotischen Expressionsvektoren in die Zellen transfiziert, die auf ihrer Oberfläche weder TLR-2 noch TLR-4 besitzen. Neben den TLR-Plasmiden wurden die HEK293-Zellen mit den Plasmid-DNAs der Reporterproteine  $\beta$ -Galaktosidase und Luciferase kotransfiziert. Das Gen der  $\beta$ -Galaktosidase besitzt einen konstitutiven Promotor, sodass das Protein unabhängig von einer Stimulanz synthetisiert wird, wenn die DNA der  $\beta$ -Galaktosidase durch Transfektion in der Zelle vorhanden ist. Durch das Messen seiner Aktivität in dem  $\beta$ -Gal Reporter Gene Assay (Roche, Mannheim) wurde die Transfektionseffizienz ermittelt und zur Normalisierung der Luciferasewerte verwendet. Der Promotor des Luciferase-Gens wird durch den zelleigenen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert. NF- $\kappa$ B wird aktiviert, wenn eine Stimulanz an den TLR gebunden hat. Die Aktivität von Luciferase und damit die des TLR wurde im Luciferase Reporter Gene Assay (Roche, Mannheim) bestimmt.

#### 3.2.7.1 Zellkultur und Transfektion von HEK293-Zellen

##### Lösungen/Materialien:

- HEK293-Zellen
- DMEM-Komplettmedium (*Dulbecco's modified Eagle Medium*, GIBCO Invitrogen, Carlsbad, USA), 10 % FCS (Biochrom, Berlin), 100 U/ml Penicillin (PAA, Pasching, Österreich), 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA), 200mM L-Glutamin (GIBCO Invitrogen, Karlsruhe)
- Genetizin 418 (Sigma, Deisenhofen)
- FuGENE 6 Transfektionsreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim)
- DNA-Plasmide: hTLR2  
RSV- $\beta$ -Galaktosidase  
NF- $\kappa$ B Reporter-Luciferase  
hTLR4  
hMD-2

Wildtyp-HEK293-Zellen wurden für die Überexpressionsexperimente mit TLR2 eingesetzt. Für die Überexpressions-Experimente mit TLR4 wurde eine mit hCD14 stabil transfizierte HEK293-Zell-Linie verwendet, da CD14 als Korezeptor in der Signaltransduktion via TLR4 fungiert. Die Zellen wurden in DMEM-Komplettmedium mit Natriumpyruvat, versetzt mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 200 mM L-Glutamin, kultiviert. Außerdem wurde das Aminoglycosidantibiotikum Genetizin 418 als Selektionsmarker zugegeben. Das Genetizin 418 wirkt antibiotisch auf eukaryotische Zellen, die keine Resistenz dagegen besitzen. Das Gen für die Resistenz liegt auf dem gleichen Plasmid wie CD14, sodass nur Zellen, die CD14 enthalten, überleben. Im Brutschrank wurden die Zellen in Zellkulturflaschen kultiviert. Bis zum Durchführen der Reporterger-Assays wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Vor jedem Schritt wurde unter dem Binokular überprüft, ob die Zellen unversehrt waren.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit je 1 ml pro Loch in 12-Loch-Platten mit einer HEK293-Zellzahldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml ausgesät. Die Zellzahl wurde zuvor mit der Neubauerzählkammer bestimmt. Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen zu 50-80% konfluent sein. Die Transfektion wurde mit FuGENE 6 Transfektionsreagenz durchgeführt. Diese auf Lipiden basierende, aus vielen Komponenten bestehende Transfektionsreagenz bildet Komplexe mit der DNA und kann diese so in die Zellen transportieren. Der Transfektionsansatz mit einem Endvolumen von 52,5  $\mu$ l pro Loch bestand aus 50  $\mu$ l Kulturmedium ohne FCS, 0,5  $\mu$ l FuGENE und 2  $\mu$ l DNA-Mix. Der DNA-Mix pro Loch bestand aus der Plasmid-DNA für TLR2 (40 ng), RSV- $\beta$ -Galaktosidase (40 ng) und NF- $\kappa$ B Reporter-Luciferase (120 ng). Der DNA-Mix für die Zellen, die mit TLR4 transfiziert wurden, bestand aus Plasmid-DNA

für TLR4 (2 ng), MD-2 (40 ng), RSV- $\beta$ -Galaktosidase (40 ng) und NF- $\kappa$ B Reporter-Luciferase (120 ng). Die Plasmid-DNAs wurden für mehrere Anwendungen zusammen pipettiert, mit H<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20 °C gelagert. Der Transfektionsansatz wurde in der oben angegebenen Reihenfolge als Mastermix für alle Proben zusammenpipettiert und 15 Min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium der Zellen gewechselt, wobei das Volumen des Komplettmediums auf 500  $\mu$ l verringert wurde. Nach der Inkubationszeit des Mastermixes wurde er auf die Zellen gegeben und diese weiter im Brutschrank kultiviert.

#### 3.2.7.2 Stimulation von HEK293-Zellen

##### Lösungen/Materialien:

- Stimulanzen:
  - synthetisches *P. falciparum*-GPI (AG Seeberger, ETH Zürich, Schweiz)
  - Pam<sub>2</sub>Cys-Ser-Lys<sub>4</sub> (Pam<sub>2</sub>Cys) (EMC microcollections, Tübingen)
  - LPS Re 595 von *Salmonella minnesota* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Minimalmedium: DMEM mit 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 200 mM L-Glutamin

Einen Tag nach der Transfektion wurden die HEK293-Zellen mit synthetischem GPI stimuliert. Es wurden verschiedene Varianten des synthetischen *P. falciparum*-GPI als potentielle Liganden in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten aus der Literatur bekannte Liganden für den jeweiligen Rezeptor. Für TLR4 wurden 10 ng/ml LPS verwendet. Für TLR2 wurden 50 ng/ml Pam<sub>2</sub>Cys-Ser-Lys<sub>4</sub>, das synthetische Analogon eines bakteriellen Lipoproteins, eingesetzt. Zudem wurden als Negativkontrolle Zellen, die weder transfiziert noch stimuliert worden waren, und Zellen, die transfiziert, jedoch nicht stimuliert worden waren, mitgeführt.

Pro Loch wurden 500  $\mu$ l Minimalmedium, in dem die Stimulanzen aufgenommen worden waren, eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank einen weiteren Tag kultiviert.

#### 3.2.7.3 Luciferase- und $\beta$ -Galaktosidasemessung

Etwa 24 Stunden nach Stimulation der transfizierten HEK293-Zellen wurden die Transfektionseffizienz und die Rezeptoraktivität mittels  $\beta$ -Gal Reporter Gene Assay und

Luciferase Reporter Gene Assay bestimmt. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen, allerdings reichte die Hälfte der angegebenen Mengen aus.

#### Lösungen:

- PBS (GIBCO Invitrogen, Karlsruhe)
- $\beta$ -Gal Reporter Gene Assay Kit (Roche, Mannheim)  
Lysepuffer  
Substratlösung:  $\beta$ -Gal-Substrat ( $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli*) und Assay-Puffer  
Initiationslösung: Verstärkerlösung und Initiationslösung
- Luciferase-Reagenz (Roche, Mannheim): lyophilisiertes Luciferase-Substrat gelöst in Reaktionspuffer (Tricine-Puffer, pH 7,8, Inhaltsstoffe: Luciferin, ATP, CoA, andere Zusätze, nicht näher vom Hersteller angegeben)

Zunächst wurden die Zellen gewaschen: das alte Medium wurde entfernt, und einmal PBS auf die Zellen gegeben und wieder abgenommen. Zur Lyse der Zellen wurden 100  $\mu$ l Lysepuffer zu den Zellen auf die Platte gegeben und diese 15 Min bei RT geschüttelt. Das Zelllysate wurde auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt und zehn Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Für die  $\beta$ -Galaktosidase-Messung wurden 25  $\mu$ l Überstand in eine weiße 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt, mit 50  $\mu$ l Substratlösung versetzt und mindestens 15 Minuten geschüttelt. Nun wurden 25  $\mu$ l Initiationslösung dazugegeben und sofort die Lichtproduktion über einen Zeitraum von 1000 ms gemessen. Damit wurde die Transfektionseffizienz innerhalb eines Versuchsansatzes überprüft. Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase hängt direkt von der Menge der zur Verfügung stehenden Genkopien ab.

Der Luciferase-Assay wurde durchgeführt, um die TLR-Aktivierung zu ermitteln. Hierfür wurden ebenfalls aus dem abzentrifugierten Überstand des Zelllysats 25  $\mu$ l auf eine weiße 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Für die Lichtreaktion wurden 50  $\mu$ l Luciferase-Reagenz hinzugefügt und sofort die Lichtfreisetzung wie oben luminometrisch gemessen. Die Ergebnisse wurden aus dem Quotienten aus Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Wert ermittelt. Jeder Versuchsansatz wurde dreimal parallel eingesetzt und gemessen (Mittelwert +/- SD).

#### **3.3 Vermeidung von Kontamination**

Beim Pipettieren von DNA-haltigen Lösungen kam es grundsätzlich zum Einsatz von sterilen Filterpipettenspitzen, um eine Kontamination der Proben durch Aerosole zu vermeiden. In jedem PCR-Ansatz wurde immer eine Negativkontrolle mitgeführt. Die



Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen gehalten. Die Zubereitung und Zugabe der Transfektions- und Stimulationsansätze zu den Zellen erfolgten stets in einer Laminar-Flow-Box (Steril-Arbeitsbank Antair BSK, Anthos, Siegburg).

#### 3.4 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit freundlicher Unterstützung durch Dr. Ekkehart Dietz, ehemals Institut für Sozialmedizin, Epidemiologie und Gesundheitsökonomie der Charité.

Die Parasitendichten wurden durch log<sub>10</sub>-Transformation normalisiert, so konnten die Geometrische Durchschnittsparasitendichte (*geometric mean parasite density*, GMPD) und die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle (95%-KI) berechnet werden.

Frequenzen und Proportionen wurden anhand des  $\chi^2$ -Testes, des  $\chi^2$ -Trendtestes bzw. des exakten Tests nach Fisher verglichen. Die Analyse der Matched-pairs wurde mittels McNemar-Test durchgeführt. Odds Ratio und 95%-Konfidenzintervalle wurden berechnet. Unterschiede in der Verteilung stetiger Parameter wurden mittels parametrischer (Student's t-Test) bzw. nicht-parametrischer Testverfahren (Mann-Whitney-U-Test) untersucht. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ( $p < 0,05$ ) als statistisch signifikant betrachtet.

### 4 Ergebnisse

#### 4.1 Charakteristika der Malariapatienten und der gesunden Kontrollgruppe

Die grundlegenden Charakteristika der im Zeitraum August bis November 2002 rekrutierten Fallgruppe der 290 Kinder mit schwerer Malaria sind in Tabelle 6 dargestellt. Das Durchschnittsalter der Kinder betrug zwei Jahre. Aufgrund des merkmalsbezogenen Matching bei der Auswahl beider Kontrollgruppen sind alle Gruppen identisch hinsichtlich Geschlechter- und Altersklassenverteilung. Am häufigsten trat bei über der Hälfte der Fallgruppe eine schwere Anämie, bei einem Drittel der Patienten Prostration (Definition s. Kapitel 2.1.1) sowie bei einem Fünftel der Patienten eine respiratorische Insuffizienz im Rahmen der schweren Malaria auf. Eine Vigilanzminderung bzw. generalisierte Krampfanfälle traten vergleichsweise seltener auf. Paraklinisch war eine Hyperlaktatämie bei über einem Drittel der Patienten auffällig. Über ein Zehntel der Patienten mit schwerer Malaria (11,2% der 285 Kinder, die nachverfolgt werden konnten) verstarb. Die Fallgruppe weist im Vergleich zur parasitärischen, asymptomatischen Kontrollgruppe eine wesentlich höhere GMPD auf (29.512/ $\mu$ l;  $p < 0,0005$ ). Die GMPD der asymptomatischen Kontrollgruppe betrug 1732/ $\mu$ l Blut (95% KI: 1385 - 2166/ $\mu$ l). Die 290 Kinder der gesunden Kontrollgruppe waren aparasitärisch. Sowohl die Kinder der gesunden wie auch der parasitärischen, asymptomatischen Kontrollgruppe hatten weder Fieber noch zeigten sie klinische Symptome.

Parameter	Wert
Alter in Monaten (Mittelwert, Spannweite)	24 (6 – 102)
Weiblich / Männlich	155 : 135
Temperatur axillär, * °C (Mittelwert +/- SD)	38.6 +/- 1.1
GMPD (/µl; 95% KI)	29512 (21904 – 39763)
Hämoglobin, g/dl (Mittelwert, Spanne)	4.9 (1.5 – 13.4)
<b>Diagnosekriterien nach WHO-Kriterien für die Schwere Malaria (2000), % (n)</b>	
Schwere Anämie	55.2 (160)
Prostration	33.4 (97)
Respiratorische Insuffizienz	22.8 (66)
Generalisierte Krampfanfälle	20.3 (59)
Vigilanzminderung	19.3 (56)
Ikterus	11.7 (34)
Kreislaufkollaps	3.4 (10)
Hämoglobinurie	2.8 (8)
Lungenödem	0 (0)
Abnorme Blutungsneigung	0 (0)
<b>Diagnosekriterien anhand anderer Parameter, % (n)</b>	
Hyperparasitämie (> 250000/µl)	22.1 (64)
Hypoglykämie (Glukose < 40 mg/dl)	16.9 (49)
Hyperlaktatämie (Laktat ≥ 5 mmol/l)	39.3 (114)
Hyperpyrexie* (> 40°C)	8.1 (23)
Mangelernährung (Gewicht zu Alter z-Wert < -2)	42.4 (123)
Todesfälle, % (n) †	11.2 (32)

\* n = 283; † n = 285

**Tabelle 6. Charakteristika der Fallgruppe: 290 Kinder mit schwerer Malaria**  
(modifiziert nach [93])

### **4.2 Verteilung von TLR-Polymorphismen bei Kindern mit schwerer Malaria und Kontrollen**

#### **4.2.1 *TLR-4* Asp299Gly und *TLR-4* Thr399Ile**

Im Rahmen der Fall-Kontroll-Studie wurde die Häufigkeit der bekannten *TLR-4*-SNP Asp299Gly und Thr399Ile bei 290 an schwerer Malaria erkrankten Kindern, von 290 asymptomatisch infizierten und 290 gesunden Kontrollen bestimmt (s. Kapitel 2.1.4).

Der SNP *TLR-4* Asp299Gly wurde bei 21,5% aller untersuchten Kinder entdeckt. Der SNP *TLR-4* Thr399Ile hingegen konnte bei nur 4,3% aller untersuchten Individuen detektiert werden. Alle Kinder, die Träger des SNP Thr399Ile waren, waren gleichzeitig Träger des SNP Asp299Gly; bei 16% (19/117) der Träger des SNP Asp299Gly konnte der SNP Thr399Ile detektiert werden ( $P < 0,0001$ ). Die Allelfrequenzen beider Mutationen waren am höchsten bei den Kindern mit schwerer Malaria, etwas niedriger in der Kontrollgruppe der asymptomatischen Kinder und am niedrigsten in der Gruppe der gesunden Kontrollen ( $\chi^2$ -trend-test: Asp299Gly,  $P = 0,06$ ; Thr399Ile,  $P = 0,02$ ) (s. Tabelle 7).

	Fallgruppe	Kontrollgruppe		<i>P</i> *
	Patienten mit schwerer Malaria	Parasitämische, asymptomatische Kinder	Gesunde Kinder	Patienten vs. gesunde Kontrollen
Anzahl	290	290	290	
Prävalenz <b><i>TLR-4</i></b> <b>Asp299Gly</b> , % (n)	24,1 (70)	22,8 (66)	17,6 (51)	0,046
Heterozygot, % (n)	22,4 (65)	22,1 (64)	16,2 (47)	0,04
Homozygot, % (n)	1,7 (5)	0,7 (2)	1,4 (4)	1
Allelfrequenz	0,129	0,117	0,095	0,06 <sup>†</sup>
Prävalenz <b><i>TLR-4</i></b> <b>Thr399Ile</b> , % (n)	6,2 (18)	4,1 (12)	2,4 (7)	0,03
Heterozygot, % (n)	5,9 (17)	3,8 (11)	2,4 (7)	0,04
Homozygot, % (n)	0,3 (1)	0,3 (1)	0	1
Allelfrequenz	0,033	0,022	0,012	0,02 <sup>†</sup>

**Tabelle 7. Verteilung der *TLR-4*-Polymorphismen unter den Patienten mit schwerer Malaria und den Kontrollgruppen**

\* McNemar-Test; †  $\chi^2$ test

Zwischen der gesunden und der parasitämischen Kontrollgruppe bzw. zwischen der parasitämischen Kontrollgruppe und den Patienten mit schwerer Malaria bestanden dagegen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Allel- oder Genotyphäufigkeit.

