

Single-Nukleotid-Polymorphismen in der
Toll-like Rezeptor 9-Promotor-Region bei COPD und Sarkoidose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Oxana Bradler, geb. Krawtschenko
aus Karaganda / Kasachstan

2013

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. C. Grohé
2. Gutachter: Prof. Dr. med G. Baumgarten

Tag der Mündlichen Prüfung: 08.07.2013

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Bonn
Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	5
2	Einleitung	7
2.1	Das Immunsystem	7
2.1.1	Das angeborene Immunsystem	7
2.1.2	Das erworbene Immunsystem	9
2.1.3	Transmitter des Immunsystems.....	10
2.2	Toll-like Rezeptoren.....	11
2.2.1	CpG-Motive	13
2.2.2	TLR9: Entdeckung, Expression, Lokalisation und Liganden	14
2.2.3	PDCs und die TLR9-vermittelte Signaltransduktion	16
2.3	Definition der Polymorphismen	18
2.3.1	SNPs in der Promotorregion des TLR9	19
2.4	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD).....	21
2.4.1	Definition der COPD	21
2.4.2	Epidemiologie.....	22
2.4.3	Risikofaktoren	22
2.4.4	Pathogenese der COPD	23
2.5	Sarkoidose.....	29
2.5.1	Definition.....	29
2.5.2	Epidemiologie.....	29
2.5.3	Ätiologie	30
2.5.4	Pathologie und Immunpathogenese.....	31
2.5.5	Symptomatik und Verlaufsformen.....	33
2.6	Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	35
3	Material und Methoden.....	36
3.1	Personenkollektiv	36
3.2	Material	37
3.2.1	Chemikalien.....	37
3.2.2	Geräte.....	38

3.3	Durchführung der Untersuchungen	38
3.3.1	Blutentnahme	38
3.3.2	Extraktion genomischer DNA aus Vollblut nach der Aussalzmethode	38
3.3.3	Primer: (Oligonukleotide).....	39
3.3.4	DNA-Amplifikation durch PCR.....	40
3.3.5	Gelelektrophorese	42
3.3.6	Restriktionsenzyme	44
3.3.7	Enzymatischer Verdau der PCR-Produkte.....	44
3.4	Statistik.....	45
4	Ergebnisse	47
4.1	Auswertung von Polymerasekettenreaktion und Restriktionsverdau	47
4.1.1	TLR9 T-1486C rs187084 Polymorphismus	48
4.1.2	TLR9 T-1237C rs5743836 Polymorphismus	49
4.2	Statistische Datenanalyse	50
4.2.1	Demographische Basisdaten.....	50
4.2.2	Verteilung von Genotypen und Allelfrequenzen/Allelprävalenzen.....	55
5	Diskussion	66
5.1	COPD und TLR9 SNPs	67
5.2	Sarkoidose und TLR9 SNPs.....	72
6	Zusammenfassung	79
7	Literaturverzeichnis	81
	Danksagung	98

1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAT	α_1 -Antitrypsin
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
Aqua dest	Destilliertes Wasser
ATS	American Thoracic Society
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
BsmB	Bacillus stearothermophilus
C	Cytosin
CO	Kohlenstoffmonoxid
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CpG	bakterielle DNA mit statistisch erhöhter Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotid-Dichte
CD	Cluster of Differentiation
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
DCs	dendritische Zellen
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERS	European Respiratory Society
EtOH	Ethanol
FEV ₁	Forciertes Expiratorisches Volumen in einer Sekunde
FVC	Forcierte Vitalkapazität
G	Guanin
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HLA	Humanes Leukozytenantigen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSV	Herpes Simplex Virus
ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1
IL-	Interleukin-
IFN-	Interferon-
Kb	Kilobasen
LPS	Lipopolysaccharide

MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Peptid 1
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
Mrd	Milliarden
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
ODN	Oligodinukleotide
OH ⁻	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
p _a CO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Struktur
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDCs	plasmazytoide dendritische Zellen
PRR	„Pattern-Recognition“-Rezeptor
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Rotation Per Minute
rs	Reference SNP
Pu	Purinbase
Py	Pyrimidinbase
sec	Sekunden
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TIMP	Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Vielzellige Organismen verfügen über ein Abwehrsystem, das eingedrungene, pathogene Mikroorganismen erkennt, ihre Ausbreitung verhindert und sie beseitigt. Das Abwehrsystem der Wirbeltiere besteht aus einer angeborenen, unspezifischen Immunantwort und einer erworbenen, adaptiven, antigenspezifischen Immunantwort (Janeway et al., 2005).

2.1.1 Das angeborene Immunsystem

Eine effektive Barriere zwischen dem inneren Milieu des Organismus und der äußeren, keimhaltigen Umwelt bildet das Epithel der Körperoberflächen. Eine Infektion setzt die Epithelpassage eines Keims voraus. Um dies zu vermeiden bedient sich das Epithel zahlreicher physikalischer, chemischer sowie mikrobiologischer Mechanismen („tight junctions“ der Epithelzellen, die epitheliale Mucinproduktion, der Zilienschlag, der longitudinale Strom der Luft sowie zahlreiche Körperflüssigkeiten und die physiologische Mikroflora), die das parazelluläre Eindringen und die epitheliale Adhäsion der Keime verhindern oder zumindest erschweren.

Unmittelbar nach dem Eindringen des Infektionserregers werden die zellulären und humoralen Mechanismen der angeborenen Resistenz in Gang gesetzt, die den Erreger erkennen und durch Opsonierung, Phagozytose und Zellyse beseitigen.

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Makrophagen, dendritische Zellen (DCs), Mastzellen, Neutrophile, Eosinophile und die Natürliche Killer (NK)-Zellen. Diese Immunzellen sind polyklonal und jede Klasse verfügt über identische Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind in der Keimbahn kodiert und unterliegen im Gegensatz zu den Rezeptoren des adaptiven Immunsystems keinem Genrearrangement. Sie erkennen Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (z.B. Lipopolysaccharide (LPS), bakterielle DNA mit statistisch erhöhter Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotid-Dichte (CpG-DNA)) und werden deshalb als „Pattern-Recognition“-Rezeptoren (PRRs) bezeichnet. Die PAMPs (engl.: pathogen-associated molecular patterns) werden ausschließlich von Mikroorganismen produziert und erlauben es dem Wirtsorganismus zwischen eigenen und fremden/pathogenen Molekülen zu

unterscheiden. Sie sind für das Überleben und die Pathogenität der Mikroorganismen essentiell und wurden trotz des negativen Selektionsdrucks infolge ihrer Detektion durch das Immunsystem des Wirtsorganismus im Laufe der Evolution konserviert (Medzhitov und Janeway, 2000). Die PRRs werden auf der Zelloberfläche und in intrazellulären Kompartimenten der Zellen des angeborenen Immunsystems und der Epithelzellen exprimiert oder in die Blutstrombahn sowie die Gewebsflüssigkeit sezerniert. Die wichtigsten Funktionen dieser Rezeptoren sind Opsonierung, Phagozytose, Aktivierung proinflammatorischer Signalwege und Induktion der Apoptose. Funktionell können PRRs in drei Klassen unterteilt werden: sezernierte, phagozytierende und signaltransferierende Rezeptoren. Die wichtigsten Vertreter der signaltransferierenden PRRs sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs), auf die im Kapitel 2.2 gesondert eingegangen wird. Nach Erkennung der PAMPs vermitteln sie eine Signaltransduktion, die zur Expression proinflammatorischer Mediatoren (z.B. Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-6, IL-8 usw.) und kostimulierender Moleküle, die für die Induktion des adaptiven Immunsystems essentiell sind, führt (Medzhitov und Janeway, 2000).

Zu den humoralen Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems gehören das Komplementsystem und die Entzündungsmediatoren (Zytokine, Chemokine). Das Komplementsystem ist eine Komponente des Blutplasmas und besteht aus einer Kaskade von Proteasen, die sich gegenseitig durch proteolytische Spaltung aktivieren und durch drei verschiedene Mechanismen den Organismus vor einer Infektion schützen. Erstens bindet eine große Anzahl von aktivierten Komplementfaktoren kovalent an die Keime und steigert die Phagozytose dieser Keime durch Makrophagen und Neutrophile, die auf ihrer Zelloberfläche Komplement-bindende Rezeptoren tragen. Zweitens haben die Spaltprodukte bestimmter Komplementfaktoren Chemokin- und Zytokin-ähnliche Wirkung. Drittens führt die Komplementkaskade zur Bildung eines Membran-Angriff-Komplexes, der durch eine Porenbildung in der bakteriellen Membran zur Störung der zellulären Homöostase und zur Penetration von zelldestruierenden Enzymen wie z.B. dem Lysozym führt (Janeway et al., 2005).

Die Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt zu einer Gefäßerweiterung, einer Blutstromverlangsamung und der Rekrutierung von Entzündungszellen aus der Blutstrombahn

zum Infektionsort. Die Opsonierung der Erreger durch das Komplementsystem und die Erkennung mikrobieller Strukturen durch PRRs erleichtern die Phagozytose der Erreger durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die dabei aktiviert werden und ihrerseits Entzündungsmediatoren und antimikrobielle Peptide freisetzen. Beim Verlust des Haupthistokompatibilitätskomplexes I (MHC I) somatischer Zellen werden NK-Zellen aktiviert, die als Effektorzellen die infizierten Zellen lysieren und große Mengen von Interferon (IFN)- γ freisetzen (Janeway et al., 2005).

2.1.2 Das erworbene Immunsystem

Wenn die Mechanismen des angeborenen Immunsystems für die Eindämmung und Beseitigung der Infektion nicht ausreichen, wird das antigenspezifische, adaptive Immunsystem zur Abwehr aktiviert. Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind die Lymphozyten, die in T- und B- Lymphozyten unterschieden werden und auf ihrer Oberfläche Antigen-spezifische Rezeptoren exprimieren. Die Vielfalt der Rezeptoren basiert auf einer Rekombination verschiedener Genelemente (Genrearrangement) und erlaubt es den Lymphozyten jede fremde molekulare Struktur mit Präzision zu detektieren. Die T-Lymphozyten werden in zytotoxische Cluster of Differentiation (CD)8⁺-Lymphozyten und in CD4⁺-T-Helferzellen unterteilt, wobei die T-Helferzellen weiter in Th1-Zellen, Th2-Zellen und Th17-Zellen klassifiziert werden (Janeway et al., 2005; Onishi und Gaffen, 2010).

Der wichtigste Schritt im adaptiven Immunsystem ist die Aktivierung naiver T-Lymphozyten. Dies setzt die Reifung dendritischer Zellen voraus, die am Ort der Infektion durch die Aktivierung der PRRs und das vorherrschende Zytokinmilieu erfolgt. Die aktivierten dendritischen Zellen exprimieren vermehrt antigengebundene MHC-Moleküle sowie kostimulierende Faktoren und wandern in das nächste lymphatische Gewebe ein, wo sie auf naive T-Lymphozyten treffen. Erst die simultane Bindung an die Antigen-MHC-Komplexe und kostimulierenden Faktoren erlaubt eine Differenzierung der naiven T-Lymphozyten zu Effektorzellen.

Aktivierte zytotoxische CD8⁺-Lymphozyten erkennen Fremdpeptide auf den MHC-I-Komplexen infizierter Zellen und leiten die Apoptose oder die Lyse dieser Zielzellen ein. Die T-Helferzellen tragen auf ihrer Oberfläche CD4-Korezeptoren und erkennen Antigene, die von spezifischen

Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) auf MHC-II-Komplexen dargestellt werden. Die Art des Pathogens und das Zytokinmilieu entscheiden über die terminale Differenzierung der naiven T-Helferzellen. Viren, intrazelluläre Erreger und die Zytokine IL-12 und IFN- γ induzieren einen Th1-Phänotyp, der seinerseits das IL-2 und das IFN- γ produziert und damit die Immunantwort durch Steigerung der eigenen Proliferation, durch Aktivierung von Makrophagen und CD8⁺-Lymphozyten und durch Hemmung der Th2-gerichteten Immunantwort in eine zelluläre Richtung polarisiert. Ein Zytokinmilieu, in dem IL-4 und IL-10 vorherrschen, induziert eine Th2-gerichtete Immunantwort, die für die Differenzierung der naiven B-Lymphozyten in Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen verantwortlich ist (Janeway et al., 2005). Die kombinierte Wirkung der Zytokine Transforming Growth Factor (TGF)- β , IL-1 β und IL-6 auf naive T-Lymphozyten erzeugt einen Th17-Phänotyp, dessen Zytokine (IL-17, IL-21, IL-22, TNF- α) in ihren Zielzellen (immunologische, mesenchymale und epitheliale Zellen) die Freisetzung von proinflammatorischen und antimikrobiellen Genprodukten induzieren und in die Pathogenese chronisch entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen involviert sind (Onishi und Gaffen, 2010).

2.1.3 Transmitter des Immunsystems

Zytokine sind die Transmitter des Immunsystems. Sie werden von immunologischen und nichtimmunologischen Zellen freigesetzt und beeinflussen das Verhalten anderer Zellen, die mit Zytokinrezeptoren ausgestattet sind. Es handelt sich bei den Zytokinen um kleine Glykoproteine mit geringer Halbwertszeit, die autokrin, parakrin oder endokrin wirken können. Zytokine können synergistisch oder antagonistisch arbeiten und eine vielseitige (pleiotrope) oder ähnliche (redundante) Wirkung zeigen (Janeway et al., 2005).

Die Zytokine können anhand ihrer strukturellen Verwandtschaft in Zytokinfamilien unterteilt werden: Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktor-Superfamilien-Mitglieder, Chemokine, koloniestimulierende Faktoren und andere Zytokine. Interleukine beeinflussen Wachstum, Differenzierung, Teilung und Aktivierung der Zielzellen. Interferone wirken antiviral und antitumoral durch die Induktion einer gesteigerten MHC-Klasse-I-Expression somatischer Zellen, die Aktivierung der NK-Zellen und die Hemmung der viralen Proteinbiosynthese. Die Ausschüttung von IFN- γ führt zur Aktivierung der Makrophagen und erhöht die zytotoxische

T-Zell-Antwort. Der prominenteste Vertreter der TNF-Familie ist der TNF- α , der von Immunzellen nach Stimulierung mit LPS ausgeschüttet wird und eine Entzündungsreaktion durch die Aktivierung des Endothels, die Permeabilitätssteigerung der Gefäße und die Plasma- und Zellextravasation auslöst. Zusammen mit IL-1 und IL-6 induziert TNF- α die hepatische Produktion der Akute-Phase-Proteine, die Neutrophilenmobilisation, Fieber und die Protein- und Energiemobilisierung. Entzündungszellen, Epithel-/Endothelzellen und Bindegewebszellen sezernieren Zytokine, die die Fortbewegungsrichtung der Entzündungszellen beeinflussen. Man nennt sie aufgrund ihrer chemotaktischen Wirkung Chemokine. Entzündungszellen aus der Blutstrombahn wandern entlang des Konzentrationsgradienten in das Gewebe zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration ein. Darüber hinaus beeinflussen die Chemokine die Aktivität und Degranulation der Leukozyten und spielen eine wichtige Rolle bei chronischen Entzündungsprozessen und der Angiogenese (Janeway et al., 2005).

2.2 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören zu den „Pattern-Recognition“-Rezeptoren (s. Kapitel 2.1.1). Die TLRs findet man in allen höheren Organismen, wobei die Anzahl der Subtypen einer starken Variation unterliegt. Beim Säugetier sind bislang dreizehn verschiedene Toll-like Rezeptoren identifiziert worden (Akira et al., 2006). Nur die ersten 10 werden im humanen Organismus exprimiert. Ein Stop-Codon im humanen TLR11-Gen verhindert die Expression des Proteins beim Menschen (Lauw et al., 2005).

Die TLRs sind in der Lage eine Vielfalt an pathogenen Keimen wie Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen zu erkennen. Nach Stimulation der TLRs mit PAMPs werden Signaltransduktionswege aktiviert, die die Expression inflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12) und/oder die Produktion von Typ I Interferonen (IFN- α , IFN- β) induzieren (Kawai und Akira, 2007). Zusätzlich wird über diese Signalkaskaden die Transkription kostimulierender Faktoren (CD80 und CD86) induziert, die auf APCs exprimiert werden (Kadowaki et al., 2001; Takeda et al., 2003). Hier wird eine Brücke zum erworbenen Immunsystem geschlagen und sichergestellt, dass sich das Immunsystem nur gegen fremde Substanzen wehrt.

Die TLR-Familie kann anhand der genomischen Struktur und der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz in verschiedene Unterfamilien gruppiert werden, die verwandte

molekulare Strukturen (PAMPs) erkennen können. So hat sich z.B. die Unterfamilie von TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6 auf die Erkennung von Lipiden spezialisiert, während die Untergruppe von TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 Nukleinsäuren erkennt (Takeda et al., 2003). TLRs sind in der Lage Liganden unterschiedlicher Struktur zu binden (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren mit ihren bekannten Liganden (Tukhvatulin et al., 2010)

TLR-Familie	Ligand	Herkunft
TLR 1, 2, 6	Glycolipids	Treponema maltephilum
	Glycosylphosphatidylinositol	T. gondii, T. cruzi
	Lysophosphatidylserin	Schistosoma monsoni
	Lipoteichonsäure	S. aureus, S. pneumoniae
	Lipoarabidomannan	Mykobakterien
	atypische Lipopolysaccharide	L. interrogans, L. pneumophila usw.
	Porin	N. meningitidis, H. influenza
	Zyosan	S. cerevisiae
	β-Defensin-3	H. sapiens
TLR3	dsRNA	RNA-Viren
TLR4	Lipopolysaccharide	gramnegative Bakterien
	Mannan	S. cerevisiae
	Taxol	Taxus brevifolia
	Fusionsprotein	Respiratory syncytial virus
	HSP60	H. sapiens
	Fibronectin	H. sapiens
	Fibrinogen	H. sapiens
	β-Defensin-2	H. sapiens
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR7	ssRNA	RNA-Viren
	Guanosinanaloga	synthetische Komponente
	Bropyrinin	synthetische Komponente
TLR8	ssRNA	RNA-Viren
	R-848	synthetische Komponente
TLR9	CpG-DNA	Bakterien, DNA-Viren
	Chromatin-IgG-Komplexe	H. Sapiens
	LL-37-DNA-Komplex	H. Sapiens
TLR10	Liganden bisher unbekannt (Lazerus et al., 2004)	
TLR11	unbekannte Komponente	uropath. Bakterien
	Profilin-like Protein	T. gondii

Sie werden im menschlichen Organismus sowohl von immunologischen als auch von nicht-immunologischen Zellen exprimiert. Die TLR 1, 3, 4, 5, 6, und 10 befinden sich an der Zelloberfläche, während die TLR 3, 7, 8, und 9 intrazellulär lokalisiert sind (Ishii et al., 2005).

Die TLRs gehören zu der Familie der Typ I Transmembranrezeptoren und sind durch eine extrazelluläre Domäne mit Leucin-reichen Wiederholungsmotiven (leucin-rich repeats domane) und einer zytoplasmatischen Toll/IL-1Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne), die eine Homologie zu der des IL-1 Rezeptors aufweist, charakterisiert. Sie benutzen dieselben Signalmoleküle, die auch an der Signaltransduktion des IL-1 Rezeptors beteiligt sind. Nach Bindung von Liganden rekrutieren sowohl der IL-1 Rezeptor als auch die TLRs das Adapterprotein MyD88 (Myeloid differentiation factor 88), das im Weiteren eine Signalkaskade, die im Kapitel 2.2.3 ausführlich erklärt wird, aktiviert. Am Schluss dieser Signaltransduktion stehen die Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitors (I κ B) und die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der für die Transkription zahlreicher proinflammatorischer Zytokine und Chemokine verantwortlich ist (Takeda et al., 2003).

2.2.1 CpG-Motive

Tokunaga et al. fand im Jahre 1984 heraus, dass es sich bei der immunstimulierenden und tumorsuppressiven Komponente des Bacillus Calmette-Guérin um bakterielle DNA handelte. Auf die Frage nach der immunstimulierenden DNA-Struktur konnten Krieg et al. (1995) mit der Entdeckung der CpG-Motive antworten. Sie zeigten, dass sowohl bakterielle DNA als auch synthetisierte Oligodinukleotide, die ein in einen bestimmten Basenkontext eingebettetes CpG-Dinukleotid (5'-Pu-Pu-CpG-Pyr-Pyr-3') besitzen, in der Lage sind, die Proliferation der murinen B-Zellen und die Immunglobulinsekretion zu induzieren.

Geht man von einer zufälligen Verteilung der Nukleobasen aus, so müssten CpG-Dinukleotide mit einer Häufigkeit von 1:16 im Genom vorkommen. Während dies für die bakterielle DNA zutrifft, ist die Häufigkeit der CpG-Motive im menschlichen Genom auf ein Fünftel des Erwartungswertes reduziert. Hinzu kommt noch, dass im Gegensatz zu den nichtmethylierten CpG-Dinukleotiden der bakteriellen DNA die Cytosine der Wirbeltier-DNA an der Position 5 zu 70 % methyliert sind (Bird et al., 1986). Krieg et al. (1995) haben gezeigt, dass Oligodinukleotide mit methylierten Cytosinen in den CpG-Dinukleotiden ihre

immunstimulierende Wirkung verlieren, während die Methylierung der Cytosine außerhalb der CpG-Dinukleotide keinen negativen Einfluss auf die Immunstimulation hat. Diese strukturellen Unterschiede in der DNA erlauben den Wirbeltieren die bakterielle DNA als Fremdmaterial zu erkennen.

Über die Jahre hat sich gezeigt, dass CpG-Motive je nach Sequenz und Rückgrat (Phosphorothioat, Phosphodiester oder Mixmer) deutliche Unterschiede im Profil und Kinetik ihrer immunmodulatorischen Wirkung aufweisen. Es werden drei Hauptklassen von CpG-ODN unterschieden: CpG-A- (auch CpG-D-), CpG-B- (auch CpG-K-) und CpG-C-ODN (Müller et al., 2008). Charakteristisch für die Wirkung von CpG-A-ODN sind die indirekte Aktivierung der NK-Zellen, die Induktion der IFN-Typ I-Produktion durch pDCs (plasmazytoide dendritische Zellen) und eine schwache B-Zell-Aktivierung (Krug et al., 2001a; Müller et al., 2008). Im Gegensatz zu CpG-A-ODN induzieren CpG-B-ODN nur eine sehr schwache IFN-Typ I-Produktion in pDCs. Dafür sind CpG-B-ODN starke Stimulatoren der B-Zellen (Müller et al., 2008). CpG-C-ODN stellen eine strukturelle Mischung aus CpG-A- und CpG-B-ODN dar. Ihr Charakteristikum ist die Kombination einiger stimulatorischer Eigenschaften der A- und B-Typen. Daher führen sie sowohl zur Induktion der IFN-Typ I-Sekretion als auch zur Aktivierung der B-Zellen (Hartmann et al., 2003; Müller et al., 2008).

CpG-DNA induziert *in vivo* und *in vitro* eine Th1-gerichtete Immunreaktion, die durch Zytokine wie IL-12, -18 und IFN- γ charakterisiert ist (Heeg und Zimmermann, 2009).

2.2.2 TLR9: Entdeckung, Expression, Lokalisation und Liganden

Die zelluläre Antwort auf die CpG-DNA wird durch den TLR9 vermittelt (Hemmi et al., 2000). Beim Menschen wird der TLR9 vorwiegend in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) und in B-Gedächtniszellen exprimiert (Hornung et al., 2002; Kadowaki et al., 2001; Krug et al., 2001b). Diverse Studien haben auch in anderen humanen Immun- und Epithelzellen eine Expression und ein TLR9-abhängiges Ansprechen einiger dieser Zellen auf CpG-DNA gezeigt. Zu diesen Zellen gehören neutrophile Granulozyten, Alveolarmakrophagen, periphere Blutmonozyten, NK-Zellen und T-Zellen sowie Bronchialepithelzellen, intestinale Epithelzellen und Keratinozyten (Hayashi et al., 2003; Hornung et al., 2002; Juarez et al., 2010; Olaru und Jensen, 2010; Pedersen et al., 2005; Platz et al., 2004).

In ruhenden Immunzellen wird der TLR9 im Endoplasmatischen Retikulum exprimiert (Leifer et al., 2004). Latz et al. (2004) haben gezeigt, dass im Anschluss an die endosomale Internalisierung der CpG-DNA Aktivierungsprozesse in Gang gesetzt werden, die zu einer Fusion der TLR9-besetzten Membranabschnitte des Endoplasmatischen Retikulums (ER) mit den Membranen der CpG-DNA enthaltenden Endolysosoms führen. Dabei ist die ligandenbindende Domäne des Rezeptors zum Lumen des Endolysosoms hin ausgerichtet. Die CpG-DNA-abhängige Aktivierung des TLR9 im Endolysosom findet nur im sauren Milieu von reifen Endosomen statt und kann durch Substanzen wie z.B. Chloroquin oder Bafilomycin A1, die die vakuoläre Protonen-ATPase und damit die endosomale Azidifizierung hemmen, verhindert werden (Macfarlane und Manzel, 1998).

Kürzlich konnte die Arbeitsgruppe von Ewald et al. (2008) zeigen, dass ein Teil des im ER exprimierten TLR9, gebunden an das Protein UNC93B1 (Tabeta et al., 2006), das ER verlässt und nach Passage des Golgi-Apparats in den Endolysosomen im Bereich der Ektodomäne prozessiert wird. Obwohl beide Formen in der Lage sind CpG-DNA zu binden, bindet nur die prozessierte Form an MyD88 und wird von Ewald et al. (2008) als die funktionale Form des Rezeptors beschrieben. Unter bestimmten, bisher noch ungeklärten Bedingungen kann der TLR9 an die Zelloberfläche gelangen. Die an der Zelloberfläche exprimierte Form des TLR9 entgeht der endosomalen Proteinprozessierung und ist nach Stimulation nicht in der Lage NF- κ B-abhängige Signalwege zu induzieren (Ewald et al., 2008).

Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass TLR9 über eine größere Auswahl an Liganden verfügt, als bisher angenommen. Das Malariapigment Hemozoin wurde von Coban et al. (2005) als ein weiterer Ligand des TLR9 vorgestellt. Coch et al. (2009) demonstrierten eine TLR9-vermittelte Aktivierung der pDCs durch methylierte, an kationische Lipide gebundene CpG-DNA, wenngleich die Aktivierung durch unmethylierte CpG-DNA deutlich stärker ausfiel. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die körpereigene DNA in Verbindung mit Autoantikörpern oder dem antimikrobiellen Peptid LL-37 in der Lage ist den TLR9-Signaltransduktionsweg zu aktivieren (Barrat et al. 2005; Lande et al., 2007). Diese Beobachtungen lenken die Aufmerksamkeit auf die Rolle der humanen DNA als autoreaktiv wirkende Substanz über einen TLR9-vermittelten Mechanismus.

2.2.3 pDCs und die TLR9-vermittelte Signaltransduktion

Die ersten beschriebenen pulmonalen DCs waren Langerhanszellen, die CD1a und Langerin exprimieren (Tsoumakidou et al., 2008). Später wurden drei weitere phänotypisch und funktionell unterschiedliche Subpopulationen der DCs beschrieben: myeloide DCs Typ 1 und Typ 2 und plasmazytoide DCs (Tsoumakidou et al., 2008). Während die Expression der unterschiedlichen Oberflächenmarker für einen lymphoiden Ursprung der pDCs und einen myeloiden Ursprung der mDC sprechen, zeigen neuere Erkenntnisse, dass die pDCs sich sowohl aus lymphoiden als auch myeloiden Vorläuferzellen entwickeln und nach viralen Infektionen sogar in myeloide DCs differenzieren können (Lande und Gilliet, 2010; Zuniga et al., 2004). In der Infektabwehr spielen die mDCs und pDCs unterschiedliche und komplementäre Rollen (Tsoumakidou et al., 2008). Beide Subpopulationen verfügen über unterschiedliche Rezeptorkombinationen. Während die mDCs mit TLR1-6 und TLR8 ausgestattet sind, exprimieren die pDCs TLR7 und TLR9 im endosomalen Kompartiment (Ito et al., 2005).

Der Anteil der pDCs im peripheren Blut ist gering und beträgt nur 0,2-0,8 % (Lande und Gilliet, 2010). Nach ihrer Bildung im Knochenmark werden die unreifen pDCs in die Blutstrombahn freigesetzt. Unter „Steady-state“-Bedingungen wandern sie anders als die unreifen mDCs nicht ins periphere Gewebe sondern direkt in die T-Zell-reichen Zonen der lymphatischen Organe. Ihre Migration in die lymphatischen Organe erfolgt über die „high endothelial venules“ (HEV), deren konstitutiv exprimierten Chemokine wie CCL21 und CCL17 von Chemokinrezeptoren der pDCs (z.B. CCR7) erkannt werden (Yoneyama et al., 2004). Eine Akkumulation von pDCs im peripheren Gewebe findet man im Rahmen viraler Infektionen und autoreaktiver Prozesse (Cavanagh et al., 2005; Farkas et al., 2001; Smit et al., 2006). Zu den chemischen Lockstoffen der pDCs gehören Adenosin, Anaphylatoxine C3a und C5a, sowie Liganden des CXCR3 (CXCL9, CXCL10, CXCL11) und des CXCR4 (CXCL12) (Lande und Gilliet, 2010).

