

**Einfluss von *CARD15* Haplotypen auf die Entstehung und den Verlauf
der Sarkoidose**

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

Martha Katharina Golebiewski
aus Lniano/Polen

2012

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. C. Grohé
2. Gutachter: Professor Dr. med. R. Meyer

Tag der Mündlichen Prüfung: 07.06.2012

Aus der Medizinischen Klinik II der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. med. G. Nickenig

Diese Dissertation ist meinen Eltern gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
2	EINLEITUNG	10
	2.1 Definition der Sarkoidose	10
	2.2 Ätiologie der Sarkoidose	10
	2.3 Epidemiologie der Sarkoidose	11
	2.4 Klinik der Sarkoidose	12
	2.4.1 Pulmonaler Befall.....	14
	2.4.2 Neurosarkoidose.....	15
	2.4.3 Kardialer Befall.....	15
	2.4.4 Hautbefall.....	16
	2.4.5 Therapie.....	16
	2.5 Pathologie der Sarkoidose	17
	2.6 Diagnostik der Sarkoidose	18
	2.6.1 Bildgebung	18
	2.6.2 Bronchoalveoläre Lavage (BAL).....	20
	2.6.3 Biopsie/Histologie.....	20
	2.6.4 Lungenfunktionsuntersuchung.....	21
	2.6.5 Laborchemische Untersuchungen	21
	2.7 Pathogenese der Sarkoidose	22
	2.8 Molekulargenetischer Hintergrund	26
	2.8.1 Molekulargenetische Untersuchungen	26
	2.8.2 Der genetische Hintergrund der Sarkoidose	31
	2.9 Kandidatengen <i>CARD15</i> und seine Polymorphismen	35
	2.10 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	40
3	MATERIAL UND METHODEN	41
	3.1 Probanden	41
	3.2 Materialien	42
	3.2.1 Chemikalien für die DNA-Extraktion:.....	42
	3.2.2 Geräte für die DNA-Extraktion:.....	42
	3.2.3 Software für die iPLEX Reaktion:	43
	3.2.4 Reagenzien für die iPLEX-Reaktion (nach Sequenom Standard 2007):	43
	3.3 Durchführung der Untersuchung	44

3.3.1	Blutentnahme	44
3.3.2	MassARRAY System-iPLEX Verfahren.....	44
3.3.2.1	SNP- Auswahl und Assay Design.....	47
3.3.2.2	Isolierung genomischer DNA aus Vollblut nach der Aussalzmethode.....	49
3.3.2.3	PCR Amplifikation	50
3.3.2.4	SAP(shrimp alkalinephosphatase) Verfahren	51
3.3.2.5	iPLEX Reaktion- Primer Extension.....	52
3.3.2.6	Entsalzung und SpectroCHIP Bioarray.....	52
3.3.2.7	MALDI-TOF MS	53
3.4	Statistik	54
3.4.1	Statistische Variablen.....	54
3.4.2	Statistische Verfahren	55
4	ERGEBNISSE	56
4.1	Studienaufbau und -ziel.....	56
4.2	Statistische Datenanalyse.....	56
4.2.1	Demographische Basisdaten	56
4.2.2	Verteilung von Genotypen, Allelfrequenzen und Haplotypen.....	57
4.2.2.1	SNP- Analyse	57
4.2.2.2	Haplotypanalyse.....	61
4.2.2.3	Pseudofallkontroll Analyse	63
5	DISKUSSION.....	65
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	73
7	PUBLIKATIONEN	74
8	LITERATURVERZEICHNIS	75
9	DANKSAGUNG	95
10	LEBENS LAUF	96

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACCESS	A Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis
ACE	Angiotensin-I-Converting-Enzym, Angiotensin-I-Konversionsenzym
<i>ANXA-11</i>	<i>Annexin-11</i>
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ATS	American Thoracic Society
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaar
BTNL-2	Butyrophilin-like 2
BS	Blau Syndrom
C	Cytosin
<i>CARD15</i>	<i>Caspase Recruitment Domain</i>
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand
Chron.	chronisch
CMA1	Chymase 1, mast cell
CO	Kohlenstoffmonoxid
D	Deletion
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DLco	Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
EBUS	Endobronchialer Ultraschall
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOS	Early Onset Sarcoidosis
ERS	European Respiratory Society
EtOH	Ethanol

FAS	Fatigue Assessment Scale, Müdigkeitsfragebogen
FEV ₁	Forciertes Expiratorisches Volumen in einer Sekunde, Einsekundenkapazität
FVC	Forcierte Vitalkapazität
G	Guanin
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HLA	Human lymphocyte antigene, humanes Lymphozyten-Antigen
HR-CT	High Resolution Computer Tomography, Hochauflösende Computertomographie
I	Insertion
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
iVC	inspiratory Vital Capacity, inspiratorische Vitalkapazität
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MC	Morbus Crohn
n	Anzahl der Merkmalsausprägungen
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nuclear factor-κB
nm	Nanometer
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
OH [·]	Hydroxylradikal
OR	Odds ratio, Quotenverhältnis
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
Pat.	Patient/en

p _a CO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
p _a O ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
SACE	Serum Angiotensin-Converting-Enzyme
sIL-R2	soluble Interleukin-2-Receptor; löslicher Interleukin-2-Rezeptor
sec	Sekunden
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Thymin
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
TH1	T-Helfer-1-Zellen
TH2	T-Helfer-2-Zellen
TLC	Total Lung Capacity, Totale Lungenkapazität
TLCOc SB	Carbon monoxide lung transfer factor in single breath, Hb-korrigierter CO-Transferfaktor (in Single-Breath-Technik)
TLCOc/VA	Carbon monoxide lung transfer factor per alvolar volume, Hb-korrigierter CO-Transferfaktor geteilt durch das Alveolarvolumen
TBLB	Transbronchiale Lungenbiopsie
TBNA	Transbronchiale Nadel Aspiration
TLR	Toll-like Receptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris-HCl	Trishydroxymethylaminomethan-Salzsäure
VC	Vital Capacity, Vitalkapazität
WASOG	World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
WHOQOL	World Health Organization Quality of Life, Fragebogen der Weltgesundheitsorganisation zur Erfassung der Lebensqualität