Bezogen auf die gesunden Kontrollen ergibt sich, dass das Risiko, an einer schweren Malaria zu erkranken, für Träger des *TLR-4*-SNP Asp299Gly 1,5-fach und für Träger des *TLR-4*-SNP Thr399Ile 2,6-fach erhöht ist (s. Tabelle 8). Berücksichtigt man die Hämoglobinvarianten HbAS und HbAC [81] mittels konditionaler logistischer

Regressionsanalyse, ist eine leichte Verbesserung dieser Risikoabschätzungen zu verzeichnen. In diesem Modell ergibt sich eine OR von 1,33 für Träger des *TLR-4*-SNP Asp299Gly ohne *TLR-4*-SNP Thr399Ile, bzw. eine OR von 2,9 für Träger beider *TLR-4*-SNPs.

<b><i>TLR-4</i> SNP</b>	<b>Odds Ratio (95% KI)</b> Schwere Malaria vs. gesunde Kontrollen
<i>TLR-4</i> Asp299Gly	1,45 (1,01 – 2,3)
<i>TLR-4</i> Thr399Ile	2,57 (1,1 – 6,0)
<b>Berücksichtigung HbAS und HbAC</b>	
<i>TLR-4</i> Asp299Gly	1,53 (1,0 – 2,3); <i>P</i> = 0,049
<i>TLR-4</i> Thr399Ile	2,78 (1,1 – 7,4); <i>P</i> = 0,04
<i>TLR-4</i> Asp299Gly ohne <i>TLR-4</i> Thr399Ile	1,33 (0,8 – 2,1); <i>P</i> = 0,2
<i>TLR-4</i> Asp299Gly mit <i>TLR-4</i> Thr399Ile	2,9 (1,1 – 7,6); <i>P</i> = 0,04

**Tabelle 8. Risikoabschätzung (OR) für Träger von *TLR-4* SNP an schwerer schwerer Malaria zu erkranken, unter Berücksichtigung der Hämoglobinvarianten HbAS und HbAC**

Die Patienten mit schwerer Malaria wurden nach führendem Symptom in zwei Gruppen eingeteilt: Patienten mit schwerer Anämie ohne zerebrale Beteiligung (*n* = 88) sowie Patienten mit zerebraler Beteiligung (Bewußtseinstrübung, Prostration und/oder Krampfanfälle) ohne schwere Anämie (*n* = 114) (s. Tabelle 6). Bei der ersten Gruppe trat der Polymorphismus *TLR-4*-SNP Asp299Gly bei 23,9%, bei der zweiten Gruppe bei 24,6% auf (*P* = 0,9). Der *TLR-4*-SNP Thr399Ile trat entsprechend bei 4,5% und bei 7,0% auf (*P* = 0,5). Dementsprechend war kein Einfluß der *TLR-4*-Polymorphismen auf diese beiden Symptomgruppen erkennbar. Auch ließ sich bei Patienten mit schwerer Malaria kein Zusammenhang zwischen den *TLR-4*-Polymorphismen und den Laborparametern Hämoglobin, Glukose, Laktat und GMPD finden (s. Tabelle 9). Die Letalitätsrate unter den Kindern mit *TLR-4*-Wildtyp betrug 12,9% (28/217). Unter den Trägern des *TLR-4*-SNP Asp299Gly ohne *TLR-4* Thr399Ile lag die Letalitätsrate bei 8,0% (4/50), bei den Trägern beider *TLR-4*-Polymorphismen lag sie bei 0% (0/18) ( $\chi^2$ -trend-test, *P* = 0,07).

	<i>TLR-4</i> Kodon 299		<i>TLR-4</i> Kodon 399	
	Wildtyp (Asp)	Mutation (Gly)	Wildtyp (Thr)	Mutation (Ile)
Anzahl	220	70	272	18
GMPD/ $\mu$ l (95% KI)	29242 (20627 – 41454)	30269 (17060 – 53706)	29923 (22012 – 40676)	23714 (6616 – 84991)
Hämoglobin, g/dl (Mittelwert, Spannweite)	4,9 (1,5 – 13,4)	4,9 (2,2 – 13,4)	4,9 (1,5 – 13,4)	4,9 (2,2 – 10,0)
Laktat, mmol/l (Mittelwert, Spannweite)	4,1 (0,7 – 21,0)	4,4 (1,2 – 16,6)	4,3 (0,7 – 21,0)	3,6 (1,3 – 15,9)
Glukose, mg/dl (Mittelwert, Spannweite)	76,4 (5 – 209)	74,1 (5 – 168)	75,3 (5 – 209)	64,8 (28 – 134)

**Tabelle 9. Laborparameter bei Patienten mit schwerer Malaria, unterteilt nach den *TLR-4*-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile**

Alle Gegenüberstellungen ergaben  $P > 0,5$ .

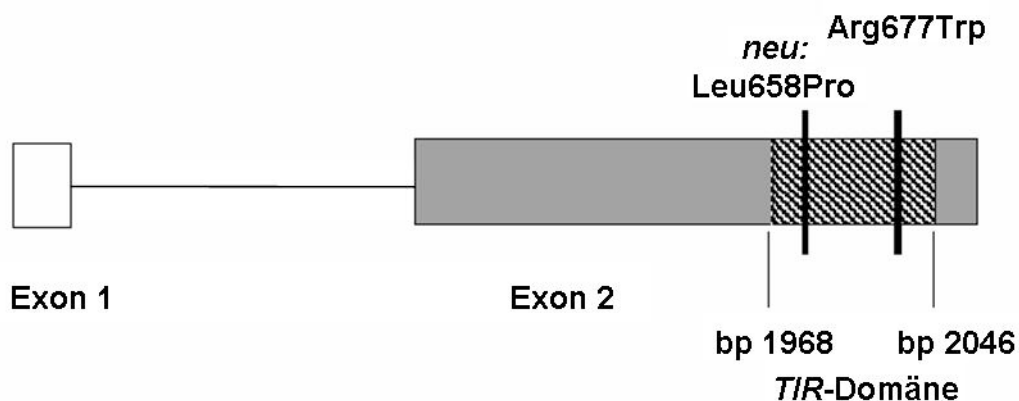
#### 4.2.2 *TLR-2* Arg677Trp und *TLR-2* Arg753Gln

Überraschenderweise konnte weder bei den 290 Kindern mit schwerer Malaria noch bei den 290 asymptomatischen Kindern oder 290 gesunden Kontrollen einer der *TLR-2*-Polymorphismen Arg753Gln und Arg677Trp entdeckt werden.

#### 4.2.3 *TLR-2* Leu658Pro

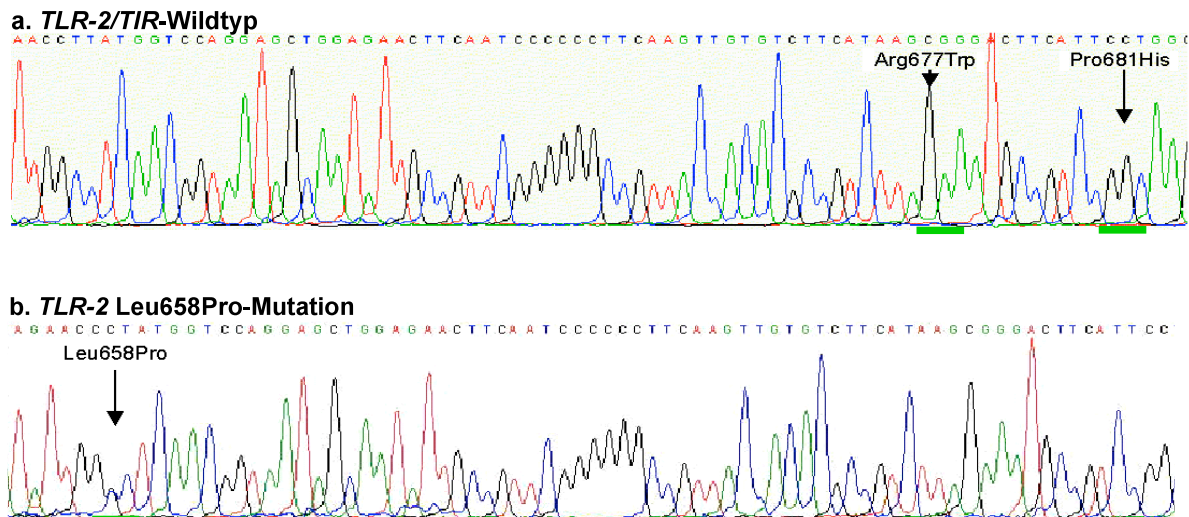
Aus der Studienpopulation von 870 Kindern wurden nach dem Zufallsprinzip 100 Proben von Kindern mit schwerer Malaria und 100 Proben von gesunden, aparasitämischen Kindern (gematcht nach Alter und Geschlecht) ausgewählt und hinsichtlich der *TLR2/TIR*-Domäne sequenziert. Anschließend wurden alle durch Sequenzierung (s. Kapitel 2.1.2) ermittelten Sequenzen mit der Wildtyp-Sequenz der

*TLR-2/TIR*-Domäne verglichen, um zu prüfen, ob neue Polymorphismen in einer der untersuchten Gruppen vorkommen. In der Gruppe der Malariapatienten wurde keine Mutation entdeckt, während in der Gruppe der gesunden Kontrollen ein neuer Polymorphismus in der *TLR-2/TIR*-Domäne entdeckt werden konnte. An der Stelle von Basenpaar (bp) 2042 befindet sich die bisher unbekannte Mutation C→A, die zur Folge hat, dass es zu einem Aminosäureaustausch an dieser Stelle kommt. Dabei wird Leucin an der Stelle 658 gegen Prolin ausgetauscht (s. Abbildung 5). Die Allelfrequenz dieser nicht-synonymen Mutation beträgt 0,5%. Die Mutation befindet sich in einer hochkonservierten Region des *TLR-2*-Gens, in der Nähe der bekannten Polymorphismen Arg677Trp und Pro681His (s. Abbildung 6 a+b). Die neu entdeckte, dominant-negative Mutation Pro681His hebt die Interaktion mit MyD88 auf, die für die Signaltransduktion über TLR erforderlich ist [94]. Auch hier bei der Genomsequenzierung wurde keine der bekannten *TLR-2*-SNP Arg743Gln, Arg677Trp und Pro681His detektiert.



**Abbildung 5. *TLR-2/TIR* Wildtyp und neu entdeckte Mutation: *TLR-2* Leu658Pro**  
Die neu entdeckte Mutation Leu658Pro befindet sich in der *TIR*-Domäne von *TLR-2*.





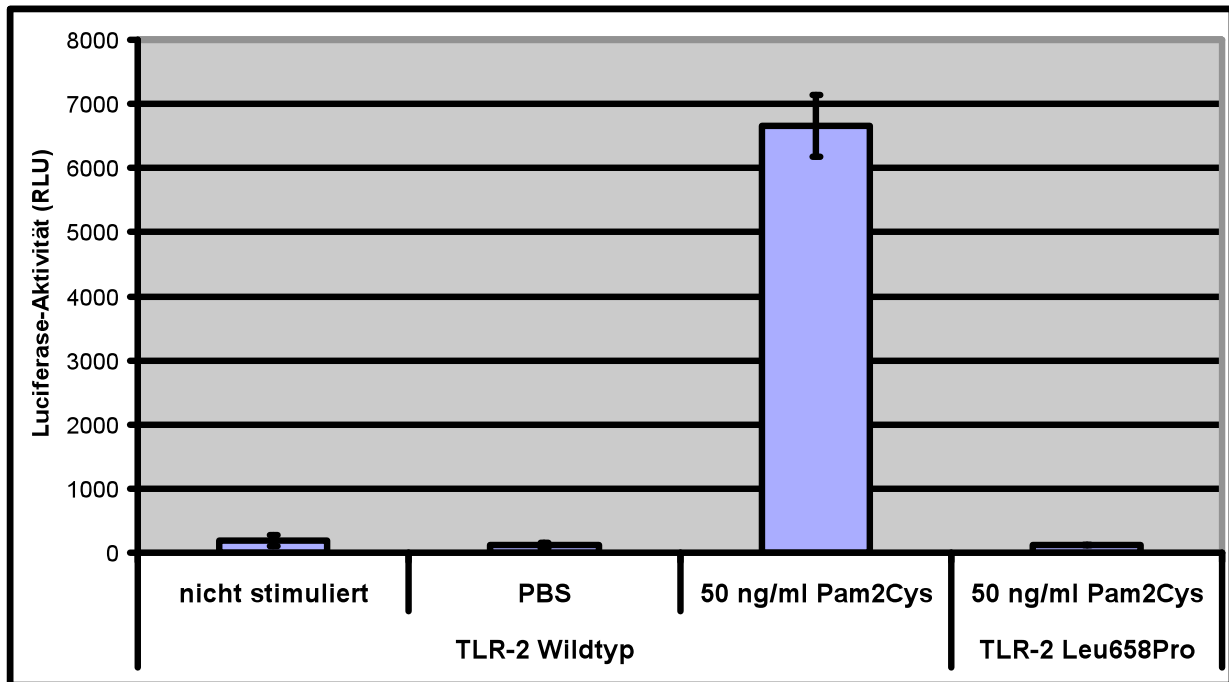
**Abbildung 6 a + b. Sequenzausschnitt der *TLR-2/TIR*-Domäne**

- Wildtyp *TLR-2/TIR*, die Lokalisation der bekannten *TLR-2*-SNP Arg677Trp (C → T, bp 2029) und Pro681His (C → A, bp 2042) ist farbig markiert.
- Neu entdeckte heterozygot aufgetretene Mutation Leu658Pro in der *TLR-2/TIR*-Domäne (T → C, bp 1973) bei einem ghanaischen Kind, das nicht an Malaria erkrankt war. Sie befindet sich in einer hochkonservierten Region der *TLR-2/TIR*-Domäne in der Nähe der in a) markierten bekannten SNP.

Der bekannte *TLR-2*-SNP Arg753Gln befindet sich an bp 2258, G → A, und ist hier nicht mit abgebildet.

#### 4.2.4 Funktionelle Analyse der gefundenen Neumutation *TLR-2* Leu658Pro

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die in der Kontrollgruppe neu entdeckte Mutation *TLR-2* Leu658Pro auf den Signaltransduktionsweg über TLR-2 und die inflammatorische Zytokinproduktion hat, wurde eine funktionelle Analyse durchgeführt (s. Kapitel 2.1.3). Während die mit *TLR-2*-Wildtyp transfizierten Zellen via TLR-2 durch Pam<sub>2</sub>Cys aktiviert wurden, kam es in den Zellen, die die Mutation enthielten, zu keiner Aktivierung. Die Analyse ergab, dass aufgrund der Mutation im *TLR-2*-Gen keine Stimulation der Signaltransduktion über TLR-2 möglich war (s. Abbildung 7).



**Abbildung 7. Funktionelle Analyse der gefundenen Neumutation *TLR-2* Leu658Pro innerhalb der *TLR-2/TIR*-Domäne**

*TLR-2* Leu658Pro inaktiviert die Funktion des *TLR-2*. Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Kontrollen: *TLR-2* Wildtyp – nicht stimuliert, *TLR-2* Wildtyp – PBS (Medium), *TLR-2* Wildtyp – stimuliert mit 50 ng/ml Pam<sub>2</sub>Cys; Funktionelle Analyse der Neumutation: *TLR-2* Leu658Pro – stimuliert mit 50 ng/ml Pam<sub>2</sub>Cys.