Die pDCs sind die Hauptproduzenten des IFN Typ I. Die Triggerung des TLR9 durch CpG-DNA führt im frühen Endolysosomen der pDCs zu einer Rekrutierung des Adapterproteins MyD88, das seinerseits die Aggregation des Signaltransduktionskomplexes, bestehend aus IRAK-1, IRAK-2, TRAF6, BTK und IRF7, aktiviert. Dieser Komplex phosphoryliert den Transkriptionsfaktor IRF7, dessen anschließende Interaktion mit TRAF3, IKK, IRAK1, OPN und PI3K zu seiner

nukleären Translokation führt. Im Zellkern initiiert IRF7 die Transkription der IFN Typ I-Gene (Lande und Gilliet, 2010).

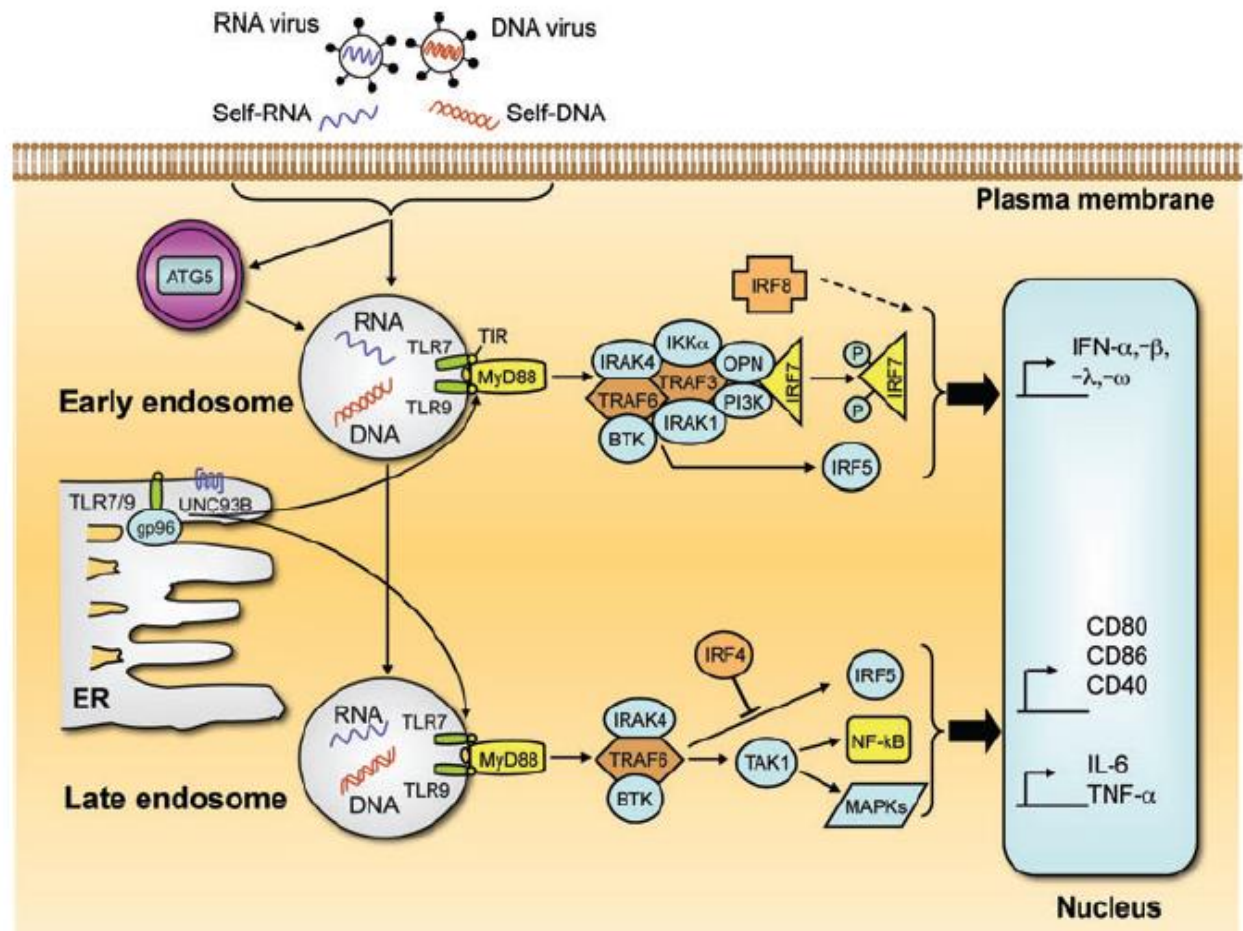


Abb. 1: TLR-Signaltransduktionswege in späten und frühen Lysosomen der plasmazytoiden Dendritischen Zellen (Lande und Gilliet, 2010)

IFN Typ I induziert eine starke Th1-gerichtete Immunantwort durch Anregung der unreifen mDCs zur Produktion von IL-12, IL-15, IL-18 und IL-23, durch Steigerung der Interaktion zwischen mDCs und CD8⁺-T-Zellen und durch Polarisierung der CD4⁺-T-Zellen zu Th1-Zellen (Lande und Gilliet, 2010). Außerdem fördert IFN Typ I das Überleben und die klonale Expansion der CD8⁺-T-Zellen und stimuliert die Aktivierung der NK-Zellen und die Differenzierung der B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen (Lande und Gilliet, 2010; Theofilopoulos et al., 2004).

Die TLR9-Triggerung in späten Lysosomen der aktivierten pDCs führt, vermittelt durch einen MyD88-Transduktionskomplex, über eine Ubiquitylierung von TAK1 (transforming growth factor-beta-activated kinase 1) zur Aktivierung des NF- κ B und der MAPK (mitogen-activated protein kinase). Die Aktivierung dieser Proteine führt zu einer Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF- α , von MHC-Molekülen und von kostimulierenden Molekülen (Lande und Gilliet, 2010). Eine synergistische Aktivierung der pDCs durch die CpG-DNA und den CD40-Liganden führt zu einer Freisetzung des Zytokins IL-12, das die in der COPD vorherrschende Th1-gerichtete Immunantwort induziert (Krug et al., 2001b). Die TLR9-Signalwege in frühen und späten Lysosomen sind in der Abbildung 1 schematisch dargestellt.

2.3 Definition der Polymorphismen

Beim Vergleich zweier beliebiger menschlicher Genome findet man eine 99,9-prozentige Übereinstimmung in der DNA-Sequenz. Die restlichen 0,1 Prozent unterliegen einer interindividuellen Variabilität und repräsentieren insgesamt 3.000.000 Sequenzunterschiede. Es liegt auf der Hand, dass ein Teil dieser Sequenzunterschiede für die phänotypische Variabilität und die genetische Krankheitsdisposition verantwortlich sein muss.

Ist die Auftretenshäufigkeit einer Genvariante in einer Population größer als ein Prozent, so wird sie als ein genetischer Polymorphismus bezeichnet. Den weitaus größten Teil (90 %) der Variabilität im menschlichen Genom machen die Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (single-nucleotide polymorphisms, SNPs) aus, von denen insgesamt mehr als zwei Millionen bekannt sind. Sie stellen Mutationen eines einzelnen Basenpaars dar.

Viele SNPs haben keine phänotypische Konsequenz, weil sie entweder im nichtkodierenden Bereich liegen oder sich im kodierenden Bereich auf Positionen befinden, die nicht zu einer abweichenden Dekodierung des Codons führen. Einige dieser SNPs können als genetische Marker an Bedeutung gewinnen, wenn sie und ein Krankheitsgenort nahe beieinander liegen und entgegen der Erwartung überzufällig häufig zusammen vererbt werden (Kopplungsungleichgewicht).

Ein großes Interesse besteht an Genvarianten, die zu einer Funktionsänderung der Proteine führen oder über eine veränderte Genregulation eine Verschiebung der quantitativen

Zusammensetzung zellulärer Proteine verursachen. Diese Genvarianten haben eine phänotypische Konsequenz und können sich durch Interaktionen mit anderen Genvarianten und bestimmten Umweltfaktoren günstig oder ungünstig auf den Träger auswirken. (Cichon et al., 2002).

2.3.1 SNPs in der Promotorregion des TLR9

Das Gen für TLR9 befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 (3p21.3). Es umfasst ungefähr 5 kb (Kilobasen) und besitzt 2 Exons, wobei das 2. Exon für den größten Teil des Proteins kodiert. Das Protein besteht aus 1032 Aminosäuren (Lazarus et al., 2003). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten SNPs T-1237C (rs5743836) und T-1486C (rs187084) befinden sich in der potentiellen Promotorregion des TLR9.

Eine Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen an den Positionen der TLR9-Polymorphismen T-1237C und T-1486C hat gezeigt, dass durch beide SNPs sich Veränderungen an den Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ergeben. Während das Wildtyp-Allel keine Transkriptionsfaktorbindungsstellen an -1486 und -1237 aufweist, entsteht durch den T/C-Austausch eine c-Rel/NF- κ B-Bindungsstelle an Position -1237 und eine neue Bindungsstelle für Sp-1 an Position -1486 (Hamprecht, 2005). Eine Prästimulation mit CpG-DNA bewirkt eine signifikante Hochregulation der TLR9-Expression in Zellen mit der homozygoten Variante des TLR9 SNPs T-1486C (Elmaagacli et al., 2009). Ähnlich verhält es sich mit der TLR9 -1237C-Variante. Ng et al. (2010) konnten zeigen, dass das Tragen des C-Allels an der Position -1237 durch eine Erhöhung der Bindungsaffinität des NF- κ B an die TLR9-Promotorregion zu einer signifikant stärkeren Transkriptionsaktivität führt.

Für den TLR9 SNP T-1237C ist eine Assoziation mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen gezeigt worden. Lazarus et al. (2003) haben in der europäisch-amerikanischen Kohorte eine marginal signifikante Assoziation zwischen der TLR9 SNP -1237C-Variante (Fisher's Exact test, $P = 0,042$) und Asthma bronchiale gefunden. Diese Assoziation konnte von einer tunesischen Arbeitsgruppe, die 210 asthmatische Kinder kaukasischer Herkunft untersuchte, bestätigt werden (Lachheb et al., 2008). Novak et al. (2007) zeigten an einer deutschen Population, dass in Familienkohorten das T-Allel des SNPs T-1237C mit dem atopischen Ekzem, insbesondere der intrinsischen Form, assoziiert ist. Die Assoziation zwischen

dem SNP T-1237C und der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn wurde von Török et al. (2004; 2006) gefunden. Zwei weitere Studien zeigten, dass der SNP T-1237C sowohl mit dem postinfektiösem Reizdarmsyndrom als auch mit wiederholten Rezidiven einer Ileum-Pouchitis bei Patienten mit Colitis ulcerosa assoziiert ist (Lammers et al., 2005; Villani et al., 2010). Ng et al. (2010) berichteten kürzlich über eine Assoziation zwischen dem C-Allel des SNP T-1237C und der Entwicklung einer *Helicobacter pylorus*-induzierten gastralen Präkanzerose.

Toll-like Rezeptoren scheinen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu spielen, indem sie das Gleichgewicht zwischen der peripheren Toleranz und der Autoimmunität zu Gunsten von Autoimmunerkrankungen verschieben (Lang et al., 2005; Waldner et al., 2004). Für die SNPs des TLR9 konnten Assoziationen mit Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, der multiplen Sklerose und dem Morbus Basedow nachgewiesen werden (Etem et al., 2010; Ji et al., 2010; Liao et al., 2010). Tao et al. (2007) fanden in einem japanischen Kollektiv eine Assoziation zwischen dem G-Allel des TLR9 SNP A+1174G und einem erhöhten Risiko für SLE. Das Vorkommen des C-Allels an der Position -1486 war bei den SLE-Patienten dieses Kollektivs jedoch nicht signifikant erhöht.

Die TLR9 SNPs scheinen auch den Verlauf infektiöser Erkrankungen zu beeinflussen. Sam-Agudu et al. (2010) zeigten, dass bei komplizierten Malariaverläufen die erhöhten IFN- γ -Konzentrationen mit dem C-Allel des TLR9 SNPs T-1237C assoziiert waren. Leoratti et al. (2008) untersuchten Patienten mit einer milden Form der Malaria und einer asymptomatischen Plasmodieninfektion und konnten eine starke Assoziation ($p < 0,001$) zwischen dem C-Allel des TLR9 SNPs T-1486C und einer hohen Parasitämie nachweisen. Eine italienische Arbeitsgruppe untersuchte Varianten in den TLR9-Genen an einer Gruppe von Kindern mit hämatologischen Malignomen und zeigte, dass die Frequenz des C-Allel des TLR9 SNPs T-1486C bei Patienten mit invasiver Pilzinfektion signifikant höher war als bei Patienten mit nicht-invasiver Infektion (Lanciotti et al., 2008). Darüber hinaus berichteten Carvalho et al. (2008) über eine signifikant höhere Frequenz des C-Alles des TLR9 SNP T-1237C (p -Wert = 0,043) bei Patienten mit einer allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Davis et al. (2010) beschrieben kürzlich eine Assoziation zwischen dem TLR9 SNP T-1486C und der puerpuralen Streptokokkensepsis.

2.4 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

2.4.1 Definition der COPD

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) charakterisiert sich durch eine nicht vollständig reversible, über Jahrzehnte progressiv verlaufende Atemflussbegrenzung. Sie entwickelt sich auf der Basis einer abnormen, pulmonalen Entzündungsreaktion auf Zigarettenrauch und andere inhalative Noxen (Pauwels et al., 2001). Die COPD fasst die Entitäten chronische Bronchitis und Lungenemphysem zusammen und schließt Asthma, das sich durch seine Pathogenese, Therapie und Prognose von der COPD unterscheidet, als eigenständiges Krankheitsbild aus ihrer Definition aus (Vogelmeier et al., 2007).

Eine chronische Bronchitis ist dann anzunehmen, wenn bei einem Patienten in mindestens zwei auf einander folgenden Jahren während der meisten Tage in mindestens 3 auf einander folgenden Monaten Husten, Auswurf und Hypersekretion bestehen, wobei andere kardiale und pulmonale Ursachen ausgeschlossen sein müssen (Barnes et al., 2003). Das Emphysem bezeichnet eine irreversible Erweiterung der Lufträume distal der Bronchioli terminales infolge der auf einer chronischen Entzündung basierenden Destruktion der Alveolarwände mit Verminderung der pulmonalen Elastizität und der Gasaustauschfläche (Pauwels et al., 2001).

Die Definition der „Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease“ ist von der gemeinsamen amerikanischen/europäischen Arbeitsgruppe - der „ATS/ERS Task Force“-dahingehend erweitert worden, dass die COPD auch eine systemische Komponente, sei es als Ursache oder als Folge der pulmonalen Erkrankung, zeigt (Celli et al., 2004). Die Schweregradeinteilung erfolgt gemäß den GOLD-Leitlinien (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Schweregradeinteilung der Atemflussbegrenzung in der COPD (GOLD, Update 2011)

Schweregrad			FEV ₁ */FVC**
COLD 1	mild	FEV ₁ ≥ 80 % des Sollwertes	< 70 %
COLD 2	moderat	50 % ≤ FEV ₁ < 80 % des Sollwertes	< 70 %
COLD 3	schwer	30 % ≤ FEV ₁ < 50 % des Sollwertes	< 70 %
COLD 4	sehr schwer	FEV ₁ < 30 % des Sollwertes	< 70 %

* FEV₁: Einsekundenkapazität; **FVC: funktionelle Vitalkapazität

2.4.2 Epidemiologie

Die COPD ist gegenwärtig die zwölft häufigste Morbiditätsursache und die vierthäufigste Todesursache weltweit. Experten schätzen, dass sie im Jahr 2030 in Ländern mit einem hohen und niedrigen Einkommen an vierter Stelle und in Ländern mit einem mittleren Einkommen sogar an dritter Stelle der Todesursachenstatistik stehen wird (Mathers et al., 2006).

Buist et al. (2007) haben zur standardisierten Erfassung der weltweiten Prävalenzdaten eine internationale Studie durchgeführt. Das Studienprotokoll sah standardisierte, international verwendbare und vergleichbare Methoden vor, die in jedem Land unabhängig von dessen Entwicklungsstufe durchführbar waren und mit einem nach American Thoracic Society (ATS)-Kriterien standardisierten Fragebogen und einer Post-Broncholyse-Spirometrie neben der Prävalenzschätzung auch die Erfassung der Risikofaktoren erlaubten. An der Studie partizipierten insgesamt zwölf Länder (Buist et al., 2007). Die Prävalenz der COPD-Schweregrade GOLD I+ unterschied sich signifikant zwischen den einzelnen Ländern und lag zwischen 11,4 % und 26,1 %. Die durchschnittliche Prävalenz für COPD-Schweregrade GOLD II+ betrug 10,1 % (11,8 % für Männer und 8,5 % für Frauen). In Ländern, in denen sich das Rauchverhalten der Frauen an das der Männer angeglichen hat, zeigte sich der Geschlechtsunterschied in der Prävalenz der COPD aufgehoben. Eine klinisch relevante COPD II+ ist inzwischen sogar in vielen entwickelten Ländern beim weiblichen Geschlecht häufiger anzutreffen. Die Prävalenz der COPD-Schweregrade I+ lag in Deutschland bei 13,2 % (GOLD I: 7,4 %, GOLD II: 5,0 % und GOLD III-IV: 0,8 %). Es zeigte sich eine Zunahme der Prävalenz und des Schweregrades der COPD in Abhängigkeit vom Alter und Zigarettenkonsum (Buist et al., 2007).

2.4.3 Risikofaktoren

Die pathophysiologischen Prozesse der COPD werden in erster Linie durch Zigarettenrauchen verursacht (Sandford und Paré, 2000). Die beiden Tatsachen, dass nur 10-50 % der Raucher an der COPD erkranken und ca. 10 % der COPD Patienten Nichtraucher sind, legen nahe, dass weitere exogene und endogene Faktoren bei der Entwicklung der COPD relevant sind (Stevenson und Underwood, 2006). Zu den nennenswerten exogenen Risikofaktoren gehören gehäufte Atemwegsinfektionen in der Kindheit, die allgemeine Luftverschmutzung und

berufliche Staubexposition (Pauwels et al., 2001). Ferner belegen epidemiologische und klinische Daten, dass genetische Faktoren an der Entstehung der COPD beteiligt sind. In verschiedenen Studien wurden eine familiäre Krankheitshäufung sowie eine signifikant höhere Prävalenz bei enger Verwandtschaft erkrankter Patienten beobachtet (Sandford und Paré, 2000; Silverman, 2002).

Der α_1 -Antitrypsinmangel (AATM) ist bisher der einzige bekannte, validierte genetische Risikofaktor für COPD. Das α_1 -Antitrypsin (AAT) neutralisiert die Neutrophilen-Elastase und schützt dadurch die Lunge vor einem zu einem Lungenemphysem führenden Selbstverdau (Schroth und Bals, 2010).

Als Folge des geänderten Rauchverhaltens der Frauen wandelt sich die COPD von einer typischen Männererkrankung zu einer Erkrankung des weiblichen Geschlechts. In entwickelten Ländern wie den USA, Canada und Finnland sind die COPD-Fallzahlen, die Hospitalisierungs- und Sterberaten bei Frauen bereits höher als bei Männern (Carrasco-Garrido et al., 2009). Verschiedene Studien postulieren eine höhere Anfälligkeit des weiblichen Geschlechts für die schädliche Wirkung des Tabakrauchs (Chen et al., 1991; Xu et al., 1994). Diese führt dazu, dass Frauen schon in jüngeren Jahren und nach einer deutlich geringeren Tabakrauchexposition schwerere Lungenfunktions- einschränkungen haben als Männer (de Torres et al., 2005).

2.4.4 Pathogenese der COPD

Die COPD ist eine chronisch entzündliche Lungenerkrankung, die durch einen akzelerierten, mit dem Alter fortschreitenden Abfall der FEV₁ charakterisiert ist. Die im Vordergrund der Erkrankung stehende Atemwegsobstruktion resultiert aus einer inhomogenen Pathomorphologie, die sich bei den meisten Patienten unterschiedlich proportioniert aus drei Pathomechanismen (chronische Bronchitis, Emphysem und Mukushypersekretion) zusammensetzt (Barnes et al. 2003)

Die pathomorphologische Inhomogenität spiegelt die komplexe Vernetzung zahlreicher Entzündungsmechanismen in der Pathogenese der COPD wieder. Die verschiedenen, durch toxische Reize getriggerten Pathomechanismen wie die entzündliche Gewebsinfiltration, der oxidative Stress und das Proteasen-Antiproteasen-Ungleichgewicht laufen parallel ab und halten sich gegenseitig aufrecht (Barnes et al., 2003).

Eine mechanische Obstruktion der peripheren Atemwege entsteht zum einen durch einen abnorm erhöhten und anhaltenden Tonus der glatten Bronchialmuskulatur und zum anderen durch ein Ödem der Mucosa. Beide sind Folgen einer entzündlichen Gewebsinfiltration der Bronchialwand. Dauerhaft führt diese chronische Entzündung zu einer peribronchialen Fibrosierung und der damit verbundenen Fixierung der Bronchialobstruktion. Beim Lungenemphysem findet ein entzündungsbedingter Abbau der bindegewebigen und elastischen Fasern zwischen den terminalen Bronchiolen statt, der zur Instabilität der kleinen Atemwege mit dem Resultat einer expiratorischen Flusslimitierung und der Überblähung der Alveolen führt. Verstärkt wird die Atemwegsobstruktion durch eine gesteigerte Schleimproduktion und die verlangsamte Schleimclearance, die auf einer Ziliendysfunktion basiert (Pforte, 2002).

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese der COPD spielen verschiedene Zytokine, die unterschiedliche Zellpopulationen aktivieren und damit zur eigenen Freisetzung sowie zur Freisetzung anderer Zytokine aus diesen Zellen und folglich zu der Aufrechterhaltung der Inflammation beitragen (Pforte, 2002). Im Weiteren werden die komplexen Entzündungsmechanismen kurz vorgestellt.

Gewebsinfiltration durch Entzündungszellen

Eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der COPD kommt verschiedenen Entzündungszellen zu, die in vermehrter Anzahl in den Atemwegen und dem Lungenparenchym von Rauchern und COPD-Patienten histopathologisch nachweisbar sind. Alveolarmakrophagen und T-Lymphozyten sind in Biopsien der Bronchien und des Lungenparenchyms vorherrschend, wobei die Anzahl der zytotoxischen T-Lymphozyten im Vergleich zu T-Helferlymphozyten überwiegt. In der BAL-Flüssigkeit und im induzierten Sputum sind sowohl Makrophagen als auch Neutrophile in vermehrter Anzahl nachweisbar (Barnes et al., 2003; MacNee, 2005).

Die Organisation der rekrutierten B-Lymphozyten in Lymphfollikel in peripheren Atemwegen und die Anwesenheit oligoklonaler T-Lymphozyten weist darauf hin, dass die Ansammlung der Lymphozyten das Ergebnis einer antigenspezifischen, adaptiven Immunantwort ist, bei der dendritische Zellen eine entscheidende Rolle spielen (Hogg et al., 2004; Sullivan et al., 2006).

Respiratorisches Epithel

In der Pathogenese der COPD spielt das respiratorische Epithel bei der Initiierung und Vermittlung der Entzündungsprozesse eine wichtige Rolle. Das respiratorische Epithel exprimiert verschiedene Mitglieder der TLR-Familie (TLR1-6 und TLR9), über die es pathogene Keime erkennt und folglich eine Vielzahl an proinflammatorischen Mediatoren freisetzt (Mayer et al., 2007; Platz et al., 2004; Thorley und Tetley, 2007).

Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen (AMs) sind an vielen entzündlichen Prozessen und pathologischen Veränderungen in der COPD beteiligt. Sie liegen in verschiedenen Lungenkompartimenten der COPD-Patienten in erhöhter Anzahl vor und weisen eine gesteigerte chemotaktische und elastolytische Aktivität auf. Nach Aktivierung durch Zigarettenrauch sezernieren AMs eine Vielzahl inflammatorischer Mediatoren (z.B. TNF- α , IL-8, Liganden des CXC-Motiv-Chemokinrezeptors 3 (CXCR3)) sowie elastolytische Enzyme wie z.B. Matrix-Metalloprotease (MMP)-2, MMP-9, MMP-12 und produzieren reaktive Sauerstoffspezies (Barnes et al., 2003).

Neutrophile

Es wird eine vermehrte Anzahl von Neutrophilen in der BAL-Flüssigkeit und im Bereich der bronchialen Schleimdrüsen der COPD-Patienten beschrieben (Barnes et al., 2003; Saetta et al., 1998). Aktivierte neutrophile Granulozyten produzieren die Neutrophilen-Elastase und verschiedene Serinproteasen. Die Serinproteasen sind potente Sekretagoga und regen die bronchialen Schleimdrüsen zur mukösen Hypersekretion an. Zusätzlich produzieren neutrophile Granulozyten große Mengen an IL-8 und reaktiven Sauerstoffspezies (Barnes et al. 2003).

Hayashi et al. (2003) haben gezeigt, dass die humanen Neutrophilen funktionelle TLRs exprimieren. Nach einer Vorbehandlung der Neutrophilen mit GM-CSF exprimieren diese vermehrt TLR-9 und setzen nach Stimulation mit CpG-DNA IL-8 frei (Hayashi et al., 2003).

Lymphozyten

Im Lungenparenchym, in peripheren und zentralen Atemwegen sowie Gefäßwänden von Rauchern und insbesondere von COPD-Patienten findet man eine vermehrte Ansammlung von T-Lymphozyten. Dabei werden mehr zytotoxische CD8⁺-Lymphozyten als T-Helferzellen rekrutiert (Barnes et al., 2003; Saetta et al., 1997; Saetta et al., 1999). Die Ansammlung von T-Lymphozyten korreliert mit dem Destruktionsgrad der Alveolen und dem Schweregrad der Obstruktion (Barnes et al., 2003). Grumelli et al. (2004) konnten zeigen, dass die T-Lymphozyten in Emphysemungen Marker eines Th1-Phänotyps (CXCR-5 und CXCR-3) exprimieren und vermehrt Zytokine (CXCR3-Liganden und IFN- γ) sezernieren, die das adaptive Immunsystem in die Th1-Richtung polarisieren.

Dendritische Zellen

Halle et al. (2009) konnten tierexperimentell zeigen, dass die Ausbildung und Aufrechterhaltung des Bronchus-assoziierten lymphoiden Gewebes (BALT) eine Interaktion zwischen Lymphozyten und dendritischen Zellen erfordert. Tatsächlich konnte im humanen Lungengewebe die Anwesenheit der drei DC-Subpopulationen, die bereits im Kapitel 2.2.3 vorgestellt wurden, nachgewiesen werden (Demedts et al., 2006). Die verschiedenen DC-Subpopulationen übernehmen unterschiedliche Aufgaben und Funktionen in der Immunabwehr gegen respiratorische Erreger. Während die myeloiden DCs sich entsprechend ihrer TLR-Ausstattung auf die Erkennung von Bakterien, die Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 und die Induktion der T-Zellproliferation konzentrieren, haben sich die pDCs durch ihre starke antivirale Aktivität, die aus der Freisetzung von IFN-Typ I resultiert, auf die Erkennung respiratorischer Viren spezialisiert (Demedts et al., 2006).

Proteasen-Antiproteasen-Ungleichgewicht

Die Hypothese, dass das Proteasen-Antiproteasen-Ungleichgewicht eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Lungenemphysems spielt, basiert auf der Entdeckung des Zusammenhangs zwischen einem schweren α_1 -Antitrypsinmangel (AATM) und der Entwicklung eines Lungenemphysems (Laurel und Eriksson, 1963). In emphysematös veränderten Lungen von Rauchern konnte darüber hinaus eine erhöhte Aktivität der Matrix-Metalloproteasen MMP-1,

MMP-2, MMP-8 und MMP-9 nachgewiesen werden (Belvisi und Bottomley, 2003). Zigarettenrauch, LPS und IL-1 β induzieren eine gesteigerte Expression der MMP-9 in Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten (Russell et al., 2002). Es konnte auch für die CpG-DNA gezeigt werden, dass sie TLR9-vermittelt die Makrophagen zur Freisetzung von MMP-9 anregt (Lee et al., 2007; Lim et al., 2006). Die Bedeutung der MMP-9 in der Pathogenese der COPD wird durch das Ergebnis einer japanischen Studie gestützt, die gezeigt hat, dass ein SNP (C-1562T) in der Promotorregion der MMP-9 mit der Entwicklung eines Emphysems der peripheren Lungenabschnitte bei japanischen Rauchern assoziiert ist (Ito et al., 2005).