2 EINLEITUNG

2.1 Definition der Sarkoidose

Die Sarkoidose, auch Morbus Boeck genannt, ist eine inflammatorische, multifaktorielle Systemerkrankung, charakterisiert durch eine erhöhte Immunreaktion des Körpers auf einen noch unbekanntem Auslöser. Zum ersten Mal beschrieben wurde diese Erkrankung im Jahre 1886 von dem Dermatologen und Chirurgen J. Hutchinson. Bis heute ist die genaue Ätiologie nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich kommt es bei einer genetischen Suszeptibilität nach Exposition mit einem noch unbekanntem exogenen Stimulus zum Ausbruch der Erkrankung (Lympny und du Bois, 1997; McGrath et al., 2001; Müller-Quernheim, 1998). Die Sarkoidose tritt weltweit auf; jedes Alter, alle ethnischen Gruppen und beide Geschlechter können betroffen sein (Sharma, 2005). Klinisch manifestiert sich die Sarkoidose sehr variabel. Von der akuten Form, z.B. dem Löfgren Syndrom, bis hin zu mehreren Stadien der chronisch persistierenden Form zeigt sie ihre Ausprägung. Betroffen sind am häufigsten Lunge und mediastinale Lymphknoten, allerdings können alle anderen Organe, insbesondere Haut und Augen an der Erkrankung beteiligt sein (Hunninghake et al., 1999). Charakteristische pathologische Befunde sind nicht verkäsende Epitheloidzellgranulome, die auf eine übersteigerte inflammatorische Aktivität von CD4 T-Lymphozyten und Makrophagen zurückzuführen sind (Drake und Newman, 2006). Laut der American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS)/World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) (1999) ist die Diagnose erst nach klinisch-radiographischen Belegen, unterstützt durch den histologischen Nachweis nichtverkäsender Epitheloidzellgranulome, zu stellen. Granulome anderer Ursachen müssen jedoch ausgeschlossen werden.

2.2 Ätiologie der Sarkoidose

Die Ätiologie der Sarkoidose ist bis heute nicht vollständig geklärt trotz der Tatsache, dass diese Erkrankung schon seit über 130 Jahren bekannt ist. Dies veranschaulicht die Komplexität und Variabilität der Sarkoidose. Nach heutigem Wissensstand vermutet man einen polyätiologischen Hintergrund. Wahrscheinlich spiegelt die Sarkoidose das Produkt aus einem unbekanntem exogenen Stimulus und einer endogenen prädisponierenden Suszeptibilität wider. (Lympny und du Bois, 1997; McGrath et al., 2001; Müller-Querenheim, 1998). Unterstützt wird diese Hypothese durch beobachtete familiäre Häufungen und unterschiedliches Auftreten der Erkrankung abhängig vom ethnischen Hintergrund (James, 1976; Jörgensen, 1964; Kirsten, 1995;

Nowack und Goebel, 1987; Sharma et al., 1976; Rybicki et al., 1996; Wiman, 1972; Wurm et al., 1962).

Ribicki et al. zeigten in einer 2001 durchgeführten Studie ein signifikant erhöhtes Risiko an einer Sarkoidose zu erkranken bei Verwandten 1. und 2. Grades. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Sarkoidosepatient von einem weiteren betroffenen Geschwister- oder Elternteil berichtete, war fünf Mal höher als bei den Kontrollpersonen. Sverrild et al. (2008) beschäftigten sich in einer Studie mit dem Erkrankungsrisiko bei Zwillingen, wobei einer an Sarkoidose erkrankt war. Ihre Ergebnisse zeigten, dass das hereditäre Risiko eine Sarkoidose zu bekommen bei monozygoten Zwillingen um das 80-fache und bei dizygoten Zwillingen um das 7-fache erhöht war im Vergleich zum Normalkollektiv. Daraus folgerten sie, dass die genetische Disposition eine immens wichtige Rolle für die Ätiologie der Sarkoidose spielen muss. Die Tatsache, dass bei monozygoten Zwillingen nicht immer beide erkranken, lässt wiederum Rückschlüsse auf den Einfluss eines exogenen Stimulus zu. Man geht von einem multifaktoriellen Geschehen aus, wobei wahrscheinlich erst das Zusammenspiel aus verschiedenen Genpolymorphismen zur genetischen Prädisposition beiträgt (Smith et al., 2008). Anfänglich suchte man nach einer infektiösen Ursache und brachte lange Zeit den Erreger der Tuberkulose (*Mycobacterium tuberculosis*) mit der Sarkoidose in Verbindung. Die "World Association Of Sarcoidosis And Other Granulomatous Disorders" (WASOG) benannte außerdem in den neunziger Jahren noch Borellien, Mykoplasmen, Herpesviren, Aluminium, Zirkonium, Talk, Kieferpollen und Feinstaub als mögliche zu untersuchenden Auslöser (Costabel und Hunninghake, 1999). Bis heute konnte jedoch kein Nachweis für eine eindeutige Verbindung hergestellt werden (Drake und Newman, 2006).