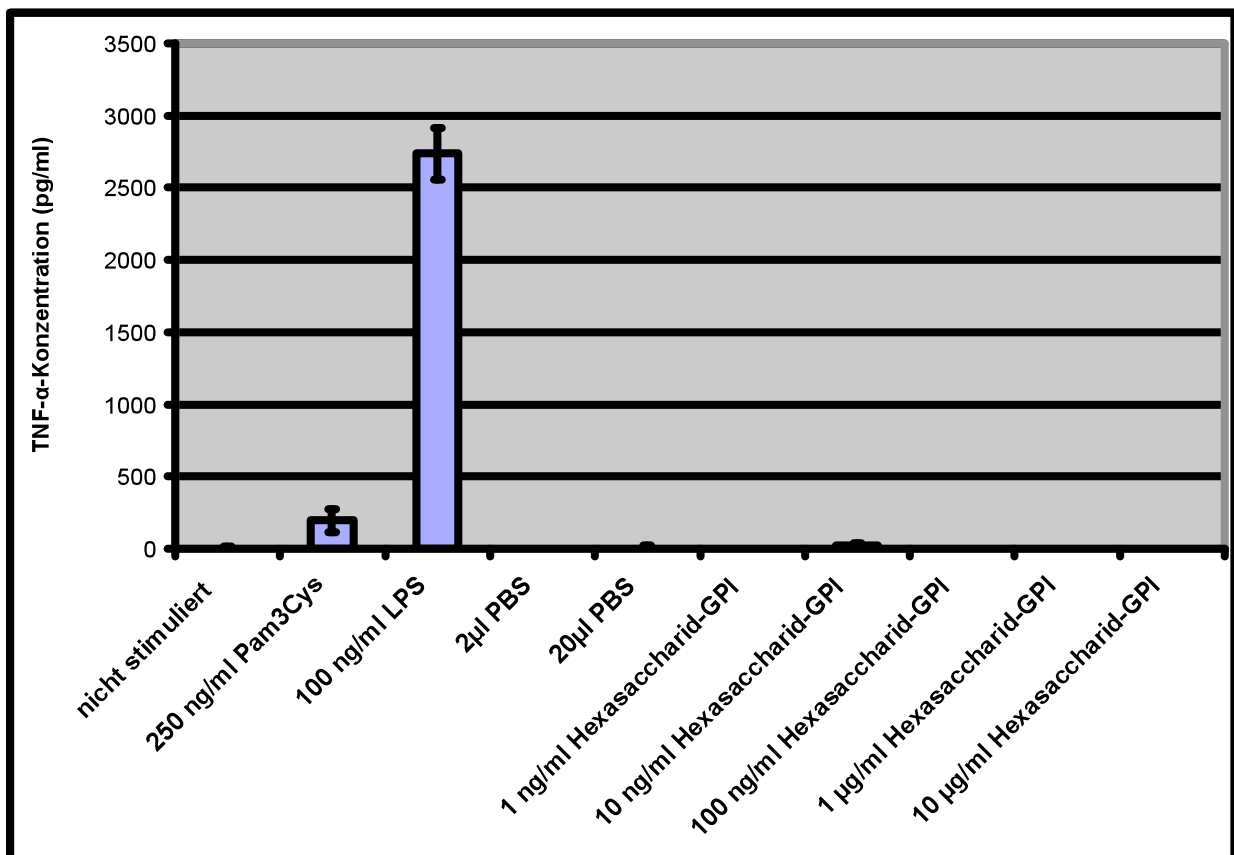
#### 4.3 Zellstimulation mit synthetischem *Plasmodium falciparum* - GPI

Der Effekt von synthetischem *P. falciparum*-GPI in unterschiedlichen Konzentrationen auf *TLR-2* und *TLR-4* wurde durch Stimulation von murinen RAW264.7-Zellen, humanen PBMC und mit *TLR-2*-und *TLR-4*-transfizierten HEK293-Zellen und die Analyse der anschließenden Zytokinexpression bzw. relativen Luciferase-Aktivität untersucht (s. Kapitel 2.2).

##### 4.3.1 Stimulation mit *Plasmodium falciparum* – GPI ohne Lipidanker

Um den Effekt des *P. falciparum*-GPI ohne Lipidanker auf die Aktivierung der TNF- $\alpha$ -Produktion zu untersuchen, wurde die GPI-Variante Hexasaccharid ohne Lipidanker in Zellversuchen mit humanen PBMC getestet.

Wie die Abbildung (s. Abbildung 8) zeigt, kam es bei der Stimulation humaner PBMC mit synthetischem Hexasaccharid-GPI ohne Lipidanteil in steigenden Konzentrationen zu keiner TNF- $\alpha$ -Produktion. Vergleicht man dies mit der eindeutig messbaren Zytokinausschüttung nach Stimulation mit den Positivkontrollen LPS und Pam<sub>3</sub>Cys, die bekannte Liganden für TLR-4 und TLR-2 darstellen, zeigt sich der deutliche Unterschied, dass das hier verwendete GPI kein Signal auslöste. Das Ergebnis konnte in unabhängiger Wiederholung des Versuches bestätigt werden.



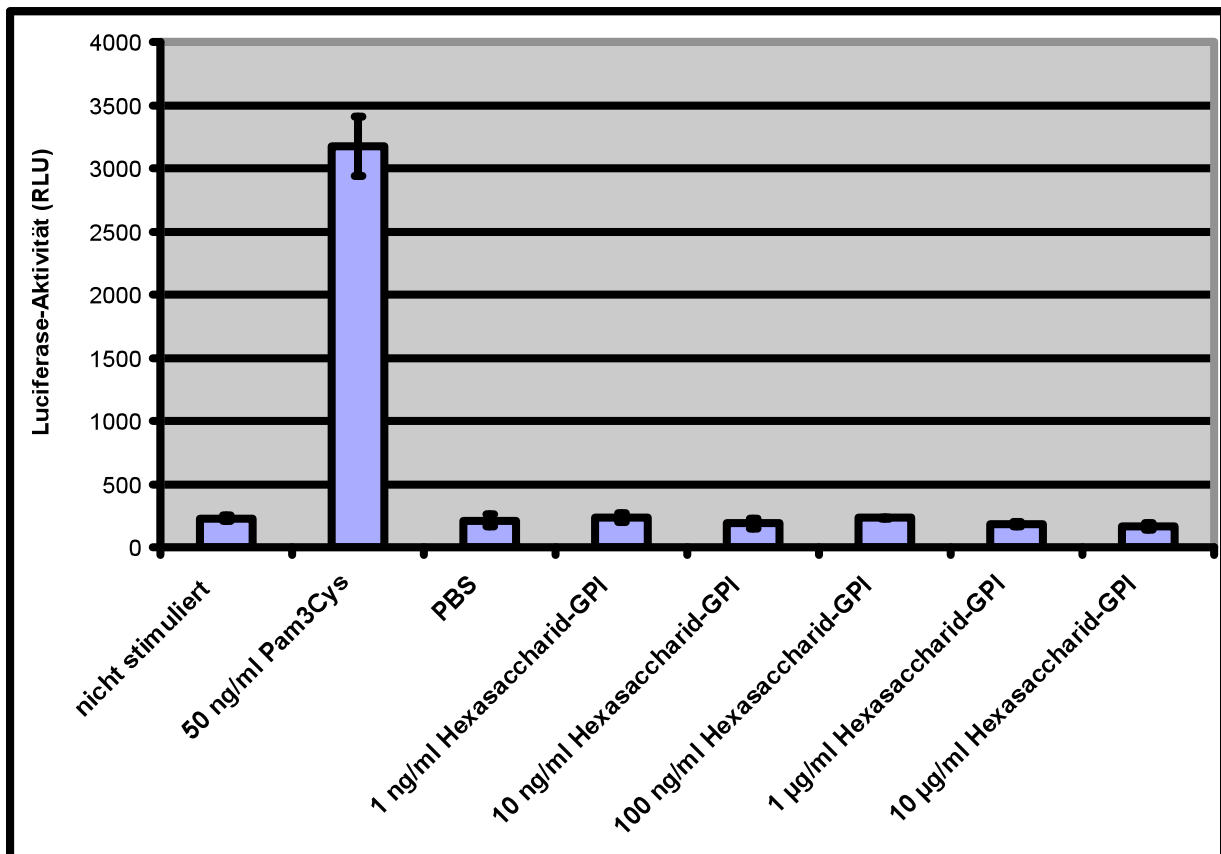
**Abbildung 8. Stimulation humaner PBMC: TNF- $\alpha$ -Produktion nach Stimulation mit *P. falciparum*-GPI (Hexasaccharid ohne Lipidanker) in steigenden Konzentrationen**

Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Zum Vergleich der Ergebnisse der Stimulation von humanen PBMC wurde die Hexasaccharid-GPI-Variante als Stimulus in TLR-Überexpressions-Versuchen eingesetzt.

Entsprechend dem Ergebnis der Stimulation humaner Makrophagen mit Hexasaccharid-GPI ohne Lipidanker wurden mit TLR-2-transfizierte HEK293-Zellen

ebenfalls nicht durch das Hexasaccharid-GPI stimuliert (s. Abbildung 9). Als Positivkontrolle diente hier Pam<sub>3</sub>Cys. Es zeigte sich kein Signal unabhängig von der eingesetzten Konzentration des Hexasaccharid-GPI ohne Lipidanker.



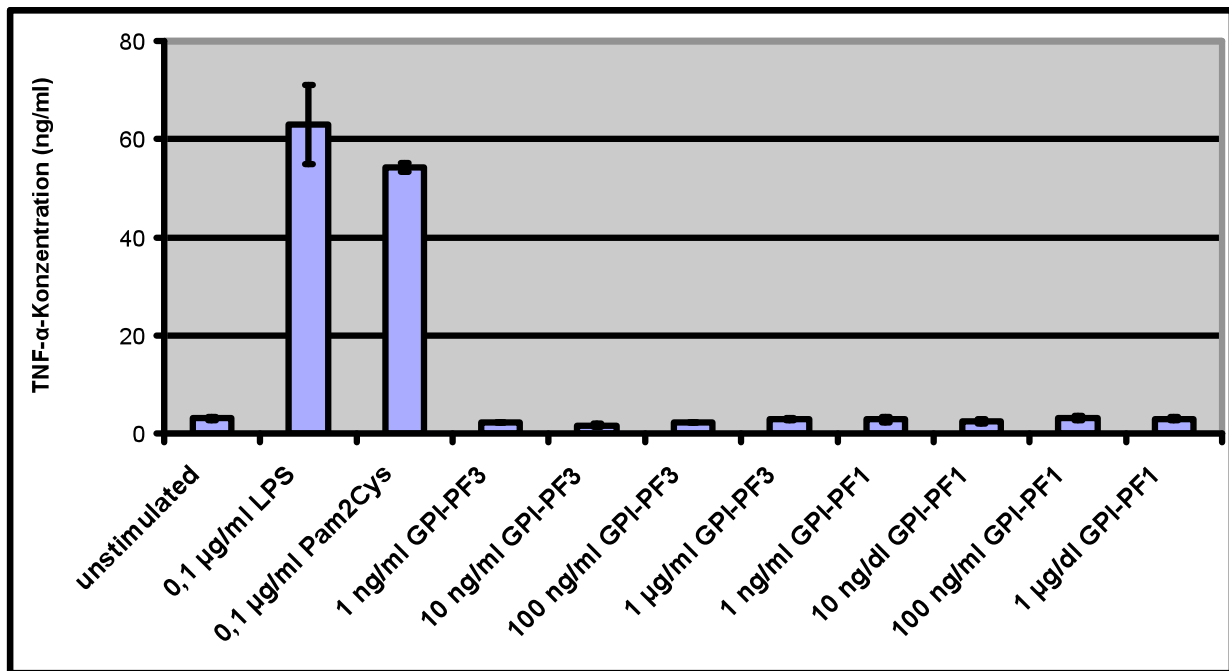
**Abbildung 9. Stimulation Humaner Embryonaler Nierenzellen 293 (transfiziert mit *TLR-2*): Luciferase-Aktivität (*relative light units*, RLU) nach Stimulation mit *P. falciparum*-GPI (Hexasaccharid ohne Lipidanker) in steigenden Konzentrationen**

Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

#### 4.3.2 Stimulation mit *Plasmodium falciparum* – GPI mit Lipidanker

Um den Effekt von synthetischem *P. falciparum*-GPI mit Lipidanteil auf TLR zu testen, wurde zunächst die Mausmakrophagenzelllinie RAW264.7 mit verschiedenen Konzentrationen *P. falciparum*-GPI stimuliert. Bei den eingesetzten GPI-Varianten handelte es sich einerseits um ein Disaccharid mit drei Lipidketten (GPI-PF3), andererseits um ein Hexasaccharid mit Lipidanteil (GPI-PF1).

Während die zwei bekannten TLR-Liganden Pam<sub>2</sub>Cys und LPS als Positivkontrollen in der Lage waren, eine mTNF- $\alpha$ -Produktion zu induzieren, führte weder der Einsatz des Disaccharids mit Lipidanteil GPI-PF3 noch des Hexasaccharids mit Lipidanteil GPI-PF1 zu einer mTNF- $\alpha$ -Produktion der Makrophagen (s. Abbildung 10).

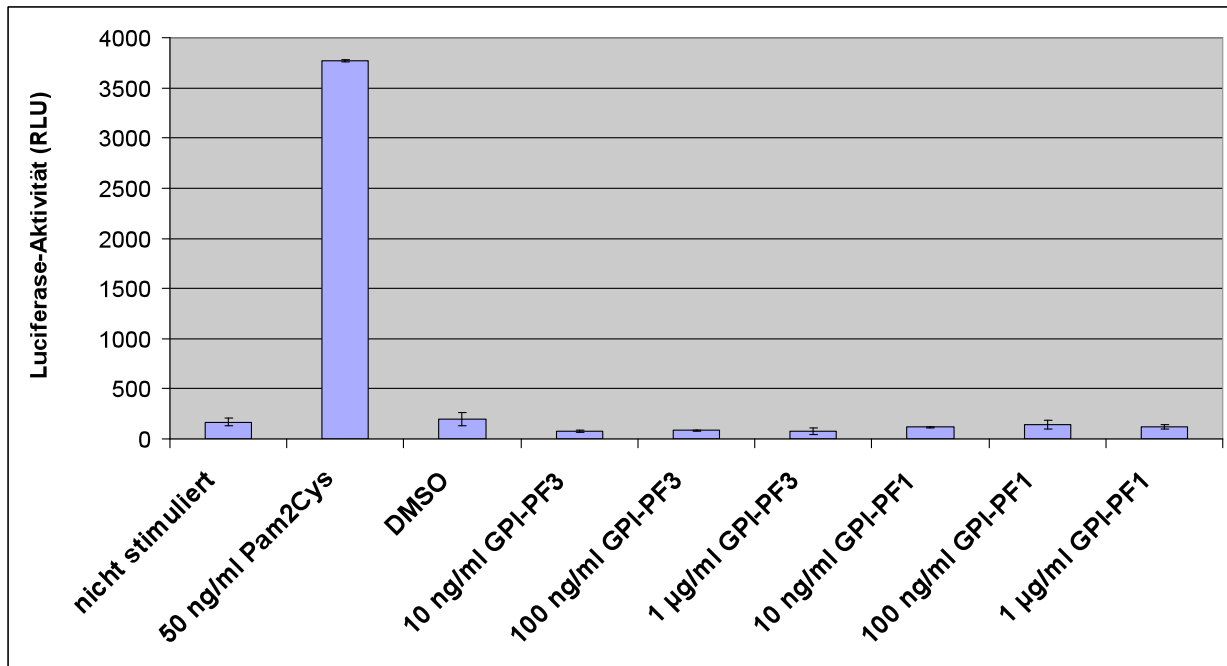


**Abbildung 10. Stimulation muriner RAW264.7-Zellen: TNF- $\alpha$ -Produktion nach Stimulation mit den *P. falciparum*-GPI-Varianten Disaccharid mit drei Lipidankern (GPI-PF3) und Hexasaccharid mit Lipidanteil (GPI-PF1) in steigenden Konzentrationen**

Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

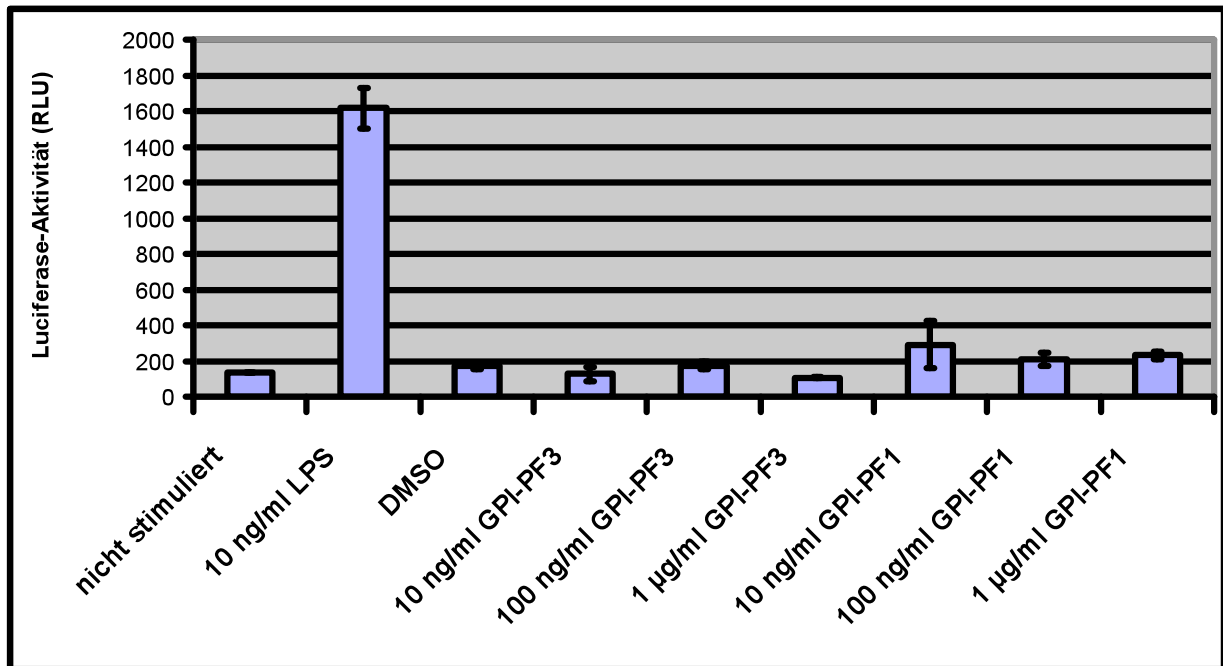
Die Ergebnisse wurden anschließend durch TLR-Überexpressions-Versuche überprüft. Im Gegensatz zu murinen RAW264.7-Zellen wurden dazu die menschlichen embryonalen Nierenzellen HEK293 eingesetzt. Damit wurde verifiziert, dass mögliche Variablen im Mausmodell, die nicht dem menschlichen entsprechen, ausgeschaltet sind.