Oxidantien-Antioxidantien-Ungleichgewicht

Oxidativer Stress ist in den Lungen von Patienten mit COPD im Vergleich zu gesunden Individuen und Rauchern ohne Atemwegsobstruktion vermehrt (MacNee, 2007). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Konzentrationen der Biomarker des oxidativen Stresses (H₂O₂, Nitrotyrosin) im exhalieren Atemwegskondensat und im Sputum von Rauchern mit COPD deutlich erhöht sind (Dekhuijzen et al., 1996; Ichinose et al., 2000).

Oxidantien führen über eine vermehrte Schleimsekretion der Atemwegsepithelzellen und eine Beeinträchtigung des Zilienschlags schon in geringer Konzentration zu einer Akkumulation von Schleim in den Atemwegen. Darüber hinaus wirken sie bronchokonstriktiv und verursachen durch die Zellschädigung eine gesteigerte Permeabilität des Epithels und folglich ein Schleimhautödem (MacNee, 2007).

Oxidativer Stress erhöht die Bereitschaft der Alveolarmakrophagen vermehrt proteolytische Enzyme und chemotaktische Faktoren wie IL-8 zu sezernieren mit der Konsequenz, dass neutrophile Granulozyten ins Lungengewebe einströmen und zusätzlich Elastasen, MMPs und Oxidantien freisetzen (Nishikawa et al., 1999).

Exazerbationen

Unter einer Exazerbation versteht man eine akute Verschlechterung der Leitsymptome (Dyspnoe, Auswurf, Husten) der COPD, die deutlich über die individuelle tägliche Schwankungsbreite dieser Symptome hinausgeht und eine Änderung der therapeutischen

Maßnahmen notwendig macht (Vogelmeier et al., 2007). Virale und/oder bakterielle Atemwegsinfektionen gehören zu den häufigsten Ursachen der Exazerbationen. Darüber hinaus können auch Umwelteinflüsse, kaltes Wetter und eine irreguläre Einnahme der antiobstruktiven Therapie zu Exazerbationen führen (Burge und Wedzicha, 2003). Einige Patienten mit fortgeschrittener COPD neigen zu häufigeren Exazerbationen (3 > Exazerbationen/Jahr), die eine stationäre Behandlung erfordern und dadurch eine beachtliche, gesundheitsökonomische Herausforderung darstellen. Die Atemwegsobstruktion der instabilen Verlaufsform unterscheidet sich nicht wesentlich von der Atemwegsobstruktion der stabilen Verlaufsform (< 3 Exazerbationen/Jahr), jedoch findet man bei der instabilen Verlaufsform höhere Entzündungsmarker (IL-6 und IL-8) und häufigere Kolonisationen mit Bakterien wie *Haemophilus influenza* und *Streptococcus pneumoniae* während der stabilen Phase (Burge und Wedzicha, 2003).

Die Rolle der Viren und Bakterien in der COPD

Seit der Einführung sensitiverer Nachweismethoden wie der PCR haben Studien gezeigt, dass ca. 40 % der ambulanten COPD-Exazerbationen und mehr als 40 % der hospitalisierten Fälle mit Atemwegsviren assoziiert sind (Seemungal et al., 2001; Varkey und Varkey, 2008). Die wichtigsten, mit COPD-Exazerbationen assoziierten, respiratorischen Viren sind Rhinovirus, Coronavirus, Influenza, Parainfluenza, Respiratorisches Synzytialvirus (RSV), Adenovirus und humanes Metapneumovirus (Rohde et al., 2008; Wedzicha, 2004). Im induzierten Sputum von Patienten mit stabiler COPD findet man am häufigsten den RSV, aber auch das Rhinovirus und das Coronavirus (Seemungal et al., 2001). RSV-positive Patienten mit stabiler COPD zeigen erhöhte systemische Entzündungsparameter und eine akzelerierte Abnahme der FEV₁ (Wilkinson et al., 2006).

In der Hälfte der Fälle werden akute COPD-Exazerbationen durch Bakterien verursacht (Sethi, 2004). Zu den wichtigsten Keimen gehören *Haemophilus influenza*, *Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis*, wobei sich das Spektrum bei fortgeschrittener COPD zu *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas spp.* verschiebt (Rohde et al., 2007). In den unteren Atemwegen der meisten COPD-Patienten (71-83 %) konnte eine bakterielle Kolonisation mit potentiell pathogenen Keimen wie *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* und

Enterobacteriaceae nachgewiesen werden (Cabello et al., 1997; Marin et al., 2010). Diese scheint mit einer Entzündungsreaktion der unteren Atemwege, einer erhöhten Exazerbationsrate und einer signifikanten Abnahme der FEV₁ assoziiert zu sein (Marin et al., 2010; Patel et al., 2002).

2.5 Sarkoidose

2.5.1 Definition

Die Sarkoidose ist eine granulomatöse Multisystemerkrankung bisher unklarer Ätiologie, die akut oder chronisch verlaufen kann. Im Allgemeinen sind Erwachsene mittleren Alters betroffen, die in den meisten Fällen eine bilaterale hiläre Lymphadenopathie, pulmonale Infiltrationen sowie okuläre und kutane Herde aufweisen. Die Diagnosestellung fordert den histologischen Nachweis nicht-verkäsender Granulome im befallenen Organ sowie den Ausschluss anderer granulomatöser Erkrankungen. Charakteristische immunologische Eigenschaften sind eine unterdrückte, kutane Spättyp-Überempfindlichkeitsreaktion und eine gesteigerte Th1-Immunantwort am Ort des Krankheitsgeschehens (ATS/ERS/WASOG, 1999).

2.5.2 Epidemiologie

Die Sarkoidose tritt weltweit mit variierenden Prävalenzen auf. Die höchsten Prävalenzen findet man in skandinavischen Ländern und bei Afroamerikanern (Costabel, 2001). In Europa besteht ein Nord-Süd-Gefälle der Prävalenzen (Schweden 64/100.000; Spanien 4/100.000). In Deutschland rechnet man mit einer Inzidenz von ca. 12 Erkrankten auf 100.000 Einwohner und mit einer Prävalenz von ca. 44/100.000 (Eberhardt und Gaede, 2006). Da die asymptomatischen Verläufe häufig durch Thoraxröntgenuntersuchungen aufgedeckt werden, ist von einer großen Dunkelziffer auszugehen (Nunes et al., 2007; Eberhardt und Gaede, 2006). Die Sarkoidose tritt gehäuft bei jungen Erwachsenen zwischen dem 2. und 4. Lebensjahrzehnt auf. In europäischen Ländern erkranken Frauen und Männer etwa gleich häufig (Kirsten und Magnussen, 2000). Ethnische Unterschiede findet man nicht nur in der Häufigkeit sondern auch in der Ausprägung der Sarkoidose. So erkranken Afroamerikaner häufiger an einer

prognostisch ungünstigen, chronisch-progredienten Verlaufsform, während europäische Kaukasier eher asymptomatische Verläufe entwickeln (ATS/ERS/WASOG, 1999).

2.5.3 Ätiologie

Die Ursache der Sarkoidose ist bis heute nicht geklärt. Die variable Präsentation des klinischen Bildes der Erkrankung im Zusammenhang mit geographischen, umweltbedingten und genetischen Unterschieden lässt auf ein polyätiologisches Syndrom schließen, unter dem sich wahrscheinlich unterschiedliche Entitäten verbergen. Die Unterschiede in den ethnischen Prävalenzen, die familiäre Häufung und die Histomorphologie der Granulome geben Anhalt dafür, dass spezifische Umweltreize bei genetisch empfänglichen Personen granulomatöse Veränderungen im Sinne einer Sarkoidose induzieren (Kirsten und Magnussen, 2000).

Umweltfaktoren

Hinweise auf eine infektiöse Genese der Sarkoidose liefern epidemiologische Studien, die für Berufe, die mit einer hohen Antigenexposition und einer räumlichen, zeitlichen sowie körperlichen Nähe zu den Kollegen einhergehen, erhöhte Sarkoidoseprävalenzen gezeigt haben (Kern et al., 1993; Kirsten und Magnussen, 2000).

Da viele granulomatöse Erkrankungen durch Mikroorganismen verursacht werden, wurden verschiedene Erreger wie z.B. Mykobakterien, humaner Herpesvirus, *Chlamydia pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi* und zuletzt *Propionibacterium acnes* als verursachende Keime der Sarkoidose vorgeschlagen. Überzeugende Beweise für die pathogene Rolle dieser Keime fehlen jedoch bisher (Newmann, 2005). Neben infektiösen Erregern können auch anorganische und organische Stäube sarkoidoseähnliche Erkrankungen auslösen. Dies ist für Metalle wie Beryllium, Titanium, Zirkonium und Aluminium bekannt. So konnte Berylliose, an der genetisch prädisponierte Personen schon bei einer Exposition gegenüber geringen Konzentrationen von Beryllium erkranken, aus dem Syndrom Sarkoidose abgetrennt und als eigenständige Entität definiert werden (Kirsten und Magnussen, 2000).

Genetische Faktoren

Die erste publizierte genomweite Kopplungsanalyse, die 63 deutsche Sarkoidosefamilien umfasste, konnte in einer absteigenden Stärke eine genetische Suszeptibilität für folgende Chromosomenregionen nachweisen: die HLA-Klasse-II Genregion auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 (6p21-22), Chromosom 3p21, 1p22, 9p33, X, 7q22 und 7q36 (Schürmann et al., 2001). Iannuzzi et al. (2005) konnten in einer zweiten genomweiten Kopplungsanalyse in afroamerikanischen Familien Kopplungen in Chromosomen 1p22, 2p25, 5p15-13, 5q11, 5q35, 9q34, 11p15 und 20q13 ermitteln, wobei sich die signifikanteste Kopplung in der Chromosomenregion 5q11 befand. Die geringe Überschneidung dieser Kopplungsanalysen weist auf eine ethnische Heterogenität der zur Sarkoidose prädisponierenden, genetischen Faktoren hin.

Diverse Studien haben über Assoziationen zwischen HLA-Klasse-II Allelen und einem erhöhten Krankheitsrisiko für Sarkoidose berichtet (Steele und Brown, 2007). Rybicki et al. (2005) fanden eine signifikante Assoziation zwischen dem funktionalen SNP (rs2076530) im Butyrophilin-like 2 Gen (BTNL-2-Gen) und der Sarkoidose bei Amerikanern kaukasischer Abstammung. Akahoshi et al. (2004) demonstrierten eine Assoziation zwischen dem funktionalen SNP T551G (Ile184Arg) des IFN- α -Gens, der eine gesteigerte Produktion des IFN- α induziert, und der Suszeptibilität für die Sarkoidose in der japanischen Bevölkerung. Viele andere Studien haben ebenfalls Anstrengungen unternommen Zusammenhänge zwischen Polymorphismen von Kandidatengenen und der Sarkoidose aufzudecken. Dies gelang tatsächlich für SNPs in Genen der folgenden Proteine: Angiotensin-converting Enzym (ACE), Komplement Rezeptor-1 (CR-1), Inhibitor- κ B (I κ B), Transforming Growth Factor- β (TGF- β), TLR-4, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Vitamin D-Rezeptor (VDR) (Iannuzzi et al., 2005; Pabst et al. 2006; Pabst et al., 2010).

2.5.4 Pathologie und Immunpathogenese

Die Sarkoidosegranulome bestehen aus herdförmig angeordneten Epitheloidzellen und mehrkernigen Riesenzellen, bei denen es sich um Abkömmlinge der Makrophagen handelt. Diese Zellen sind umgeben von einem Lymphozytenwall, dessen innere Schicht von CD4⁺-Lymphozyten und die äußere Schicht von CD8⁺-Lymphozyten dominiert wird. Die

Sarkoidosegranulome neigen in auffälliger Weise zur Fibrosierung, die von der Peripherie des Granuloms ausgeht. Da eine zentrale Nekrose fehlt, spricht man von nicht-verkäsenden epitheloidzelligen Granulomen (ATS/ERS/WASOG, 1999).

Die Sarkoidose ist assoziiert mit einer hohen Anzahl aktivierter Alveolarmakrophagen und CD4⁺-Lymphozyten, die sich gegenseitig stimulieren. Am Anfang der Entzündungskaskade wird das prozessierte, an der Oberfläche der Makrophagen exprimierte Antigen im Kontext kostimulierender Oberflächenmoleküle den naiven T-Helferzellen präsentiert. Diese differenzieren sich nach dem Zellkontakt unter dem Einfluss des IL-12, das von Makrophagen sezerniert wird, zu Th1-Effektorzellen (Lynch et al., 2007). Aktivierte Th1-Zellen akkumulieren im interstitiellen und alveolären Mikromilieu der Lunge und sezernieren dort IL-2, IFN- γ und andere Zytokine, die mononukleäre Zellen insbesondere Monozyten in die Alveolen anlocken und ihre Aktivierung, Proliferation und Differenzierung am Ort des Krankheitsgeschehens induzieren (Kirsten und Magnussen, 2000; ATS/ERS/WASOG, 1999). IL-2 bindet vor allem autokrin an die IL-2-Rezeptoren auf den aktivierten T-Lymphozyten und führt zur Proliferation der T-Zellklone, die über ein restringiertes Repertoire an T-Zell-Rezeptoren verfügen (Kirsten und Magnussen, 2000). Unter dem Einfluss von IFN- γ wandeln sich die Monozyten/Makrophagen zu Phagozytose- und Antigenpräsentationsspezialisten um. Aktivierte Makrophagen sezernieren verschiedene Zytokine und Chemokine, zu denen IL-1, IL-12, IL-15, IL-16, TNF- α , GM-CSF, CCL2, CCL3, CCL5 und CCL10 gehören, und exprimieren vermehrt Aktivierungsmarker und Adhäsionsmoleküle. Diese Moleküle führen zur Rekrutierung, Proliferation und Aktivierung von Makrophagen, T-Lymphozyten und anderen Immunzellen und zur Erhaltung der Granulomformation. Man findet aufgrund einer unspezifischen Stimulation der B-Lymphozyten durch aktivierte T-Helferzellen eine vermehrte unspezifische Antikörperbildung, die einen erhöhten Serum-Immunglobulinspiegel verursachen kann (Kirsten und Magnussen, 2000).

An den Fibrosierungsprozessen sind wahrscheinlich die von den Makrophagen sezernierten, fibroblastischen Wachstumsfaktoren beteiligt, die zur Proliferation der Fibroblasten und Kollagensynthese führen. Die Mechanismen, die an der Remission, der Persistenz und dem Progress der Erkrankung beteiligt sind, sind bisher noch nicht definiert. Man vermutet eine

Beteiligung der regulatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- β sowie der Th2-Immunantwort (Kirsten und Magnussen, 2000; Noor und Knox, 2007).

2.5.5 Symptomatik und Verlaufsformen

Das klinische Bild der Sarkoidose ist aufgrund der unterschiedlichen Krankheitsverläufe und Organbeteiligungen sowie der fluktuierenden Aktivität des granulomatösen Entzündungsprozesses sehr variabel. Die Sarkoidose präsentiert sich häufig mit unspezifischen Allgemeinsymptomen und organbezogenen Symptomen, kann aber auch inapparent verlaufen (Costabel, 2001). Für den prozentualen Anteil der asymptomatischen Patienten gibt es keine zuverlässigen Angaben, weil diese Patienten häufig nur zufällig vom Gesundheitssystem, meist (8-60 %) durch ein Röntgenscreening der Thoraxorgane, erfasst werden (Nunes et al., 2007). Bei der Diagnosestellung der Sarkoidose sind 30-50 % der Patienten asymptomatisch. Unspezifische Allgemeinsymptome wie Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Müdigkeit treten bei einem Drittel der Patienten auf (Costabel, 2001).

Als Multiorganerkrankung kann die Sarkoidose prinzipiell jedes Organ befallen. Am häufigsten sind die mediastinalen Lymphknoten (95-98 %) und die Lunge (> 90 %) betroffen. Ein Drittel bis die Hälfte der Fälle berichtet über einen hartnäckigen trockenen Husten, Thoraxschmerzen und Dyspnoe. Die Lungenparenchyimbeteiligung manifestiert sich als eine interstitielle Lungenerkrankung und kann bis in das Endstadium einer Lungenfibrose fortschreiten (Costabel, 2001).

Die extrathorakale Manifestation, die man in der Hälfte der Fälle findet, ist in 80-90 % der Fälle mit der intrathorakalen Beteiligung assoziiert (Nunes et al., 2007). Extrathorakal können ein oder mehrere Organe gleichzeitig involviert sein. Zu den häufigsten extrathorakalen Manifestationsorganen gehören die Leber (50-80 %), Milz (40-80 %), periphere Lymphknoten (30 %), Augen (20-50 %) und Haut (25 %). Die Lokalisation der Sarkoidose am Herzen, ZNS, Knochen und den Nieren ist zwar selten aber sehr komplikationsträchtig und stellt meist eine Therapieindikation dar (Costabel, 2001; Nunes et al., 2007).

Akute Sarkoidose

Die akute Sarkoidose tritt in bis zu 30 % der Fälle auf und zeichnet sich durch ein akut beginnendes, schweres Krankheitsgeschehen mit grippeähnlicher Symptomatik (Kirsten und Magnussen, 2000; Costabel, 2001). Die häufigste Form der akuten Sarkoidose ist das Löfgren-Syndrom, das durch die klassische Trias (bihiläre Lymphadenopathie, Arthritis meist der oberen Sprunggelenke, Erythema nodosum meist an den Streckseiten der Unterschenkel) charakterisiert ist. Nach 4-8 Wochen kommt es zu einer Remission der schweren Symptomatik, die der Rückbildung der bihilären Lymphadenopathie meist voraus geht. Die akute Form hat eine ausgezeichnete Prognose mit einer Spontanremission von ca. 95 % in den ersten zwei Jahren (Kirsten und Magnussen, 2000).

Chronische Sarkoidose

Die chronische Sarkoidose entwickelt sich in 10-30 % der Fälle und wird häufig zufällig oder symptomgebunden diagnostiziert (Costabel, 2001; Kirsten und Magnussen, 2000). Aufgrund einer nahezu regelhaften Beteiligung der Lunge hat die Röntgenuntersuchung des Thorax eine überragende Bedeutung in der Diagnostik (Kirsten und Magnussen, 2000). Die internationale Einteilung der pulmonalen Sarkoidose nach dem Thoraxröntgenbefund lautet (ATS/ERS/WASOG, 1999):

- Stadium 0 = Normalbefund bei seltener isolierter extrapulmonaler Organsarkoidose
- Stadium I = Bihiläre Lymphadenopathie ohne parenchymatöse Herdsetzungen
- Stadium II = Bihiläre Lymphadenopathie mit parenchymatösen Herdsetzungen
- Stadium III = Parenchymatöse Herdsetzungen ohne bihiläre Lymphadenopathie
- Stadium IV = Lungenfibrose mit irreversibler Funktionsminderung.

Das röntgenologische Stadium korreliert negativ mit der Remissionsrate. So beträgt die Remissionsrate im Stadium I 60-90 %, im Stadium II 40-70 %, im Stadium III 10-20 % und im Stadium IV 0 % (Lynch et al., 2007). Persistieren die radiologischen Befunde länger als zwei Jahre, so wird eine Spontanremission sehr unwahrscheinlich. Rezidivierendes Auftreten der Sarkoidose und ein Ausbleiben der Remission in den ersten 2 Jahren sind Zeichen eines chronischen Verlaufs der Erkrankung (Lynch et al., 2007).

2.6 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Bei multifaktoriell bedingten Krankheitsbildern, zu denen COPD und Sarkoidose gehören, sind neben nicht-genetischen auch genetische Faktoren mitverursachend. Bestimmte Genvarianten führen hier nicht zwingend zu der Erkrankung, sondern verleihen eine genetische Prädisposition. Während verursachende Genvarianten monogener Erkrankung gut erforscht sind, ist der genetische Hintergrund komplexer Erkrankungen erst in jüngerer Zeit Gegenstand der Forschung. Die komplexen Erkrankungen unterscheiden sich von monogenetischen Erkrankungen dadurch, dass ihr Auftreten nicht allein durch Mendelsche Gesetze erklärbar ist und sie in der Allgemeinbevölkerung viel häufiger vorkommen. Vermutet wird ein komplexes Wechselspiel genetischer Risikofaktoren untereinander und mit externen Faktoren. Die Entwicklung neuer Therapieverfahren aus der Erkenntnis der pathophysiologischen Abläufe komplexer genetischer Erkrankungen wäre von außerordentlicher gesundökonomischer Bedeutung (Bammann und Wawro, 2006).

Aufgrund der ubiquitären, pulmonalen Expression des TLR9 und seines Potentials, mikrobielles genetisches Material zu erkennen, ist TLR9 maßgeblich an der Koordination und Modulation komplexer Vorgänge des Immunsystems beteiligt. Es verdichten sich die Hinweise, dass die beiden TLR9 SNPs T-1237C und T-1486C eine funktionelle Relevanz besitzen. Da am Ende des TLR9-Signaltransduktionswegs die Expression verschiedenster regulatorischer Proteine steht, kann eine quantitative Änderung des Rezeptors zu einer Verschiebung der quantitativen Zusammensetzung der zellulären Mikroumwelt und folglich zu einer veränderten Zellkommunikation führen, die an der Amplifizierung der Entzündungsmechanismen, die man bei COPD und Sarkoidose findet, beteiligt ist.

Signifikante Ergebnisse vorausgegangener Studien weisen darauf hin, dass beide SNPs eine Rolle in der Pathogenese chronisch entzündlicher und infektiöser Erkrankungen spielen. In der vorliegenden genetischen Assoziationsstudie wurde untersucht, ob die SNPs T-1237C und T-1486C in der potentiellen Promotorregion des TLR9-Gens im Zusammenhang mit der Manifestation der COPD und Sarkoidose stehen. Durch die Unterteilung der erkrankten Kollektive in eine stabile und instabile bzw. akute und chronische Verlaufsform sollte die Frage geklärt werden, ob diese Polymorphismen Einfluss auf den Krankheitsverlauf bzw. Krankheitsprogress nehmen.

3 Material und Methoden

3.1 Personenkollektiv

Zur Durchführung der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie waren drei Probandenkollektive zu erstellen: zwei Stichproben bestehend aus Sarkoidose- und COPD-Patienten und eine aus gesunden Probanden. Die Studienteilnehmer wurden an der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Bonn, der Robert-Koch-Klinik Sankt Georg in Leipzig und dem Johanniter-Krankenhaus Bonn sowie aus Selbsthilfegruppen für Sarkoidose und aus dem Sarkoidosenetzwerk Bonn rekrutiert. Die Blutproben der Kontrollkohorte stammten aus Einstellungsuntersuchungen und gesunden Mitarbeitern der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Bonn sowie aus der Blutbank der Robert-Koch Klinik Sankt Georg in Leipzig. Im Weiteren erfolgte die Rekrutierung der Patienten und des gesunden Kollektivs auch über Hausärzte. Die Studieneinschlusskriterien waren das eindeutige Vorliegen einer COPD gemäß der GOLD (The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) Richtlinien bzw. eine eindeutige Diagnose der Sarkoidose mittels klinischer, röntgenologischer Untersuchung und des Biopsiematerials. Das Kontrollkollektiv setzte sich nur aus Personen zusammen, bei denen inflammatorische, immunologische und maligne Erkrankungen ausgeschlossen werden konnten. Da sich die Allelfrequenz der SNPs in den verschiedenen ethnischen Gruppen unterscheidet (Lazarus et al., 2003), waren alle Probanden dieser Studie ausschließlich kaukasischer Herkunft. Bei Unsicherheiten in der Eindeutigkeit der Einschlusskriterien erfolgte der Ausschluss aus der Studie. Die Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie war eine schriftliche Einverständniserklärung der Probanden. Das Versuchsprotokoll wurde gemäß der Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki der Ethikkommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn vorgelegt und von ihr genehmigt.

Das in die Studie eingeschlossene COPD-Kollektiv für den SNP T-1237C bzw. SNP T-1486C des TLR9 umfasste 175 Personen bzw. 174 Personen, von denen 60 bzw. 61 (35 Prozent) dem weiblichen und 115 bzw. 113 (65 Prozent) dem männlichen Geschlecht angehörten. Eine Untergliederung des Kollektivs in Subgruppen mit stabiler und instabiler Verlaufsform der COPD sollte differenziertere Auswertungen ermöglichen. Patienten, die drei oder mehr Hospitalisierungen aufgrund der COPD im vorangegangenen Jahr angaben, wurden unter instabiler Verlaufsform subsummiert. Das Kollektiv der Sarkoidosepatienten für den SNP

T-1237C bzw. SNP T-1486C des TLR9 umfasste 171 Personen bzw. 165 Personen, von denen 95 bzw. 91 (55 Prozent) dem weiblichen und 76 bzw. 74 (45 Prozent) dem männlichen Geschlecht angehörten. Hinsichtlich der klinischen Symptomatik erfolgte eine Unterteilung in akute und chronische Form. Eine chronische Verlaufsform charakterisierte sich durch ein mindestens zweimaliges Auftreten der Symptomatik seit Erstdiagnose der Sarkoidose bzw. durch eine länger als zwei Jahre anhaltende Symptomatik. Patienten mit Löfgren-Syndrom wurden der akuten Verlaufsform zugeordnet. Den Fall-Kollektiven wurden Kontrollkollektive aus maximal 233 Personen mit maximal 112 Frauen (53 Prozent) und maximal 111 Männern (47 Prozent) gegenübergestellt. Die Kontrollpersonen wurden für die jeweiligen Erkrankungen so ausgewählt, dass sie in Alter und Geschlecht möglichst dem Patientenkollektiv entsprachen, weshalb die Kontrollkollektive in der Anzahl der Probanden differierten. Die relevanten klinischen Patientendaten wurden durch Recherche in Patientenarchiven als auch über direkte Befragung der Personen mittels Fragebogen erhoben. Die erhobenen Daten bezogen sich auf: Alter, Geschlecht, ethnische Herkunft, Krankheitsanamnese, granulomatöse Erkrankungen, Komorbiditäten, Rauchgewohnheiten, Lungenfunktion, Stadium und Verlauf der COPD bzw. Sarkoidose.

3.2 Material

3.2.1 Chemikalien

Chemikalien für die DNA-Extraktion:

bidest. Wasser, 0,1 % Triton X 100-Lösung, Lysis-Puffer (Natriumchloridlösung, EDTA, aqua dest.), 10 % Natrium-Dodecyl-Sulfat-Lösung (SDS-Lsg), Proteinase-K-Lösung, 6 M Natriumchlorid-Lösung, 100 % Ethanol, 70 % Ethanol, TE8-Puffer (Tris-HCl, EDTA, aqua dest.).

Chemikalien für die PCR:

0,5 U Taq DNA Polymerase (Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 1,25 mM dNTPs 32(Firma GE Healthcare Bio-Sciences, Deutschland), 10 µM Primer (Firma MWG BIOTECH, Ebersberg, Deutschland), 10x PCR-Puffer (Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), Magnesiumchlorid (Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), aqua dest.

Chemikalien für den enzymatischen Verdau:

Restriktionsenzyme: 20 U/μl Mwo I, 10x NE Buffer 2, 100x BSA (Firma New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland), 10 U/μl BstN I, 10x NE Buffer2, 100x BSA (Firma New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland), aqua dest.

Chemikalien für die Gelelektrophoresen:

Marker V und Marker VIII (Firma Roche, Mannheim, Deutschland), Gelladepuffer (30 % Glycerol, 0,25 % Xylene Cyanol, 0,25 % Bromphenolblau), 1 % Ethidiumbromid, Agarosen (Firma Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland): SeaKem-Agarose, MetaPhor-Agarose, TBE-Puffer (Tris, Borsäure, 0,5 M EDTA, aqua dest.), aqua dest.

3.2.2 Geräte

Thermocycler:

Biometra T-gradient für 96 Proben (Firma Biometra, Göttingen, Deutschland), Zentrifuge: Mikrofuge E TM (Firma Beckmann, München, Deutschland), Vortexgerät: Vortex Genie (Firma Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz), Energiequelle und Gellaufkammer: Power Pack P 25 und Agagel Maxi (Firma Biometra, Göttingen, Deutschland), Wasserbad/Inkubator, Gel doc 1000 (Firma Biorad, München, Deutschland).

3.3 Durchführung der Untersuchungen

3.3.1 Blutentnahme

Unter Routinelaborbedingungen wurde dem Patienten- und Kontrollkollektiv venöses Blut mittels Vacutainersystem entnommen. Von jedem Probanden erhielt man auf diese Weise zwei 10 ml-Röhrchen mit EDTA-Vollblut, das zur DNA-Extraktion verwendet wurde.