2.3 Epidemiologie der Sarkoidose

Die Sarkoidose tritt als entzündlich granulomatöse Erkrankung überall auf der Welt auf. Man hat sie sowohl in allen ethnischen Gruppen, den beiden Geschlechtern als auch in allen Altersgruppen diagnostizieren können. Aufgrund von fehlenden standardisierten Studien, d.h. keiner einheitlichen Diagnostik zur Erfassung der Patienten und keiner standardisierten Patientenrekrutierung, können die Daten zu Inzidenz, Prävalenz, Morbidität und Mortalität nicht exakt evaluiert werden. Darüber hinaus ist die Symptomatik der Sarkoidose so variabel im Befall und Ausmaß, dass es bei vielen Betroffenen nie zu einer klinischen Manifestation und somit zur Diagnose der Erkrankung kommt. In einer Kohorte von über einer Million amerikanischen Soldaten wurde ein Röntgen-Thorax Screening durchgeführt. Bei 134 Soldaten wurde eine

Sarkoidose diagnostiziert, 48,5 % von ihnen hatten jedoch zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nie Beschwerden (Sartwell und Edwards, 1974).

Die Schätzungen der weltweiten jährlichen Inzidenz der Sarkoidose belaufen sich auf 16,5/100.000 bei Männern und 19/100.000 bei Frauen (Hillerdal et al., 1984). Die Ergebnisse der ermittelten Prävalenzen reichen von 0,03 in Korea bis zu 640 pro 100 000 in Schweden (Hägerstrand und Linell, 1964; Kim, 2001). Sowohl in den Inzidenz- als auch in den Prävalenzraten ist ein Nord-Süd-Gefälle auffallend mit einer Häufung der Fälle in den nördlichen Breiten. Anhand von Röntgen-Thorax-Aufnahmen berechneten Siltzbach et al. (1974) eine Prävalenz von nur 0,2 in Portugal, in Schweden kamen sie auf 64 pro 100.000. 28,2/100.000 betrug die Prävalenz in Finnland, die Inzidenz mit 11,4 pro 100.000 pro Jahr war auch eher hoch (Pietinalho et al., 1995). Die Inzidenz in Deutschland wird mit 10/100.000/Jahr angegeben (Scharkoff, 1993). Dass die Sarkoidose in den verschiedenen ethnischen Gruppen unterschiedlich häufig gesehen und diagnostiziert wird, zeigen auch Studien aus den USA. Dort reichen die Inzidenzraten von 10,9 in der weißen Bevölkerung bis zu 35,5 in der afroamerikanischen Bevölkerung (Rybicki et al., 1997). Des Weiteren zeigt sich eine Diskrepanz sowohl zwischen beiden Geschlechtern als auch in den unterschiedlichen Altersgruppen. Frauen erkranken nach Hillerdal et al. (1984) mit einer höheren Inzidenzrate von 21,5 und meist innerhalb zwei verschiedener Altersgipfeln, einmal zwischen 25-29 und dann wieder im Alter von 65-69 Jahren (Byg et al., 2003). Männer sind hingegen mit einer niedrigeren Inzidenzrate von 16,5 hauptsächlich im Alter zwischen 30-34 Jahren von der Sarkoidose betroffen (Byg et al., 2003). Die Inzidenz bei Kindern ist mit 1,2/100.000/Jahr bei den 14 bis 15 Jährigen und mit 0,06/100.000/Jahr vor dem 4. Lebensjahr eher gering (Hoffmann et al., 2004). Die Mortalitätsrate schwankt zwischen einem und sechs Prozent (Chappell et al., 2000; Hillerdal et al., 1984; Neville et al., 1983).

2.4 Klinik der Sarkoidose

Die klinische Erscheinungsform der Sarkoidose ist sehr variabel. Jedes Organsystem kann betroffen sein, auch wenn die Lungenbeteiligung mit 90 % deutlich überwiegt (Lynch et al., 1998). Mit abfallender Häufigkeit wäre der Befall folgender Organe zu nennen: Lymphsystem (ca. 30 %), Haut, Leber, Milz, Augen, Knochen, und endokrine Drüsen (Smith et al., 2008). Die Symptomatik ist sehr heterogen, unspezifisch und nur bei ca. 30 % der Patienten überhaupt vorhanden (Cavazza et al., 2009). Zu den Beschwerden gehören Fieber, Arthralgien, Nachtschweiß, Gewichtsabnahme sowie besonders häufig Müdigkeit und Abgeschlagenheit.

30-60 % der an Sarkoidose Erkrankten weisen gar keine Symptome auf und werden rein zufällig durch eine röntgenologische Untersuchung erstdiagnostiziert (Hillerdal et al., 1984; Lynch et al., 1997; Reich und Johnson, 1985; Reich, 2002). Man teilt die Erkrankung, je nach Verlauf, in eine akute, d.h. spontan ausheilende, nicht rezidivierende und in eine chronische, zum Teil rezidivierende Form ein. Besonders auffallend ist der Zusammenhang zwischen bestimmten Symptomen und der Progressivität sowie Rasse, Geschlecht oder dem Alter. Akute, spontan ausheilende Krankheitsbilder werden eher bei der weißen Bevölkerung beobachtet. Im Gegensatz dazu herrscht bei Afroamerikanern die chronische, progressive Form vor (ATS/ERS/WASOG Committee, 1999; Baughman et al., 2001; Baughman et al., 2003; Nunes et al., 2005; Siltzbach et al., 1974). Diese ist charakterisiert durch einen schleichenden Beginn und eine sehr variable Ausprägung. Ein höheres Alter bei Erstdiagnose, schwarze Rasse, ein Lupus pernio, chronische Uveitis, chronische Hypercalcämie, Nephrocalcinose, progressive pulmonale Sarkoidose, cystische Knochenläsionen, Neurosarkoidose oder eine myokardiale Beteiligung werden mit einer chronischen oder progressiven Form assoziiert. Insgesamt geht man bei ca. zwei Drittel aller Sarkoidosepatienten von einer Remission ohne erforderliche medikamentöse Therapie aus. Ein Drittel aller Erkrankten leidet jedoch an einer chronischen Sarkoidose, die bei ca. 10 % zu einer progressiven Organbeteiligung führen kann. Weniger als 5 % sterben an den Komplikationen wie einer Lungenfibrose, einem Herzversagen oder einem schweren neurologischen Befall (Cavazza et al., 2009).