Keine der verwendeten GPI-Varianten aktivierte die mit *TLR-2* (s. Abbildung 11) bzw. *TLR-4* und *MD-2* (s. Abbildung 12) transfizierten HEK293-Zellen. Dagegen verursachte die Stimulation der Zellen mit Pam<sub>2</sub>Cys (*TLR-2*) und LPS (*TLR-4*) eine Induktion der Luciferase-Aktivität.



**Abbildung 11. Stimulation Humaner Embryonaler Nierenzellen 293 (transfiziert mit *TLR-2*): Luciferase-Aktivität (RLU) nach Stimulation mit den *P. falciparum*-GPI-Varianten Disaccharid mit drei Lipidankern (GPI-PF3) und Hexasaccharid mit Lipidanteil (GPI-PF1) in steigenden Konzentrationen**

Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.



**Abbildung 12. Stimulation Humaner Embryonaler Nierenzellen 293 (transfiziert mit *TLR-4* und *MD-2*): Luciferase-Aktivität (RLU) nach Stimulation mit den *P. falciparum*-GPI-Varianten Disaccharid mit drei Lipidankern (GPI-PF3) und Hexasaccharid mit Lipidanteil (GPI-PF1) in steigenden Konzentrationen**

Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

## 5 Diskussion

### 5.1 Methodenkritik

#### 5.1.1 Studiendesign der Fall-Kontroll-Studie zu schwerer Malaria in Tamale

Im Rahmen der Fall-Kontrolle-Studie wurde die untersuchte Stichprobe nach Zielereignis in folgende zwei Gruppen gegliedert: die Fallgruppe schloß die Studienteilnehmer mit schwerer Malaria ein, die Kontrollgruppe setzte sich aus den Studienteilnehmern ohne schwere Malaria zusammen. Das Zielereignis war hier als das Auftreten einer schweren Malaria definiert. Anschließend wurde bestimmt, wie hoch die Allelfrequenz bestimmter SNP im Sinne einer Exposition in beiden Gruppen war. So kann ein Zusammenhang zwischen dem Zielereignis, der schweren Malaria, sowie der Exposition, dem Vorkommen bestimmter SNP, festgestellt werden [95].

Der Vorteil dieses Studiendesigns ist, dass seltene Ereignisse wie die schwere Malaria detektiert werden und beurteilt werden können. Im Vergleich zu einer prospektiven Studien ist eine Fall-Kontroll-Studie in deutlich kürzerer Zeit durchführbar. Zudem sind Fall-Kontroll-Studien unkomplizierter durchführbar und erkrankte Personen sind einfacher aufdeckbar. Als nachteilig kann die Auswahl der Kontrollen gewertet werden. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden die Kontrollen nach Alter und Geschlecht gematched. Mögliche Störgrößen wie andere, beispielsweise bakterielle Infektionen oder andere genetische Erkrankungen, sind nur schwierig kontrollierbar. Hierdurch könnte die Datenqualität mangelhaft werden, ferner könnte eine Kausalität gegebenenfalls nicht nachgewiesen werden [96].

Zur Reduktion möglicher Fehler (Bias) und Wahrung der Repräsentivität erfolgte die Unterteilung des Gebietes für die Rekrutierung der Studienteilnehmer in mehrere Einheiten, aus denen dann eine randomisierte Stichprobenziehung erfolgte. Das Rekrutierungsgebiet der Kontrollgruppe entspricht dem Einzugsgebiet des Tamale Teaching Hospitals, so dass die Auswahl der Fälle als weitgehend repräsentativ zu werten ist. Es wurde ein paarweises Matching durchgeführt zur Minimierung des Fehlers, dass der Zusammenhang zwischen Exposition und einem Ergebnis auf eine dritte Variable (*Confounder*) zurückführbar ist [81].



### 5.1.2 Nachweis der Plasmodium falciparum-Infektion und der Parasitendichte

Eine *P. falciparum*-Infektion wurde mikroskopisch nachgewiesen. Der Goldstandard ist der Dicke Tropfen. Die Auszählung in Ghana erfolgte am luftgetrockneten, regulär nach Giemsa gefärbten Dicken Tropfen pro 500 Leukozyten; über gemessene oder gesetzte Leukozytenzahlen ergab sich die Parasitendichte/ $\mu\text{L}$ . Der Dicke Tropfen hat den Vorteil, dass durch die fehlende Fixierung und die Lyse der Erythrozyten einzelne Parasiten auch unter mehreren Schichten von Erythrozyten mikroskopisch nachweisbar sind, ferner zeichnet er sich durch eine hohe Sensitivität für den Nachweis von Plasmodien aus. Die Nachweisgrenze der Mikroskopie liegt bei 50 Parasiten pro Mikroliter Blut, was einer Parasitämie von unter 0,001% entspricht [97]. Die Durchführung der Diagnostik mittels Dicken Tropfen ist aufgrund der Unkompliziertheit und Schnelligkeit der Methode, sowie der geringen Materialkosten sofort vorort durchführbar.

Der Nachteil der Methode liegt in einer Abhängigkeit der Richtigkeit und Genauigkeit des Ergebnisses von der Fachkenntnis des Mikroskopierenden. In der hier durchgeführten Studie erfolgte die Diagnostik durch intensiv geschulte und erfahrene Mikroskopierende.

Zur Sicherung der Diagnose erfolgte zusätzlich ein Nachweis mittels PCR, wobei es sich hier um einen rein qualitativen Nachweis einer Parasitämie mit *P. falciparum* mit hoher Sensitivität handelt [98].

### 5.1.3 Diagnosestellung einer schweren Malaria

Bei der Auswahl der erkrankten Kinder wurden die klinischen und paraklinischen Kriterien der WHO (2000) für die schwere Malaria sowie die mikroskopische Parasitenbestimmung berücksichtigt. Nachteilig kann in diesem Zusammenhang sein, dass eine primär klinisch gestellte Diagnose eine Fehldiagnose, wie beispielsweise eine bakterielle Infektion, nicht ausschließt.

Die Parasitendichte variiert sehr deutlich während einer Infektion, teilweise werden im Rahmen einer Infektion sogar negative mikroskopische Befunde erhoben. In der hier durchgeführten Studie wurden Kinder von der Fallgruppe ausgeschlossen, wenn sie lediglich klinisch die Kriterien einer schweren Malaria erfüllten, der mikroskopische Befund von Plasmodien negativ ausfiel [99].

### 5.1.4 Vor- und Nachteile der angewendeten Labormethoden

Zur Genotypisierung von TLR-Sequenzen wurden die Sequenzierung sowie die *real-time*-PCR durchgeführt.

Das aufgrund der vielen Arbeitsschritte personal- und arbeitsaufwendige Verfahren der Sequenzierung setzt sich aus der PCR, der Überprüfung der PCR-Produkte am Gel, der Reinigung der PCR-Produkte, dem *Cycle Sequencing*, der Fällung der *Cycle-Sequencing*-Produkte sowie dem eigentlichen Sequenzierlauf zusammen. Vorteilhaft ist eine hohe Auflösung mit der Möglichkeit der Bestimmung der Abfolge der einzelnen Basen und insbesondere des Nachweises noch unbekannter Polymorphismen. Im Vergleich zur kostengünstigeren *real-time*-PCR ist der bei der Sequenzierung benötigte Zeitaufwand von ca. 12 Stunden bis zum Vorliegen des Ergebnisses deutlich höher. Durch die verschiedenen Arbeitsschritte bestehen viele Fehlermöglichkeiten und damit verbundener „Verschleiß“ von Patientenmaterial [87].

Zur funktionellen Analyse von synthetischem GPI als TLR-2- und TLR-4-Ligand wurden verschiedene Immunzelllinien stimuliert. Je nach Zelltyp wurde im Zellkulturüberstand die Zytokinproduktion bestimmt. Die Induktion der Zytokinsekretion war für alle verwendeten Kontroll-Liganden gleich deutlich, sowohl in der murinen, als auch in der humanen Zelllinie. Um zu vermeiden, dass die Untersuchungen nur an Zelllinien, die als „sehr künstliches“ System für funktionale Untersuchungen kritisiert werden, durchgeführt werden, erfolgten auch Untersuchungen mit humanen Monozyten freiwilliger Spender. In diesem System konnten die Ergebnisse analog zu denen der anderen Zelllinien bestätigt werden.

### 5.1.5 Zellstimulation mit synthetischem *Plasmodium falciparum*-GPI

Das Oberflächenprotein GPI verschiedener Protozoen aktiviert das angeborene Immunsystem [6], [72]. Das GPI als konserviertes Glycolipid auf der Oberfläche von *P. falciparum* ist ein Endotoxin dieser Parasiten, das eine bedeutende Rolle in der Pathologie der Malariaerkrankung spielt. Die Expression von iNOS [79] wie auch der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, V-Cam-1, E-Selektin in Endothelzellen [78] wird durch GPI von *P. falciparum* induziert. Die Zytokinproduktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 in Makrophagen

konnte durch GPI-Anker, die aus *P. falciparum* isoliert worden waren, induziert werden [77]. Bei Mäusen, die mit *P. falciparum*-GPI behandelt wurden, kam es zur Ausprägung der Symptome einer schweren Malaria. Die Entwicklung dieser Symptome wie Azidose, Lungenödem, zerebrale Beteiligung und erhöhte Sterblichkeit konnte durch eine vorangegangene Impfung mit GPI verhindert werden. Die Anti-GPI-Antikörper wirkten auf die proinflammatorische Immunantwort neutralisierend [74]. *In vivo* konnte eine positive Korrelation zwischen *P. falciparum*-spezifischen Anti-GPI-Antikörpern und der Immunität gegenüber der Erkrankung beobachtet werden. Die Anti-GPI-Antikörper-Produktion scheint einen protektiven Effekt auf die Ausbildung einer Malaria und den obligaten Hämoglobin-Abfall zu haben [75].

In den Versuchen mit synthetischem GPI, das keinen Lipidanteil besitzt, konnte in stimulierten humanen PBMC bzw. mit TLR transfizierten HEK293-Zellen keine Zytokinproduktion induziert werden. Dies entspricht dem Ergebnis vorangegangener Untersuchungen von Schofield [77] und Bäckhed [100], die zeigen, dass der Lipidanteil für eine Antwort des angeborenen Immunsystems notwendig ist. Das Hexasaccharid ohne Fettsäuren reicht für eine Stimulation der Rezeptoren von Makrophagen und HEK293-Zellen, die mit TLR-2 bzw. TLR-4 transfiziert worden waren, *in vitro* nicht aus. Damit entspricht dieses Ergebnis der Hypothese, dass sowohl der Kohlenhydrat- als auch der Lipidanteil für die Aktivierung der Zytokininduktion durch GPI benötigt werden.

In weiteren Untersuchungen, in denen synthetisches *P. falciparum*-GPI mit Lipidanteil eingesetzt wurde, konnte diese These allerdings nicht bestätigt werden. Auch hier blieb eine Stimulation von Mausmakrophagen der Zelllinie RAW264.7 und HEK293-Zellen, die mit TLR-2 wie auch TLR-4 transfiziert waren, aus. Schon das negative Ergebnis der fehlenden Zytokinproduktion der RAW 264.7-Zellen ließ vermuten, dass das hier eingesetzte GPI zu keiner Stimulation führt. Allerdings gibt es bisher kein ideales Tiermodell, das die Pathologie und Immunantwort der humanen Malaria adäquat imitiert [101]. So lag die Vermutung nahe, dass Mausimmunzellen eventuell nicht das ideale Versuchssystem darstellen. Die anschließend mit TLR-2 und TLR-4 transfizierten HEK293-Zellen reagierten jedoch auf die GPI-Stimulation auch nicht, während es durch Stimulation durch bekannte Liganden stets zu einer Aktivierung kam.

Die vorliegenden Resultate sind widersprüchlich zu dem im Jahr 2005 publizierten Bericht, der anhand von Experimenten mit murinen Makrophagenzelllinien,

transfizierten HEK293-Zellen und TLR-2- und TLR-4-defizienten Mäusen TLR-2 und TLR-4 als *P. falciparum*-GPI-Rezeptoren darstellte [5]. In diesen Versuchen wurde mit *P. falciparum*-GPI gearbeitet, das aus *P. falciparum* aufgereinigt worden war, während in den hier diskutierten Untersuchungen synthetisches GPI zum Einsatz kam. Die Methode, die angewandt wurde, GPI aus *P. falciparum* zu isolieren, schließt eine Kontamination durch Phospholipide und andere hydrophobe Komponenten nicht aus [102]. Durch den Einsatz synthetischer GPI-Varianten sollte diese Kontamination ausgeschlossen werden.

Durch das Ausbleiben eines Signals der mit TLR-4 transfizierten Zellen kann man davon ausgehen, dass die eingesetzten Stimulantien nicht mit TLR-4-Liganden wie LPS kontaminiert waren. Es wurden jeweils 10  $\mu\text{M}$  der synthetischen GPI-Varianten, Hexasaccharid und Disaccharid, beide einen Lipidanteil enthaltend, für die Stimulation der RAW 264.7- Zellen eingesetzt. Die mit TLR-2 und TLR-4 transfizierten HEK293-Zellen wurden mit 1 und 10  $\mu\text{M}$  GPI stimuliert. Es ist nicht bekannt, wie viel des aufgereinigten GPI in der Arbeit von Krishnegowda *et al.* [5] eingesetzt worden ist. Daher ist ein Vergleich mit unseren Ergebnissen nicht direkt möglich. Wahrscheinlich ist eine höhere als die von uns verwendete Menge an GPI notwendig, um eine Antwort des angeborenen Immunsystems über den TLR-Signaltransduktionsweg auszulösen. Es ist nicht eindeutig geklärt, in welchem Medium die Löslichkeit von GPI am besten ist. Die synthetischen GPI-Varianten wurden in dieser Arbeit in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst, da das synthetische *P. falciparum*-GPI in allen anderen organischen Lösungsmitteln nur unzureichend löslich ist [92]. Mit in diesen Untersuchungen sehr geringen eingesetzten Mengen des DMSO wurde verhindert, dass die zelltoxische Wirkung des DMSO zu groß war.