3.3.2 Extraktion genomischer DNA aus Vollblut nach der Aussalzmethode

Zur Gewinnung der DNA wurden unter sterilen Bedingungen 7 ml EDTA-Blut mit bidestilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Nach einer Ruhephase von 30 Minuten bei 40 °C wurde der Ansatz 20 Minuten bei 3000 rpm ($r = 20\text{cm}$, 1500xg) zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und verworfen. Der Rückstand (= Pellet bestehend aus Leukozyten) wurde mit 30 ml 0,1 % Triton

X100-Lösung versetzt und durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette aufgenommen und verworfen. Das verbleibende Pellet wurde anschließend mit 5 ml Lysis-Puffer versetzt und resuspendiert. Durch die folgende Zugabe von 250 µl 10 % SDS-Lösung wurden die Zellkerne zur Fragmentierung gebracht, so dass die genomische DNA in freier Form vorlag. Um Zellfragmente enzymatisch zu spalten, wurden 100 µl Proteinase-K-Lösung (20 mg/ml) hinzugefügt. Der Extraktionsansatz wurde bei 37 °C im Wasserbad über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und zum Aussalzen der Proteine mit 1,5 ml 6 M NaCl-Lösung versetzt. Zur quantitativen Ausfällung der Proteine wurden die Proben auf einem Rotationsschüttler 90 Minuten lang durchmischt. Daraufhin folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 3750 rpm ($r = 20$ cm, 3500 xg). Erneut wurde der Überstand (ca. 6,5 ml) in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 25 ml 100 %igem EtOH versetzt. Dadurch wurde die DNA gefällt und konnte mit einer Pasteurpipette geborgen werden, in 70 %igem EtOH gewaschen und anschließend nach kurzem Austrocknen an der Luft in 250 µl TE8-Puffer mittels dreitägigem Aufenthalt im Brutschrank bei 37 °C gelöst werden.

3.3.3 Primer: (Oligonukleotide)

Als Primer werden Oligonukleotide bezeichnet, die als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme wie die DNA-Polymerase dienen. Für ihre erste Verknüpfungsreaktion benötigen DNA-Polymerasen eine Hydroxylgruppe als Startpunkt. Primer stellen mit ihrem 3'OH-Ende eine passende Hydroxyfunktion zur Verfügung und werden zur *in-vitro*-Amplifikation von DNA bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Hier lässt sich mit Hilfe der Primer der spezifische DNA-Abschnitt, der amplifiziert werden soll, festlegen. Der 5'-Primer (= sense-Primer, forward) entspricht der Anfangssequenz des zu amplifizierenden DNA-Fragments und bindet an den komplementären DNA-Strang, während der 3'-Primer (= antisense-Primer, reverse) an das Ende des Amplikons bindet und zu diesem komplementär und invers ist. Von den Primern für PCR-Ansätze wird für das Erreichen ähnlicher Primerschmelztemperaturen zwischen 60 °C und 75 °C gefordert, dass die Länge der Primersequenzen zwischen 18 und 30 Nukleotiden liegt und das Verhältnis von GC- zu AT-Paaren beider Primer sich ähnelt. Grundlage für die Primer der Polymorphismus TLR9

T-1234C und TLR9 T-1486C war die Arbeit von Hamann et al. (2004). Die Sequenzen der einzelnen Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Sequenzen verwendeter Primerpaare für die TLR9-Single-Nukleotid-Polymorphismen T-1237C und T-1486C

TLR9 SNP	Primersequenz
T-1486C	forward: 5'-TCCCAGCAGCAACAATTCATTA-3' reverse: 5'-CTGCTTGCACTTGACTGTGT-3'
T-1237C	forward: 5'-ATGGGAGCAGAGACATAATGGA-3' reverse: 5'-CTGCTTGCACTTGACTGTGT-3'

3.3.4 DNA-Amplifikation durch PCR

Die am meisten benutzte Standardmethode zur Amplifizierung von Nukleinsäure-Fragmenten, stellt die von Mullis und Faloona (1987) veröffentlichte Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dar. Mit diesem Verfahren können auf enzymatischem Wege, d.h. mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, *in vitro* kurze, genau definierte Teile eines DNA-Strangs semikonservativ amplifiziert werden.

Zu den grundlegenden Komponenten der PCR gehören (s. Tabelle 4):

- die Original-DNA, die die zu amplifizierende Sequenz (Template) enthält,
- zwei Primer, die zum einen den Startpunkt der DNA-Synthese festlegen und zum anderen den amplifizierten Bereich flankieren,
- die zur Replikation benötigte Taq-Polymerase, eine aus dem Organismus *Thermus aquaticus* gewonnene DNA-Polymerase, die auch bei Temperaturen von 90 - 95 °C stabil bleibt,
- Desoxyribonucleosidtriphosphate, Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang,
- Mg²⁺-Ionen, die für die Funktion der Polymerase essentiell sind,
- sowie die Pufferlösungen, die eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellen.

Tabelle 4: Reaktionsansätze mit 25 µl für die in Tabelle 5 dargestellten PCRs

Reagenz	TLR9II T-1237C	TLR9I T-1486C
dNTP's (µl)	4	4
Puffer 10x (µl)	2,5	2,5
Mg-Cl ₂ (µl)	1	1
Primer 5' (µl)	1	1
Primer 3' (µl)	1	1
H ₂ O (µl)	15,4	15,4
Taq-Polymerase (µl)	0,1	0,1

Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 12 - 50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Die PCR muss auf die spezifische Reaktion hin optimiert werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung: Durch das Erhitzen der doppelsträngigen DNA auf 94 - 96 °C werden durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen die Stränge getrennt. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt (Initialisierung), um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen.

2. Primer-Annealing: Die Temperatur wird ca. 30 Sekunden lang auf einer Temperatur gehalten, die eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA erlaubt. Die Annealing-Temperatur ist hierbei abhängig von der Primerlänge und der Primersequenz. Bei zu niedrig gewählter Temperatur können sich die Primer auch an nicht 100 % komplementäre Sequenzen anlagern und so zu unspezifischen Produkten („Geisterbanden“) führen. Im Falle zu hoher Temperatur kann eine zu große thermische Bewegung der Primer das Anheften an die komplementäre Sequenz verhindern und zu einer ineffizienten Produktbildung führen. Die optimale Temperatur liegt normalerweise 2 - 3 °C unter dem Schmelzpunkt der Primersequenzen und entspricht meist einer Temperatur von 55 - 65 °C.

3. Extension: In diesem Abschnitt füllt die Taq-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'OH-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Der Primer wird nicht wieder abgelöst, er bildet den Anfang des neuen Einzelstrangs.

Die finale Extension wird über 10 Minuten nachgeschaltet, um noch verbliebene DNA-Einzelstränge vollständig zu komplettieren (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: PCR-Programme für die TLR9 SNPs T-1237C und T-1486C

Arbeitsschritte	TLR9II T-1237C	TLR9I T-1486C
1. Initiale Denaturierung	95 °C 6min	95 °C 6min
2. Denaturierung	95 °C 30sec	95 °C 30sec
3. Annealing	62 °C 30sec	60 °C 30sec
4. Extension	72 °C 45sec	72 °C 45sec
2.-4. Zyklenanzahl	29	34
5. Finale Extension	72 °C 10min	72 °C 10min
6. Abkühlphase	4 °C Pause	4 °C Pause

Die einzelnen Reagenzien wurden nach Lagerung bei - 17 °C im Kühlschrank zunächst aufgetaut, kräftig durchmischt und anschließend herunter zentrifugiert. Jedem Ansatz wurde anschließend 0,8 - 1 µl genomischer DNA der einzelnen zu untersuchenden Proben zugegeben. Die gewonnene DNA lässt sich anschließend durch das Verfahren der Gelelektrophorese sichtbar machen.

3.3.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese bietet eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäure-Stränge nach ihrer Größe zu trennen. Es werden lange Fäden aus Agarosepolymeren zu einem Gel vernetzt, das mit seinen Poren wie ein Sieb für die, nach Anlegen eines elektrischen Feldes, wandernden negativen DNA-Moleküle funktioniert, wobei die kleineren Moleküle schneller durch das Gel wandern und die Stränge somit entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Größe der einzelnen Fraktionen, PCR- und Verdauprodukte, lässt sich durch einen Vergleich mit Strängen bekannter Größe (Marker) bestimmen.

Die MetaPhor-Agarose polymerisiert zu einem Netzwerk mit feineren Poren als die SeaKem-Agarose. Aus diesem Grund eignet sich MetaPhor-Agarose zur Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente. Um Konsistenzveränderungen des Gels zu vermeiden, läuft die Elektrophorese bei 200V im Eisbad ab. Die Gelelektrophoresebedingungen wie die Konzentration und Beschaffenheit der Gele, die Laufzeiten und die angelegten

Feldspannungen, die zu einer sichtbaren Auftrennung der PCR- bzw. der verdauten PCR-Produkte der beiden untersuchten SNPs führen, kann man der Tabelle 6 entnehmen.

Zur Visualisierung der aufgetrennten DNA wird dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt. Das Ethidiumbromid bildet mit der DNA Komplexe, welche bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoreszieren.

Zusammensetzung der einzelnen Gele:

- 2 % Agarose-Gel: 70 ml 0,5 M TBE-Puffer + 1,4 g SeaKem-Agarose + 4,5 µl Ethidiumbromid
- 3 % MetaPhor-Gel: 70 ml 0,5 M TBE-Puffer + 2,1 g MetaPhor-Agarose + 4,5 µl Ethidiumbromid

Tabelle 6: Gelelektrophoresebedingungen für die PCR- bzw. die verdauten PCR-Produkte

	TLR9II T-1237C	TLR9I T-1486C
PCR	2 % Agarose-Gel, 50 min bei 100 V	2 % Agarose-Gel, 50 min bei 100 V
Restriktionsverdau	3 % MetaPhor-Gel, 60 min im Eisbad bei 200 V	2 % Agarose-Gel, 50 min bei 100 V

Arbeitsschritte: Der Puffer und die Agarose wurden zunächst in ein hitzestabiles Gefäß gegeben und in der Mikrowelle bis zu fünf Minuten mit wiederholten, kurzen Pausen erhitzt. Nachdem das Agarosepulver unter mehrmaligem Aufkochen vollständig im Puffer gelöst war, wurde das Gefäß zum Abkühlen unter den Abzug gestellt. Nach dem Abkühlen auf 70 °C konnte das Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gefäß zum Mischen vorsichtig geschwenkt werden. Die Flüssigkeit wurde in einen Gelträger mit einem Kamm zur Anfertigung von Geltaschen (slots) gegossen und unter dem Abzug zur Aushärtung stehen gelassen. Anschließend wurde das Gel in eine puffergefüllte Gelkammer gestellt und dort mit einem Gemisch aus 10 µl DNA-Produkt und 2,5 µl Gelladepuffer, das das Herausströmen des Produkts verhindern und die Lauffront markieren sollte, bestückt. Um die Fragmentgröße des DNA-Produktes einschätzen zu können, wurden in die jeweils ersten Geltaschen ein DNA-Marker, der DNA-Fragmente definierter Länge enthält, pipettiert. Es wurden die Marker V

(pBR322DNA/HaeIII) und VIII (pUCBM21DNA/HpaIII + pUCBM21DNA/DraI+HindIII) verwendet. Des Weiteren lief bei jedem Reaktionsansatz eine Blindprobe mit, welche nur den Reaktionsmix ohne DNA enthielt, um auszuschließen, dass das Ergebnis durch eine Verunreinigung beeinflusst wurde.

3.3.6 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen) gehören zum bakteriellen Abwehrmechanismus gegen eingedrungene, fremde DNA. Die bakterielle DNA wird mittels spezifischer Methylasen modifiziert. Fremde DNA, die der spezifischen Methylierung nicht unterliegt, wird von den Endonukleasen intrabakteriell abgebaut. Restriktionsenzyme zeichnen sich durch ihre hohe Spaltungsspezifität aus, da sie doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen, die aus mindestens vier Basen bestehen und sich durch eine palindromische Struktur auszeichnen, spalten. Bei palindromischen Strukturen müssen die Basensequenzen der beiden Einzelstränge, vom 5'OH-Ende her gelesen, identisch sein. Die Namensgebung der Restriktionsenzyme orientiert sich an dem Namen ihrer Quelle. Die in der Arbeit von Hamann et al. (2004) verwendeten Restriktionsenzyme BstN I (aus dem *Bacillus stearothermophilus* N) und Afl II (aus *E. coli* Stamm, das das klonierte Afl II-Gen von *Anabaena flos-aquae* trägt) wurden zur Genotypisierung der beiden TLR9 SNPs eingesetzt (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Restriktionsenzyme und ihre Erkennungssequenzen

TLR 9 SNP	Restriktionsenzym	Erkennungssequenz
T-1486C	Afl II	5'...C/TTAAG...3' 3'...GAATT/C...5'
T-1237C	BstN I	5'...CC/W*GG...3' 3'...GGW*/CC...5'

*W = A oder T

3.3.7 Enzymatischer Verdau der PCR-Produkte

Die Untersuchung von Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) stellt ein hochspezifisches molekularbiologisches Detektionsverfahren für den Nachweis des Basenaustauschs in der DNA dar (Ziemssen et al., 2001). Spezifische Restriktionsenzyme erkennen die punktmutierte Sequenz und schneiden die DNA in einer charakteristischen

Weise. Andererseits kann durch eine Punktmutation eine Schnittstelle für ein spezifisches Restriktionsenzym verloren gehen. Der Verdau eines PCR-Produktes mittels eines spezifischen Enzyms generiert somit Fragmente unterschiedlicher Länge, die nach Anfärben mit Ethidiumbromid und elektrophoretischer Auftrennung im Agarose- und MetaPhor-Gel unter UV-Lampe sichtbar gemacht werden können. Die unterschiedlichen Spaltmuster lassen zuverlässig auf den Genotypen schließen. In der Tabelle 8 sind die verwendeten Restriktionsenzyme und die Fragmentgrößen der einzelnen Allele dargestellt.

Vorgehensweise: 3 µl bzw. 5 µl des Enzymgemisches wurden direkt zu 10 µl PCR-Produkt in die Caps hineinpipettiert und über Nacht bei 37 °C bzw. 60 °C im Wasserbad inkubiert (Tabelle 9). Die entstanden DNA-Fragmente wurden nach Anfärben mit Ethidiumbromid und elektrophoretischer Auftrennung im Agarose- bzw. MetaPhor-Gel unter der UV-Lampe sichtbar gemacht.

Tabelle 8: Restriktionsenzyme, -temperaturen und Länge der Restriktionsfragmente

TLR9 SNP	T-1486C	T-1237C
Restriktionsenzym	Afl II	BstN I
Restriktionstemperatur	37 °C	60 °C
Länge der Fragmente	C-Allel: 499bp T-Allel: 172bp, 327bp	C-Allel: 60bp,48bp,27bp T-Allel: 108bp, 27bp

Tabelle 9: Restriktionsansätze für den Restriktionsverdau der PCR-Produkte

Reagenz (µl)	TLR9 T-1486C	TLR9 T-1237C
PCR-Produkt	10	10
Puffer 10x	1,3	1,5
Restriktionsenzym	0,2	0,4
BSA	0,13	0,15
H2O	1,37	2,95

3.4 Statistik

Die statistische Datenanalyse wurde mit Hilfe des Programmsystems SPSS 13 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) vorgenommen. Die untersuchten COPD- und Sarkoidosekollektive wurden anhand von Merkmalen (Variablen) mit nominalem und

metrischem Messskalenniveau charakterisiert. Zu den qualitativen Variablen mit nominalem Messskalenniveau zählten der Genotypen der untersuchten SNPs, der Krankheitsverlauf der COPD (stabil/instabil) und der Sarkoidose (akut/chronisch), die Rauchgewohnheiten (Raucher/Nichtraucher/ Ex-Raucher) und das Geschlecht (männlich/weiblich). Zu der Gruppe der quantitativen Variablen mit metrischem Messniveau gehörten Alter der Probanden bei Blutentnahme, Packyears (20 Zigaretten oder eine Schachtel Zigaretten pro Tag multipliziert mit den Raucherjahren) und die Lungenfunktionparameter (FEV_1 in Prozentsoll und FEV_1/FVC). Zur Untersuchung signifikanter Unterschiede in der Verteilungen der Genotypen, der Allele und des C-Trägertyps (Mutationsprävalenz) bei Erkrankten und Gesunden, unter anderem auch krankheitsverlauf- und geschlechtsspezifisch, wurde aufgrund des nominalen Messskalenniveaus der entsprechenden Variablen der χ^2 -Test nach Pearson mit einem festgelegten Signifikanzniveau $< 0,05$ verwendet. Mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben konnten Mittelwerte und Standardabweichungen der quantitativen Variablen berechnet und verglichen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertung von Polymerasekettenreaktion und Restriktionsverdau

Zur Genotypisierung der zwei TLR9 Single-Nukleotid-Polymorphismen in der Promotorregion kamen die in der Arbeit von Hamann et al. (2004) verwendeten Primer und Restriktionsenzyme zum Einsatz. Die zur *in vitro*-Amplifikation der untersuchten DNA-Abschnitte benötigten Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt. Der *antisense*-Primer flankiert beide PCR-Produkte und ist invers sowie komplementär zu deren Enden. Die DNA-Sequenz des PCR-Produkts für TLR9 SNP T-1486C beinhaltet die DNA-Sequenz des PCR-Produkts für den TLR9 SNP T-1237C. Wie auch Hamann et al. (2004) haben wir unterschiedliche *sense*-Primer benutzt und damit PCR-Produkte unterschiedlicher Größe erhalten. Die Primersequenzen, die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme mit den polymorphen Stellen T-1486C und T-1237C im TLR9-Gen sind in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt.

TCCTCCCAGCAGCAACAATTCATTAATTCATTCATTCAGCCTTCATCAGAAATACCCTCTCTGTGCCTGCC
 CAGAGCTGACTGCTGGGTGTACATAATTCAGCAGATATCAAGCACTTACTATGTGCTGGGCACTGTACT
 GGATCCTGGGGATGCAGATAAAAGATCACTGCC|***T(T/C)AAGA***AAGCTGACATTCCAGCAGGGGAATA
 AGACGATATAACAATAAACCATGAAAGATCAATGATCCGGTGTGCTAGCAGTTAAAAAATGTTAGGACA
 AAGAGAAACATAGACCAGGCAAAGGAGCTCAGGAGTGCCAGATCTGGGGTGGGAGGTTTGTAAGAA
 GGCTGGATGGCCCTGTTGAGAGGGTGACATGGGAGCAGAGACATAATGGAGGCAAAGGAGGGGTCA
 TATGAGACTTGGGGGAGTTTTTCAGGCAGAGGGAACAGCACATCCCAAGGCCCTGAGGCAGGAGAATG
 CCCAGGGGCTACACAGTCAACTGCAAGCAGGCCAGTGGGCCTGGAGAGCACTCA

Abb. 2: DNA-Sequenz im Bereich des TLR9 SNP T-1486C. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Afl II ist fett + kursiv dargestellt. Die Primersequenzen sind unterstrichen. Das polymorphe Nukleotid steht in Klammern. Cytosin an der polymorphen Stelle führt zum Verlust der Schnittstelle (|).

TCCTCCCAGCAGCAACAATTCATTAATTCATTCATTCAGCCTTCATCAGAAATACCCTCTCTGTGCCTGCC
 CAGAGCTGACTGCTGGGTGTACATAATTCAGCAGATATCAAGCACTTACTATGTGCTGGGCACTGTACT
 GGATCCTGGGGATGCAGATAAAAGATCACTGCCCTTAAGAAGCTGACATTCCAGCAGGGGAATAAGAC
 GATATAACAATAAACCATGAAAGATCAATGATCCGGTGTGCTAGCAGTTAAAAAATGTTAGGACAAAGA
 GAAACATAGACCAGGCAAAGGAGCTCAGGAGTGCCAGATCTGGGGTGGGAGGTTTGTAAAGAAGGCTG
 GATGGCCCTGTTGAGAGGGTGACATGGGAGCAGAGACATAATGGAGGCAAAGGAGGGGTCATATGA
 GACTTGGGGGAGTTT(*T/C*)**C|AGGCAGAGGGAACAGCACATCCCAAGGCCCTGAGGCAGGAGAATGC**
CC|AGGGGCTACACAGTCAACTGCAAGCAGGCCAGTGGGCCTGGAGAGCACTCA

Abb. 3: DNA-Sequenz im Bereich des TLR9 SNP T-1237C. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BstN I ist fett + kursiv dargestellt. Die Primersequenzen sind unterstrichen. Das polymorphe Nukleotid steht in Klammern. Cytosin an der polymorphen Stelle erzeugt eine neue Schnittstelle (|).

4.1.1 TLR9 T-1486C rs187084 Polymorphismus

Die DNA-Sequenz des PCR-Produktes ist als Bande in Abbildung 4 dargestellt und besteht aus 499 Basenpaaren.

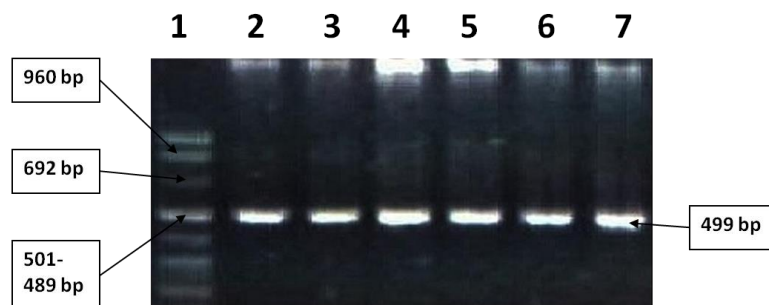


Abb. 4: PCR-Produkt des TLR9 SNP T-1486C; 1: Marker VIII, 2-7: exemplarische Banden des PCR-Produkts

Der homozygote TT-Genotyp (Wildtyp) besitzt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Afl II. Beim enzymatischen Verdau des PCR-Produktes mit Afl II wird der DNA-Abschnitt in zwei unterschiedlich große Fragmente (327bp und 172bp) geschnitten. Diese sind in Abbildung 5 dargestellt.

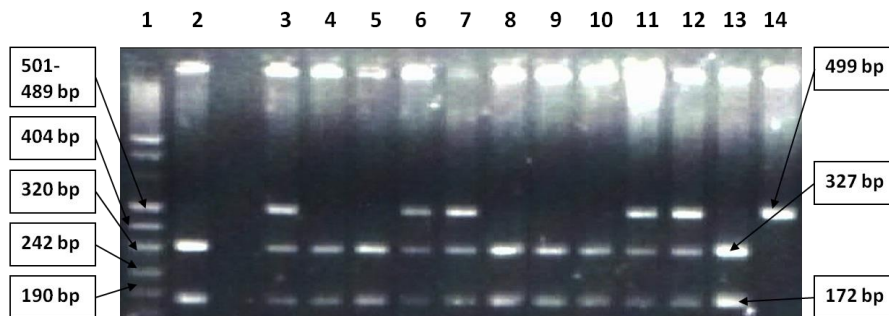


Abb. 5: Restriktionsfragmente des TLR9 SNP T-1486C nach enzymatischen Verdau mit Afl II; 1: Marker VIII; 2,4,5,8,9,10 und 13: homozygot (TT-Genotyp/Wildtyp); 3,6,7,11 und 12: heterozygot (TC-Genotyp); 14: homozygot (CC-Genotyp/Mutante)

Wird an der polymorphen Stelle das Nukleotid Thymin gegen Cytosin ausgetauscht, dann geht die für das Restriktionsenzym wichtige palindromische Struktur verloren und das PCR-Produkt wird nicht mehr geschnitten. Auf dem Gel sieht man dementsprechend beim homozygoten CC-Genotyp nur eine Bande mit der Fragmentgröße 499bp, während der heterozygote TC-Genotyp an 3 Restriktionsfragmenten (499bp, 327bp und 172bp) erkennbar ist.

4.1.2 TLR9 T-1237C rs5743836 Polymorphismus

Das PCR-Produkt dieses Polymorphismus ist 135 Basenpaare lang (s. Abbildung 6). Der homozygote TT-Genotyp enthält eine Schnittstelle für das Enzym BstN I. Nach enzymatischem Verdau lassen sich zwei Banden (108bp und 27bp) mittels Gelelektrophorese darstellen. Der SNP befindet sich innerhalb des größeren Fragments. Bei Individuen, die an der polymorphen Stelle Cytosin statt Thymin aufweisen, entsteht eine weitere Restriktionsstelle für das Enzym BstN I. Das lange Fragment (108bp) wird in zwei weitere Fragmente (60bp und 48bp) geschnitten, so dass der homozygote CC-Genotyp durch 3 Fragmente dargestellt wird (s. Abbildung 7). Der heterozygote TC-Genotyp präsentiert sich mit vier verschiedenen Fragmenten (108bp, 60bp, 48bp und 27bp).

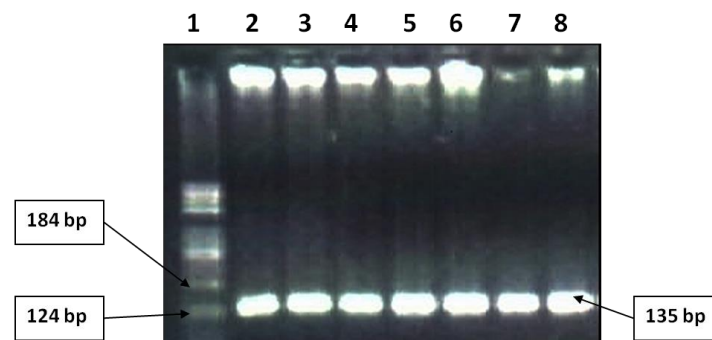


Abb. 6: PCR-Produkt des TLR9 SNP T-1237C; 1: Marker V, 2-8: exemplarische Banden des PCR-Produkts

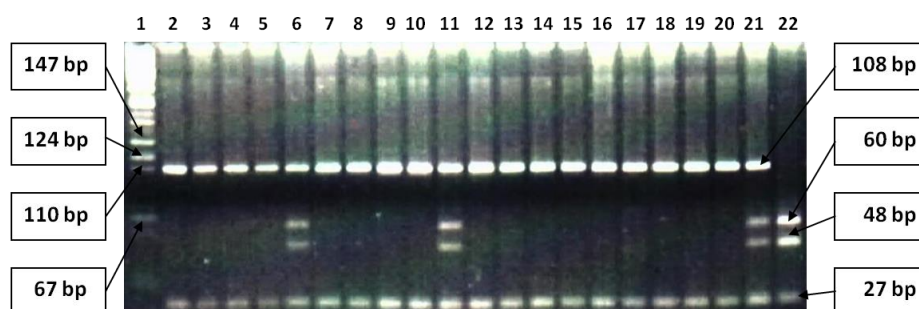


Abb. 7: Restriktionsfragmente des TLR9 SNP T-1237C nach enzymatischen Verdau mit BstN I; 1: Marker VIII; 2,3,4,5,7,8,9,10,12,13,14,15,16,17,18,19 und 20: homozygot (TT-Genotyp/Wildtyp); 6, 11, und 21: heterozygot (TC-Genotyp); 22: homozygot (CC-Genotyp/Mutante)

4.2 Statistische Datenanalyse

4.2.1 Demographische Basisdaten

Die Patienten- und gegenübergestellten Kontrollkollektive wurden in Abhängigkeit vom jeweiligen SNP und der Grunderkrankung sowohl in ihrer Gesamtheit als auch differenziert nach dem Krankheitsverlauf grundcharakterisiert. Die Verteilung der wichtigen Merkmale findet sich in den nachfolgenden Tabellen 10 - 13.

Während die diskreten Variablen mit Absolutwerten bzw. Prozentsätzen dargestellt sind, findet man die stetigen Variablen mit Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Im Hinblick darauf, dass der Tabakrauch als wichtigster Risikofaktor für die Entwicklung der COPD aufgefasst wird, wurde das COPD-Kollektiv eingehend bezüglich des Rauchverhaltens und der

Lungenfunktion untersucht. Das Merkmal Rauchverhalten wurde in die drei Kategorien: Raucher, Nichtraucher und Ex-Raucher eingeteilt und der langjährige Tabakrauchkonsum in Packyears als stetige Variable mit Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Lungenfunktion wurde durch FEV₁ (Einsekundenkapazität) und den auf die funktionelle Vitalkapazität (FVC) bezogenen Wert (FEV₁/FVC) objektiviert.

Bei der Gegenüberstellung „COPD (gesamt) vs. Kontrolle“ zeigten sich signifikante Unterschiede in der Kohortenzusammensetzung (s. Tabellen 10 - 11). Das Kontrollkollektiv war mit dem Durchschnittsalter von 56,8 Jahren ca. 7 Jahre jünger als das COPD-Kollektiv (p-Wert = 0,000). Während der prozentuale Anteil der männlichen COPD-Patienten 65 % betrug, war das Geschlechterverhältnis im Kontrollkollektiv annähernd ausgeglichen mit einem leichten Überwiegen des weiblichen Geschlechts. Hinsichtlich der Rauchgewohnheiten und der Lungenfunktion zeichnete sich das Normalkollektiv durch einen signifikant niedrigeren Tabakrauchkonsum (p-Wert = 0,000) und signifikant bessere pulmonale Funktionsparameter (p-Wert = 0,000) aus.