Eine Sonderform der akuten Sarkoidose ist das Löfgren-Syndrom, charakterisiert durch Fieber, bilaterale Lymphadenopathie, Sprunggelenksarthritiden und Erythema nodosum (Grunewald et al., 2004). Patienten mit dieser Symptomatik zeigen sehr oft einen günstigen Verlauf mit einer spontanen Remission. Aus den Ergebnissen einer aktuellen Studie von Grunewald und Eklund (2009) geht hervor, dass 81 % der Löfgren-Patienten einen selbstlimitierenden Verlauf aufweisen. Diese Studie beschäftigte sich vor allem mit der Prognose abhängig von dem HLA-DRB1*03 Gen. Die Daten belegen, dass fast alle HLA-DRB1*03 positiven Patienten einen günstigen, ausheilenden Verlauf hatten. Im Gegensatz dazu waren HLA-DRB1*03 negative Patienten einem 50 %igen Risiko ausgesetzt, an einer chronischen Sarkoidose zu erkranken. Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte auch ein geschlechterspezifisches Auftreten. Frauen erkrankten häufiger am Löfgren-Syndrom, welches sich vorwiegend klinisch durch ein Erythema nodosum zeigte. Männer mit Löfgren Syndrom hingegen litten eher an einer Arthritis ohne Erythema nodosum (Grunewald und Eklund, 2007).

Im Folgenden werden einige Erscheinungsformen der Sarkoidose dargestellt. Diese reichen aber bei weitem nicht aus, um die vollständige Klinik zu erläutern, da jedes Organsystem betroffen sein kann. Es wird nur auf die wichtigsten Manifestationen eingegangen.

2.4.1 Pulmonaler Befall

90 % aller Sarkoidosepatienten weisen eine Lungenbeteiligung auf und bei ca. 33 % findet man einen Befall des Lymphsystems. 60-90 % der Fälle werden im radiologischen Stadium I diagnostiziert (siehe Kapitel Diagnostik), das meist spontan ausheilt (Lynch et al., 1997; Pietinalho et al., 1999). Bei 10-30 % kommt es zu einem chronischen Verlauf, der lebensgefährliche Komplikationen mit sich bringen kann, wie eine Lungenfibrose, eine pulmonale Hypertonie oder eine Infektion mit den Aspergillen (Judson, 2008). Symptome eines pulmonalen Befalls äußern sich nur in 30-50 % der Fälle durch trockenen Husten, Dyspnoe und Brustschmerz (ATS/ERS/WASOG, 1999). Das klassische Merkmal auf einer Röntgen-Thorax Aufnahme ist eine bilaterale Lymphadenopathie, welche bei ca. drei Viertel der Patienten vorkommt (Lynch et al., 1997).

Eine Lungenfibrose ist eine ernst zu nehmende Komplikation der pulmonalen Sarkoidose, die bei 10-30 % der Patienten mit einem chronischen Krankheitsverlauf auftritt. In westlichen Ländern stellt sie die Haupttodesursache bei Sarkoidosepatienten dar (Nunes et al., 2007). Dabei kommt es zu einer massiv unkontrollierten Ausbreitung von Granulomen, die sich weder spontan noch mit einer immunsuppressiven Therapie zurückbilden (Semenzato et al., 2005). Die Entwicklung einer Fibrose wird moduliert durch Makrophagen, Neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Mastzellen (Bjermer et al., 1987; Inoue et al., 1996).

Man geht davon aus, dass vor allem die Makrophagen in Sarkoidose-Granulomen durch die Produktion von Wachstumsfaktoren wie TGF- β , dem „Platelet-derived growth factor“ und dem „Insulin-like growth factor-1“ zu einer unproportionalen Vermehrung der Extrazellulärmatrix und einer Fibroblastenproliferation führen (Semenzato et al., 2005). Außerdem kommt es durch die von den Makrophagen ausgeschütteten Cytokine (IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α und GM-CSF) zu einer Überproduktion von Stickstoffmonoxid in den Granulomen (Ishioka et al., 1996; Homma et al., 1995; Bost et al., 1994; Facchetti et al., 1999). Diese Prozesse resultieren unter anderem in lokalen Mikroverletzungen, Basalmenbranschäden mit Permeabilitätserhöhung und einer Zerstörung der normalen parenchymalen Lungenstruktur (Agostini und Semenzato, 1998).

Eine pulmonale Hypertension durch die Obliteration der pulmonalen Gefäße oder eine Bronchusstenose können mögliche Komplikationen der fibrotischen Veränderungen sein (Jannuzzi et al., 2007).