GPI sind hochkomplexe Moleküle, da sie eine Kombination aus Lipiden, Kohlenhydraten und Peptiden darstellen. Die Struktur des Lipidanteils ist noch nicht vollständig geklärt. Womöglich weicht die exakte Struktur des *P. falciparum*-GPI von der des hier eingesetzten ab [92], was ebenfalls eine Erklärung für das Ausbleiben einer Aktivierung des TLR-Signaltransduktionsweges sein könnte. Es bleibt abzuwarten, ob durch den Einsatz weiterer GPI-Varianten mit unterschiedlichen Lipidanteilen ein positives Ergebnis zu erzielen ist und der TLR-Signaltransduktionsweg auf diese Weise aktiviert wird [103].

### **5.2 Genetische Wirtsfaktoren und ihre Relevanz bei *Plasmodium falciparum*-Infektion**

Die Plasmodien-Infektion hat im Laufe der Evolution eine erhebliche Selektion auf die Menschheit ausgeübt. Die Malaria stellt den größten bekannten Selektionsfaktor auf das humane Genom dar [3]. Die Selektion erfolgt über den daraus entstehenden Überlebensvorteil, das Erreichen des Reproduktionsalters. In Endemiegebieten hat die Malaria folglich das Auftreten genetischer Varianten begünstigt, die in Abwesenheit von Malaria unter Umständen nachteilig gewesen wären. Bei Trägern dieser genetischen Varianten könnten sie jedoch durch einen gewissen Schutz vor Malaria diesen Nachteil kompensieren. Die hohe Prävalenz verschiedener genetischer Polymorphismen in heutigen oder ehemaligen Malariagebieten wird auf die Selektion durch den relativen Schutz vor Malaria zurückgeführt [104]. Die von Haldane bereits im Jahre 1949 formulierte „Malariahypothese“ beschreibt am Beispiel der  $\beta$ -Thalassämie und deren Selektion in Malaria-endemischen Gebieten einen Genpolymorphismus, der durch die Malaria balanciert wird. Haldane postulierte, dass das häufige Auftreten dieses vererbaren Erythrozytendefektes im Mittelmeerraum in einem Schutz vor der in früheren Zeiten in dieser Region endemischen Malaria und daraus folgender Selektion begründet läge. Die Nachteile homozygoter Anlageträger, die häufig frühzeitig verstarben, wurden durch eine bessere Überlebensfähigkeit heterozygoter Individuen ausgeglichen. Überträgt man diese Hypothese auf das Vorkommen anderer genetischer Varianten, müsste einerseits sich die Häufigkeit der Variante in Bevölkerungen proportional zur Malariaprävalenz verhalten, andererseits müssten Träger der Varianten eine vergleichsweise geringere Malariasterblichkeit aufweisen. Außerdem sollte nachweisbar sein, dass die Variante *in vitro* die Parasitenentwicklung hemmt.

Verschiedene Wirtsfaktoren tragen dazu bei, dass die Anfälligkeit für Malaria und die Manifestation der Krankheit bei einzelnen Individuen sehr unterschiedlich ausfällt. In Sri Lanka beispielsweise konnten etwa 15% der Varianz des Auftretens einer Malaria auf die Genetik des Menschen zurückgeführt werden [105]. Dieser Anteil wird in Afrika mit rund 25% veranschlagt, da hier eine noch höhere Zahl an Todesfällen durch Plasmodien verzeichnet werden muß [105]. Die Mortalitätsrate durch Malaria ist in einigen Teilen der Erde so hoch, dass eine Reihe von Polymorphismen, die vor dieser

Infektion einen Schutz bieten, deshalb weit verbreitet sind. Die meisten der „klassischen“ Schutzfaktoren wie die Hämoglobinvarianten Hb AC [81], Hb AS [106] und Hb AE [107] bzw. der G6PD (Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase)-Mangel treten in Gebieten, wo die Malaria endemisch vorkommt, als „balancierte Polymorphismen“ auf. Darunter versteht man die Ausbalancierung homozygoter Überlebensnachteile durch heterozygote Vorteile infolge des Schutzes vor der Malaria [108]. Die Thalassämien beschränken sich in ihrer Verbreitung auf ehemalige oder bestehende Endemiegebiete der Malaria, weshalb angenommen wird, dass sie einen gewissen Schutz vor tödlicher Malaria bieten. Es handelt sich um Mutationen der an der Hämoglobinsynthese beteiligten Globingene. Möglicherweise erfahren die Mutationsträger häufiger nicht-tödliche Krankheitsepisoden und entwickeln so rascher die Teilimmunität. Bei Patienten mit Sichelzellanämie konnte im Sinne der Malariahypothese epidemiologisch, klinisch und *in vitro* bestätigt werden, dass heterozygote Hb AS-Genträger vor tödlich verlaufender Malaria geschützt sind [109]. Das Risiko, an einer Malaria zu erkranken oder Komplikationen zu erleiden, reduziert sich durch die heterozygote Variante Hb AS um 70 – 90%. Die Varianten des Mangels an G6PD, deren Vorkommen weitestgehend auf die Endemiegebiete der Malaria begrenzt sind, bewirken eine etwa 50-prozentige Reduktion des Risikos, eine komplizierte Malaria mit Organversagen zu entwickeln [110].

Mockenhaupt et al. konnten zeigen, dass in Ghana, wo auch die Studienpopulation dieser Arbeit herkommt, sowohl Hb AS, Hb AC [81] wie auch  $\alpha^+$ -Thalassämie [84] einen Schutz vor der Entwicklung einer schweren Malaria bieten.

Neben den genetischen Varianten, die mit erythrozytären Defekten einhergehen, konnte in Westafrika auch für immungenetische Varianten gezeigt werden, dass ein Schutz vor schwerer Anämie und zerebralen Komplikationen der *P. falciparum*-Malaria besteht. Bestimmte HLA-Genotypen (*Human Leucocyte Antigen*) vermitteln im Rahmen der erworbenen Immunantwort eine Resistenz gegen schwere Verlaufsformen der Malaria [111]. Es wurde nachgewiesen, dass die Wirkung des HLA-B53, ein bestimmtes Allel des *Major Histocompatibility Complex* (MHC), auf die Präsentation eines Antigenes zurückzuführen ist, das von *P. falciparum* im Stadium der Leberschizonten exprimiert wird und T-Lymphozyten teilimmuner Bewohner des Endemiegebietes stimuliert [112].

Zusätzlich wurden verschiedene Polymorphismen des Wirtes von Mediatoren des angeborenen Immunsystems mit der Anfälligkeit für Malaria in Verbindung

gebracht. Es wurde gezeigt, dass sie unterschiedliche Effekte haben, einige bieten Schutz vor Malaria, andere wirken prädisponierend. Zu den untersuchten Genvarianten gehören Mannose-bindendes Lektin, die Stickoxid (NO) -bildende induzierbare NO-Synthase (iNOS), IFN-Rezeptoren (IFNGR1), TNF- $\alpha$  und der vaskuläre Hauptrezeptor für *P. falciparum*-infizierte Erythrozyten CD36 [113], [114], [115], [116]. Bei ihnen konnte eine prädisponierende oder protektive Funktion bei der klinischen Ausprägung der Malaria gezeigt werden.

Bisher gab es kaum Daten zur geographischen Verteilung und Frequenz von *TLR*-Polymorphismen auf dem afrikanischen Kontinent südlich der Sahara. Außerdem war bisher die Frage nicht beantwortet, inwiefern *TLR*-Polymorphismen in Zusammenhang mit einer Malaria durch *P. falciparum* stehen. Die Rolle von genetischen Variationen der *TLR* auf die Anfälligkeit für und die Manifestation einer Malaria wurde hier erstmals untersucht.

### 5.3 TLR und Malaria

Es gibt viele Hinweise darauf, dass *TLR* an der Erkennung von *P. falciparum* und der Pathogenese der Malariaerkrankung beteiligt sind. Die Aktivierung des *TLR*-MyD88-Signalweges durch eine Protozoeninfektion wurde erstmals im Jahr 2001 beschrieben. Hierbei wurde gezeigt, dass das Adapterprotein MyD88, das eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion über *TLR* und IL-1 spielt, bei einer Infektion mit dem Parasiten *P. berghei* für die IL-12-Induktion in dendritischen Zelle, erforderlich ist [117]. Als erster *TLR*, der an der Erkennung von Protozoen beteiligt ist, wurde *TLR*-2 als Rezeptor für das GPI von *T. cruzi* identifiziert [6]. Es wurde beschrieben, dass *TLR*-2 maßgeblich in die Erkennung von aufgereinigtem GPI aus *P. falciparum* und die Signalübertragung involviert ist [5]. Inzwischen hat sich herausgestellt, dass die Immunantwort im Rahmen der Chagas-Erkrankung, die durch das GPI von *T. cruzi* ausgelöst wird, mehr über *TLR*-4 als über *TLR*-2 vermittelt wird [118]. Zudem wurde demonstriert, dass sowohl *TLR*-2 wie auch *TLR*-4 in die Erkennung von *P. falciparum*-GPI involviert sind [5]. Darüber hinaus ist *TLR*-9 an der Auslösung des Fiebers bei Malaria beteiligt. Die Aktivierung von dendritischen Zellen durch Malaria-Schizonten erfolgt dabei durch Plasmodien-DNA, die an Hämozoïn, auch als Malariapigment bezeichnet, adsorbiert in die Immunzellen gelangt. Hämozoïn entsteht als hydrophobes

Häm-Polymer in der Nahrungsvakuole der Plasmodien während des Abbaus von Hämoglobin der Erythrozyten [40], [41], [119].

### 5.3.1 Genotypisierung der *TLR-2/TIR*-Domäne

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 870 Kinder einer Fall-Kontroll-Studie aus Ghana genotypisiert. Überraschenderweise konnte in unserer Studienpopulation aus dem subsaharischen Afrika keiner der bisher beschriebenen Polymorphismen der intrazellulären *TIR*-Domäne des TLR-2, die in anderen Populationen in hoher Frequenz gefunden wurden, detektiert werden.

Es stellt sich die Frage, warum die *TLR-2/TIR*-Polymorphismen in unserem Studienkollektiv aus einem Malariaendemiegebiet nicht nachgewiesen wurden. Es wurde zuvor in mehreren Studien mit unterschiedlichen Studienkollektiven gezeigt, dass Polymorphismen der *TLR-2/TIR*-Domäne mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionskrankheiten einhergehen. Der SNP Arg677Trp, der sich in einem konservierten Abschnitt der Region des C-Terminus der *TLR-2/TIR*-Domäne befindet, konnte bei kaukasischen, gesunden Probanden bisher nicht entdeckt werden [47], während er bei nordafrikanischen Tuberkulosepatienten mit einer Allelfrequenz von 47% beobachtet wurde [55]. Ein weiterer vorbeschriebener klinisch relevanter Polymorphismus der *TLR-2/TIR*-Domäne, Arg753Gln, der sich auch innerhalb der Region des C-Terminus befindet, kommt in verschiedenen europäischen Populationen bei bis zu 14% vor und inaktiviert die Signaltransduktion über TLR-2 [46], [47], [48]. Er wurde in Verbindung mit einem erhöhten Risiko für Tuberkulose in einer türkischen Population gebracht. Für homozygote Träger (AA-Genotyp) war das Risiko 6-fach, für heterozygote Träger (GA-Genotyp) 1,6-fach erhöht [49]. Weiterhin wurde eine erhöhte Anfälligkeit für Sepsis bei Infektion mit grampositiven Bakterien demonstriert [46]. Eine protektive Wirkung scheint er vor der Entwicklung des Spätstadiums der Lyme-Borreliose durch *B. burgdorferi* zu bieten [51]. Auch die *TLR-2*-SNPs Arg677Trp und Pro681His verursachen eine fehlerhafte Signalübertragung [48]. Keine dieser Studien wurde in Afrika südlich der Sahara durchgeführt. Die vorliegende Arbeit ist somit die erste Studie, die in dieser Region durchgeführt wurde. Außerdem gibt es bisher keinerlei Berichte über Studien, die das Vorkommen von *TLR-2*-Gen-Varianten in



Verbindung mit *P. falciparum*-Malaria beim Menschen untersuchen. Dies wurde in dieser Arbeit erstmals untersucht.

Die beschriebene Existenz eines Pseudogens im Zusammenhang mit dem Auftreten des SNP Arg677Trp [56] stellt die bisher veröffentlichten Daten in Frage. Dies könnte möglicherweise erklären, warum der *TLR-2*-SNP Arg677Trp in den hier untersuchten Proben aus Nordghana nicht zu finden war. Das Auftreten des Pseudogens bei dieser Studie wurde ausgeschlossen, indem die in dieser Arbeit eingesetzten Primer spezifisch für das *TLR-2*-Gen ausgewählt wurden.

Gleichwohl ist das Ergebnis, dass der *TLR-2*-SNP Arg753Gln ebenso nicht entdeckt werden konnte, recht verblüffend. Die Inzidenzrate der Tuberkulose ist in Ghana sehr hoch [120]. Dennoch werden die Ergebnisse dieser Arbeit durch eine kürzlich durchgeführte Studie aus dem Sudan unterstützt. Im Rahmen der sudanesischen Studie konnten ebenfalls keine der hier untersuchten *TLR-2*-SNP detektiert werden (L. Hamann, G. El Ghazali, H. El Turabi, I. El Khidir und R. R. Schumann, nicht publizierte Ergebnisse). In Afrika südlich der Sahara, wo die Malaria das größte Gesundheitsproblem unter den Infektionskrankheiten darstellt, könnte ein potentieller evolutionärer Nachteil, der von diesen Polymorphismen ausgeht, einen möglichen Vorteil überwiegen. Ein denkbarer Nachteil könnte die Inaktivierung des Signaltransduktionsweges über *TLR-2* bei der Infektion durch *P. falciparum* sein. Der, bisher nicht definierte, vorstellbare Vorteil wiederum könnte die vergleichsweise hohe Allelfrequenz bei Europäern, Asiaten und Nordafrikanern erklären. Vielleicht bieten diese *TLR-2*-Varianten durch das Ausschalten des Signaltransduktionsweges über *TLR-2* keinerlei Schutz vor *P. falciparum*-Malaria, haben unter Umständen eine schädliche Wirkung im Rahmen einer Malaria und kommen aufgrund dessen bei Afrikanern südlich der Sahara nicht vor. In einer Studie zum Vorkommen von *TLR*-Polymorphismen in Populationen aus Malariaendemiegebieten, die 2009 durchgeführt wurde, konnte hingegen kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Polymorphismen und einer natürlichen Selektion durch Malaria dargestellt werden [121].

### 5.3.2 Neue Mutation in hochkonservierter Region der *TLR-2/TIR*-Domäne, die zu Funktionsverlust des TLR-2 führt

Während bei den untersuchten Kindern mit schwerer Malaria in der *TLR-2/TIR*-Domäne keine neue Mutation detektiert werden konnte, trat in der Gruppe der gesunden Kontrollen eine neue, bisher nicht beschriebene Mutation auf: *TLR-2*-SNP Leu658Pro.