Beim Vergleich „COPD (stabil) vs. COPD (instabil)“ zeigten sich im Hinblick auf die Verteilung des Rauchverhaltens und den langjährigen Tabakrauchkonsum (packyears) keine statistisch signifikanten Unterschiede (s. Tabellen 10 - 11). Jedoch zeichnete sich das Kollektiv der instabilen COPD-Patienten durch eine größere Einschränkung der Lungenfunktion in Form einer signifikant geringeren Einsekundenkapazität aus (p-Wert = 0,001).

Bei der Gegenüberstellung „Sarkoidose (gesamt) vs. Kontrolle“ waren die Kontrollkollektive mit 215 Probanden für TLR9 SNP T-1486C und 233 Probanden für TLR SNP T-1237C größer als die Patientenkollektive (165 bzw. 166 Sarkoidosepatienten). In der Alters- und Geschlechterstruktur fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (s. Tabellen 12 - 13).

Beim Vergleich „Sarkoidose (akut) vs. Sarkoidose (chronisch)“ zeigte sich ein nahezu identisches Geschlechterverhältnis (p-Wert = 0,969 für T-1486C und p-Wert = 0,916 für T-1237C). Die Sarkoidosepatienten mit der akuten Verlaufsform waren signifikant jünger als die chronisch kranken Patienten (p-Wert = 0,000).

Tabelle 10: Demographische Basisdaten der COPD- und Kontrollkohorte für TLR9 SNP T-1486C (Darstellung der stetigen Variablen: Mittelwert \pm Standardabweichung, statistische Analyse der Daten mittels t-Test für unabhängige Stichproben (p -Wert $< 0,05$); Darstellung der diskreten Variablen: Absolutwert (Prozentsatz), statistische Analyse der Daten mittels χ^2 -Test nach Pearson (p -Wert $< 0,05$))

	COPD (gesamt)	Kontrolle	p-Wert COPD (gesamt) vs. Kontrolle	COPD¹ (stabil)	COPD² (instabil)	p-Wert stabil vs. instabil
Gesamtzahl	174	170		73	101	
Geschlecht	w: 61 35 % m: 113 65 %	w: 93 55 % m: 77 45 %	0,000	w: 28 38 % m: 45 62 %	w: 33 33 % m: 68 67 %	0,438
Alter³ \pm SD	63,59 \pm 10,89	57,44 \pm 13,35	0,000	62,68 \pm 11,91	64,25 \pm 10,10	0,352
Packyears⁴ \pm SD	33,23 \pm 25,68	3,95 \pm 8,953	0,000	32,23 \pm 25,42	33,96 \pm 25,99	0,668
Raucher %	73 41,9 %	48 28,2 %	0,000	33 45,2 %	40 39,6 %	0,196
Nicht-Raucher %	18 10,3 %	80 47,1 %		4 5,4 %	14 13,9 %	
Ex-Raucher %	83 47,7 %	42 24,7 %		36 49,3 %	47 46,5 %	
FEV₁ (% des Sollwertes) \pm SD	52,38 \pm 21,10	79,81 \pm 21,33	0,000	58,53 \pm 18,86	47,78 \pm 20,93	0,001
FEV₁/FVC \pm SD	58,57 \pm 14,87	98,29 \pm 25,27	0,000	62,79 \pm 15,9	58,04 \pm 14,97	0,062

Legende:

¹ < 3 COPD-bedingte Hospitalisierung im vorausgegangenen Kalenderjahr

² ≥ 3 COPD-bedingte Hospitalisierung im vorausgegangenen Kalenderjahr

³ Alter bei Studieneinschluss

⁴ Anzahl der Zigaretten pro Tag multipliziert mit Raucherjahren

Tabelle 11: Demographische Basisdaten der COPD- und Kontrollkohorte für TLR9 SNP T-1237C (Darstellung der stetigen Variablen: Mittelwert \pm Standardabweichung, statistische Analyse der Daten mittels t-Test für unabhängige Stichproben (p -Wert $< 0,05$); Darstellung der diskreten Variablen: Absolutwert (Prozentsatz), statistische Analyse der Daten mittels χ^2 -Test nach Pearson (p -Wert $< 0,05$))

	COPD (gesamt)	Kontrolle	p-Wert COPD (gesamt) vs. Kontrolle	COPD¹ (stabil)	COPD² (instabil)	p-Wert stabil vs. instabil
Gesamtzahl	175	149		72	103	
Geschlecht	w: 60 34 % m: 115 66 %	w: 76 51 % m: 73 49 %	0,002	w: 27 38 % m: 45 62 %	w: 33 32 % m: 70 68 %	0,454
Alter³ \pm SD	63,74 \pm 10,73	56,28 \pm 13,26	0,000	62,99 \pm 11,71	64,26 \pm 10,01	0,440
Packyears⁴ (\pm SD)	33,89 \pm 26,08	4,07 \pm 9,13	0,000	32,49 \pm 25,52	34,9 \pm 26,56	0,551
Raucher %	73 41,7 %	50 33,6 %	0,000	32 44,4 %	41 39,8 %	0,225
Nicht-Raucher %	18 10,3 %	60 40,3 %		4 5,6 %	14 13,6 %	
Ex-Raucher %	84 48,0 %	39 26,2 %		36 50,0 %	48 46,6 %	
FEV₁ (% des Sollwertes) (\pm SD)	51,97 \pm 20,83	77,87 \pm 20,44	0,000	58,54 \pm 19,00	47,34 \pm 20,91	0,001
FEV₁/FVC (\pm SD)	59,31 \pm 15,92	97,76 \pm 26,49	0,000	62,21 \pm 15,32	57,21 \pm 16,10	0,053

Legende:

¹ < 3 COPD-bedingte Hospitalisierung im vorausgegangenen Kalenderjahr

² ≥ 3 COPD-bedingte Hospitalisierung im vorausgegangenen Kalenderjahr

³ Alter bei Studieneinschluss

⁴ Anzahl der Zigaretten pro Tag multipliziert mit Raucherjahren

Tabelle 12: Demographische Basisdaten der Sarkoidose- und Kontrollkohorte für TLR9 SNP T-1486C (Darstellung der stetigen Variablen: Mittelwert \pm Standardabweichung, statistische Analyse der Daten mittels t-Test für unabhängige Stichproben (p -Wert $< 0,05$); Darstellung der diskreten Variablen: Absolutwert (Prozentsatz), statistische Analyse der Daten mittels χ^2 -Test nach Pearson (p -Wert $< 0,05$))

	Sarkoidose (gesamt)	Kontrolle	p-Wert Sarkoidose (gesamt) vs. Kontrolle	Sarkoidose (akut)	Sarkoidose (chronisch)	p-Wert akut vs. chronisch
Gesamtzahl	165	215		31	134	
Geschlecht	w: 91 55 % m: 74 45 %	w: 117 54 % m: 98 46 %	0,887	w: 17 54,8 % m: 14 45,2 %	w: 74 55,2 % m: 60 44,8%	0,969
Alter¹ \pm SD	50,93 \pm 12,55	48,53 \pm 16,52	0,109	42,45 \pm 10,51	52,89 \pm 12,19	0,000

¹ Alter bei Studieneinschluss

Tabelle 13: Demographische Basisdaten der Sarkoidose- und Kontrollkohorte für TLR9 SNP T-1237C (Darstellung der stetigen Variablen: Mittelwert \pm Standardabweichung, statistische Analyse der Daten mittels t-Test für unabhängige Stichproben (p -Wert $< 0,05$); Darstellung der diskreten Variablen: Absolutwert (Prozentsatz), statistische Analyse der Daten mittels χ^2 -Test nach Pearson (p -Wert $< 0,05$))

	Sarkoidose (gesamt)	Kontrolle	p-Werte Sarkoidose (gesamt) vs. Kontrolle	Sarkoidose (akut)	Sarkoidose (chronisch)	p-Wert akut vs. chronisch
Gesamtzahl	166	233		32	134	
Geschlecht	w: 92 55 % m: 74 45 %	w: 122 52 % m: 111 48 %	0,546	w: 18 56 % m: 14 44%	w: 74 55 % m: 60 45 %	0,916
Alter¹ \pm SD	50,65 \pm 12,62	48,61 \pm 16,52	0,163	42,81 \pm 10,41	52,52 \pm 12,42	0,000

¹ Alter bei Studieneinschluss

4.2.2 Verteilung von Genotypen und Allelfrequenzen/Allelprävalenzen

Jeder Proband wurde an den polymorphen Genorten genotypisiert. Die Häufigkeit und die Verteilung der Genotypen, der Allelfrequenzen und des C-Trägertyps (TC- und CC-Genotyps) für jedes Kollektiv wurde mit Hilfe der SPSS-Software errechnet und die Verteilungsunterschiede mittels χ^2 -Test nach Pearson auf statistische Signifikanz hin untersucht.

TLR9 SNP T-1486C bei COPD

Eine Übersicht über die Ergebnisse der Genotypverteilungen, der Mutationsallelfrequenzen und -prävalenzen im Bereich des TLR9-Polymorphismus T-1486C sowie die statistische Auswertung geben Tabellen 14 und 15. Eine grafische Darstellung der Genotypverteilung der betrachteten Kollektive zeigt Abbildung 8. Das COPD-Kollektiv wurde sowohl in seiner Gesamtheit als auch differenziert nach Verlaufsformen (stabil und instabil) dem Kontrollkollektiv gegenübergestellt. Zur Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Genotypverteilung wurden die betrachteten Kollektive nach den Ausprägungen „weiblich“ und „männlich“ des Merkmals Geschlecht unterteilt.

Tabelle 14: Genotypverteilung am Genort des TLR9-Polymorphismus T-1486C, Fallzahl (N), w (weiblich), m (männlich), statistische Analyse der Daten mittels χ^2 -Test nach Pearson (**p-Wert < 0,05**)

TLR9 T-1486C		TT		TC		CC		Σ	p-Wert
		N	(%)	N	(%)	N	(%)		
COPD (gesamt)	Σ	46	26,4	102	58,6	26	14,9	174	0,009
	w	11	18	39	63,9	11	18	61	0,013
	m	35	31	63	55,8	15	13,3	113	0,214
COPD (stabil)	Σ	20	27,4	44	60,3	9	12,3	73	0,037
	w	5	17,9	19	67,9	4	14,3	28	0,048
	m	15	33,3	25	55,6	5	11,1	45	0,347
COPD (instabil)	Σ	26	25,7	58	57,4	17	16,8	101	0,042
	w	6	18,2	20	60,6	7	21,2	33	0,085
	m	20	29,4	38	55,9	10	14,7	68	0,291
Kontrolle	Σ	66	38,8	72	42,4	32	18,8	170	
	w	36	38,7	39	41,9	18	19,4	93	
	m	30	39	33	42,9	14	18,2	77	

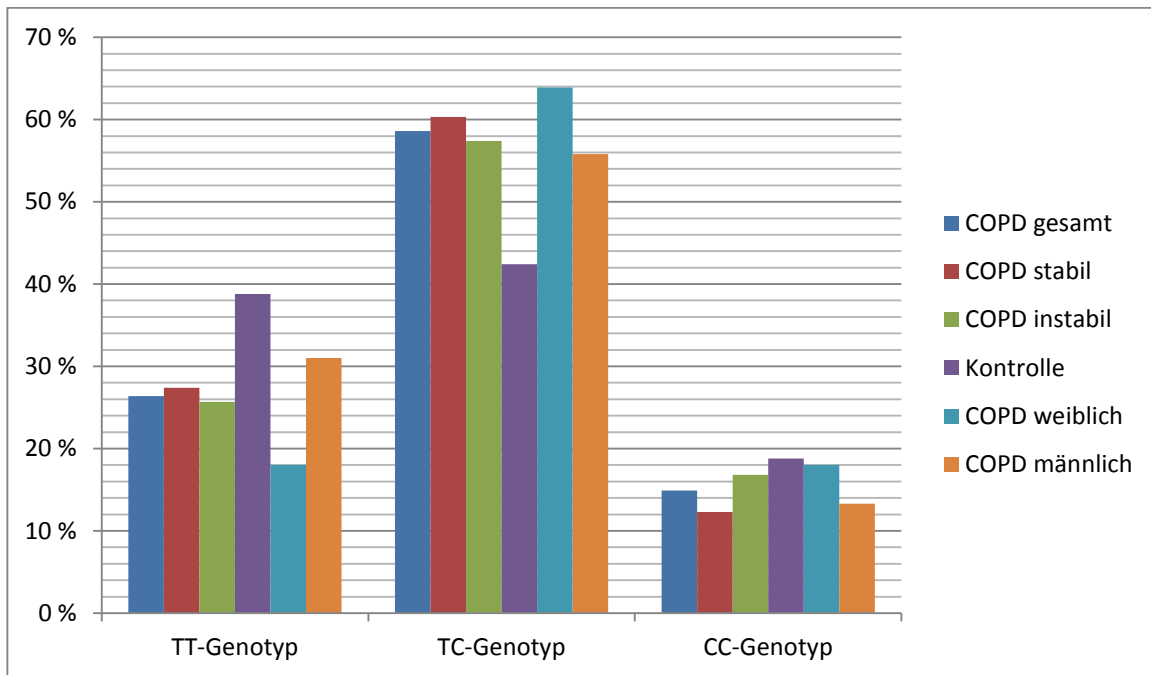


Abb. 8: Grafische Darstellung der Genotypverteilung am Genort des TLR9-Polymorphismus T-1486C für COPD

Tabelle 15: TLR9-Polymorphismus T-1486C: C-Allelfrequenz, C-Allelprävalenz, p-Werte (**p-Wert < 0,05**), Fallzahl (N), w (weiblich), m (männlich)

TLR9 SNP T-1486C		C-Allelfrequenz		p-Wert	C-Allelprävalenz		p-Wert
		N	(%)		N	(%)	
COPD (gesamt)	Σ	154/348	44,3	0,259	128/174	73,6	0,014
	w	61/122	50	0,094	50/61	82,1	0,006
	m	93/226	41,2	0,764	78/113	69	0,255
COPD (stabil)	Σ	62/146	42,5	0,612	53/73	72,6	0,088
	w	27/56	48,2	0,294	23/28	82,1	0,044
	m	35/90	38,9	0,911	30/45	66,7	0,554
COPD (instabil)	Σ	92/202	45,5	0,206	75/101	74,3	0,028
	w	34/66	51,4	0,115	27/33	81,8	0,032
	m	58/136	42,6	0,6	48/68	70,6	0,227
Kontrolle	Σ	136/340	40		104/170	61,2	
	w	75/186	40,3		57/93	61,3	
	m	61/154	39,6		47/77	61	

Unter Anwendung des χ^2 -Tests nach Pearson zeigen sich beim Vergleich der einzelnen COPD-Kollektive (gesamt, stabil und instabil) mit dem Kontrollkollektiv statistisch signifikante Unterschiede in der Verteilung der Genotypen (p -Wert = 0,009, = 0,048 und = 0,042). Es findet sich im COPD-Gesamtkollektiv verglichen mit dem Kontrollkollektiv eine signifikant höhere C-Allelprävalenz (p -Wert = 0,014), die ein Ausdruck des überwiegenden Vorkommens des heterozygoten Genotyps im erkrankten Kollektiv ist. Während sich die COPD-Kranken von den Gesunden in der Anzahl der homozygoten C-Allelträger nur geringfügig unterscheiden (14,9 % vs. 18,8 %), ist der Unterschied bezüglich des heterozygoten Genotyps (58,6 % vs. 42,4 %) und des Wildtyps (26,4 % vs. 38,8 %) stark ausgeprägt (s. Abb. 8).

Zwischen den beiden Verlaufsformen der COPD findet sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung (p -Wert = 0,713). Patienten mit instabiler Verlaufsform der COPD haben eine statistisch signifikant höhere C-Allelprävalenz (p -Wert = 0,028) verglichen mit dem Normalkollektiv.

Zur Identifizierung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Genotypverteilung wurden die betrachteten Kollektive dem Merkmal Geschlecht nach differenziert. Zunächst wurde das Normalkollektiv nach Männern und Frauen aufgeteilt und die Genotypverteilung zwischen den Geschlechtern im Normalkollektiv untersucht, um geschlechtsspezifische Verteilungsunterschiede bereits bei Gesunden zu erkennen. Mit einem p -Wert von 0,980 besteht ein nahezu identisches Genotypverteilungsmuster. Das Gleiche erfolgte auch am COPD-Kollektiv. Hier zeigt sich zwar bei einem p -Wert von 0,168 kein signifikanter, geschlechtsspezifischer Verteilungsunterschied des Genotyps, jedoch haben erkrankte Frauen eine um 11,1 % höhere C-Allelprävalenz (82,1 % vs. 69 %; p -Wert von 0,065) als erkrankte Männern.

Vergleicht man COPD-Frauen mit gesunden Frauen, so sind 64 % der kranken Frauen und nur 42 % der gesunden Frauen Trägerinnen des heterozygoten Genotyps, während der Wildtyp bei gesunden Frauen mehr als doppelt so häufig vorkommt (38,7 % vs. 18 %). Die homozygote Mutante ist bei den COPD-Patientinnen (18 %) und bei gesunden Frauen (19,4 %) annähernd gleich häufig vorhanden. Hier zeigt sich mit einem p -Wert von 0,013 ein statistisch signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung. Die C-Allelfrequenz (50 % vs. 40,3 %) und die

C-Allelprävalenz (82,1 % vs. 61,3 %) im weiblichen COPD-Kollektiv liegen deutlich über denen der gesunden Frauen. Ein statistisch signifikanter Unterschied (p -Wert = 0,006) ergibt sich jedoch nur für die Mutationsallelprävalenz (s. Tabelle 15). Bei Frauen mit einer stabilen COPD kommt der heterozygote Typ mit 67 % am häufigsten vor. Im Vergleich zum weiblichen Normalkollektiv findet sich auch hier ein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung (p -Wert = 0,048). Im Gegensatz zur C-Allelfrequenz ist die C-Allelprävalenz (p -Wert = 0,044) bei COPD-Frauen mit stabiler Verlaufsform signifikant häufiger als bei gesunden Frauen. Der Unterschied in der Genotypverteilung zwischen Frauen mit instabiler Verlaufsform und der weiblichen Kontrollgruppen entgeht mit einem p -Wert von 0,085 nur knapp einer statistischen Signifikanz. Es zeigt sich ein deutliches Überwiegen des C-Mutationsallels auf der Seite der instabilen COPD-Frauen mit einer Allelfrequenz von 51,4 % gegenüber einer Allelfrequenz von 40,3 % bei gesunden Frauen (s. Tabelle 15). Der Unterschied in der C-Allelfrequenz ist mit einem p -Wert von 0,115 statistisch nicht signifikant. Dafür zeigt sich auch bei Frauen mit der instabilen Verlaufsform der COPD ein statistisch signifikanter Unterschied in der C-Allelprävalenz (p -Wert = 0,032) gegenüber gesunden Frauen.

Das männliche COPD-Kollektiv weist keinen signifikanten Unterschied zum männlichen Normalkollektiv auf, auch nach einer Subgruppierung in die stabile und instabile Verlaufsform. Der Vergleich der Genotypverteilung (p -Wert = 0,298) und der C-Allelprävalenz (p -Wert = 0,137) zwischen tabakrauchexponierten (Raucher/Ex-Raucher) COPD-Patienten und tabakrauchexponierten gesunden Probanden zeigt keine statistische Signifikanz. Ein statistisch signifikantes Ergebnis mit einem p -Wert von 0,02 zeigt sich beim Vergleich der Genotypverteilung der Nichtraucher in beiden Kollektiven. 72 % (13/18) der Nichtraucher der COPD-Gruppe im Vergleich zu 36,3 % (29/80) der Nichtraucher des Kontrollkollektivs sind heterozygot, während 11,1 % (2/18) der Erkrankten und 22,5 % (18/80) der Gesunden den CC-Genotyp tragen.

TLR9 SNP T-1237C bei COPD

Bei der Gegenüberstellung des COPD-Gesamtkollektivs und der gesunden Kontrollgruppe zeigt sich in der Genotypverteilung des TLR9-Polymorphismus T-1237C kein statistisch signifikanter Unterschied (s. Tabelle 16). Weder die C-Allelfrequenz (15,4 % vs. 13,1 %) noch die

C-Allelprävalenz (28,6 % vs. 24,8 %) sind signifikant höher als im Normalkollektiv (s. Tabelle 17). Die Abbildung 9 zeigt eine ähnliche Genotypverteilung in allen Kohorten. Auch die Untersuchungen auf Unterschiede in der Genotypverteilung im Hinblick auf die Tabakrauchexposition zeigen keine statistischen Zusammenhänge.

Tabelle 16: Genotypverteilung am Genort des TLR9-Polymorphismus T-1237C, Fallzahl (N), w (weiblich), m (männlich), statistische Analyse der Daten mittels χ^2 -Test nach Pearson (**p-Wert < 0,05**)

TLR9 SNP T-1237C		TT		TC		CC		Σ	p-Wert
		N	(%)	N	(%)	N	(%)		
COPD (gesamt)	Σ	125	71,4	46	26,3	4	2,3	175	0,673
	w	45	75,0	15	25,0	0	0,0	60	0,656
	m	80	69,6	31	27,0	4	3,5	115	0,379
COPD (stabil)	Σ	50	69,4	21	29,2	1	1,4	72	0,659
	w	18	66,7	9	33,3	0	0,0	27	0,627
	m	32	71,1	12	26,7	1	2,2	45	0,686
COPD (instabil)	Σ	75	72,8	25	24,3	3	2,9	103	0,664
	w	27	81,8	6	18,2	0	0,0	33	0,510
	m	48	68,6	19	27,1	3	4,3	70	0,336
Kontrolle	Σ	112	75,2	35	23,5	2	1,3	149	
	w	55	72,4	20	26,3	1	1,3	76	
	m	57	78,1	15	20,5	1	1,4	73	

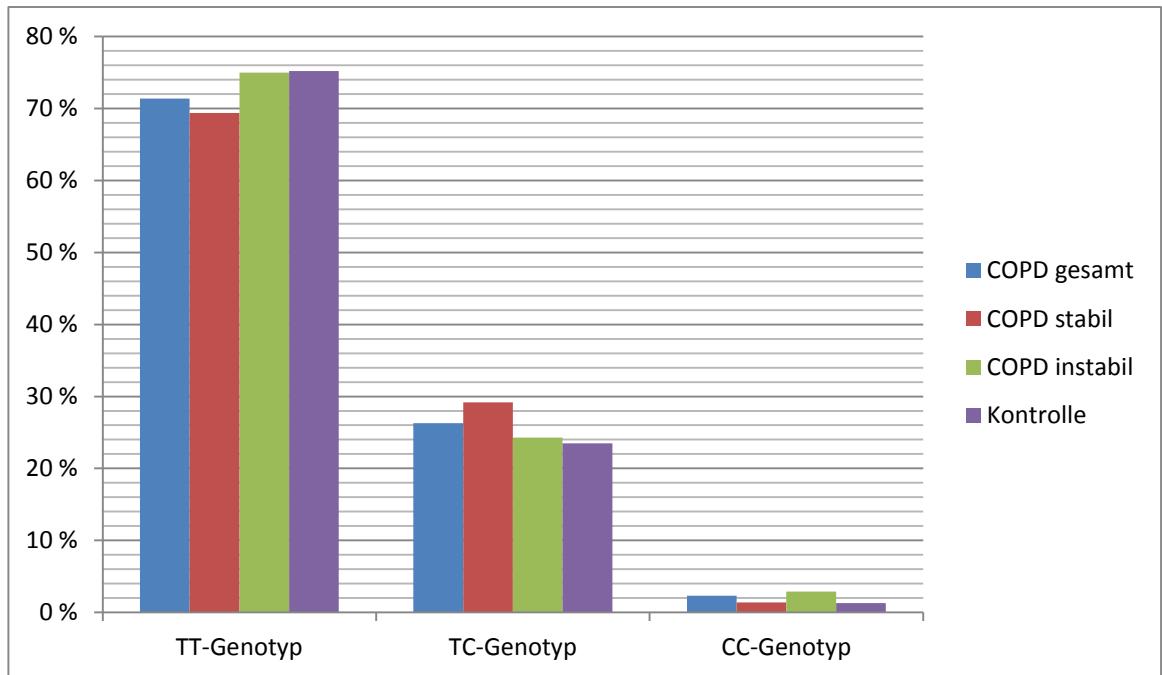


Abb. 9: Grafische Darstellung der Genotypverteilung am Genort des TLR9-Polymorphismus T-1237C für COPD

Tabelle 17: TLR9-Polymorphismus T-1237C: C-Allelfrequenz, C-Allelprävalenz, p-Werte ($p\text{-Wert} < 0,05$), Fallzahl (N), w (weiblich), m (männlich)

TLR9 SNP T-1237C		C-Allelfrequenz		p-Wert	C-Allelprävalenz		p-Wert
		N	(%)		N	(%)	
COPD (gesamt)	Σ	54/350	15,4	0,397	50/175	28,6	0,449
	w	15/120	12,5	0,637	15/60	25	0,73
	m	39/230	17	0,158	35/115	30,4	0,201
COPD (stabil)	Σ	23/144	16	0,413	22/72	30,5	0,367
	w	9/54	16,7	0,699	9/27	33,3	0,575
	m	14/90	15,6	0,388	13/45	28,9	0,393
COPD (instabil)	Σ	31/206	15	0,531	28/103	27,2	0,675
	w	6/66	9,1	0,275	6/33	18,2	0,294
	m	25/140	17,9	0,138	22/70	31,4	0,198
Kontrolle	Σ	39/298	13,1		37/149	24,8	
	w	22/152	14,5		21/76	27,6	
	m	17/146	11,6		16/73	21,9	

TLR9 SNP T-1486C bei Sarkoidose

Einen Überblick über die Ergebnisse der Genotypverteilungen, der Mutationsallelfrequenzen und -prävalenzen im Bereich des TLR9-Polymorphismus T-1486C sowie die statistische Auswertung bieten Tabellen 18 und 19. Eine grafische Darstellung der Genotypverteilung der betrachteten Kollektive zeigt Abbildung 10. Das Sarkoidose-Kollektiv wurde sowohl in seiner Gesamtheit als auch differenziert nach den Verlaufsformen (akut und chronisch) dem Kontrollkollektiv gegenübergestellt. Zur Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Genotypverteilung wurden die betrachteten Kollektive nach den Ausprägungen „weiblich“ und „männlich“ des Merkmals Geschlecht unterteilt.

Tabelle 18: Genotypverteilung am Genort des TLR9-Polymorphismus T-1486C, Fallzahl (N), w (weiblich), m (männlich), statistische Analyse der Daten mittels χ^2 -Test nach Pearson (p-Wert < 0,05)

TLR9 SNP T-1486C		TT		TC		CC		Σ	p-Wert
		N	(%)	N	(%)	N	(%)		
Sarkoidose (gesamt)	Σ	57	34,5	88	53,3	20	12,0	165	0,057
	w	27	29,7	56	61,5	8	8,8	91	0,008
	m	30	40,5	32,2	43,2	12	16,5	74	0,981
Sarkoidose (akut)	Σ	9	32,4	17	52,9	5	14,7	31	0,382
	w	4	23,5	11	64,7	2	11,8	17	0,185
	m	5	35,7	6	42,9	3	21,4	14	0,920
Sarkoidose (chronisch)	Σ	48	35,8	71	53,0	15	11,2	134	0,068
	w	23	31,1	45	60,8	6	8,1	74	0,014
	m	25	41,7	26	43,3	9	15,0	60	0,924
Kontrolle	Σ	85	39,5	90	41,9	40	18,6	215	
	w	46	39,3	48	41,0	23	19,7	117	
	m	39	39,8	42	42,9	17	17,3	98	

Es lassen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Genotypverteilung beim Vergleich der einzelnen Sarkoidose-Kollektive (gesamt, akut und chronisch) mit dem Kontrollkollektiv feststellen (p-Wert = 0,057, = 0,382 und = 0,068). Die C-Allelfrequenzen und -prävalenzen der Sarkoidosekollektive und -subkollektive zeigen ebenfalls keine statistisch

signifikanten Unterschiede verglichen mit den C-Allelfrequenzen und -prävalenzen des Kontrollkollektivs.