2.4.2 Neurosarkoidose

Diese eher seltene Form der Sarkoidose kommt mit einer Inzidenzrate von ca. 5-15 % vor (Stern et al., 1985; James und Sharma, 1967). Der neurologische Befall bleibt oft subklinisch. Autopsien von Sarkoidosepatienten ergeben erstaunlicherweise bei bis zu 25 % eine Beteiligung des Nervensystems (Jannuzzi et al., 2007). Jeder Bereich des Nervensystems kann grundsätzlich betroffen sein, obgleich Hirnnerven, Hypothalamus und Hypophyse die Hauptmanifestationsorte der Sarkoidose darstellen (Stern et al., 1985). Die Symptomatik kann sich sehr variabel äußern, weshalb sich die Diagnosestellung oft schwierig gestaltet. Zu den häufigsten Symptomen zählen Hirnnervenausfälle, Kopfschmerzen, Ataxie, kognitive Dysfunktionen, Schwäche und Krampfanfälle (Scott et al., 2007). Der Ausfall des N. facialis überwiegt und führt deshalb in den meisten Fällen einer Neurosarkoidose zusammen mit bildgebenden Verfahren und Liquoruntersuchungen zur Diagnosestellung (Hoitsma und Sharma, 2005). Eine aseptische Meningitis, Hydrozephalus, hypothalamische Dysfunktionen oder eine Enzephalopathie gehören zu den Komplikationen einer Neurosarkoidose und können zu lebensbedrohlichen Zuständen führen (Jarnier und Seriès, 1999).

2.4.3 Kardialer Befall

Bei 5 % aller Sarkoidosepatienten wird ein kardialer Befall diagnostiziert. Granulome im Herzen während einer Autopsie werden dagegen bei 25 % der Erkrankten gefunden (Sherma et al., 1993; Silverman et al., 1978). Aus diesen Zahlen geht hervor, dass auch viele Patienten mit kardialen Befall gar keine Symptomatik während ihres Lebens aufweisen. Oft kommen die Beschwerden plötzlich und äußern sich in Arrhythmien, die bis zum plötzlichen Herztod führen können (Boglioli et al., 1998).

Eine kardiale Sarkoidose stellt nach dem Lungenversagen die zweithäufigste mit der Sarkoidose assoziierte Todesursache dar (Gideon und Mannino, 1996; Baughman et al., 1997). Generell können alle Strukturen des Herzens von der Granulombildung betroffen sein, meistens sind jedoch das Myokard, insbesondere des linken Ventrikels, und das Reizleitungssystem beeinträchtigt (Roberts et al., 1977). Klinisch kann sich die kardiale Sarkoidose als eine dilatative Kardiomyopathie mit Verlust der Muskelfunktion oder in Tachyarrhythmien und Bradyarrhythmien manifestieren (Jannuzzi et al., 2007). Herzklappenfunktionsstörungen äußern sich hauptsächlich

in einer Mitralklappeninsuffizienz aufgrund einer granulomatösen Infiltration des korrespondierenden Papillarmuskels oder einer Veränderungen der Ventrikelstruktur (Zoneraich et al., 1974). Da der plötzliche Herztod das erste Symptom einer Herzbeteiligung sein kann, empfiehlt das ATS/ERS/WASOG Committee (1999) bei allen diagnostizierten Sarkoidosepatienten ein 12-Kanal-EKG durchzuführen, um eine eventuelle Herzbeteiligung zu erkennen. Eine weiterführende Diagnostik beinhaltet eine Echokardiographie, eine Positronenemissionstomographie und eine Magnetresonanztomographie. Der Goldstandard ist die endomyokardiale Biopsie, die jedoch aufgrund eines häufig lokalisierten und damit schwer zu biopsierenden Granulombefalls eine Sensitivität von weniger als 25 % erreicht (Uemura et al., 1999).

2.4.4 Hautbefall

Eine Hautbeteiligung kommt in 25-35 % aller Sarkoidosepatienten vor, welche in spezifische, granulomatös entzündliche und unspezifische Läsionen unterteilt wird (Jannuzzi et al., 2007). Das Erythema nodosum, wie auch andere unspezifische Hautveränderungen, weisen eine gute Prognose auf und verschwinden innerhalb weniger Wochen (Jannuzzi et al., 2007). Eine besondere spezifische Läsion ist der perinasale Lupus Pernio, welcher mit einem chronischem Verlauf und schwerer pulmonaler Beteiligung assoziiert ist (Yanardag et al., 2003).

2.4.5 Therapie

Grundsätzlich wird primär keine medikamentöse Therapie empfohlen, da immerhin zwei Drittel aller Patienten ohne Therapie spontan genesen. Es gibt allerdings Sonderfälle, wo eine medikamentöse Intervention indiziert ist. Patienten mit einer fortgeschrittenen oder progressiven pulmonalen Sarkoidose, einer Augenbeteiligung, einer Neurosarkoidose und Patienten mit einem kardialen Befall sollten auf jeden Fall immunsuppressiv behandelt werden. Des Weiteren stellen natürlich Erkrankte in einem progressiven Stadium oder in lebensbedrohlichen Zuständen eine therapiebedürftige Gruppe dar (Judson, 2007). Corticosteroide sind generell Mittel der Wahl, jedoch gibt es mittlerweile einige (in Deutschland für diese Indikation nicht zugelassene) Alternativen, die in Tabelle 1 mit den Indikationen und Dosisangaben vorgestellt werden.