Die neu entdeckte Mutation am Basenpaar 2042 (C→A) bewirkt den Austausch von Leucin gegen Prolin am Kodon 658. Prolin ist wie das inerte Leucin eine hydrophobe Aminosäure mit großer aliphatischer Seitenkette, die Proteinstruktur könnte jedoch durch die heterozyklische Aminosäure Prolin verändert werden. Die Mutation befindet sich in einer hoch konservierten Region des *TLR-2*-Gens; in der Nähe der bekannten Mutationen Arg677Trp und Pro681His. Die dominant-negative Mutation Pro681His hebt die Interaktion mit MyD88 auf, welches für die Signaltransduktion des TLR-2 notwendig ist [94]. Interessant hierbei ist jedoch vielmehr, dass in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die neu entdeckte Mutation *TLR-2* Leu658Pro, wie die Funktionsverlustmutationen Arg677Trp, Arg753Gly und Pro681His, den Signaltransduktionsweg über TLR-2 *in vitro* inaktiviert. Hierzu wurde eine funktionelle Analyse durchgeführt, wobei HEK293-Zellen mit einem Plasmid, das den *TLR-2*-SNP-Leu658Pro enthielt, transfiziert wurden und mit einem Lipopeptid als bekanntes TLR-2-Stimulanz stimuliert wurden. Aufgrund der neu entdeckten Mutation im *TLR-2*-Gen war keine Aktivierung des TLR-2-Signaltransduktionsweges möglich. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass diese Region des *TLR-2*-Gens eine kritische Rolle im Signaltransduktionsweg über TLR-2 spielt. Das Auftreten dieser Genvariante ist jedoch zu selten, um im Studienkollektiv epidemiologische Relevanz zu besitzen. Ein möglicher Zusammenhang mit der Malaria bleibt wegen des seltenen Auftretens offen und könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

### 5.3.3 Bedeutung von *TLR-4*-Polymorphismen bei schwerer Malaria

Im Rahmen der hier durchgeführten Fall-Kontroll-Studie mit einem Studienkollektiv aus 870 Kindern wurde der Einfluss der häufigen *TLR-4*-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile auf die Suszeptibilität und Manifestation von Malaria untersucht. Die Ergebnisse der Genotypisierung ergeben den deutlichen Hinweis, dass die bekannten *TLR-4*-Polymorphismen Risikofaktoren für schwere Malariaverläufe bei Kindern in

Ghana darstellen. Dies unterstützt die Hypothese, dass die angeborene Immunantwort auf eine Infektion mit *P. falciparum* neben TLR-2 zusätzlich über TLR-4 vermittelt wird, was *in vitro* gezeigt werden konnte [5]. Dies legt nahe, dass TLR-4 an der Pathophysiologie der Malariaerkrankung beteiligt ist. In Analogie zu bakteriellen Infektionen könnte durch die bekannten *TLR-4*-Polymorphismen bei einer Infektion durch *P. falciparum* und vornehmlich einer Stimulation durch GPI die Aktivität des TLR-4 reduziert sein. Die Allelfrequenz der *TLR-4*-Polymorphismen war gegenüber der gesunden Kontrollgruppe bei den parasitärischen Kontrollen nur gering erhöht (s. Tabelle 5). Im Vergleich zu der Fallgruppe der Patienten mit schwerer Malaria ergab sich allerdings ein signifikanter Unterschied in der Allelfrequenz. Diese Beobachtung spricht gegen einen bedeutenden Einfluß der *TLR-4*-Polymorphismen auf die Suszeptibilität gegenüber einer Infektion durch *P. falciparum*. Allerdings deutet die signifikante Erhöhung der Allelfrequenzen zwischen gesunder Kontrollgruppe und schwer erkrankter Fallgruppe darauf hin, dass die *TLR-4*-Polymorphismen eine entscheidende Rolle im Krankheitsverlauf spielen.

Insgesamt ist nicht vollständig geklärt, welche Funktion TLR bei der Malariaerkrankung einnehmen. Die Immunantwort des angeborenen Immunsystems wird im Wesentlichen durch TLR aktiviert. Dadurch wird einerseits darauf abgezielt, Invasion von Pathogenen zu kontrollieren, andererseits mag die Aktivierung des angeborenen Immunsystems auch den Verlauf der Pathophysiologie verschärfen [4], [8]. Es wurde gezeigt, dass bei Mäusen eine Impfung mit *P. falciparum*-GPI einen protektiven Effekt in Bezug auf die Entwicklung einer Azidose, eines Lungenödems und einer zerebraler Symptomatik im Laufe einer Malariaerkrankung bewirken kann, während eine Parasitämie und schwere Anämie nicht verhindert werden konnten [74]. Folglich könnte man daraus schließen, dass aufgrund von *TLR*-Polymorphismen eine defiziente Erkennung des GPI und eine mangelhafte Signaltransduktion über TLR eine prädisponierende Wirkung für spezifische Symptome haben könnte. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden. Eine verminderte Fähigkeit, auf *P. falciparum* zu reagieren, könnte, teilweise durch eine unzureichende Antwort des angeborenen Immunsystems zu Beginn der Erkrankung, wie auch durch eine mangelnde Stimulation der erworbenen Immunität während folgenden Infektionen, eine schwere Malaria auslösen.

Es ist bekannt, dass TLR-4 neben anderen Liganden auch intrinsische Mediatoren wie *Heat-Shock*-Proteine erkennen. *Heat-Shock*-Proteine werden bei der schweren Malaria stark exprimiert [122]. Es ist denkbar, dass *TLR-4*-Polymorphismen dazu führen könnten, dass eine mögliche Erkennung dieser Proteine durch eine Abweichung vom üblichen Reaktionsmuster über TLR-4 eingeschränkt ist, und dies zur Manifestation der schweren Malaria beiträgt.

Interessanterweise deuten die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchung darauf hin, dass die *TLR-4*-Polymorphismen vor einem letalen Ausgang der schweren Malaria schützen. Ursächlich hierfür könnte eine weniger starke Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren sein, die einen tödlichen Ausgang fördern könnte. Allerdings erreicht diese Aussage aufgrund der geringen Fallzahl kein signifikantes Niveau. Möglichenfalls erhöhen einerseits die *TLR-4*-SNPs tatsächlich das Risiko, an Malaria zu erkranken. Andererseits verhindern sie gleichzeitig unter Umständen die Progression einer lebensbedrohlichen Malaria mit tödlichem Ausgang. In diesem Fall könnte die ebenfalls gefundene, im Gegensatz zu europäischen und amerikanischen Populationen außergewöhnlich hohe Allelfrequenz, insbesondere des *TLR-4*-SNP Asp299Gly von ca. 10% in der ghanaischen Studiengruppe, durch die natürliche Selektion begründet sein. Den Selektionsdruck würde hier nicht der Schutz vor der Erkrankung an Malaria sondern der Schutz vor einem tödlichen Ausgang einer schweren Malaria ausüben. Diese Hypothese sollte in Studien mit größeren Fallzahlen bestätigt werden. Die bisher vorliegenden Studienergebnisse zur Bewertung des Zusammenhanges von genetischen Varianten und Malaria sind nicht einheitlich. In einem Studienkollektiv aus einem Mesoendemiegebiet in Indien konnte überhaupt kein Zusammenhang zwischen *TLR-4*-Polymorphismen und Malaria nachgewiesen werden [123]. Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit nachgewiesenen erhöhten Risiko einer schweren Malaria konnte in einer kürzlich durchgeführten großen Fall-Kontroll-Studie mit 1862 Teilnehmern aus Kamerun ein nur marginaler Effekt von diesem Polymorphismus auf die schwere Malaria gezeigt werden [124]. Andererseits liegen Daten aus einer anderen indischen Studie vor, die darauf schließen lassen, dass der *TLR-4*-SNP Asp299Gly einen protektiven Effekt vor einer schweren Malaria hat [125]. Auch im Iran [126] und in Uganda [127] trat dieser Polymorphismus insbesondere bei Kindern mit milder Malaria und unkomplizierter Malaria auf. In einem Studienkollektiv aus einer holoendemischen Region in Brasilien ergab sich ein reduziertes Malariarisiko

für Träger des *TLR-4*-Polymorphismus [128]. In einem Studienkollektiv aus einer hochendemischen Region in Burundi wurde eine Allelfrequenz des Polymorphismus von <10% festgestellt ohne einen Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung nachzuweisen zu können [129]. Auch bezüglich des Auftretens des *TLR-4*-SNP Thr399Ile gibt es keine einheitlichen Daten, teilweise wurde ein Zusammenhang mit schwerer Malaria dargestellt, in anderen Studien trat der Polymorphismus in gleicher Frequenz bei Malariapatienten und gesunden Kontrollen auf, so dass sich kein Zusammenhang nachweisen ließ [125], [126]. Zusammengefaßt sind weitere Studien notwendig, die die Rolle von TLR-4 in der Erkennung von *P. falciparum* und der Immunantwort des Wirtes untersuchen.

Die Bedeutung von *TLR*-Polymorphismen ist möglicherweise so wie die klinische Manifestation der Krankheit von der Endemizität der Malaria abhängig. Dies würde der Rolle und der geographischen Verbreitung je nach lokalem Selektionsdruck anderer genetischer Wirtsfaktoren wie z. B. den iNOS-Polymorphismen [114] entsprechen. Der beobachtete Einfluss der *TLR-4*-Polymorphismen auf die schwere Malaria bei ghanaischen Kindern aus einer hochendemischen Region sollte in Gegenden mit unterschiedlicher Malariatransmission und Manifestationsmuster bestätigt werden.

Die Ursache der außergewöhnlich hohen Allelfrequenz der *TLR-4*-Polymorphismen in dieser afrikanischen Population ist ungeklärt. In einer Studie, die eine sudanesische Population untersuchte, konnte eine ähnlich hohe Prävalenz beobachtet werden (L. Hamann, G. El Ghazali, H. El Turabi, I. El Khidir und R. R. Schumann, nicht publizierte Ergebnisse). In einer groß angelegten Studie, die 2491 Individuen aus 15 verschiedenen Bevölkerungsgruppen bezüglich dem Auftreten von *TLR-4*-Polymorphismen untersuchte, wurde gezeigt, dass die Prävalenz des *TLR-4* Asp299Gly-Allels in den fünf untersuchten afrikanischen Populationen zwischen 10 und 18% liegt. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Studie bestätigt, dass in einer hyperendemischen Region in Kamerun die Anwesenheit des *TLR-4*-SNP Asp299Gly einerseits mit einer höheren Parasitämie (80% höher als bei Trägern des *TLR-4*-Wildtyps), andererseits einer niedrigeren Prävalenz von schwerer Malaria mit zerebralen Komplikationen einhergeht (12% vs. 24% bei Trägern des *TLR-4*-Wildtyps) [130]. Daraus wird ersichtlich, dass der *TLR-4*-SNP Asp299Gly neben beispielsweise der Sichelzellanämie, den Thalassämien und TNF- $\alpha$ -Polymorphismen zu den Genvarianten gezählt werden sollte, die durch die Malaria selektiert werden. Dies wirkt

die Frage auf, ob ein bisher unerkannter selektiver Vorteil, der durch die *TLR-4*-Polymorphismen entsteht, involviert ist. Wie weiter oben erläutert, ist denkbar, dass ein potentieller Vorteil der *TLR-4*-Polymorphismen darin besteht, dass sie mit einem reduzierten Risiko einhergehen, an schwerer Malaria zu versterben. Der hohe Selektionsdruck in Afrika, der von der Malaria ausgeht, scheint den negativen Effekt, den dieser Polymorphismus auf die Entwicklung einer schweren Sepsis durch gramnegative Infektionen hat, zu überwiegen.

Darüber hinaus ist zu beachten, dass systemische bakterielle Infektionen sowohl zu einem komplizierten Verlauf der schweren Malaria beitragen wie auch die Manifestation einer schweren Malaria imitieren können [131]. Dies bedeutet für die hier durchgeführte Arbeit, dass das beobachtete erhöhte Risiko für eine schwere Malaria bei einigen der Kinder, die Träger der *TLR-4*-Polymorphismen waren, zum Teil eine erhöhte Suszeptibilität für bakterielle Ko-Infektionen widerspiegeln mag [18]. Eine erhöhte Anfälligkeit für bestimmte bakterielle Infektionen, auch mit schwerem septischen Verlauf, ist bei Trägern des *TLR-4*-SNP Asp299Gly beispielsweise für gramnegative Infektionen gezeigt worden [59]. Dieser Störfaktor kann in dieser Arbeit nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Allerdings wird dessen Relevanz durch sorgfältige klinische Untersuchungen minimiert. Weiterhin spricht die eher niedrige Letalitätssrate bei den Kindern mit *TLR-4*-Polymorphismen (Träger des *TLR-4*-Wildtyps: 12,9%; Träger des SNP Asp299Gly ohne Thr399Ile 8,0%; Träger beider *TLR-4*-Polymorphismen 0% ( $P = 0,07$ )) gegen einen entsprechend großen Einfluss.

### 5.3.4 Bedeutung der Befunde zu *TLR*-Polymorphismen und Malaria

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen könnten auch Auswirkungen auf Kontrollmaßnahmen gegen die Malaria haben. Sowohl die Morbidität wie auch die Mortalität stellen in weiten Teilen Afrikas südlich der Sahara weiterhin größte Probleme dar [1]. Effiziente Kontrollmaßnahmen werden sehr dringend gebraucht. Ein Ansatz, die bedeutendste parasitäre Infektionskrankheit des Menschen einzudämmen, ist die Entwicklung eines GPI-basierten Impfstoffes [74]. Geht man davon aus, dass das GPI normalerweise unter anderem über *TLR-4* eine Immunantwort auslöst, könnte ein potentieller Impfschutz bei Trägern der *TLR-4*-Varianten eingeschränkt sein oder sogar ausbleiben, da über den veränderten *TLR-4* die gewünschte Antikörperproduktion

gestört sein könnte. Dies wäre in Populationen, wie in der hier untersuchten, mit hohen Allelfrequenzen der *TLR-4*-Polymorphismen von besonders großer Bedeutung, da diese Kontrollmaßnahme bei einem hohen Prozentsatz der Bevölkerung unter Umständen nicht fuß fassen würde. Gleiches gilt für Impfstoffe, die TLR-4-Agonisten als Adjuvans einsetzen [132]. Hier sei auf den RTS,S/AS02A-Impfstoff verwiesen, der sich in klinischen Studien wirksam erwiesen hat [133]. Der Adjuvans AS02A gehört zu den TLR-4-Agonisten [134] und steigert die Immunantwort auf die Impfung. Eine hohe Allelfrequenz von *TLR-4*-Polymorphismen könnte die Wirksamkeit des Impfstoffes durch ein vermindertes Ansprechen des Adjuvans als TLR-4-Agonist beeinflussen.

Im Kontext der Impfstoffentwicklung ist zu beachten, dass TLR-2 den Hauptrezeptor für das GPI von *P. falciparum* darzustellen scheint. Im Gegensatz zu den hohen Allelfrequenzen der *TLR-4*-Polymorphismen konnte in dieser Arbeit keiner der gängigen bekannten *TLR-2*-Polymorphismen in mehreren hundert afrikanischen Individuen detektiert werden.

Mutationen in weiteren Genen des TLR-Signalweges sind möglicherweise assoziiert mit der Anfälligkeit für eine Plasmodieninfektion.

Die im Jahre 2007 veröffentlichten Ergebnisse zur Prävalenz eines SNP im Bereich des *TIRAP* unterstützen diese Annahme. Es wurde gezeigt, dass der SNP Ser180Leu (rs8177374) des *TIRAP*-Gens eine signifikant protektive Wirkung vor Malaria hat. Dies geht aus einer Studie hervor, die 2296 afrikanische Individuen aus Kenia und Gambia untersucht hat [135]. Der SNP führt zu einem Funktionsverlust von Mal/TIRAP, das ein Adapterprotein im MyD88-abhängigen Signaltransduktionsweg über TLR-2 und TLR-4 darstellt [20], [136]. In der schon erwähnten Studie aus dem Jahre 2009 ergab sich allerdings kein Hinweis auf einen starken Selektionsdruck durch Malaria auf die untersuchten TLR- und TIRAP-Polymorphismen [121].

Der vollständige Signaltransduktionsweg über TLR ist bisher noch nicht vollkommen identifiziert. Man geht davon aus, dass weitere, noch unbekannte Adapterproteine involviert sind [137]. Diese müssen noch identifiziert werden, außerdem muß ihre Rolle bei der Infektionssuszeptibilität festgestellt werden.

Es wurde gezeigt, dass *P. falciparum*-DNA, die an Hämozoin gebunden wird, über TLR-9 dendritische Zellen und damit das angeborene Immunsystem aktiviert [40], [119]. Hämozoin wird von *P. falciparum* im Schizontenstadium produziert und vermittelt die Präsentation der Parasiten-DNA, wodurch die Produktion proinflammatorischer

Zytokine induziert wird [41]. Aufgrund der Hinweise, dass TLR-9 eine Rolle bei der *P. falciparum*-Malaria spielt, wurde das Studienkollektiv dieser Arbeit in unserem Labor von PD Dr. rer. nat. L. Hamann *et al.* auf das Vorkommen von häufigen *TLR-9*-Polymorphismen untersucht. In der *TLR-9/TIR*-Domäne wurde bei den 870 ghanaischen Kindern kein Polymorphismus detektiert. Ebenso zeigte das Vorkommen zweier häufiger *TLR-9*-Promotor-Polymorphismen (*TLR-9*-SNP T1237C und T1486C) keine klare Assoziation mit dem Schweregrad der Malaria bei den untersuchten Kindern. Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie bei 304 ghanaischen erstschwangeren Frauen gezeigt, dass der *TLR-9*-SNP T1486C einen Einfluss auf die Manifestation der plazentaren Malaria hat. Es wurde ein erhöhtes Risiko für die Geburt von Kindern mit niedrigem Geburtsgewicht beobachtet [138]. Verschiedene Studien, die den Einfluß des TLR-9 am murinen Modell auf die Entwicklung einer zerebralen Malaria untersuchten, ergaben konträre Resultate [139], [140], [141]. Das weitverbreitete Malariamedikament Chloroquin inhibiert die Hämazoin-induzierte Zytokinproduktion via TLR-9 [40]. Das Auftreten von *TLR-9*-SNP könnte daher eine Bedeutung für den therapeutischen Effekt von Chloroquin haben.