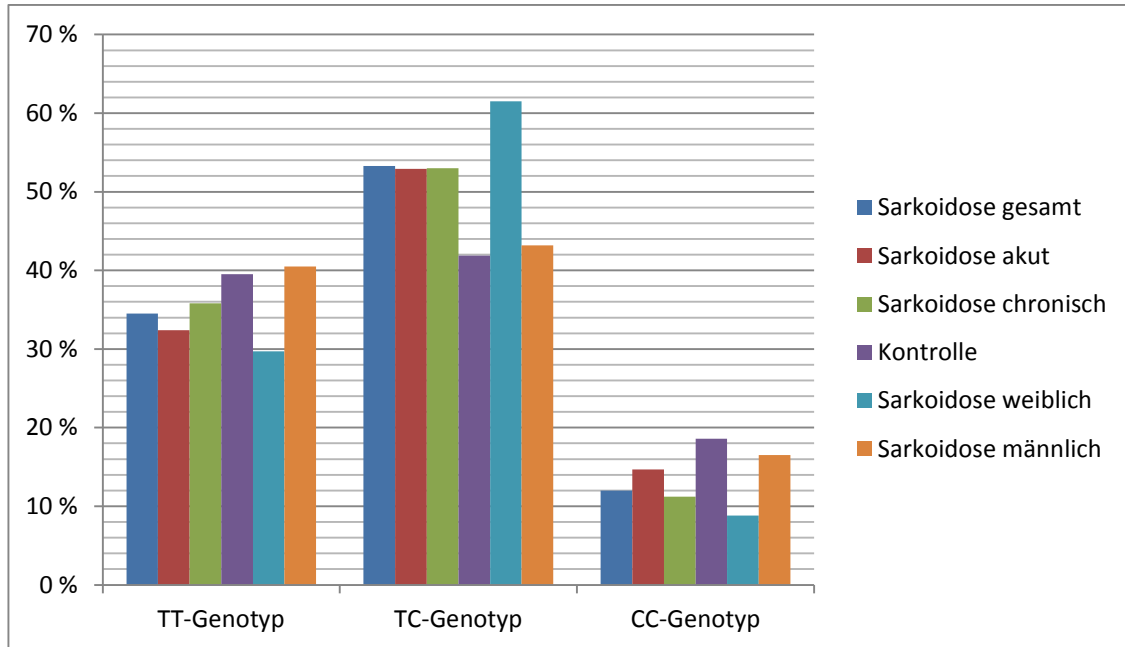


Abb. 10: Grafische Darstellung der Genotypverteilung am Genort des TLR9-Polymorphismus T-1486C für Sarkoidose

Tabelle 19: TLR9-Polymorphismus T-1486C: C-Allelfrequenz, C-Allelprävalenz, p-Werte ($p\text{-Wert} < 0,05$), Fallzahl (N), w (weiblich), m (männlich)

TLR9 SNP T-1486C		C-Allelfrequenz		p-Wert	C-Allelprävalenz		p-Wert
		N	(%)		N	(%)	
Sarkoidose (gesamt)	Σ	128/330	38,8	0,834	108/165	65	0,319
	w	72/182	39,6	0,900	64/91	70,3	0,148
	m	56/148	37,8	0,859	44/74	59,5	0,921
Sarkoidose (akut)	Σ	27/62	43,5	0,547	22/31	71,0	0,261
	w	15/34	44,1	0,662	13/17	76,5	0,209
	m	12/28	42,9	0,679	9/14	64,3	0,770
Sarkoidose (chronisch)	Σ	101/268	37,7	0,626	86/134	64,2	0,487
	w	57/148	38,5	0,747	51/74	68,9	0,248
	m	44/120	36,7	0,708	35/60	58,3	0,816
Kontrolle	Σ	170/430	39,5		130/215	60,5	
	w	94/234	40,2		71/117	60,7	
	m	76/196	38,8		59/98	60,2	

Zur Identifizierung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Genotypverteilung wurden die betrachteten Kollektive dem Merkmal Geschlecht nach differenziert. Zunächst wurde das Normalkollektiv nach Männern und Frauen aufgeteilt und die Genotypverteilung zwischen den Geschlechtern im Normalkollektiv untersucht, um geschlechtsspezifische Verteilungsunterschiede bereits bei Gesunden zu erkennen. Mit einem p-Wert von 0,905 besteht ein nahezu identisches Genotypverteilungsmuster.

Eine geschlechtsspezifische Betrachtung zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied (p-Wert = 0,008) in der Genotypverteilung zwischen den Frauen des Sarkoidose-Gesamtkollektivs und den Frauen der Kontrollgruppe. Im weiblichen Sarkoidose-Gesamtkollektiv tragen 61,5 % (56/91) den heterozygoten Genotyp, während im weiblichen Kontrollkollektiv nur 41,9 % (48/117) heterozygote C-Allelträgerinnen sind. Der homozygote CC-Typ kommt bei gesunden Frauen im Vergleich zu kranken Frauen (19,7 % vs. 8,8 %) häufiger vor. Die Genotypverteilung im männlichen Sarkoidosekollektiv unterscheidet sich nicht von der Genotypverteilung im Normalkollektiv (p-Wert = 0,981).

TLR9 SNP T-1237C bei Sarkoidose

Eine Übersicht über die Ergebnisse der Genotypverteilung, der Mutationsallelfrequenzen und -prävalenzen im Bereich des TLR9-Polymorphismus T-1237C sowie die statistische Auswertung geben Tabellen 20 und 21. Eine grafische Darstellung der Genotypverteilung der betrachteten Kollektive zeigt Abbildung 11. Das Sarkoidose-Kollektiv wurde sowohl in seiner Gesamtheit als auch differenziert nach den Verlaufsformen (akut und chronisch) dem Kontrollkollektiv gegenübergestellt. Zur Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Genotypverteilung wurden die betrachteten Kollektive nach den Ausprägungen „weiblich“ und „männlich“ des Merkmals Geschlecht unterteilt.

Bei der Gegenüberstellung des Sarkoidose-Gesamtkollektivs und des Normalkollektivs fällt auf, dass der Unterschied in der Genotypverteilung mit einem p-Wert von 0,056 nur knapp einen statistisch signifikanten Zusammenhang verfehlt.

Nach Verlaufsformen differenziert, zeigt das Sarkoidosekollektiv mit der chronischen Verlaufsform einen statistisch signifikanten Unterschied in der Genotypverteilung im Vergleich zum Normalkollektiv (p-Wert von 0,023). Die Häufigkeit des heterozygoten Genotyps liegt mit

34,3 % deutlich über der des Normalkollektivs (22,3 %). Der homozygote Wildtyp ist hingegen bei dem Kontrollkollektiv frequenter. Die seltenen homozygoten C-Allelträger sind ebenfalls häufiger unter den gesunden Probanden zu finden (2,6 % vs. 0,7 %). Beim Sarkoidosekollektiv mit der chronischen Sarkoidose zeigt sich im Vergleich zur Kontrollkohorte eine statistisch signifikant höhere Mutationsallelprävalenz (p -Wert = 0,038).

Im Weiteren wurden die Kollektive in weibliche und männliche Subgruppen unterteilt. Ein geschlechtsabhängiger Unterschied der Genotypverteilung innerhalb des Kontrollkollektivs kann bei einem p -Wert von 0,632 ausgeschlossen werden.

Tabelle 20: Genotypverteilung am Genort des TLR9-Polymorphismus T-1237C, Fallzahl (N), w (weiblich), m (männlich), statistische Analyse der Daten mittels χ^2 -Test nach Pearson (p -Wert < 0,05)

TLR9 SNP T-1237C		TT		TC		CC		Σ N	p-Wert
		N	(%)	N	(%)	N	(%)		
Sarkoidose (gesamt)	Σ	110	66,3	54	32,5	2	1,2	166	0,056
	w	62	67,4	28	30,4	2	2,2	92	0,358
	m	48	64,9	26	35,1	0	0	74	0,057
Sarkoidose (akut)	Σ	23	71,9	8	25,0	1	3,1	32	0,923
	w	11	61,1	6	33,3	1	5,6	18	0,245
	m	12	85,7	2	14,4	0	0,0	14	0,569
Sarkoidose (chronisch)	Σ	87	64,9	46	34,3	1	0,7	134	0,026
	w	51	68,9	22	29,7	1	1,4	74	0,491
	m	36	60,0	24	40,0	0	0,0	60	0,025
Kontrolle	Σ	175	75,1	52	22,3	6	2,6	233	
	w	93	76,2	27	22,1	2	1,6	122	
	m	82	73,9	25	22,5	4	3,6	111	

Vierzig Prozent (24/60) der Männer mit chronischer Form der Sarkoidose sind Träger eines heterozygoten Genotyps, während es beim männlichen Normalkollektiv nur 22,5 % sind. Der homozygote CC-Genotyp kommt bei den Männern mit chronischer Verlaufsform der Sarkoidose nicht vor. Bei gesunden männlichen Probanden sind es 4 von 111 Probanden, die das Mutationsallel in einer homozygoten Form besitzen. Der Unterschied in der Genotypverteilung zwischen diesen beiden Subkollektiven ist mit einem p -Wert von 0,025

statistisch signifikant. Die C-Allelprävalenz von 40 % bei chronisch erkrankten Männern ist verglichen mit der C-Allelprävalenz bei gesunden Männer, die 26 % beträgt, deutlich höher und entgeht mit einem p-Wert von 0,061 nur knapp einem statistisch signifikanten Unterschied.

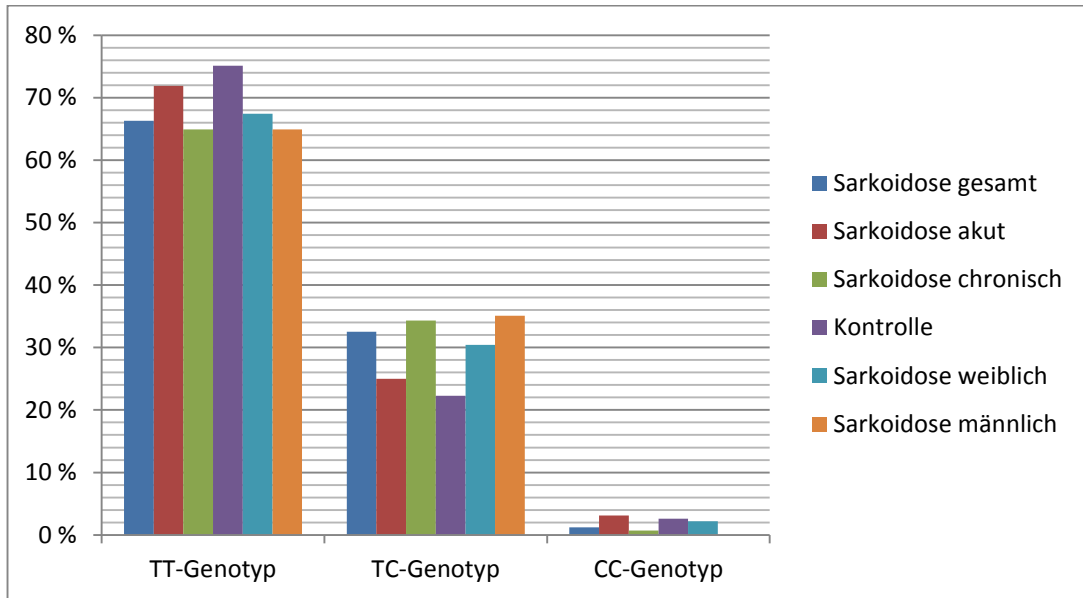


Abb. 11: Grafische Darstellung der Genotypverteilung am Genort des TLR9-Polymorphismus T-1237C für Sarkoidose

Tabelle 21: TLR9-Polymorphismus T-1237C: C-Allelfrequenz, C-Allelprävalenz, p-Werte (**p-Wert < 0,05**), Fallzahl (N), w (weiblich), m (männlich)

TLR9 SNP T-1237C		C-Allelfrequenz		p-Wert	C-Allelprävalenz		p-Wert
		N	(%)		N	(%)	
Sarkoidose (gesamt)	Σ	58/332	17,5	0,148	56/166	33,7	0,054
	w	32/184	17,4	0,176	30/92	32,6	0,167
	m	26/148	17,6	0,487	26/74	35,1	0,189
Sarkoidose (akut)	Σ	10/64	15,6	0,682	9/32	28,1	0,693
	w	8/36	22,2	0,124	7/18	38,9	0,171
	m	2/28	7,1	0,267	2/14	14,3	0,334
Sarkoidose (chronisch)	Σ	48/268	18,1	0,110	47/134	35,1	0,038
	w	24/148	16,2	0,332	23/74	31,1	0,261
	m	24/120	20,0	0,224	24/60	40,0	0,061
Kontrolle	Σ	64/466	13,7		58/233	24,9	
	w	31/244	12,7		29/122	23,8	
	m	33/222	14,9		29/111	26,1	

5 Diskussion

Basierend auf der Überlegung, dass der genetische Hintergrund der COPD und der Sarkoidose bislang noch ungenügend verstanden ist, wurden in der vorliegenden genetischen Assoziationsstudie zwei Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (T-1237C/T-1486C), die sich in der potentiellen Promotorregion des TLR9-Gens befinden und in potentiellen Zusammenhang mit verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen stehen, auf ihre Bedeutung als mögliche, für COPD und Sarkoidose prädisponierende Faktoren durchleuchtet.

Für beide Polymorphismen wurde eine funktionelle Relevanz konstatiert (Hamprecht, 2005). Novak et al. (2007), die eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der intrinsischen Form des Atopischen Ekzems und dem T-Allel des TLR9 SNPs T-1237C fanden, konnten mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assays eine signifikant höhere Promotoraktivität des TT-Genotyps dieses SNPs nachweisen. Zum ähnlichen Ergebnis kam auch eine andere Forschergruppe, die das C-Allel des TLR9 -1237T/C-Polymorphismus als einen Risikofaktor für die Entwicklung einer *Helicobacter pylorus*-induzierten gastralen Präkanzerose identifizierte (Ng et al., 2010). Unter nicht infektiösen, basalen Bedingungen haben auch diese Forscher demonstrieren können, dass das T-Allel eine tendenziell aber statistisch nicht signifikant stärkere Transkription des TLR9 induziert. Andererseits zeigten sie, dass das C-Allel an der Position -1237 eine höhere Bindungsaffinität des Transkriptionsfaktors NF- κ B an die Promotorregion hervorruft und unter Konditionen, unter denen eine starke Aktivierung des NF- κ B vorherrscht, wie z.B. in der COPD (Isajevs et al., 2011), eine signifikant höhere Transkriptionsaktivität bewirkt (Ng et al., 2010). Tao et al. (2007) konnten eine signifikant geringere TLR9-Promotoraktivität des Haplotyps mit dem C-Mutationsallel auf Position -1486 und G-Mutationsallel auf Position +1174 im Vergleich zum Haplotypen mit T-Allel auf Position -1486 und A-Allel auf Position +1174 zeigen. In Übereinstimmung damit konnten auch Elmaagacli et al. (2009) eine statistisch nicht signifikante Herunterregulierung der TLR9-Expression des CC-Genotyps des TLR9 SNPs T-1486C mittels Reporter-Gen-Assays nachweisen. Eine Stimulation mit CpG-ODN führte jedoch zu einer signifikant stärkeren Hochregulierung der TLR9-Expression in Zellen mit der CC-Genvariante als in Zellen mit der TT-Genvariante des TLR9 SNPs T-1486C. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass das C-Allel sowohl an der Position -1237 als auch -1486 im Kontext einer

bakteriellen Entzündungsreaktion zu einer signifikant stärkeren Hochregulierung der TLR9-Expression führt.

5.1 COPD und TLR9 SNPs

Assoziationen des TLR9 -1237T/C-Polymorphismus mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale, dem Morbus Crohn, der allergischen bronchopulmonalen Aspergillose und der chronischen Niereninsuffizienz sprechen für eine Beteiligung dieses SNPs an der Modulation chronischer Entzündungsprozesse (Carvalho et al. 2008; Lazerus et al., 2007; Lu et al., 2011; Török et al., 2006) .

Einen Zusammenhang zwischen dem TLR9 SNP T-1237C und der COPD haben bisher nur zwei Studien untersucht. Lazerus et al. (2003) konnten keine Assoziation zwischen dem TLR9 SNP T-1237C und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung der COPD feststellen. Ihre Limitation findet diese Studie in der geringen Fallzahl, die nur 70 COPD-Patienten umfasst. Sethi et al. (2011) konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit der TLR9 SNPs T-1237C und T-1486C zwischen rauchenden bzw. ex-rauchenden COPD-Patienten und gesunden Nichtrauchern finden. Auch diese Ergebnisse sind durch die Gegenüberstellung von Gruppen mit stark voneinander abweichenden Probandenzahlen (86 Raucher mit COPD bzw. 74 Ex-Raucher mit COPD vs. 20 gesunde Raucher) limitiert.

Trotz deutlich höherer Fallzahl (175 COPD-Patienten) und ähnlicher Kohortengrößen (175 COPD-Patienten vs. 149 gesunde Probanden) konnte auch in der vorliegenden Studie kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem TLR9 -1237T/C-Polymorphismus und der COPD auch in der differenzierten Betrachtung des Verlaufs, des Geschlechts und der Rauchgewohnheiten gefunden werden. Die Genotypverteilung und die C-Allelfrequenz des TLR9 SNPs T-1237C unseres Kontrollkollektivs unterscheiden sich nicht von den Daten, die Lazerus et al. (2003) in ihrem Kontrollkollektiv beobachtet haben.

Die Assoziationen des C-Allels des TLR9 SNPs T-1237C mit Asthma bronchiale (Lazerus et al., 2007; Lachheb et al., 2008) und der allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (Carvalho et al. 2008) weisen zunächst auf eine die Th2-Antwort begünstigende Rolle dieses Allels hin. Im Widerspruch zu diesen Studien haben Novak et al. eine Assoziation des T-Allels an der Position -1237 und der intrinsischen Form des atopischen Ekzems gefunden. Ihr Nachweis einer

höheren Promotoraktivität des Wildtyps an der Position -1237 erhärtet jedoch den Standpunkt der vorher genannten Publikationen, wenn man die Ergebnisse der Studie von Dong et al. (2006) berücksichtigt. Diese Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) von Asthmapatienten im Vergleich zu COPD-Patienten und gesunden Kontrollpersonen eine statistisch signifikant schwächere Expression der TLR9-mRNA, die mit einem attenuierten Th1-Zytokinprofil korreliert, aufweisen. Daraus kann man ableiten, dass das C-Allel des TLR9 SNPs T-1237C, das im Vergleich zum Wildtypallel eine signifikant geringere Promotoraktivität hat (Novak et al., 2007), für eine schwächere Expression der TLR9-mRNA bei Asthmapatienten mitverantwortlich sein könnte. Des Weiteren konnten Dong et al. (2006) zeigen, dass eine Inkubation der PBMCs von Asthmapatienten mit CpG-ODN zu einer statistisch signifikanten Hochregulierung der TLR9-mRNA und folglich einer Wiederherstellung des Ungleichgewichts der Th1/Th2-Zytokine bei Asthmapatienten führt (Dong et al., 2006). Dies kann damit zusammenhängen, dass unter infektiösen Bedingungen sich die Verhältnisse ändern, indem das C-Allel an Position -1237 gegenüber dem Wildtypallel eine statistisch signifikant stärkere Transkriptionsaktivität entwickelt (Ng et al., 2010). Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass das C-Allel des TLR9 SNPs T-1237C in Abhängigkeit vom zellulären Mikromilieu sowohl eine Th2-Antwort als auch eine Th1-Antwort begünstigen kann. Eine Beteiligung des C-Allels des TLR9 SNPs T-1237C an der gesteigerten Th1-Antwort in der COPD kann anhand unserer Ergebnisse jedoch widerlegt werden.

Wie bereits im Kapitel 2.3.1 dargestellt, scheint der TLR9 -1486T/C-Polymorphismus den Verlauf infektiöser Erkrankungen wie der Plasmodieninfektion, der puerpuralen Streptokokkeninfektion und den Pilzinfektionen bei Kindern mit hämatologischen Malignomen zu beeinflussen (Davis et al., 2010; Lanciotti et al., 2008; Leoratti et al., 2008). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse unserer Studie, dass das C-Allel des TLR9 -1486T/C-Polymorphismus mit der Manifestation der COPD, insbesondere beim weiblichen Geschlecht, assoziiert ist. Gegen eine protektive Rolle des C-Allels spricht seine signifikant höhere Prävalenz im instabilen COPD-Kollektiv. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie konnten Sethi et al. (2011) keinen Zusammenhang dieses SNP mit der COPD nachweisen. Andere Studien, die die Rolle des TLR9 -1486T/C-Polymorphismus in der COPD untersucht haben, findet man in der Literatur nicht. Wie bereits in diesem Kapitel

erwähnt, ist die Studie von Sethi et al. (2011) durch einen starken Unterschied der Kohortengrößen und eine geringe Anzahl gesunder Probanden limitiert. Die in der Literatur angegebene C-Allelfrequenz des TLR9 -1486T/C-Polymorphismus in der kaukasischen Bevölkerung rangiert zwischen 39 und 46,6 % (Berghöfer et al., 2005; Hamann et al., 2006; Lazarus et al., 2003; Novak et al., 2007). In Übereinstimmung damit lag in der vorliegenden Studie die C-Allelfrequenz des Normalkollektivs bei 40,0 %.

Zwar konnten Sethi et al. (2011) im Gegensatz zu uns keine Assoziation zwischen den TLR9 SNPs und der Manifestation der COPD feststellen, es gelang ihnen jedoch zu zeigen, dass bei Ex-Rauchern mit COPD eine Assoziation zwischen der Expression des TLR9 SNPs (T-1237C) und einer verminderten IL-8-Antwort der mit respiratorischen Keimen stimulierten Alveolarmakrophagen besteht. Diese Beobachtung weist wie das Ergebnis der vorliegenden Studie auf einen Zusammenhang zwischen dem TLR9 und der COPD hin.

Betrachtet man die in die Pathogenese der COPD involvierten Zellpopulationen, so ist für jeden dieser Zelltypen die Expression eines funktionalen TLR9 beim Menschen nachgewiesen (s. Kapitel 2.2.2). Eine Stimulation des humanen respiratorischen Epithels mit bakterieller DNA führt TLR9/MyD88/NF- κ B-abhängig zu einer Freisetzung von IL-8 und IL-6 sowie dem antimikrobiellen Peptid humanes β -Defensin 2 (h β D2) und dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 (Greene et al., 2005; Mayer et al., 2007; Platz et al., 2004). Im Vergleich zu B-Zellen und pDCs exprimiert das gesunde respiratorische Epithel den TLR9 nur auf einem geringen Niveau, so dass es zur Stimulation der Immunantwort einer hohen bakteriellen Last bedarf, die man nur in schwer infizierten Atemwegen findet (Platz et al., 2004). Die DNA der meisten für die COPD-Exazerbationen verantwortlichen Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* und *Enterobacteriaceae* ist in der Lage den TLR9 zu stimulieren (Bhan et al., 2010; Greene et al., 2005; Jendholm et al., 2009; Magnusson et al., 2007; Mogensen et al., 2006). Anhand der aktuellen Datenlage könnte man schlussfolgern, dass das C-Allel des SNPs T-1486C im Kontext bakterieller Kolonisation der unteren Atemwege und der bakteriellen COPD-Exazerbation mit einer gesteigerten TLR9-Expression einhergeht und folglich die Entzündungsreaktion amplifiziert. Nadigel et al. (2011) haben die Expression des TLR9 im respiratorischen Epithel der COPD-Patienten untersucht und eine statistisch nicht signifikant höhere TLR9-Expression der COPD-Patienten

im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden. Dies korreliert mit Ergebnissen, die darauf hinweisen, dass die Expression von TLR9 in Atemwegsepithel nicht reguliert, sondern konstitutiv ist (Platz, 2005). Andererseits konnten Nadigel et al. (2011) demonstrieren, dass 90 % der CD8⁺-Zellen in COPD-Lungen und nur 20 % der CD8⁺-Zellen gesunder Probanden TLR4 und TLR9 exprimieren. Die Ergebnisse dieser Studie belegen die Relevanz einer erhöhten Expression des TLR9 in der Pathogenese der COPD und untermauern die Resultate der vorliegenden Studie.

Die häufigsten viralen Verursacher der COPD-Exazerbationen gehören zu der Gruppe der einzelsträngigen RNA (ssRNA)-Viren (Rhinovirus, Influenzavirus, Respiratorische Synzytialvirus (RSV) und Coronavirus), deren Detektion über die Toll-like Rezeptoren 7 und 8 erfolgt (Tukhvatulin et al., 2010). Da sowohl eine Assoziation zwischen dem TLR9 SNP T-1237C und der RSV-Infektion als auch zwischen dem TLR9 SNP T-1486C und der Nairovirus-Infektion gefunden wurde, kann man einen Einfluss des TLR9 auf den Verlauf der durch ssRNA-Viren verursachten Infektionen nicht ausschließen (Engin et al., 2010; Mailaparambil et al., 2008). Das Nairovirus, das zu den ssRNA-Viren gehört, verursacht das Krim-Kongo-Fieber. Engin et al. (2010) konnten zeigen, dass der TC- und der CC-Genotyp des TLR9 SNPs T-1486C signifikant häufiger bei Erkrankten als bei Gesunden vorkamen (p-Wert = 0,009). Darüber hinaus war der CC-Genotyp mit schweren Verläufen des Krim-Kongo-Fiebers assoziiert. Für einige virale (z.B. Rhinovirus, RSV) und auch bakterielle Erreger (z.B. *Haemophilus influenzae*) wird die Infektion des Atemwegsepithels durch die Bindung an das Adhäsionsmolekül ICAM-1 erleichtert (Behera et al., 2001; Chin et al., 2005; Papi und Johnston, 1999). Eine verstärkte Expression des ICAM-1 basierend auf einer Triggerung des überexprimierten TLR9 im Rahmen bakterieller Superinfektionen könnte einen Erklärungsansatz dafür bieten, wie TLR9-Genvarianten, trotz der Unfähigkeit das Genmaterial der verursachenden Erreger zu erkennen, Einfluss auf den Verlauf der Infektionen nehmen können. Des Weiteren sind z.B. krankheitsverursachende RSV-Stämme in der Lage die TLR9-vermittelte Produktion des Typ I Interferons in pDCs, das eine antivirale Th1-gerichtete Immunantwort induziert, zu unterdrücken, woraus ein Th1/Th2-Ungleichgewicht zugunsten der Th2-gerichteten Immunantwort und folglich die Ausbildung einer inadäquaten antiviralen Immunität resultiert, die nur einen schwachen Schutz gegen RSV-Reinfektionen bietet (Schlender et al., 2005). In diesem Kontext könnte jede,

insbesondere verstärkte Aktivierung des TLR9 zu unerwünschten proinflammatorischen Effekten führen.

Auch Zigarettenrauch hat einen reduzierenden Effekt auf die Freisetzung von IFN- α in TLR9-stimulierten pDCs, wobei dieser Effekt bei COPD-Patienten signifikant stärker ausfällt als bei gesunden Probanden (Van Pottelberge et al., 2010). Gleichzeitig setzt Zigarettenrauch in Neutrophilen TLR9-abhängig IL-8 frei und führt dadurch zu einer Akkumulation von Neutrophilen, die die pulmonale Entzündung aufrecht erhalten (Mortaz et al. 2010). Der immunmodulierende Einfluss des Zigarettenrauchs auf die aktivierte TLR9-Signalkaskade, den man bereits in Immunzellen gesunder Probanden findet, scheint bei COPD-Patienten stärker ausgeprägt zu sein und eine Chronifizierung der Inflammation zu begünstigen (Mortaz et al., 2010; Van Pottelberge et al., 2010). Wie im Kapitel 2.4.3 bereits angesprochen, gibt es Studien, die eine höhere Anfälligkeit des weiblichen Geschlechts für die schädliche Wirkung des Tabakrauchs postulieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass es sich bei dem C-Allel des TLR9 SNP T-1486C, für das wir eine Assoziation mit der Manifestation der COPD insbesondere bei Frauen beobachtet haben, um einen prädisponierenden, genetischen Faktor für diese Anfälligkeit des weiblichen Geschlechts handeln könnte.

In der Literatur gibt es viele Anhaltspunkte dafür, dass die COPD eine autoimmune Komponente besitzt (Agusti et al., 2003; Bonarius et al., 2011; Feghali-Bostwick et al., 2008). Mehrere Studien haben Assoziationen zwischen Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, der Multiplen Sklerose, dem Morbus Basedow sowie dem Lupus erythematodes (SLE) und Polymorphismen im TLR9 nachweisen können (Etem et al., 2010; Ji et al., 2010; Liao et al., 2010; Tao et al., 2007). Tao et al. (2007), die eine Assoziation zwischen dem G-Allel auf Position +1174 im TLR9-Gen und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung des systemischen Lupus erythematodes (SLE) demonstrierten, berichteten zudem über eine Tendenz zur C-Allelträgerschaft auf der Position -1486 im TLR9-Gen im SLE-Kollektiv. Der in der vorliegenden Studie erbrachte Nachweis einer Assoziation zwischen der COPD und dem C-Allel des TLR9 -1486 C/T-Polymorphismus stützt die Autoimmunhypothese der COPD.

Da die vorliegende Studie über einige Limitationen verfügt, ist eine zusätzliche Fall-Kontroll-Studie mit einem verbesserten Studiendesign notwendig, um für die deutsch-kaukasische Bevölkerung eine allgemeingültige Aussage des nachgewiesenen

Zusammenhangs treffen zu können. Anzustreben sind größere Kohorten als in der vorliegenden Studie mit einer verbesserten Anpassung des Normalkollektives bezüglich Alter, Geschlecht und Rauchgewohnheiten an das Patientenkollektiv. Hinsichtlich dieser drei Einflussgrößen finden sich in der vorliegenden Studie statistisch signifikante Unterschiede zwischen dem COPD-Kollektiv und den gesunden Probanden. Im Vergleich zum Kontrollkollektiv sind die COPD-Patienten im Durchschnitt ca. 6-7 Jahre älter, haben ca. 30 Packyears mehr geraucht und sind überwiegend Männer. Genetische Unterschiede zwischen ethnischen, sozialen und geographischen Schichten in der zu untersuchenden Population, können zu einer Verfälschung der Risikoeinschätzung führen. In unserer Studie haben wir Probanden kaukasischer Herkunft ungeachtet ihrer sozialen Schicht untersucht, so dass eine verbleibende Schichtung in unseren Kohorten nicht ausgeschlossen werden kann.