Medikamente	Dosis	Indikation	Erläuterung
Prednison (Corticosteroid)	0,5-1 mg/kg/d Anfangsdosis	bei jeder Organbeteiligung	höhere Dosen werden bei einem kardialen Befall oder bei einer Neurosarkoidose benötigt. Topische Therapie bei einer anterioren Uveitis oder lokalen Hautläsionen
Methotrexat	10-25 mg/Woche	bei Lungen-, Haut-, Augen-, Gelenk-, Leber- und Herzbeteiligung sowie bei Neurosarkoidose	Blutbild muss kontrolliert werden. Folsäure kann zugefügt werden.
Chloroquin	250-750 mg/d	bei Lungen-, Haut- und Gelenk-beteiligung sowie bei Neurosarkoidose	häufige Augenuntersuchungen sind erforderlich
Hydroxychloroquin	200-400 mg/d	bei Lungen-, Haut- und Gelenk-beteiligung sowie bei Neurosarkoidose	häufige Augenuntersuchungen sind erforderlich
Pentoxifylline	400-1200 mg/d	bei Lungenbeteiligung	
Cyclophosphamide	500-1000 mg i.v. 3-4/Woche	bei Herzbeteiligung und Neurosarkoidose	nur bei diesen beiden Formen anwenden, da das Risiko von Blasenkrebs besteht
Infliximab	5 mg/kg i.v.	nur bei Herzbeteiligung nicht indiziert	teuer, kann Tuberkulose reaktivieren
Azathioprin	1-3 mg/kg/d Anfangsdosis < 1-3 mg/kg/d Erhaltungsdosis	bei KI gegen Corticosteroide, bei Corticostereoid-Langzeiteinnahme von mehr als 10 mg/d	Gefahr der Knochenmarkschädigung durch unselektive Wirkung

Tabelle 1: Therapiemöglichkeiten der Sarkoidose (modifiziert nach Judson, 2008)

2.5 Pathologie der Sarkoidose

Charakteristisches Kennzeichen der Sarkoidose ist das kompakte, nichtverkäsende Epitheloidzellgranulom, welches typischerweise von hyalinem Kollagen lammelenartig umrandet wird. Im Anfangsstadium kann es von einem ödematösen, aus myofibroblatischem Gewebe bestehenden Randwall umgeben sein (Cavazza et al., 2009; Poletti et al., 2005). Das Granulom besteht sowohl aus hochdifferenzierten Epitheloid- und Riesenzellen vom Langerhans-Typ als auch aus T-Lymphozyten. CD4+-Lymphozyten bilden das Zentrum des Granuloms, wohingegen CD8+-Lymphozyten in der peripheren Zone dominieren (Colby, 1995; Rosen, 1994; Semenzato et al., 1994). Mikroskopisch lassen sich zytoplasmatische Einschlusskörperchen (Schaumannkörperchen) als basophile Kalzifikationen darstellen. Ebenso sieht man glänzende Calciumoxalatkristalle. Fibrotische Umwandlungen können in manchen Fällen innerhalb eines Granuloms beobachtet werden, welche bisweilen peripher beginnen und zum Zentrum hin fortschreiten. Die Folge ist eine komplette Fibrose und/oder eine Hyalinisierung (Poletti et al.,

2005). Auch wenn man bei der Sarkoidose klassischerweise von nichtnekrotisierenden (nichtverkäsenden) Granulomen spricht, haben Cheung et al. (2003) in 20 % der transbronchialen Biopsien kleine, fokale Herde einer zentralen fibrinoiden Nekrose gefunden. Dabei könnte es sich allerdings auch um eine Variante der Sarkoidose handeln, die in der Literatur als nekrotisierende, sarkoidöse Granulomatose bezeichnet wird (Churg et al., 1979; Shirodaria et al., 2003). Im Allgemeinen muss beim Auffinden einer Nekrose auch immer differentialdiagnostisch an eine infektiöse Ursache gedacht werden. Hauptsächlich findet man die Granulome bei einem pulmonalem Befall entlang der pulmonalen Lymphbahnen, der Pleura und der pulmonalen Arterien, Venen und Bronchien (Poletti et al., 2005). Die morphologische Diagnose der pulmonalen Sarkoidose beruht auf drei Hauptkriterien (Freiman und Hardy, 1970; Tuder, 1996):

1. kompakte Granulome umgeben von einem Lymphozyten- und Fibroblastenwall;
2. perilymphatische Verteilung der Granulome;
3. Ausschluss anderer Ursachen.

2.6 Diagnostik der Sarkoidose

Da die klinische Erscheinungsform, der Verlauf und Schweregrad ein sehr heterogenes Bild darstellen, ist es schwierig die Sarkoidose nach genauen Definitionen zu diagnostizieren. Es gibt lediglich Empfehlungen und Algorithmen, an die man sich halten kann. Ausgehend von dem ATS/ERS/WASOG Committee (1999) sollte man zur Diagnosestellung einer Sarkoidose die Symptomatik mit den radiographischen und histopathologischen Befunden evaluieren. Des Weiteren sollte eine andere granulomatöse Erkrankung ausgeschlossen werden.

Da sich die Sarkoidose als eine multisystemische Erkrankung äußert, ist laut Sherma (2005) neben der sicheren Bestätigung der Histologie auch die Beurteilung von Ausdehnung und Schweregrad der Organbeteiligung von großer Bedeutung. Als dritter Punkt der Untersuchungsziele von Sherma (2005) wird die Evaluation eines möglichen medikamentösen Behandlungserfolgs für den Patienten angebracht.

Im Folgenden werden die diagnostischen Möglichkeiten mit ihren Vor- und Nachteilen in Bezug auf die Sarkoidose erläutert.