Insgesamt muss man die aktuell vorliegenden Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien, die den Zusammenhang zwischen Polymorphismen und der Empfänglichkeit für Infektionskrankheiten untersuchen, noch in zahlreichen Studien bestätigen. Es ist nötig, weitere Untersuchungen an großen Populationen durchzuführen, wie auch die Anzahl der durchgeführten Studien, die vor allem das Auftreten der SNP in Verbindung mit Infektionskrankheiten erforschen, zu erhöhen.

Prinzipiell ist zu beachten, dass es sich bei der Malaria, wie bei vielen Infektionskrankheiten, um eine Krankheit handelt, bei der nicht ein einziges Gen für die Suszeptibilität oder den Schutz verantwortlich ist, sondern mehrere Gene zu dem jeweiligen Phänotyp beitragen [142]. Somit ist es notwendig, die verschiedenen Faktoren, die zu einer Erkrankung führen, zu erkennen und die Zusammenhänge zu verstehen.



## 6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin (Base)
AIDS	engl. <i>acquired immune deficiency syndrome</i>
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
<i>B.</i>	<i>Borrelia</i>
bp	engl. <i>base pair</i> ; Basenpaar
C	Cytosin (Base)
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i> ; Oberflächenmarker
CpG-DNA	Cytosin-Phosphatbindung-Guanin-DNA
D	Aspartat
ddNTP	Didesoxyribonucleosidtriphosphate
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>desoxyribonucleid acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphate
dsRNA	engl. <i>double-stranded ribonucleic acid</i> ; doppelsträngige Ribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> ; fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin (Base)
g	Beschleunigung
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GMPD	engl. <i>geometric mean parasite density</i> ; Geometrisches Mittel der Parasitendichte
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	latein <i>hora</i> ; Stunde(n)
Hb	Hämoglobin
HEK293	engl. <i>human embryonic kidney cells 293</i> ; Humane embryonale Nierenzellen 293
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hsp	engl. <i>heat shock protein</i> ; Hitzeschockprotein
hTNF- $\alpha$	Humaner Tumornekrosefaktor $\alpha$
I	Isoleucin
ICAM-1	engl. <i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN	Interferon
IKK	Inhibitor-der-NF- $\kappa$ B-Kinasen-Komplex
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
IRAK	engl. <i>IL-1 receptor associated kinase</i>

## 6. Abkürzungsverzeichnis

kb	Kilobasenpaare
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
LBP	LPS-Bindendes Protein
Leu	Leucin
LP	Lipopeptid
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	engl. <i>leucine rich repeats</i>
LTA	engl. <i>lipoteichoic acid</i> ; Lipoteichonsäure
M	Molare Masse
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mLBP	membranständiges LBP
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MNC	engl. <i>mononuclear cells</i> ; Mononukleäre Zellen
ms	Millisekunde(n)
MSP	engl. <i>merozoite surface protein</i>
mTNF- $\alpha$	Muriner Tumornekrosefaktor $\alpha$
MyD88	engl. <i>myeloid differentiation factor 88</i>
n	Anzahl der Fallzahl in absoluten Zahlen
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	engl. <i>nitric oxide</i> ; Stickoxid
OR	engl. <i>Odds Ratio</i> , Quotenverhältnis
<i>P</i>	p-Wert (stat.)
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PAF	Plättchen-Aktivierender Faktor
PAMP	engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PG	Peptidoglycan
Pro	Prolin
PRR	engl. <i>Pattern-Recognition Receptors</i>
PTCA	engl. <i>percutaneous transluminal coronary angioplasty</i> ; Herzkranzgefäßerweiterung
Q	Glutamin
R	Arginin
RA	Rheumatoide Arthritis
RAMA	engl. <i>rhoptry-associated membrane antigen</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure

## 6. Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SD	engl. <i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
sLBP	engl. <i>soluble LBP</i> ; lösliches LBP
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
SLS	engl. <i>sample loading solution</i>
SNP	engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>
<i>spec.</i>	latein <i>species</i> ; Spezies
<i>spp.</i>	Subspezies
ssRNA	engl. <i>single-stranded ribonucleic acid</i> ; einzelsträngige Ribonukleinsäure
T	Thymin (Base)
T	Threonin
TH-1	T-Helferzellen-Typ-1
Thr	Threonin
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TIRAP	engl. <i>TIR domain containing adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Assoziierter Faktor
Trp	Tryptophan
U	engl. <i>unit</i>
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
VCAM-1	engl. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
W	Tryptophan
WHO	engl. <i>World Health Organization</i>
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

---

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Lebenszyklus der <i>P. falciparum</i> -Parasiten .....	6
Abbildung 2. Schematische Darstellung der TLR und einiger Liganden .....	14
Abbildung 3. Struktur des <i>P. falciparum</i> -GPI .....	20
Abbildung 4. Synthetisches <i>P. falciparum</i> -GPI .....	35
Abbildung 5. <i>TLR-2/TIR</i> Wildtyp und neu entdeckte Mutation: <i>TLR-2</i> Leu658Pro .....	50
Abbildung 6 a + b. Sequenzausschnitt der <i>TLR-2/TIR</i> -Domäne .....	51
Abbildung 7. Funktionelle Analyse der gefundenen Neumutation <i>TLR-2</i> Leu658Pro innerhalb der <i>TLR-2/TIR</i> -Domäne .....	52
Abbildung 8. Stimulation humaner PBMC: TNF- $\alpha$ -Produktion nach Stimulation mit <i>P. falciparum</i> -GPI (Hexasaccharid ohne Lipidanker) in steigenden Konzentrationen .....	53
Abbildung 9. Stimulation Humaner Embryonaler Nierenzellen 293 (transfiziert mit <i>TLR-2</i> ): Luciferase-Aktivität ( <i>relative light</i> <i>units</i> , RLU) nach Stimulation mit <i>P. falciparum</i> -GPI (Hexasaccharid ohne Lipidanker) in steigenden Konzentrationen .....	54
Abbildung 10. Stimulation muriner RAW264.7-Zellen: TNF- $\alpha$ -Produktion nach Stimulation mit den <i>P. falciparum</i> -GPI-Varianten Disaccharid mit drei Lipidankern (GPI-PF3) und Hexasaccharid mit Lipidanteil (GPI-PF1) in steigenden Konzentrationen .....	55
Abbildung 11. Stimulation Humaner Embryonaler Nierenzellen 293 (transfiziert mit <i>TLR-2</i> ): Luciferase-Aktivität (RLU) nach Stimulation mit den <i>P. falciparum</i> -GPI-Varianten Disaccharid	

mit drei Lipidankern (GPI-PF3) und Hexasaccharid mit Lipidanteil (GPI-PF1) in steigenden Konzentrationen .....	56
<b>Abbildung 12. Stimulation Humaner Embryonaler Nierenzellen 293 (transfiziert mit <i>TLR-4</i> und <i>MD-2</i>): Luciferase-Aktivität (RLU) nach Stimulation mit den <i>P. falciparum</i>-GPI-Varianten Disaccharid mit drei Lipidankern (GPI-PF3) und Hexasaccharid mit Lipidanteil (GPI-PF1) in steigenden Konzentrationen .....</b>	<b>57</b>

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Liganden der TLR .....	15
Tabelle 2. Programm der PCR-Zyklen der allel-spezifischen PCR .....	26
Tabelle 3. Programm der Real-Time PCR am <i>LightCycler</i> .....	27
Tabelle 4. Programm der PCR-Zyklen .....	28
Tabelle 5: Programm der Sequenzierreaktion .....	31
Tabelle 6. Charakteristika der Fallgruppe: 290 Kinder mit schwerer Malaria .....	45
Tabelle 7. Verteilung der <i>TLR-4</i> -Polymorphismen unter den Patienten mit schwerer Malaria und den Kontrollgruppen .....	47
Tabelle 8. Risikoabschätzung (OR) für Träger von <i>TLR-4</i> SNP an schwerer schwerer Malaria zu erkranken, unter Berücksichtigung der Hämoglobinvarianten HbAS und HbAC .....	48
Tabelle 9. Laborparameter bei Patienten mit schwerer Malaria, unterteilt nach den <i>TLR-4</i> -Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile .....	49

**9 Literaturverzeichnis**

1. WHO/UNICEF. The Africa Malaria Report 2013: World Health Organization, UNICEF, 2013.
2. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409:928-33.
3. Hoffman SL, Subramanian GM, Collins FH, Venter JC. Plasmodium, human and Anopheles genomics and malaria. *Nature* 2002;415:702-9.
4. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature reviews* 2004;4:169-80.
5. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, Woods AS, Gowda DC. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 2005;280:8606-16.
6. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 2001;167:416-23.
7. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, Gonzalez A, Maldonado C, Isibasi A. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003;130:65-74.
8. Gazzinelli RT, Ropert C, Campos MA. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev* 2004;201:9-25.
9. Debierre-Grockiego F, Campos MA, Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Resende MG, Mansur DS, Weingart R, Schmidt RR, Golenbock DT, Gazzinelli RT, Schwarz RT. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from Toxoplasma gondii. *J Immunol* 2007;179:1129-37.
10. Marsh K. Malaria--a neglected disease? *Parasitology* 1992;104 Suppl:S53-69.
11. Greenwood B, Mutabingwa T. Malaria in 2002. *Nature* 2002;415:670-2.
12. Ross R. Memoires - with a full account of the great malaria problem and its solution. Murray, London 1923.
13. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002;415:673-9.
14. Rhee MS, Akanmori BD, Waterfall M, Riley EM. Changes in cytokine production associated with acquired immunity to Plasmodium falciparum malaria. *Clin Exp Immunol* 2001;126:503-10.
15. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, Legros F, Badji A, Ndiaye G, Ndiaye P, et al. The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:123-37.

16. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
17. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1-14.
18. Schroder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *The Lancet infectious diseases* 2005;5:156-64.
19. Rahman MM, McFadden G. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS pathogens* 2006;2:e4.
20. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews* 2004;4:499-511.
21. de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol* 2003;33:2822-31.
22. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature reviews* 2003;3:169-76.
23. Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985;42:791-8.
24. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-83.
25. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
26. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 2010;11:373-84.
27. O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2000;2000:RE1.
28. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nature immunology* 2001;2:835-41.
29. Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *International immunopharmacology* 2003;3:119-28.
30. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998;282:2085-8.
31. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature immunology* 2000;1:398-401.
32. Tal G, Mandelberg A, Dalal I, Cesar K, Somekh E, Tal A, Oron A, Itskovich S, Ballin A, Houry S, Beigelman A, Lider O, Rechavi G, Amariglio N. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis* 2004;189:2057-63.
33. Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1999;163:3920-7.
34. Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* 2002;185:1483-9.

35. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;11:443-51.
36. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999;274:17406-9.
37. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999;285:736-9.
38. Kirschning CJ, Schumann RR. TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. *Current topics in microbiology and immunology* 2002;270:121-44.
39. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13766-71.
40. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T, Akira S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 2005;201:19-25.
41. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, Halmen KA, Lamphier M, Olivier M, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, Golenbock DT. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1919-24.
42. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099-103.
43. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-5.
44. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-8.
45. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303:1526-9.
46. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 2000;68:6398-401.
47. Schroder NW, Hermann C, Hamann L, Gobel UB, Hartung T, Schumann RR. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol Med* 2003;81:368-72.
48. Bochud PY, Hawn TR, Aderem A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepomatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J Immunol* 2003;170:3451-4.
49. Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, Coskun M, Cilli A, Yegin O. The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* 2004;23:219-23.
50. Ahmad-Nejad P, Mrabet-Dahbi S, Breuer K, Klotz M, Werfel T, Herz U, Heeg K, Neumaier M, Renz H. The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:565-7.



51. Schroder NW, Diterich I, Zinke A, Eckert J, Draing C, von Baehr V, Hassler D, Priem S, Hahn K, Michelsen KS, Hartung T, Burmester GR, Gobel UB, Hermann C, Schumann RR. Heterozygous Arg753Gln polymorphism of human TLR-2 impairs immune activation by *Borrelia burgdorferi* and protects from late stage Lyme disease. *J Immunol* 2005;175:2534-40.
52. Hamann L, Gomma A, Schroder NW, Stamme C, Glaeser C, Schulz S, Gross M, Anker SD, Fox K, Schumann RR. A frequent toll-like receptor (TLR)-2 polymorphism is a risk factor for coronary restenosis. *J Mol Med* 2005;83:478-85.
53. Sanchez E, Orozco G, Lopez-Nevot MA, Jimenez-Alonso J, Martin J. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2004;63:54-7.
54. Kang TJ, Lee SB, Chae GT. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine* 2002;20:56-62.
55. Ben-Ali M, Barbouche MR, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K. Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:625-6.
56. Malhotra D, Relhan V, Reddy BS, Bamezai R. TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited. *Hum Genet* 2005;116:413-5.
57. Rallabhandi P, Bell J, Boukhvalova MS, Medvedev A, Lorenz E, Arditi M, Hemming VG, Blanco JC, Segal DM, Vogel SN. Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol* 2006;177:322-32.
58. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-91.
59. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002;162:1028-32.
60. Agnese DM, Calvano JE, Hahn SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002;186:1522-5.
61. Genc MR, Vardhana S, Delaney ML, Onderdonk A, Tuomala R, Norwitz E, Witkin SS. Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;116:152-6.
62. Van der Graaf CA, Netea MG, Morre SA, Den Heijer M, Verweij PE, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for *Candida* bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:29-34.
63. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002;347:185-92.
64. Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, Chollet-Martin S, Aumont MC, Seknadji P, Lamotte M, Leuret D, Ollivier V, de Prost D. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:e61-4.
65. Fageras Bottcher M, Hmani-Aifa M, Lindstrom A, Jenmalm MC, Mai XM, Nilsson L, Zdolsek HA, Bjorksten B, Soderkvist P, Vaarala O. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:561-7.

- 66.** Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature immunology* 2004;5:975-9.
- 67.** Read RC, Pullin J, Gregory S, Borrow R, Kaczmarek EB, di Giovine FS, Dower SK, Cannings C, Wilson AG. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2001;184:640-2.
- 68.** Smirnova I, Mann N, Dols A, Derkx HH, Hibberd ML, Levin M, Beutler B. Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6075-80.
- 69.** Ferguson MA. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci* 1999;112 ( Pt 17):2799-809.
- 70.** Sanders PR, Gilson PR, Cantin GT, Greenbaum DC, Nebl T, Carucci DJ, McConville MJ, Schofield L, Hodder AN, Yates JR, 3rd, Crabb BS. Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2005;280:40169-76.
- 71.** Naik RS, Krishnegowda G, Gowda DC. Glucosamine inhibits inositol acylation of the glycosylphosphatidylinositol anchors in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2003;278:2036-42.
- 72.** Ropert C, Gazzinelli RT. Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:395-403.
- 73.** Gowda DC. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol* 2007;23:596-604.
- 74.** Schofield L, Hewitt MC, Evans K, Siomos MA, Seeberger PH. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature* 2002;418:785-9.
- 75.** Naik RS, Branch OH, Woods AS, Vijaykumar M, Perkins DJ, Nahlen BL, Lal AA, Cotter RJ, Costello CE, Ockenhouse CF, Davidson EA, Gowda DC. Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med* 2000;192:1563-76.
- 76.** Vijaykumar M, Naik RS, Gowda DC. *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol-induced TNF-alpha secretion by macrophages is mediated without membrane insertion or endocytosis. *J Biol Chem* 2001;276:6909-12.
- 77.** Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* 1993;177:145-53.
- 78.** Schofield L, Novakovic S, Gerold P, Schwarz RT, McConville MJ, Tachado SD. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol* 1996;156:1886-96.
- 79.** Tachado SD, Gerold P, McConville MJ, Baldwin T, Quilici D, Schwarz RT, Schofield L. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Immunol* 1996;156:1897-907.
- 80.** Tachado SD, Gerold P, Schwarz R, Novakovic S, McConville M, Schofield L. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase

C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:4022-7.