Auch die Assoziation der COPD mit anderen TLR9 SNPs wie z.B. dem TLR9 +1174-G/A-Polymorphismus, dessen G-Allel einen Risikofaktor für die Entwicklung des SLE darstellt (Tao et al., 2007), sollte in zukünftigen Studien untersucht werden. Die Funktionalität der TLR9 SNPs sollte in den an der Pathogenese beteiligten Zellen bestätigt werden. Falls sich in den zukünftigen Studien eine Assoziation der TLR9 SNPs mit der COPD nachweisen bzw. reproduzieren lässt ohne den Nachweis einer tatsächlichen Funktionalität dieser SNPs, dann sollte man die Untersuchungen auf weitere krankheitsverursachende Gene, die mit den krankheitsassoziierten Allelen der TLR9 SNPs im Kopplungsungleichgewicht stehen, ausdehnen. Der kurze Arm des Chromosoms 3 beinhaltet denkbare weitere Kandidatengene wie z.B. die Gene für den CCR2 und das Makrophagenstimulationsprotein 1 (Valentonyte et al., 2005). Anhand von Tiermodellen könnte die Rolle des TLR9 in der COPD durchleuchtet werden. Da TLR9 sowohl proinflammatorische als auch immunmodulierende/protective Eigenschaften besitzt, ist für den potentiellen therapeutischen Einsatz von TLR9-Agonisten bzw. Antagonisten zu klären, welche dieser Eigenschaften in der COPD überwiegen.

5.2 Sarkoidose und TLR9 SNPs

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass der TLR9 -1237T/C-Polymorphismus mit dem chronischen Verlauf der Sarkoidose assoziiert ist. Es zeigte sich eine signifikant höhere C-Allelprävalenz (p -Wert = 0,038) auf Seiten der chronisch erkrankten Patienten. Eine

Assoziation zwischen dem TLR9 -1486T/C-Polymorphismus und der Manifestation sowie dem Verlauf der Sarkoidose ließ sich nicht feststellen. Die C-Allelfrequenzen der TLR9 SNPs T-1237C bzw. T-1486C in unseren Normalkollektiven (13,7 % bzw. 39,4 %) waren übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Studien, die bei Kontrollpersonen europäischer Herkunft für den TLR9 SNP T-1237C eine C-Allelfrequenz von 11,8 - 15 % und für den TLR-SNP T-1486C eine C-Allelfrequenz von 39 - 44 % beobachtet haben (Berghöfer et al., 2005; Hamann et al., 2006; Lazarus et al., 2003; Török et al., 2004).

In Tiermodellen wurde gezeigt, dass TLR9 eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der granulomatösen Th1-Immunantwort spielt. Im Vergleich zu Wildmäusen fand man in TLR9-defizienten Mäusen nach einer Vakzinierung mit *M. tuberculosis* und einer anschließenden Injektion von mykobakteriellen Antigenen ein beschleunigtes Granulomwachstum mit einer gesteigerten Rekrutierung von alternativ aktivierten Makrophagen, eine geringere CD4⁺-Zellzahl, ein erniedrigtes Th1-Zytokinprofil und stattdessen ein erhöhtes Th2-Zytokinprofil (Ito et al., 2007). In Doppel-Knockout-Mäusen für TLR2 und TLR9 fand sich eine stärkere Resistenzminderung mit schwereren pulmonalen Veränderungen und geringerem Th1-Zytokinprofil als in Mäusen, bei denen nur TLR9 ausgeschaltet wurde. Dies weist auf eine Kooperation zwischen den beiden Toll-like Rezeptoren hin (Bafica et al., 2005). In Übereinstimmung damit konnte eine genetische Studie zeigen, dass SNPs im TLR2 und TLR9 bei Afroamerikanern und Kaukasiern mit einer Suszeptibilität für die Tuberkulose assoziiert sind (Velez et al., 2010). Die einzige mit der Erkrankung assoziierte Genvariante im TLR9 bei Kaukasiern war der TLR9 SNP T-1237C, während in der afroamerikanischen Patientengruppe vier weitere TLR9 SNPs Risikofaktoren für die Tuberkulose darstellten. Der Zusammenhang zwischen TLR2-SNPs und der Tuberkulose wurde durch die Ergebnisse weiterer Studien untermauert (Chen et al., 2010; Thuong et al., 2007; Xue et al., 2010). Daneben haben Najmi et al. (2010) einen Einfluss der TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile auf die Anfälligkeit für Tuberkulose und ihren Schweregrad in der indischen Bevölkerung beobachtet und damit erneut die Vermutung bestärkt, dass die Polymorphismen in Genen von TLRs an der Formation der Granulome beteiligt sind.

Verschiedene Studien konnten eine Assoziation zwischen der chronisch entzündlichen, granulomatösen Darmerkrankung, Morbus Crohn, und den Polymorphismen in Genen von

NOD2/CARD15, TLR4 und TLR9 nachweisen (Devlin et al., 2007; Hume et al., 2008; Török et al., 2004; Török et al., 2006). Da andere genetische Assoziationsstudien aus dem asiatischen Raum diesen Zusammenhang nicht reproduzieren konnten, ist anzunehmen, dass diese Genvarianten vor allem in der kaukasischen Bevölkerung eine Suszeptibilität für die Entwicklung von Morbus Crohn verleihen (Shen et al., 2010; Ye et al., 2009). Einzelne Polymorphismen in den oben genannten Genen zeigten nur marginale Assoziationen mit der Erkrankung. Beim gleichzeitigen Vorliegen von Mutationen im NOD2/CARD15-Gen, die mit dem M. Crohn assoziiert sind, zeigte sich eine Verstärkung dieser Assoziationen sowohl für den TLR9 SNP T-1237C als auch für den TLR4-Polymorphismus Arg299Gly (Hume et al., 2008; Török et al., 2006). Dies weist auf die Bedeutung der Gen-Gen-Interaktion von Genen verwandter Signalwege in der Pathogenese dieser granulomatösen Erkrankung hin.

Die Assoziation granulomatöser Erkrankungen mit SNPs in Genen von TLRs sowie die Nachbarschaft der TLR4- und TLR9-Gene zu den Suszeptibilitäts-Loci der Sarkoidose, die durch Kopplungsuntersuchungen identifiziert wurden, haben das Interesse der Sarkoidoseforscher auf die TLRs als potentielle Kandidaten für Suszeptibilitätsgene gelenkt. Während Fall-Kontroll-Studien in ihrer Gesamtheit eher gegen eine Bedeutung der nicht-synonymen Polymorphismen des TLR4 sprechen (Gazouli et al., 2006; Pabst et al., 2006; Veltkamp et al., 2006), weisen zwei genomweite Kopplungsanalysen und das Ergebnis eines Testes auf Vererbungsungleichgewicht (engl.: transmission disequilibrium test, TDT) auf einen Zusammenhang zwischen dem TLR4-Locus und der Sarkoidose hin (Gazouli et al., 2006; Pabst et al., 2006; Schürmann et al., 2008; Veltkamp et al., 2006). Auch die Rolle des TLR2 in der Sarkoidose ist noch nicht abschließend geklärt. Veltkamp et al. (2007), die eine Assoziation zwischen einem SNP in der Promotorregion des TLR2-Gens und der chronischen Form der Sarkoidose im niederländischen Patientenkollektiv fanden, konnten diese Assoziation in ihrer Validationskohorte nicht bestätigen. Kürzlich gelang es diesen Forschern zu zeigen, dass das Fehlen des häufigen Haplotyps im TLR10-TLR1-TLR6-Gen-Cluster auf Chromosom 4 das Risiko für die Entwicklung einer chronischen Sarkoidose erhöht. Da TLR1, TLR10 und TLR6 als Ko-Rezeptoren des TLR2 fungieren, untermauerten sie mit diesem Studienergebnis die Annahme einer in der Pathogenese der Sarkoidose relevanten, dysregulierten TLR2-Funktion (Veltkamp et al., 2012).

Es gibt bisher nur wenige Studien, die die direkte Rolle des TLR9 in der Pathogenese der Sarkoidose untersucht haben. Die Resultate einer Kopplungsuntersuchung und eines Testes auf Vererbungsungleichgewicht (TDT) weisen auf einen Zusammenhang zwischen dem TLR9-Gen und der Sarkoidose hin (Schürmann et al., 2001; Schürmann et al., 2008). In Sarkoidosestadien mit ausgeprägter Alveolitis konnte eine stärkere TLR9-Expression der Alveolarmakrophagen als in Fibrosestadien gefunden werden (Yalcintepe, 2006). Dabei war eine positive Korrelation zwischen der TLR9-Expression und der Zahl der CD4⁺-Lymphozyten nachweisbar (Yalcintepe, 2006). Eine Stimulation mit TLR9-Liganden führte zu einer erhöhten Expression des CXCL10, das in die Pathogenese der Sarkoidose involviert ist (Nureki et al., 2008, Yalcintepe, 2006). Nach unserem besten Wissen existiert bisher nur eine genetische Assoziationsstudie (Veltkamp et al., 2010), die die Rolle der TLR9-Polymorphismen in der Sarkoidose untersucht hat. Veltkamp et al. (2010) konnten keine Assoziation zwischen den vier bekanntesten TLR9 SNPs, darunter auch TLR9 SNPs T-1237C und T-1486C, und der Sarkoidose in der holländischen Population feststellen. Die diskrepanten Ergebnisse der vorliegenden Studie und der niederländischen Studie bezüglich des TLR9-Polymorphismus T-1237C lassen sich zum Teil durch die hohe C-Allelprävalenz im niederländischen Kontrollkollektiv (32 %) erklären. Die durchschnittliche C-Allelprävalenz des TLR9-Polymorphismus T-1237C, die man in kaukasischen Kontrollkollektiven anderer Studien findet, liegt bei 23,7 % und stimmt mit der C-Allelprävalenz unseres Kontrollkollektiv (24,9 %) fast überein (Carvalho et al., 2008; Hamann et al., 2006; Lazerus et al., 2003; Novak et al., 2007; Török et al., 2004). Veltkamp et al. (2010) haben die chronisch kranken Sarkoidosepatienten in Gruppen subkategorisiert. Dabei zeigte sich in der Subgruppe mit Stadium IV oder mit Progression in Richtung Stadium IV eine hohe C-Allelprävalenz des TLR9-Polymorphismus T-1237C (40 %). Eine akzidentell zu hohe C-Allelprävalenz des TLR9-Polymorphismus T-1237C im niederländischen Kontrollkollektiv könnte zu dem fehlenden Nachweis einer Assoziation zwischen dem C-Allel dieses Polymorphismus und dem schwersten chronischen Verlauf der niederländischen Sarkoidosepatienten geführt haben. Obwohl Veltkamp et al. (2010) keinen genetischen Unterschied im TLR9 zwischen Sarkoidosepatienten und Kontrollpersonen detektieren konnten, gelang ihnen der Nachweis eines funktionellen Unterschieds. Sie demonstrierten, dass eine Stimulation des TLR9 in peripheren Blutmonozyten eine Freisetzung des IL-23,

welches an der Aufrechterhaltung chronischer Entzündungsprozesse beteiligt ist und eine essentielle Rolle bei der Amplifizierung und Stabilisierung der Th17-gerichteten Immunantwort spielt, induzierte (Cua et al., 2003; Veltkamp et al., 2010). Dabei fiel diese TLR9-vermittelte IL-23-Freisetzung der peripheren Blutmonozyten bei Sarkoidosepatienten im Vergleich zu Gesunden signifikant geringer aus. Ob sich dieses Verhalten der peripheren Blutmonozyten auf die pulmonalen Blutmonozyten übertragen lässt, müsste noch weiter untersucht werden. Zumindest korrelieren diese Ergebnisse mit dem neueren Erkenntnis, dass die Th17-gerichtete Immunantwort neben der Th1-Immunantwort in die Pathogenese der Sarkoidose involviert ist (Facco et al., 2010). Facco et al. (2010) konnten kürzlich eine Infiltration der CD4⁺-Lymphozyten vom Th17-Phänotyp sowie IL-17-sezernierende Makrophagen in den Sarkoidosegranulomen nachweisen. Dieser Nachweis gelang nicht bei Patienten, die sich in Remission befanden. TLR9 spielt eine wichtige Rolle bei der Th17-vermittelten, durch mykobakterielle Antigene erzeugten granulomatösen Lungenentzündung in Tierversuchen. In Granulommodellen fand man bei TLR9-defizienten Mäusen neben einer beschleunigten granulomatösen Immunantwort ein signifikant geringeres Th17-Zytokinprofil (IL-6, IL-23, IL-17, IL-21, TNF- α) und geringere Spiegel von Chemokinen wie CCL20 und CCL22. Daraus resultierte eine geringere Infiltration der Granulome durch dendritische Zellen, die über eine TLR9-regulierte Expression des Notch-Liganden delta-like 4 eine Differenzierung der naiven CD4⁺-Lymphozyten in Th17-Lymphozyten induzieren (Ito et al., 2009). Auf die Bedeutung einer möglicherweise dysregulierten Th17-gerichteten Immunantwort in der Pathogenese der Sarkoidose und auch des Morbus Crohn deuten die beobachteten Assoziationen zwischen SNPs im IL-23-Rezeptor-Gen und diesen Erkrankungen hin (Fischer et al., 2010; Glas et al., 2007; Lappalainen et al., 2008). Török et al. (2009) demonstrierten beim Morbus Crohn Gen-Gen-Interaktionen zwischen dem TLR9 SNP T-1237C und Varianten des IL-23-Rezeptors. Wie schon Veltkamp et al. (2010) konnten auch Bhan et al. (2010) an einem Mausmodell zeigen, dass die Aktivierung des TLR9 eine Rolle bei der Freisetzung des IL-23 spielt. Sie demonstrierten bei TLR9-defizienten Mäusen eine beeinträchtigte Th17-gerichtete Immunantwort, die sie einer verminderten IL-23-Freisetzung zuschrieben. An einem anderen Mausmodell konnte kürzlich gezeigt werden, dass IL-23, das von DCs nach Stimulation mit

CpG-DNA freigesetzt wird, an der Formation intestinaler Granulome beteiligt ist (Mizoguchi et al., 2007).

Es ist bekannt, dass sowohl *M. tuberculosis* als auch *P. acnes* sowohl eine Th1-gerichtete als auch Th17-gerichtete Immunantwort induzieren können (Miossec et al., 2009). Neben der mykobakteriellen DNA ist TLR9 in der Lage auch Propionibakterien zu detektieren. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die immunmodulierenden Aktivitäten des *P. acnes* wie die Induktion einer Hypersensitivität auf LPS und die Ausbildung von hepatischen Granulomen auf der Erkennung des *P. acnes* durch TLR9 und der daraus folgenden IL-12-vermittelten Freisetzung von IFN- γ durch T-Lymphozyten, hauptsächlich CD4⁺-Zellen, basieren (Kalis et al., 2005; Tchaptchet et al., 2010). Betrachtet man die Ergebnisse unserer Studie im Kontext der oben genannten Studie, so kann man spekulieren, dass bei einem Teil der Patienten mit chronischer Sarkoidose eine genetisch bedingte Änderung der TLR9-Expression nach Auseinandersetzung mit Myko- und Propionibakterien über eine pathologisch veränderte Konzentration des IL-23 zu einer Dysregulierung der Th17-Immunantwort führt.

Die beim Morbus Crohn beobachteten Gen-Gen-Interaktionen zwischen TLR9 SNP T-1237C und den SNPs im NOD2/CARD2-Gen sowie IL-23R-Gen sind bisher an Sarkoidosekollektiven nicht untersucht worden. Auch bei Sarkoidosepatienten wurden Assoziationen zwischen Polymorphismen im NOD2/CARD15-Gen und spezifischen Phänotypen der Sarkoidose sowie zwischen einem Haplotyp des NOD1-Gens, der mit einer geringeren NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit *P. acnes* vergesellschaftet ist, und der Erkrankungsmanifestation beobachtet (Sato et al., 2010; Tanabe et al., 2006).

In Lungenbiopsien von Sarkoidosepatienten und Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose (IPF) konnte eine statistisch signifikante Überexpression der TLR9-mRNA nachgewiesen werden (Margaritopoulos et al., 2010; Meneghin et al., 2008). Dabei findet sich bei Patienten mit IPF eine Überexpression des TLR9 nicht nur in Immunzellen sondern auch in pulmonalen Fibroblasten. Die TLR9-Expression wird in diesen Fibroblasten durch ein Th2-Zytokinmilieu (IL-4, IL-13) gesteigert. Dies ist für die Th2-Zytokine ungewöhnlich, da bisherige Studien eher eine suppressive Wirkung dieser Zytokine auf die Expression von Toll-like Rezeptoren gezeigt haben (Meneghin et al., 2008). Eine Aktivierung des TLR9 durch CpG-ODN induziert bei

Patienten mit IPF eine Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten. Myofibroblasten sind durch einen Phänotyp charakterisiert, der zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen einzuordnen ist. Sie stellen die Hauptquelle von Bestandteilen der extrazellulären Matrix dar und ihre Aktivierung führt zu einer Progression der pulmonalen Fibrose (Meneghin et al., 2008). Es sollte in nachfolgenden Studien geklärt werden, ob man auch in Fibroblasten von chronisch kranken Sarkoidosepatienten eine ähnliche TLR9-Überexpression findet, die gegebenenfalls mit TLR9 SNPs assoziiert ist.

Die in der vorliegenden Studie beobachteten Assoziationen zwischen dem C-Allel des TLR9 SNPs T-1237C und der chronischen Form der Sarkoidose bedarf einer Kontrolle an einer größeren Patientengruppe. In dieser Studie wurde das Kollektiv der chronisch Kranken nicht differenziert nach Stadien betrachtet. In zukünftigen Studien sollte geklärt werden, ob das C-Allel des TLR9 SNPs T-1237C mit spezifischen Phänotypen der chronischen Sarkoidose assoziiert ist und ob Gen-Gen-Interaktionen mit anderen Kandidatengenen wie z.B. TLR2-, TLR4-, NOD1- und NOD2-, IL-23R-, TNF- α -Genen bestehen. Da TLR9 in der Lage ist sowohl das Erbgut von Mykobakterien als auch von Propionibakterien zu erkennen und daraufhin Entzündungsprozesse einzuleiten, wird durch die hier nachgewiesene Assoziation des C-Allels des TLR9 SNPs T-1237C mit der chronischen Form der Sarkoidose die Infektionshypothese gestützt. Es besteht die Möglichkeit, dass das C-Allel des TLR9 SNPs T-1237C alleine oder viel wahrscheinlicher in Zusammenarbeit mit SNPs anderer Gene einen Teil der chronisch kranken Sarkoidosepatienten dazu prädisponiert, nach einer Auseinandersetzung mit den oben genannten Keimen eine granulomatöse Lungenentzündung zu entwickeln. Die Ergebnisse dieser Studie lassen die weitere Erforschung der genauen Rolle des TLR9 in der Pathogenese der chronischen Sarkoidose als lohnenswert erscheinen, da seine Liganden möglicherweise das Agens einer bestimmten Krankheitsentität, die sich unter dem polyäthiologischen Syndrom der Sarkoidose verbirgt, darstellen. Die Identifikation dieser vermuteten Krankheitsentität und ihres Agens könnte den Einsatz von Präventionsmaßnahmen und neuen Therapiestrategien, wie z.B. den therapeutischen Einsatz von TLR9-Liganden, für einen Teil der chronisch kranken Sarkoidosepatienten ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Lungenerkrankungen wie die COPD und die Sarkoidose gehören zu multifaktoriell bedingten Krankheitsbildern, in deren Pathogenese eine komplexe Interaktion zwischen nicht-genetischen und genetischen Faktoren vermutet wird. Der direkte Kontakt der Lunge mit der Umwelt und die Beteiligung einer antigenspezifischen, adaptiven Immunantwort an den immunologischen Prozessen beider Erkrankungen weisen auf die Präsenz eines ätiologischen, immunstimulierenden Agens hin.

Durch seine Fähigkeit mikrobielles Erbmateriale zu erkennen induziert und reguliert der Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem. Die ubiquitäre und funktionale Expression des TLR9 in immunologischen, mesenchymalen und epithelialen Zellen der Lunge, die Hinweise auf eine funktionale Relevanz der TLR9 SNPs T-1486C und T-1237C sowie die Assoziationen dieser SNPs mit verschiedenen, in ihrer Pathogenese mit der COPD und der Sarkoidose verwandten Erkrankungen weckten unser Interesse an TLR9 als Kandidatengen.

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob die TLR9 SNPs T-1486C und T-1237C mit der Manifestation oder der Progression der beiden hier untersuchten Lungenerkrankungen assoziiert sind, wurde DNA von 176 COPD-Probanden (58 % mit stabiler Verlaufsform und 42 % mit instabiler Verlaufsform), 166 Sarkoidoseprobanden (19 % mit akuter Verlaufsform und 81 % mit chronischer Verlaufsform) und 233 gesunden Probanden aus kernhaltigen Blutmonozyten zur Genotypisierung extrahiert. Bezüglich der TLR9 SNPs T-1486C und T-1237C wurden 174 bzw. 175 COPD-Probanden, 165 bzw. 166 Sarkoidoseprobanden sowie 215 bzw. 233 gesunde Probanden genotypisiert. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR und dem anschließenden Restriktionsverdau und die statistische Auswertung mittels χ^2 -Test nach Pearson. Alle Probanden waren ausschließlich deutsch-kaukasischer Herkunft.

Es zeigte sich eine signifikant höhere C-Allelprävalenz des TLR9 SNP T-1486C im COPD-Gesamtkollektiv (p-Wert = 0,014). Im weiblichen Kollektiv war der Unterschied noch stärker ausgeprägt (p-Wert = 0,006). Eine Assoziation zwischen dem TLR9 SNP T-1237C und der Manifestation oder der Progression der COPD konnten wir nicht feststellen. Im Sarkoidosekollektiv konnten wir eine signifikant höhere C-Allelprävalenz des TLR9 SNP T-1237C

seitens der chronisch kranken Sarkoidosepatienten beobachten (p-Wert = 0,038). Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen Sarkoidose und TLR9 SNP T-1486C fanden wir nicht.

Mit dieser Studie konnten wir zum ersten Mal eine Assoziation zwischen dem C-Allel des TLR9 SNP T-1486C und der Manifestation der COPD demonstrieren. Darüber hinaus gelang es uns zu zeigen, dass ein anderer TLR9 SNP (T-1237C) den Verlauf der Sarkoidose beeinflussen kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass der Erwerb und die Aufrechterhaltung der Entzündungsprozesse, die man sowohl in der COPD als auch Sarkoidose findet, mit einer genetisch bedingten, quantitativen Veränderung der TLR9-Expression zusammenhängen könnten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden zur Publikation in *Advances in Experimental Medicine and Biology* akzeptiert (Pabst et al., 2013).

6 Literaturverzeichnis

1. Agustí A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: Does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; 58: 832-834
2. Akahoshi M, Ishihara M, Remus N, Uno K, Miyake K, Hirota T, Nakashima K, Matsuda A, Kanda M, Enomoto T, Ohno S, Nakashima H, Casanova JL, Hopkin JM, Tamari M, Mao XQ, Shirakawa T. Association between IFNA genotype and the risk of sarcoidosis. *Human genetics* 2004; 114: 503-509
3. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801
4. American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG). Statement on Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 736-755
5. Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 2005; 202: 1715-1724
6. Bammann K, Wawro N. Die Einbeziehung genetischer Faktoren in Studien der Epidemiologie. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 2006; 49: 974-981
7. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22: 672-688
8. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, Chang B, Duramad O, Coffman RL. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *Exp Med* 2005; 202: 1131-1139
9. Behera AK, Matsuse H, Kumar M, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS. Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 188-195
10. Belvisi MG, Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res* 2003; 52: 95-100
11. Berghöfer B, Frommer T, König IR, Ziegler A, Chakraborty T, Bein G, Hackstein H. Common human Toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: association with atopy and functional relevance. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 1147-1154

12. Bhan U, Ballinger MN, Zeng X, Newstead MJ, Cornicelli MD, Standiford TJ. Cooperative Interactions between TLR4 and TLR9 Regulate Interleukin 23 and 17 Production in a Murine Model of Gram Negative Bacterial Pneumonia. *PLoS One* 2010; 5: 9896-9906
13. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321: 209-213
14. Bonarius HP, Brandsma CA, Kerstjens HA, Koerts JA, Kerkhof M, Nizankowska-Mogilnicka E, Roozendaal C, Postma DS, Timens W. Antinuclear autoantibodies are more prevalent in COPD in association with low body mass index but not with smoking history. *Thorax* 2011; 66: 101-107
15. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AM, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, Jensen RL, Marks GB, Gulsvik A, Nizankowska-Mogilnicka E; BOLD Collaborative Research Group. International variation in the prevalence of COPD (The BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 2007; 370: 741-750
16. Burge S, and Wedzicha JA. COPD exacerbations: definitions and classifications. *Eur Respir J Suppl* 2003; 41: 46-53
17. Cabello H, Torres A, Celis R, El-Ebiary M, Puig de la Bellacasa J, Xaubet A, González J, Agustí C, Soler N. Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study. *Eur Respir J* 1997; 10: 1137-1144
18. Carrasco-Garrido P, de Miguel-Díez J, Rejas-Gutierrez J, Martín-Centeno A, Gobartt-Vázquez E, Hernandez-Barrera V, de Miguel AG, Jimenez-Garcia R. Characteristics of chronic obstructive pulmonary disease in Spain from a gender perspective. *BMC Pul Med* 2009; 9: 2-9
19. Carvalho A, Pasqualotto AC, Pitzurra L, Romani L, Denning DW, Rodrigues F. Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 2008; 197: 618-621
20. Cavanagh LL, Boyce A, Smith L, Padmanabha J, Filgueira L, Pietschmann P, Thomas R. Rheumatoid arthritis synovium contains plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 230-240
21. Celli BR, MacNee W; ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23: 932-946
22. Chen Y, Horne SL, Dosman JA. Increased susceptibility to lung dysfunction in female smokers. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 1224-1230
23. Chen YC, Hsiao CC, Chen CJ, Chin CH, Liu SF, Wu CC, Eng HL, Chao TY, Tsen CC, Wang YH, Lin MC. Toll-like receptor 2 gene polymorphisms, pulmonary tuberculosis, and natural killer cell counts. *BMC Med Genet* 2010; 11: 17-26
24. Chin CL, Manzel LJ, Lehman EE, Humlicek AL, Shi L, Starner TD, Denning GM, Murphy TF, Sethi S, Look DC. *Haemophilus influenzae* from patients with chronic obstructive pulmonary disease

- exacerbation induce more inflammation than colonizers. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 85-91
25. Cichon S, Freudenberg J, Propping P, Nothen MM. Variabilität im menschlichen Genom. *Dtsch Arztebl* 2002, 99: 3091-3101
 26. 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
 27. Coch C, Busch N, Wimmenauer V, Hartmann E, Janke M, Abdel-Mottaleb MM, Lamprecht A, Ludwig J, Barchet W, Schlee M, Hartmann G. Higher activation of TLR9 in plasmacytoid dendritic cells by microbial DNA compared with self-DNA based on CpG-specific recognition of phosphodiester DNA. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 663-670
 28. Costabel U. Sarcoidosis: clinical update. *Eur Respir J Suppl* 2001; 32: 56-68
 29. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421: 744-748
 30. Davis SM, Clark EA, Nelson LT, Silver RM. The association of innate immune response gene polymorphisms and puerperal group A streptococcal sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202: 1-8
 31. Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, Bast A. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 813-816
 32. Demedts IK, Bracke KR, Maes T, Joos GF, Brusselle GG. Different roles for human lung dendritic cell subsets in pulmonary immune defense mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 387-393
 33. Devlin SM, Yang H, Ippoliti A, Taylor KD, Landers CJ, Su X, Abreu MT, Papadakis KA, Vasiliauskas EA, Melmed GY, Fleshner PR, Mei L, Rotter JI, Targan SR. NOD2 variants and antibody response to microbial antigens in Crohn's disease patients and their unaffected relatives. *Gastroenterology-Orlando* 2007, 132: 576-586
 34. Dong L, Chen M, Zhang Q, Li LZ, Xu XQ, Xiao W. T-bet/GATA-3 ratio is a surrogate measure of Th1/Th2 cytokine profiles and may be novel targets for CpG ODN treatment in asthma patients. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 1396-1399
 35. Drent M, van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H, Wouters EF, Bast A. NF-kappaB activation in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2001; 18: 50-56