2.6.1 Bildgebung

Da 90 % der Patienten eine Lungenbeteiligung aufweisen, ist das Röntgen-Thorax eine obligate Untersuchung, wenn der Verdacht einer Sarkoidose vorliegt. Die Befunde zeigen bei 90 % der Patienten mit Lungenbeteiligung ein abnormales Bild. In bis zu 75 % handelt es sich dabei um

eine bihiläre Lymphadenopathie, die von einer Verbreiterung der paratrachealen Lymphknoten begleitet sein kann. Ebenso können bei 25-60 % der Patienten noduläre Infiltrate beobachtet werden, die typischerweise symmetrisch, bilateral und vor allem in den Oberfeldern auftreten (Cavazza et al., 2009; Lynch et al., 1997). Wie die Krankheit selbst, können die Röntgenbilder trotz genannter typischer Merkmale sehr heterogen aussehen und zeigen manchmal Besonderheiten wie z.B. Kavitationen, Bronchialstenosen mit sekundären Atelektasen, Pleuraödeme oder Emphysebullae mit einem Pneumothorax (Chambellan et al., 2005; Hours et al., 2008).

Die Stadieneinteilung erfolgt radiologisch nach Scadding (1961):

Stadium 0: normales Röntgen mit extrathorakalem Befall

Stadium 1: bihiläre Lymphknotenadenopathie

Stadium 2: bihiläre Lymphknotenadenopathie mit parenchymaler Infiltration

Stadium 3: Lungenbefall ohne bihiläre Lymphknotenadenopathie

Stadium 4: irreversible Lungenfibrose

Patienten im Stadium 1 haben eine sehr gute Prognose, da bei 60-90 % der Fälle eine Spontanremission möglich ist. Im Stadium 2 erfolgt eine Remission nur noch in 40-70 % der Fälle. Eher schlecht sieht die Prognose in den Stadien 3 und 4 aus, da nur bei 20 % mit einem Rückgang der Symptome zur rechnen ist (Scadding, 1961; Hillerdal et al., 1984; Rømer, 1982; Neville et al., 1983).

Die Computertomographie hat eine höhere Sensitivität und Spezifität als das Röntgen-Thorax bei der Erkennung einer Sarkoidose. Trotzdem wird es nicht routinemäßig eingesetzt. Laut der Ergebnisse von Costabel et al. (2008) ist die Computertomographie bei nur 30 % der Patienten erforderlich. Dies ist der Fall bei atypischen Röntgenbildern, bei starkem klinischem Verdacht ohne röntgenologische Hinweise und bei Verdacht einer Komplikation oder einer Malignität.

Auch nuklearmedizinische Methoden werden seit den siebziger Jahren begleitend, besonders zur Einteilung der Stadien und als Verlaufskontrolle, eingesetzt. Mit einem Gallium-Scan kann man u.a. entzündliches Gewebe aufdecken. Zur Differenzierung von anderen entzündlichen Erkrankungen gibt es bei Sarkoidosepatienten eine charakteristische Aufnahme des Galliums durch das Gewebe, welche sich durch das Lambda Zeichen (Aufnahme im Hilum und Thorax) und das Panda Zeichen (Aufnahme in den Tränendrüsen) auszeichnet (Sulica et al., 2005). Sensitiver als das Gallium-Scan ist die ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG)-PET (Positron-Emissions-Tomography) bei der Evaluation inflammatorischer Aktivität im Körper (Futamatsu et al., 2006;

Nishiyama et al., 2006). Dieses Verfahren stößt allerdings auch an seine Grenzen bei der Differenzierung zwischen granulomatösen Erkrankungen, Infektionen und Neoplasien (Teirstein et al. 2007). Kaira et al. (2007) haben gezeigt, dass man mit L-[3-¹⁸F]-[alpha]-methyltyrosine (¹⁸F-FMT) PET eine höhere Spezifität erzielt und somit besser zwischen Sarkoidose und malignen Erkrankungen unterscheiden kann.

Die Magnetresonanztomographie spielt vor allem bei der Diagnostik einer kardialen und neurologischen Organbeteiligung eine Rolle.

2.6.2 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die BAL ist eine minimal invasive Untersuchung und zur Diagnosestellung einer Sarkoidose sehr hilfreich. Typischerweise findet man bei Sarkoidosepatienten eine normale oder leicht erhöhte Zellzahl, wobei in bis zu 90 % der Fälle eine erhöhte Lymphozytenkonzentration vorliegt und die Granulozytenzahl normal oder erniedrigt sein kann (Costabel et al., 2005). Hoch spezifisch für eine Sarkoidose ist eine erhöhte CD4/CD8 Ratio. Die Sensitivität dieses Wertes mit 52-59 % ist jedoch eher niedrig. Aus diesem Grund müssen andere interstitielle Lungenerkrankungen ausgeschlossen werden (Costabel et al., 2007).

2.6.3 Biopsie/Histologie

Von jedem befallenen Organ, Hautdefekten und peripheren Lymphknoten sollte zur Diagnostik einer Sarkoidose Material zu histologischen Untersuchung gewonnen werden.

An dieser Stelle wird nur auf die verschiedenen Verfahren zur Biopsiegewinnung bei der pulmonalen Sarkoidose eingegangen, da es sich um die häufigste Form handelt.

Mit Hilfe der flexiblen fiberoptischen Bronchoskopie können transbronchiale Lungenbiopsien (TBLB) entnommen werden. Die Trefferquote eines Materialgewinns bei diesem Verfahren liegt zwischen 40 und 90 % (Gilman und Wang, 1980; Koonitz et al., 1976). Die transbronchiale Nadelaspiration (TBNA) ist ein ähnliches Verfahren, welches sich besonders gut zur Biopsiegewinnung bei einer intrathorakalen Lymphadenopathie eignet.

Trisolini et al., 2004 haben gezeigt, dass die Kombination aus den beiden Methoden das beste diagnostische Ergebnis bringt. Die Komplikationen, wie Pneumothorax oder Hämatorax sollten immer vor Anwendung dieser Verfahren mitbedacht werden.