**81.** Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Cramer JP, Otchwemah RN, Anemana SD, Goltz K, Mylius F, Dietz E, Eggelte TA, Bienzle U. Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children. J Infect Dis 2004;190:1006-9.

**82.** Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000;94 Suppl 1:S1-90.

**83.** Molyneux ME, Taylor TE, Wirima JJ, Borgstein A. Clinical features and prognostic indicators in paediatric cerebral malaria: a study of 131 comatose Malawian children. Q J Med 1989;71:441-59.

**84.** Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Gellert S, Otchwemah RN, Dietz E, Anemana SD, Bienzle U. Alpha(+)-thalassemia protects African children from severe malaria. Blood 2004;104:2003-6.

**85.** Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Burkhardt J, Bosomtwe SY, Laryea S, Anemana SD, Otchwemah RN, Cramer JP, Dietz E, Gellert S, Bienzle U. Manifestation and outcome of severe malaria in children in northern Ghana. Am J Trop Med Hyg 2004;71:167-72.

**86.** Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV, Coulibaly D. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. N Engl J Med 2001;344:257-63.

**87.** Hamann L, Hamprecht A, Gomma A, Schumann RR. Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, and -9 genes. J Immunol Methods 2004;285:281-91.

**88.** Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988;239:487-91.

**89.** Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. Biochim Biophys Acta 1972;269:192-200.

**90.** Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977;74:5463-7.

**91.** Muhlradt PF, Kiess M, Meyer H, Sussmuth R, Jung G. Structure and specific activity of macrophage-stimulating lipopeptides from Mycoplasma hyorhinis. Infect Immun 1998;66:4804-10.

**92.** Liu X, Kwon YU, Seeberger PH. Convergent synthesis of a fully lipidated glycosylphosphatidylinositol anchor of Plasmodium falciparum. J Am Chem Soc 2005;127:5004-5.

**93.** Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, Otchwemah RN, Dietz E, Ehrhardt S, Schroder NW, Bienzle U, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:177-82.

**94.** Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA, Jr. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. Mol Cell 1998;2:253-8.

**95.** Sachs L. *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*: Springer, 1999.

**96.** Weiß C. *Basiswissen Medizinische Statistik*: Springer, 2005.

**97.** White N. Malaria. In: Cook GC, ed. *Manson's Tropical Diseases*. 20th edition ed: WB Saunders, London, 1996:1087-165.

**98.** Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1993;61:315-20.

- 99.** Delley V, Bouvier P, Breslow N, Doumbo O, Sagara I, Diakite M, Mauris A, Dolo A, Rougemont A. What does a single determination of malaria parasite density mean? A longitudinal survey in Mali. *Trop Med Int Health* 2000;5:404-12.
- 100.** Backhed F, Normark S, Schweda EK, Oscarson S, Richter-Dahlfors A. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes Infect* 2003;5:1057-63.
- 101.** Langhorne J, Quin SJ, Sanni LA. Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. *Chem Immunol* 2002;80:204-28.
- 102.** Azzouz N, Shams-Eldin H, Schwarz RT. Removal of phospholipid contaminants through precipitation of glycosylphosphatidylinositols. *Anal Biochem* 2005;343:152-8.
- 103.** Wichmann D, Schwarz RT, Ruppert V, Ehrhardt S, Cramer JP, Burchard GD, Maisch B, Debierre-Grockiego F. Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol induces limited apoptosis in liver and spleen mouse tissue. *Apoptosis* 2007;12:1037-41.
- 104.** Haldane JBS. The rate of mutation of human genes. *Hereditas* 1949;35 (supplement):267-72.
- 105.** Mackinnon MJ, Gunawardena DM, Rajakaruna J, Weerasingha S, Mendis KN, Carter R. Quantifying genetic and nongenetic contributions to malarial infection in a Sri Lankan population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12661-6.
- 106.** Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, McElroy PD, ter Kuile FO, Kariuki S, Nahlen BL, Lal AA, Udhayakumar V. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet* 2002;359:1311-2.
- 107.** Chotivanich K, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Chierakul W, Simpson J, Looareesuwan S, White N. Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe P falciparum malaria. *Blood* 2002;100:1172-6.
- 108.** Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994;84:3613-36.
- 109.** Allison AC. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J* 1954;1:290-4.
- 110.** Bienzle U, Ayeni O, Lucas AO, Luzzatto L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria. Greater resistance of females heterozygous for enzyme deficiency and of males with non-deficient variant. *Lancet* 1972;1:107-10.
- 111.** Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM. Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 1991;352:595-600.
- 112.** Hill AV, Elvin J, Willis AC, Aidoo M, Allsopp CE, Gotch FM, Gao XM, Takiguchi M, Greenwood BM, Townsend AR, et al. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 1992;360:434-9.
- 113.** Luty AJ, Kun JF, Kremsner PG. Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis* 1998;178:1221-4.
- 114.** Cramer JP, Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Burkhardt J, Otchwemah RN, Dietz E, Gellert S, Bienzle U. iNOS promoter variants and severe malaria in Ghanaian children. *Trop Med Int Health* 2004;9:1074-80.
- 115.** Koch O, Awomoyi A, Usen S, Jallow M, Richardson A, Hull J, Pinder M, Newport M, Kwiatkowski D. IFNGR1 gene promoter polymorphisms and susceptibility to cerebral malaria. *J Infect Dis* 2002;185:1684-7.
- 116.** Aitman TJ, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Gray JK, Curtis BR, McKeigue PM, Kwiatkowski D, Greenwood BM, Snow RW, Hill AV, Scott J. Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature* 2000;405:1015-6.
- 117.** Adachi K, Tsutsui H, Kashiwamura S, Seki E, Nakano H, Takeuchi O, Takeda K, Okumura K, Van Kaer L, Okamura H, Akira S, Nakanishi K. Plasmodium berghei

infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J Immunol* 2001;167:5928-34.

**118.** Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, Akira S, Previato JO, Mendonca-Previato L, Nobrega A, Bellio M. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* 2004;173:5688-96.

**119.** Pichyangkul S, Yongvanitchit K, Kum-arb U, Hemmi H, Akira S, Krieg AM, Heppner DG, Stewart VA, Hasegawa H, Looareesuwan S, Shanks GD, Miller RS. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *J Immunol* 2004;172:4926-33.

**120.** Lawn SD. Tuberculosis in Ghana: social stigma and compliance with treatment. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:1190-1.

**121.** Greene JA, Moormann AM, Vulule J, Bockarie MJ, Zimmerman PA, Kazura JW. Toll-like receptor polymorphisms in malaria-endemic populations. *Malar J* 2009;8:50.

**122.** Medana IM, Mai NT, Day NP, Hien TT, Bethell D, Phu NH, Farrar J, White NJ, Turner GD. Cellular stress and injury responses in the brains of adult Vietnamese patients with fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001;27:421-33.

**123.** Sawian CE, Lourembam SD, Banerjee A, Baruah S. Polymorphisms and expression of TLR4 and 9 in malaria in two ethnic groups of Assam, northeast India. *Innate Immun* 2013;19:174-83.

**124.** Apinjoh TO, Anchang-Kimbi JK, Njua-Yafi C, Mugri RN, Ngwai AN, Rockett KA, Mbunwe E, Besingi RN, Clark TG, Kwiatkowski DP, Achidi EA, Malaria GENC. Association of cytokine and toll-like receptor gene polymorphisms with severe malaria in three regions of cameroon. *PLoS One* 2013;8:e81071.

**125.** Basu M, Maji AK, Chakraborty A, Banerjee R, Mullick S, Saha P, Das S, Kanjilal SD, Sengupta S. Genetic association of Toll-like-receptor 4 and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms with *Plasmodium falciparum* blood infection levels. *Infect Genet Evol* 2010;10:686-96.

**126.** Zakeri S, Pirahmadi S, Mehrizi AA, Djadid ND. Genetic variation of TLR-4, TLR-9 and TIRAP genes in Iranian malaria patients. *Malar J* 2011;10:77.

**127.** Sam-Agudu NA, Greene JA, Opoka RO, Kazura JW, Boivin MJ, Zimmerman PA, Riedesel MA, Bergemann TL, Schimmenti LA, John CC. TLR9 polymorphisms are associated with altered IFN-gamma levels in children with cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82:548-55.

**128.** da Silva Santos S, Clark TG, Campino S, Suarez-Mutis MC, Rockett KA, Kwiatkowski DP, Fernandes O. Investigation of host candidate malaria-associated risk/protective SNPs in a Brazilian Amazonian population. *PLoS One* 2012;7:e36692.

**129.** Esposito S, Molteni CG, Zampiero A, Baggi E, Lavizzari A, Semino M, Daleno C, Groppo M, Scala A, Terranova L, Miozzo M, Pelucchi C, Principi N. Role of polymorphisms of toll-like receptor (TLR) 4, TLR9, toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein (TIRAP) and FCGR2A genes in malaria susceptibility and severity in Burundian children. *Malar J* 2012;11:196.

**130.** Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, 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 CC, Stalenhoef AF, van Crevel R, Brunner HG, Oh DY, Schumann RR, de la Rua C, Sauerwein R, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW, Netea MG. TLR4 polymorphisms,

infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:16645-50.

**131.** Evans JA, Adusei A, Timmann C, May J, Mack D, Agbenyega T, Horstmann RD, Frimpong E. High mortality of infant bacteraemia clinically indistinguishable from severe malaria. *QJM* 2004;97:591-7.

**132.** Fox CB, Moutaftsi M, Vergara J, Desbien AL, Nana GI, Vedvick TS, Coler RN, Reed SG. TLR4 ligand formulation causes distinct effects on antigen-specific cell-mediated and humoral immune responses. *Vaccine* 2013;31:5848-55.

**133.** Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP, Conzelmann C, Methogo BG, Doucka Y, Flamen A, Mordmuller B, Issifou S, Kremsner PG, Sacarlal J, Aide P, Lanasma M, Aponte JJ, Nhamuave A, Quelhas D, Bassat Q, Mandjate S, Macete E, Alonso P, Abdulla S, Salim N, Juma O, Shomari M, Shubis K, Machera F, Hamad AS, Minja R, Mtoro A, Sykes A, Ahmed S, Urassa AM, Ali AM, Mwangoka G, Tanner M, Tinto H, D'Alessandro U, Sorgho H, Valea I, Tahita MC, Kabore W, Ouedraogo S, Sandrine Y, Guiguemde RT, Ouedraogo JB, Hamel MJ, Kariuki S, Odero C, Oneko M, Otieno K, Awino N, Omoto J, Williamson J, Muturi-Kioi V, Laserson KF, Slutsker L, Otieno W, Otieno L, Nekoye O, Gondi S, Otieno A, Ogutu B, Wasuna R, Owira V, Jones D, Onyango AA, Njuguna P, Chilengi R, Akoo P, Kerubo C, Gitaka J, Maingi C, Lang T, Olotu A, Tsofa B, Bejon P, Peshu N, Marsh K, Owusu-Agyei S, Asante KP, Osei-Kwakye K, Boahen O, Ayamba S, Kayan K, Owusu-Ofori R, Dosoo D, Asante I, Adjei G, Chandramohan D, Greenwood B, Lusingu J, Gesase S, Malabeja A, Abdul O, Kilavo H, Mahende C, Liheluka E, Lemnge M, Theander T, Drakeley C, Ansong D, Agbenyega T, Adjei S, Boateng HO, Rettig T, Bawa J, Sylverken J, Sambian D, Agyekum A, Owusu L, Martinson F, Hoffman I, Mvalo T, Kamthunzi P, Nkomo R, Msika A, Jumbe A, Chome N, Nyakuipa D, Chintedza J, Ballou WR, Bruls M, Cohen J, Guerra Y, Jongert E, Lapierre D, Leach A, Lievens M, Ofori-Anyinam O, Vekemans J, Carter T, Leboulleux D, Loucq C, Radford A, Savarese B, Schellenberg D, Sillman M, Vansadia P, Rts SCTP. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* 2011;365:1863-75.

**134.** Baldrige JR, McGowan P, Evans JT, Cluff C, Mossman S, Johnson D, Persing D. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1129-38.

**135.** Khor CC, Chapman SJ, Vannberg FO, Dunne A, Murphy C, Ling EY, Frodsham AJ, Walley AJ, Kyrieleis O, Khan A, Aucan C, Segal S, Moore CE, Knox K, Campbell SJ, Lienhardt C, Scott A, Aaby P, Sow OY, Grignani RT, Sillah J, Sirugo G, Peshu N, Williams TN, Maitland K, Davies RJ, Kwiatkowski DP, Day NP, Yala D, Crook DW, Marsh K, Berkley JA, O'Neill LA, Hill AV. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet* 2007;39:523-8.

**136.** Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002;420:324-9.

**137.** Beutler B, Hoebe K, Georgel P, Tabeta K, Du X. Genetic analysis of innate immunity: TIR adapter proteins in innate and adaptive immune responses. *Microbes Infect* 2004;6:1374-81.

**138.** Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, von Gaertner C, Boye R, Fricke K, Hannibal I, Karakaya F, Schaller M, Ulmen U, Acquah PA, Dietz E, Eggelte TA, Bienzle U. Detection and clinical manifestation of placental malaria in southern Ghana. *Malar J* 2006;5:119.

- 139.** Coban C, Ishii KJ, Uematsu S, Arisue N, Sato S, Yamamoto M, Kawai T, Takeuchi O, Hisaeda H, Horii T, Akira S. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immunol* 2007;19:67-79.
- 140.** Togbe D, Schofield L, Grau GE, Schnyder B, Boissay V, Charron S, Rose S, Beutler B, Quesniaux VF, Ryffel B. Murine cerebral malaria development is independent of toll-like receptor signaling. *Am J Pathol* 2007;170:1640-8.
- 141.** Lepenies B, Cramer JP, Burchard GD, Wagner H, Kirschning CJ, Jacobs T. Induction of experimental cerebral malaria is independent of TLR2/4/9. *Med Microbiol Immunol* 2008;197:39-44.
- 142.** Hedding A. Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces. *Int J Parasitol* 2002;32:1587-98.

### 10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Miriam Songa Stegemann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Bedeutung genetischer Varianten von Toll-like-Rezeptoren (TLR) bei der schweren Malaria und Untersuchung zum TLR-Liganden Glykosylphosphatidylinositol (GPI)“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

01.04.2014

Miriam Songa Stegemann

#### Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Miriam Songa Stegemann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

- Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, **Stegemann MS** et al. “Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria“. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jan 3;103(1):177-82.  
Beitrag im Einzelnen: Sequenzierung *TLR2 TIR*-Domäne, teilweise *TLR2/4* SNP  
Typisierung, GPI Stimulationsassays

Prof. Dr. med. Frank P. Mockenhaupt (betreuender Hochschullehrer)

Miriam Songa Stegemann (Doktorandin)



### **11 Lebenslauf**

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."



### 12 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Frank P. Mockenhaupt, danke ich sehr herzlich für seine gute Betreuung, Kooperationsbereitschaft und jede Hilfestellung.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. U. Bienzle, dem ich meine Dankbarkeit leider nicht mehr aussprechen kann, für die Überlassung des Themas und die zuverlässige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. R. R. Schumann danke ich für die große Unterstützung, besonders beim Anfertigen des praktischen Teils dieser Arbeit in den Laboren des Institutes für Mikrobiologie und Hygiene der Charité. Herrn Dr. rer. nat. Lutz Hamann danke ich für die durchgeführten Laboruntersuchungen.

Frau Dr. rer. nat. Jana Eckert danke ich für die unendliche Geduld und Hilfsbereitschaft, zahlreiche Gespräche und die konstruktive Kritik beim Verfassen meiner Arbeit.

Frau Dr. med. Djin-Ye Oh, Suse Röwer, Diana Wöllner, Fränzi Creutzburg, Sabine Bobbe, Frau Dr. med. Janine Zweigner und Herrn PD Dr. med. Jakob Cramer danke ich für die Anleitung und Hilfe im Labor, die Diskussionsbeiträge und die besonders freundliche und motivierende Arbeitsatmosphäre.

Den ghanaischen Kindern und ihren Eltern, die an der Studie teilgenommen haben, sei ein großer Dank ausgesprochen.

Am meisten danke ich meiner Familie, die mich ausnahmslos unterstützt und mir so viel möglich macht.