36. Dubaniewicz A, Kämpfer S, Singh M. Serum anti-mycobacterial heat shock proteins antibodies in sarcoidosis and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2006; 86: 60-67
37. Eberhardt F, Gaede KI. Sarkoidose und chronische Berylliose. *Der Pneumologe* 2006, 3: 385-397
38. Elmaagacli AH, Koldehoff M, and Beelen DW. Improved outcome of hematopoietic SCT in patients with homozygous gene variant of Toll-like receptor 9. *Bone marrow transplantation* 2009; 44: 295-302
39. Engin A, Arslan S, Kizildag S, Oztürk H, Elaldi N, Dökmetas I, Bakir M. Toll-like receptor 8 and 9 polymorphisms in Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Microbes Infect.* 2010; 12: 1071-1078
40. Etem EO, Elyas H, Ozgocmen S, Yıldırım A, Godekmerdan A. The investigation of toll-like receptor 3, 9 and 10 gene polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int* 2011; 31: 1369-1374
41. Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, Barton GM. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 2008; 456: 658-662
42. Facco M, Cabrelle A, Teramo A, Olivieri V, Gnoato M, Teolato S, Ave E, Gattazzo C, Fadini GP, Calabrese F, Semenzato G, Agostini C. Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. *Thorax* 2011; 66: 144-150
43. Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon-alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* 2001; 159: 237-243
44. Feghali-Bostwick CA, Gadgil AS, Otterbein LE, Pilewski JM, Stoner MW, Csizmadia E, Zhang Y, Sciruba FC, Duncan SR. Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 156-163
45. Fischer A, Nothnagel M, Franke A, Jacobs G, Saadati HR, Gaede KI, Rosenstiel P, Schürmann M, Müller-Quernheim J, Schreiber S, Hofmann S. Association of IBD Risk Loci with Sarcoidosis and its Acute and Chronic Subphenotypes. *Eur Respir J* 2011 Mar; 37: 610-616
46. Gazouli M, Koundourakis A, Ikonomopoulos J, Gialafos EJ, Rapti A, Gorgoulis VG, Kittas C. CARD15/NOD2, CD14, and toll-like receptor 4 gene polymorphisms in Greek patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2006; 23: 23-29
47. Glas J, Seiderer J, Wetzke M, Konrad A, Török HP, Schmechel S, Tönenchi L, Grassl C, Dambacher J, Pfennig S, Maier K, Griga T, Klein W, Epplen JT, Schiemann U, Folwaczny C, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Folwaczny M, Mussack T, Brand S. rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS One* 2007; 2: 819-826

48. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) [Online-Text]. Letztes Update 2011 [Zugriff am 08/04 2012]. Gelesen unter: www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2011_Feb21.pdf
49. Greene CM, Carroll TP, Smith SG, Taggart CC, Devaney J, Griffin S, O'Neill SJ, McElvaney NG. TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Immunol* 2005; 174: 1638-1646
50. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis DE, Kheradmand F. An Immune Basis for Lung Parenchymal Destruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Emphysema. *PLoS Med* 2004; 1: 8-16
51. Halle S, Dujardin HC, Bakocevic N, Fleige H, Danzer H, Willenzon S, Suezer Y, Hämmerling G, Garbi N, Sutter G, Worbs T, Förster R. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *J Exp Med* 2009; 206: 2593-2601
52. Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, Gross M, Gomma A, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR)-9 promoter polymorphisms and atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* 2006; 364: 303-307
53. 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. *Journal of Immunological Methods* 2004; 285: 281-291
54. Hamprecht A. Genetische Polymorphismen in Toll-like-Rezeptoren, rheumatoide Arthritis und Höhe von Rheumafaktor im Serum. Med., Diss., Univ. Köln 2005
55. Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, Endres S. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1633-1641
56. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003; 102: 2660-2669
57. Heeg K, Zimmermann S. CpG DNA as a Th1 trigger. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121: 87-97
58. 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: 740-745
59. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645-2653
60. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral

- blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168: 4531-4537
61. Hume GE, Fowler EV, Doecke J, Simms LA, Huang N, Palmieri O, Griffiths LR, Florin TH, Annese V, Radford-Smith GL. Novel NOD2 haplotype strengthens the association between TLR4 Asp299gly and Crohn's disease in an Australian population. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 585-590
 62. Iannuzzi MC, Iyengar SK, Gray-McGuire C, Elston RC, Baughman RP, Donohue JF, Hirst K, Judson MA, Kavuru MS, Maliarik MJ, Moller DR, Newman LS, Rabin DL, Rose CS, Rossman MD, Teirstein AS, Rybicki BA. Genome-wide search for sarcoidosis susceptibility genes in African Americans. *Genes Immun* 2005; 6: 509-518
 63. Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Shirato K. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 701-706
 64. Isajevs S, Taivans I, Svirina D, Strazda G, Kopeika U. Patterns of Inflammatory Responses in Large and Small Airways in Smokers with and without Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respiration* 2011; 81: 362-371
 65. Ishii KJ, Coban C, Akira S. Manifold mechanisms of Toll-like receptor-ligand recognition. *J Clin Immunol* 2005; 25: 511-521
 66. Ito I, Nagai S, Handa T, Muro S, Hirai T, Tsukino M, Mishima M. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1378-1382
 67. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, Barnes PJ. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1967-1976
 68. Ito T, Schaller M, Hogaboam CM, Standiford TJ, Chensue SW, Kunkel SL. TLR9 activation is a key event for the maintenance of a mycobacterial antigen-elicited pulmonary granulomatous response. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2847-2855
 69. Ito T, Schaller M, Hogaboam CM, Standiford TJ, Sandor M, Lukacs NW, Chensue SW, Kunkel SL. TLR9 regulates the mycobacteria-elicited pulmonary granulomatous immune response in mice through DC-derived Notch ligand delta-like 4. *J Clin Invest* 2009; 119: 33-46
 70. Ito T, Wang YH, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26: 221-229

71. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. Immunobiology: the immune system in health and disease. New York: Garland Science Publishing, 2005
72. Jendholm J, Mörgelin M, Perez Vidakovics ML, Carlsson M, Leffler H, Cardell LO, Riesbeck K. Superantigen-and TLR-dependent activation of tonsillar B cells after receptor-mediated endocytosis. *J Immunol* 2009; 182: 4713-4720
73. Ji X, Wang Y, Huang G, Zhou W. TLR3c. 1377, TLR9-1486, and TLR9 2848 gene polymorphisms and multiple sclerosis. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010; 35: 116-122
74. Juarez E, Nuñez C, Sada E, Ellner JJ, Schwander SK, Torres M. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respir Res* 2010; 11: 2-14
75. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194: 863-869
76. Kalis C, Gumenscheimer M, Freudenberg N, Tchaptchet S, Fejer G, Heit A, Akira S, Galanos C, Freudenberg MA. Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*. *J Immunol* 2005; 174: 4295-4300
77. Kern DG, Neill MA, Wrenn DS, Varone JC. Investigation of a unique time-space cluster of sarcoidosis in firefighters. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 974-980
78. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol* 2007; 19: 24-32
79. Kirsten D, Magnussen H. Sarkoidose Up-date 2000. Großhansdorf: Interpneu, 2000
80. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374: 546-549
81. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdörfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α /b in plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology* 2001a; 31: 2154-2163
82. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *European Journal of Immunology* 2001b; 31: 3026-3037
83. Lachheb J, Dhifallah IB, Chelbi H, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children. *Tissue Antigens* 2008; 71: 417-425

84. Lammers KM, Ouburg S, Morr  SA, Crusius JB, Gionchett P, Rizzello F, Morselli C, Caramelli E, Conte R, Poggioli G, Campieri M. Combined carriership of TLR9-1237C and CD14-260T alleles enhances the risk of developing chronic relapsing pouchitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7323-7329
85. Lanciotti M, Pigullo S, Lanza T, Dufour C, Caviglia I, Castagnola E. Possible role of toll-like receptor 9 polymorphism in chemotherapy-related invasive mold infections in children with hematological malignancies. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50: 944
86. Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183: 89-103
87. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schr der JM, Liu YJ, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007; 449: 564-569
88. Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, Freigang S, Odermatt B, Conrad C, Ittner LM, Bauer S, Luther SA, Uematsu S, Akira S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nature medicine* 2005; 11: 138-145
89. Lappalainen M, Halme L, Turunen U, Saavalainen P, Einarsdottir E, F rkkil  M, Kontula K, Paavola-Sakki P. Association of IL23R, TNFRSF1A, and HLA-DRB1* 0103 allele variants with inflammatory bowel disease phenotypes in the Finnish population. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1118-1124
90. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; 5: 190-198
91. Laurel CB, Eriksson S. The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Scan J Clin Invest* 1963; 15: 132-140
92. Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends in Immunology* 2005; 26: 509-511
93. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Martinez F, Weiss ST. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three US ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* 2003, 81: 85-91
94. Lazarus R, Raby BA, Lange C, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, Vercelli D, Klimecki WJ, Martinez FD, Weiss ST. TOLL-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two independent samples. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 594-600

95. Lee SH, Chin BR, Baek SH. Role of NFkappaB in toll-like receptor 9-mediated matrix metalloproteinase-9 expression. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2007; 33: 636-642
96. Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol* 2004; 173: 1179-1183
97. Leoratti FM, Farias L, Alves FP, Suarez-Mútiis MC, Coura JR, Kalil J, Camargo EP, Moraes SL, Ramasawmy R. Variants in the Toll-Like Receptor Signaling Pathway and Clinical Outcomes of Malaria. *J Infect Dis* 2008; 198: 772-780
98. Liao WL, Chen RH, Lin HJ, Liu YH, Chen WC, Tsai Y, Wan L, Tsai FJ. Toll-like receptor gene polymorphisms are associated with susceptibility to graves' ophthalmopathy in Taiwan males. *BMC medical genetics* 2010; 11: 154-160
99. Lim EJ, Lee SH, Lee JG, Chin BR, Bae YS, Kim JR, Lee CH, Baek SH. Activation of toll-like receptor-9 induces matrix metalloproteinase-9 expression through Akt and tumor necrosis factor-alpha signaling. *FEBS Letters* 2006; 580: 4533-4538
100. Lu KC, Yang HY, Lin YF, Kao SY, Lai CH, Chu CM, Wu CC, Su SL. The T-1237C polymorphism of the Toll-like receptor-9 gene is associated with chronic kidney disease in a Han Chinese population. *Tohoku J Exp Med* 2011; 225: 109-116
101. Lynch JP 3rd, Ma YL, Koss MN, White ES. Pulmonary sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28: 53-74
102. Macfarlane DE, Manzel L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol* 1998; 160: 1122-1131
103. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 258-266
104. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* 2007; 28: 479-513
105. Magnusson M, Tobes R, Sancho J, Pareja E. Cutting edge: natural DNA repetitive extragenic sequences from gram-negative pathogens strongly stimulate TLR9. *J Immunol* 2007; 179: 31-35
106. Mailaparambil B, Krueger M, Heinze J, Forster J, Heinzmann A. Polymorphisms of toll like receptors in the genetics of severe RSV associated diseases. *Disease Markers* 2008; 25: 59-65
107. Margaritopoulos GA, Antoniou KM, Karagiannis K, Samara KD, Lasithiotaki I, Vassalou E, Lymbouridou R, Koutala H, Siafakas NM. Investigation of Toll-like receptors in the pathogenesis of fibrotic and granulomatous disorders: a bronchoalveolar lavage study. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010; 3: 20-28

108. Marin A, Monsó E, Garcia-Nuñez M, Sauleda J, Noguera A, Pons J, Agustí A, Morera J. Variability and effects of bronchial colonisation in patients with moderate COPD. *Eur Respir J* 2010; 35: 295-302
109. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006; 3: 442-461
110. Mayer AK, Muehmer M, Mages J, Gueinzus K, Hess C, Heeg K, Bals R, Lang R, Dalpke AH. Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 2007; 178: 3134-3142
111. Meneghin A, Choi ES, Evanoff HL, Kunkel SL, Martinez FJ, Flaherty KR, Toews GB, Hogaboam CM. TLR9 is expressed in idiopathic interstitial pneumonia and its activation promotes in vitro myofibroblast differentiation. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 979-992
112. Medzhitov R, Janeway C Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000; 8: 452-456
113. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009; 361: 888-898
114. Mizoguchi A, Ogawa A, Takedatsu H, Sugimoto K, Shimomura Y, Shirane K, Nagahama K, Nagaishi T, Mizoguchi E, Blumberg RS, Bhan AK. Dependence of intestinal granuloma formation on unique myeloid DC-like cells. *J Clin Invest* 2007; 117: 605-615
115. Mogensen TH, Paludan SR, Kilian M, Ostergaard L. Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 267-277
116. Mortaz E, Adcock IM, Ito K, Kraneveld AD, Nijkamp FP, Folkerts G. Cigarette smoke induces CXCL8 production by human neutrophils via activation of TLR9 receptor. *Eur Respir J* 2010; 36: 1143-1154
117. Müller T, Hamm S, Bauer S. TLR9-mediated recognition of DNA. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 183: 51-70
118. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350
119. Nadigel J, Prefontaine D, Bourbeau J, Maltais F, Eidelman D, Hamid Q. The Expression of Toll-Like Receptors in CD8 T Cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 1005
120. Najmi N, Kaur G, Sharma SK, Mehra NK. Human Toll-like receptor 4 polymorphisms TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile influence susceptibility and severity of pulmonary tuberculosis in the Asian Indian population. *Tissue Antigens* 2010; 76: 102-109

121. Newman LS. Aetiologies of sarcoidosis. *European Resp. Monograph* 2005; 32: 23-48
122. Ng MT, Van't Hof R, Crockett JC, Hope ME, Berry S, Thomson J, McLean MH, McColl KE, El-Omar EM, Hold GL. Increase in NF- κ B Binding Affinity of the Variant C Allele of the Toll-Like Receptor 9-1237T/C Polymorphism Is Associated with *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Disease. *Infect Immun* 2010; 78: 1345-1352
123. Nishikawa M, Kakemizu N, Ito T, Kudo M, Kaneko T, Suzuki M, Udaka N, Ikeda H, Okubo T. Superoxide mediates cigarette smoke-induced infiltration of neutrophils into the airways through nuclear factor-kappaB activation and IL-8 mRNA expression in guinea pigs in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 189-198
124. Noor A, Knox KS. Immunopathogenesis of sarcoidosis. *Clinics in Dermatology* 2007; 25: 250-258
125. Novak N, Yu CF, Bussmann C, Maintz L, Peng WM, Hart J, Hagemann T, Diaz-Lacava A, Baurecht HJ, Klopp N, Wagenpfeil S, Behrendt H, Bieber T, Ring J, Illig T, Weidinger S. Putative association of a *TLR9* promoter polymorphism with atopic eczema. *Allergy* 2007; 62: 766-772
126. Nunes H, Bouvry D, Soler P, Valeyre D. Sarcoidosis. *Orphanet J Rare Dis.* 2007; 2: 46
127. Nureki S, Miyazaki E, Ando M, Ueno T, Fukami T, Kumamoto T, Sugisaki K, Tsuda T. Circulating levels of both Th1 and Th2 chemokines are elevated in patients with sarcoidosis. *Respir Med* 2008; 102: 239-247
128. Olaru F, Jensen LE. Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors. *Exp Dermatol* 2010; 19: 314-316
129. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 2010; 129: 311-321
130. Pabst S, Baumgarten G, Stremmel A, Lennarz M, Knüfermann P, Gillissen A, Vetter H, Grohé C. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms are associated with a chronic course of sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 420-426
131. Pabst S, Bradler O, Gillissen A, Nickenig G, Skowasch D, Grohe C. Toll-like receptor-9 polymorphisms in sarcoidosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Adv Exp Med Biol.* 2013; 756: 239-245.
132. Pabst S, Karpushova A, Diaz-Lacava A, Herms S, Walier M, Zimmer S, Cichon S, Nickenig G, Nöthen MM, Wienker TF, Grohé C. VEGF gene haplotypes are associated with sarcoidosis. *Chest* 2010; 137: 156-163
133. Papi A, Johnston SL. Rhinovirus infection induces expression of its own receptor intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) via increased NF- κ B-mediated transcription. *J Biol Chem* 1999; 274: 9707-9720

134. Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* 2002; 57: 759-764
135. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS; GOLD Scientific Committee. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop Summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1256-1276
136. Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J, Brynskov J. Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clin Exp Immunol* 2005; 141: 298-306
137. Pforte A. COPD-Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen und Komplikationen. Berlin; Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 2002
138. Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, Bals R. Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 2004; 173: 1219-1223
139. Rohde G, Borg I, Wiethage A, Kauth M, Jerzinowski S, An Duong Dinh T, Bauer TT, Bufe A, Schultze-Werninghaus G. Inflammatory response in acute viral exacerbations of COPD. *Infection* 2008; 36: 427-433
140. Rohde G, Schlosser B, Arinir U, Kronsbein J, Knoop H, Ringshausen F, Schultze-Werninghaus G. Die Rolle von Atemwegsinfektionen bei der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung. *Medizinische Klinik* 2007, 102: 893-898
141. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 602-609
142. Rybicki BA, Walewski JL, Maliarik MJ, Kian H, Iannuzzi MC; ACCESS Research Group. The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and Whites. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 491-499
143. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallese G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ ve Cells in the Lungs of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 711-717

144. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ T-Lymphocytes in Peripheral Airways of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 822-826
145. Saetta M, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Lucchini RE, Casoni G, Maestrelli P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1633-1639
146. 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: 548-555
147. Sandford AJ, Weir TD, Paré PD. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1997; 10: 1380-1391
148. Sato H, Williams HR, Spagnolo P, Abdallah A, Ahmad T, Orchard TR, Copley SJ, Desai SR, Wells AU, du Bois RM, Welsh KI. CARD15/NOD2 polymorphisms are associated with severe pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 2010; 35: 324-330
149. Schlender J, Hornung V, Finke S, Günthner-Biller M, Marozin S, Brzózka K, Moghim S, Endres S, Hartmann G, Conzelmann KK. Inhibition of toll-like receptor 7-and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus. *J Virol* 2005; 79: 5507-5515
150. Schroth S, Bals R. α_1 -Antitrypsin-Mangel in der COPD- und Emphysementstehung. *Der Pneumologe* 2010; 7: 49-58
151. Schürmann M, Kwiatkowski R, Albrecht M, Fischer A, Hampe J, Müller-Quernheim J, Schwinger E, Schreiber S. Study of Toll-like receptor gene loci in sarcoidosis. *Clinical & Experimental Immunology* 2008; 152: 423-431
152. Schürmann M, Reichel P, Müller-Myhsok B, Schlaak M, Müller-Quernheim J, Schwinger E. Results from a genome-wide search for predisposing genes in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 840-846
153. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, MacCallum P, Meade TW, Jeffries DJ, Johnston SL, Wedzicha JA. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1618-1623
154. Sethi S. Bacteria in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: phenomenon or epiphenomenon? *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 109-114
155. Sethi S, Berenson CL, Clare RL, Eberhardt E, Wrona C. Association Of Impaired Innate Immune

- Responses Of COPD Alveolar Macrophages With Toll-Like Receptor Polymorphisms. *Am J Respi Crit Care Med* 2011; 183: 4100
156. Shen XY, Shi RH, Wang Y, Zhang HJ, Zhou XQ, Shen FC, Li KB. Toll-like receptor gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory bowel disease in Chinese Han and Caucasian populations. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2010; 90: 1416-1420
157. Silverman EK. Genetic Epidemiology of COPD. *Chest* 2002; 121: 1-6
158. Smit JJ, Rudd BD, Lukacs NW. Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *J Exp Med* 2006; 203: 1153-1159
159. Steele MP, Brown KK. Genetic predisposition to respiratory diseases: infiltrative lung diseases. *Respiration* 2007; 74: 601-608
160. Stevenson CS, Underwood DC. In vivo modeling systems for chronic obstructive pulmonary disease. *Progress in Inflammation Research* 2006; 29-57
161. Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, Cosgrove GP, Brown KK, Kotzin BL, Voelkel NF, Fontenot AP. Activated oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 486
162. Tabeta K, Hoebe K, Janssen EM, Du X, Georgel P, Crozat K, Mudd S, Mann N, Sovath S, Goode J, Shamel L, Herskovits AA, Portnoy DA, Cooke M, Tarantino LM, Wiltshire T, Steinberg BE, Grinstein S, Beutler B. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* 2006; 7: 156-164
163. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like Receptors. *Annual Review of Immunology* 2003; 21: 335-376
164. Tanabe T, Ishige I, Suzuki Y, Aita Y, Furukawa A, Ishige Y, Uchida K, Suzuki T, Takemura T, Ikushima S, Oritsu M, Yokoyama T, Fujimoto Y, Fukase K, Inohara N, Nunez G, Eishi Y. Sarcoidosis and NOD1 variation with impaired recognition of intracellular *Propionibacterium acnes*. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 794-801
165. Tao K, Fujii M, Tsukumo S, Maekawa Y, Kishihara K, Kimoto Y, Horiuchi T, Hisaeda H, Akira S, Kagami S, Yasutomo K. Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 905-909
166. Tchaptchet S, Kirberg J, Freudenberg N, Schamel WW, Galanos C, Freudenberg MA. Innate, antigen-independent role for T cells in the activation of the immune system by *Propionibacterium acnes*. *Eur J Immunol* 2010; 40: 2506-2516
167. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 307-336

168. Thorley AJ, Tetley TD. Pulmonary epithelium, cigarette smoke, and chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007; 2: 409-428
169. Thuong NT, Hawn TR, Thwaites GE, Chau TT, Lan NT, Quy HT, Hieu NT, Aderem A, Hien TT, Farrar JJ, Dunstan SJ. A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. *Genes and Immunity* 2007; 8: 422-428
170. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 955-962
171. de Torres JP, Casanova C, Hernández C, Abreu J, Aguirre-Jaime A, Celli BR. Gender and COPD in Patients Attending a Pulmonary Clinic. *Chest* 2005; 128: 2012-2016
172. Tsoumakidou M, Demedts IK, Brusselle GG, Jeffery PK. Dendritic cells in chronic obstructive pulmonary disease: new players in an old game. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1180-1186
173. Tukhvatulin AI, Logunov DY, Shcherbinin DN, Shmarov MM, Naroditsky BS, Gudkov AV, Gintsburg AL. Toll-like receptors and their adapter molecules. *Biochemistry (Mosc)* 2010; 75: 1098-1114
174. Török H, and Glas J, Tonenchi L, Endres I, Lohse P, Brand S, Folwaczny M, Ochsenkuhn T, Folwaczny C. Assoziation von Polymorphismen im TLR9-Gen mit NOD2/CARD15-Mutationen beim Morbus Crohn. *Chirurgisches Forum* 2006; 197-199
175. Török HP, Glas J, Endres I, Tonenchi L, Teshome MY, Wetzke M, Klein W, Lohse P, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Göke B, Folwaczny C, Müller-Myhsok B, Brand S. Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 1723-1733
176. Török HP, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C. Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology* 2004; 127: 365-366
177. Valentonyte R, Hampe J, Huse K, Rosenstiel P, Albrecht M, Stenzel A, Nagy M, Gaede KI, Franke A, Haesler R, Koch A, Lengauer T, Seegert D, Reiling N, Ehlers S, Schwinger E, Platzer M, Krawczak M, Müller-Quernheim J, Schürmann M, Schreiber S. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet* 2005; 37: 357-364
178. Van Pottelberge GR, Bracke KR, Van den Broeck S, Reinartz SM, van Drunen CM, Wouters EF, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG. Plasmacytoid dendritic cells in pulmonary lymphoid follicles of patients with COPD. *Eur Respir J* 2010; 36: 781-791
179. Varkey JB, Varkey B. Viral infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14: 89-94

180. Velez DR, Wejse C, Stryjewski ME, Abbate E, Hulme WF, Myers JL, Estevan R, Patillo SG, Olesen R, Tacconelli A, Sirugo G, Gilbert JR, Hamilton CD. Variants in toll-like receptors 2 and 9 influence susceptibility to pulmonary tuberculosis in Caucasians, African-Americans, and West Africans. *Human genetics* 2010; 127: 65-73
181. Veltkamp M, van Moorsel CH, Rijkers GT, Ruven HJ, Grutters JC. Genetic variation in the Toll-like receptor gene cluster (TLR10-TLR1-TLR6) influences disease course in sarcoidosis. *Tissue Antigens* 2012; 79: 25-32
182. Veltkamp M, Grutters JC, van Moorsel CH, Ruven HJ, van den Bosch JM. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphism Asp299Gly is not associated with disease course in Dutch sarcoidosis patients. *Clin Exp Immunol* 2006; 145: 215-218
183. Veltkamp M, Wijnen PA, van Moorsel CH, Rijkers GT, Ruven HJT, Heron M, Bekers O, Claessen AME, Drent M, van den Bosch JMM, Grutters JC. Linkage between Toll-like receptor (TLR) 2 promotor and intron polymorphisms: functional effects and relevance to sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 2007; 149: 453-462
184. Veltkamp M, Van Moorsel CH, Rijkers GT, Ruven HJ, Van Den Bosch JM, Grutters JC. Toll-like receptor (TLR)-9 genetics and function in sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 2010; 162: 68-74
185. Villani AC, Lemire M, Thabane M, Belisle A, Geneau G, Garg AX, Clark WF, Moayyedi P, Collins SM, Franchimont D, Marshall JK. Genetic Risk Factors for Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome Following a Waterborne Outbreak of Gastroenteritis. *Gastroenterology* 2010; 138: 1502-1513
186. Vogelmeier C, Buhl R, Criée CP, Gillissen A, Kardos P, Köhler D, Magnussen H, Morr H, Nowak D, Pfeiffer-Kascha D, Petro W, Rabe K, Schultz K, Sitter H, Teschler H, Welte T, Wettengel R, Worth H; Deutsche Atemwegsliga; Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin. [Guidelines for the diagnosis and therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin]. *Pneumologie* 2007; 61: 1-40
187. Waldner H, Collins M, Kuchroo VK. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 990-997
188. Wedzicha JA. Role of viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 115-120
189. Wilkinson TM, Donaldson GC, Johnston SL, Openshaw PJ, Wedzicha JA. Respiratory Syncytial Virus, Airway Inflammation and FEV1 Decline in Patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 871-876
190. Xu X, Li B, Wang L. Gender difference in smoking effects on adult pulmonary function. *Eur Respir J* 1994;7: 477-483

191. Xue Y, Jin L, Li AZ, Wang HJ, Li M, Zhang YX, Wang Y, Li JC. Microsatellite polymorphisms in intron 2 of the toll-like receptor 2 gene and their association with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Han Chinese. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2010; 48: 785-789
192. Yalcintepe, J. Pattern recognition receptor (PRR)-Expression der BAL-Zellen von Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen und deren funktionelle Relevanz. Diss., Univ. Freiburg 2006
193. Ye BD, Yang SK, Song K, Yang DH, Yoon SM, Kim KJ, Byeon JS, Myung SJ, Kim JH. Association of Toll-Like Receptor Gene with Crohn's Disease in Koreans. *Korean J Gastroenterol* 2009; 54: 377-383
194. Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Nishiwaki T, Kitabatake M, Ueha S, Narumi S, Morikawa S, Ezaki T, Lu B, Gerard C, Ishikawa S, Matsushima K. Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* 2004; 16: 915-928
195. Ziemssen F, Schnepf R, Pfeiffer A. Die SSCP-(Single Strand Conformation Polymorphism-) Analyse zum Nachweis von Punktmutationen. *Medizinische Klinik* 2001; 96: 515-520
196. Zuniga EI, McGavern DB, Pruneda-Paz JL, Teng C, Oldstone MB. Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat Immunol* 2004; 5: 1227-1234

Danksagung

Für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, seine Betreuung und weitreichende Unterstützung danke ich ganz besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christian Grohé.

Herrn PD Dr. Stefan Pabst danke ich sehr herzlich für die Betreuung meiner Arbeit, seine Unterstützung, Geduld und die sehr hilfreiche und konstruktive Kritik, die zum Gelingen der Arbeit enorm beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. Georg Nickenig danke ich als Klinikdirektor für die freundliche Genehmigung dieser Promotionsarbeit.

Bei Frau Martina Lennarz bedanke ich mich für die präzise labortechnische Einweisung und ihren permanenten Einsatz für uns Doktoranden.

Mein Dank gilt außerdem meinen Mitdoktoranden, ohne die die Arbeit im Labor bestimmt nicht so viel Freude gemacht hätte.

Olga Renz, Dr. Horst Bradler und Irmela Kruse gilt mein besonderer Dank für die konstruktive Kritik meiner literarischen Bemühungen.

Nicht zuletzt gilt mein spezieller Dank meinen Eltern, meiner Großmutter, meiner Schwester und allen Freunden, die mich auf ihre ganz persönliche Weise unterstützt haben.

An dieser Stelle möchte ich aus tiefstem Herzen meinem Ehemann Dr. Dirk Bradler für seine uneingeschränkte Liebe während dieser nicht ganz einfachen Zeit und unserer Tochter Anna danken.