Neuere Methoden wie die transösophageale Ultraschallgesteuerte Feinnadelbiopsie oder die ultraschallgesteuerte transbrochiale Nadelaspiration (EBUS-TBNA) haben in Studien sehr gute Ergebnisse erzielt und werden in Zukunft eventuell eine breitere Anwendung finden (Annema et al., 2005; Garwood et al., 2007; Michael et al., 2008; Wong et al., 2007).

2.6.4 Lungenfunktionsuntersuchung

Typischerweise zeigen die Resultate einer Lungenfunktionsuntersuchung bei Sarkoidosepatienten eine Restriktion. Diese äußert sich vor allem in einem reduzierten Lungenvolumen, was zur einer reduzierten Vitalkapazität (VC) und einer reduzierten Totalen Lungkapazität (TLC) führt (Costabel et al., 2008; Lynch et al., 1997). Die Diffusionskapazität kann erniedrigt sein, kommt aber erst in einem fortgeschrittenen fibrotischem Stadium zum tragen (Dunn et al., 1988). 20 % der Patienten im Stadium I und 40-70 % der Patienten in den fortgeschrittenen Stadien (II-IV) zeigen mindestens eine dieser restriktiven Veränderungen (Lynch et al., 1997; Rømer, 1982; Neville et al., 1983; Alhamad et al., 2001; Sharma und Johnson, 1988).

Bis zu 30 % der Patienten weisen auch (peripher betonte) obstruktive Einschränkungen auf, die mit der granulomatösen Inflammation der Bronchialschleimhaut in Korrelation gebracht wird. Messen lässt sich diese Atemwegsobstruktion mit dem FEV1 (forciertes expiratorisches Volumen innerhalb einer Sekunde), welches bei ca. 30 % der Fälle reduziert ist (Benatar und Clark, 1974; Costabel et al., 2008).

Der Zusammenhang zwischen den Lungenfunktionsparametern und dem Ausmaß der Lungenbeteiligung lässt sich zwar vage evaluieren, prognostische Aussagen werden daraus aber nicht geschlossen. Dennoch ist diese Untersuchung sinnvoll, um den Verlauf der Lungenbeteiligung zu kontrollieren (Costabel et al., 2008).

2.6.5 Laborchemische Untersuchungen

Es gibt eine Reihe von Laborparametern, die bei einer Sarkoidose erhöht sein können. Viele davon sind sehr unspezifisch und deswegen zur Diagnosestellung nur nebensächlich. Zu diesen Laborwerten gehören die Hypercalzämie, Hypercalzurie (welche zur Nephrocalzinose und Urolithiasis führen kann), Hypergammaglobulinämie und das erhöhte Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) (Smith et al., 2008).

Die Bestimmung von ACE, welches in den Granulomen von Makrophagen produziert wird, ist ein gut etablierter Test. Bei 40-80 % der Sarkoidosepatienten ist es erhöht, kann aber bei Patienten mit aktiver Sarkoidose auch im Normalbereich liegen (Baughman und Costabel, 2006; Gronhagen-Riska, 1979; Lieberman, 1975). Falsch positive Befunde kommen bei Diabetes, Osteoarthritis, Tuberkulose, Pilzinfektionen oder bei einem Hodgkin Lymphom vor. Die klinische Bedeutung und der Einsatz sind aus genannten Gründen kontrovers. Zur Verlaufskontrolle und als Marker für die totale Granulombelastung kann der ACE-Wert jedoch angewandt werden (Lynch et al. 1997; Müller-Quernheim et al., 1991).

Nach neueren Studien gibt es darüber hinaus andere Serummarker, die zur Diagnostik der Sarkoidose eingesetzt werden könnten. Einer davon ist der lösliche Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R), der von den aktivierten TH1-Zellen exprimiert wird und somit die Aktivität dieser widerspiegelt (Arranz et al., 2000; Grutters et al., 2003). Nach den Ergebnissen von Rozhkrantz-Kos et al. (2003) soll der sIL-2R sogar der beste Marker zur Vorhersage des Schweregrads der Sarkoidose sein. Kieszko et al. (2007a) haben sich mit der Serumkonzentration des löslichen TNF Rezeptor 2 (sTNFR2) beschäftigt und herausgefunden, dass die Höhe der Konzentration mit den radiologischen Stadien und der Schwere der Erkrankung korreliert. Ebenso hat die gleiche Arbeitsgruppe erhöhte Werte an IL-18 und IFN- γ bei Sarkoidosepatienten beobachten können (Kieszko et al., 2007). Die genaue Bedeutung und Einsatzfähigkeit dieser Werte muss allerdings noch evaluiert werden.

2.7 Pathogenese der Sarkoidose

Die nicht verkäsenden Epitheloidzellgranulome in den betroffenen Organen sind charakteristisch für die Sarkoidose. Sie stellen das Ergebnis einer komplexen immunologischen Signal-Kaskade auf noch unbekannte endogene und/oder exogene Stimuli dar. Bei einer chronischen Sarkoidose persistiert die übersteigerte Immunreaktion, was zu der Überlegung führt, dass bei den erkrankten Patienten regulatorische Mechanismen für immunologische Prozesse gestört sein könnten (Semenzato et al., 2005). Wahrscheinlich kommt es erst durch ein Zusammenspiel von T-Zellen, antigenrepräsentierende Zellen (APZ), unbekannten Antigenen und sowohl vermehrt aktivierter als auch gehemmter immunologischer Mediatoren zu der persistierenden Granulombildung. Wahrscheinlich abhängig von der individuellen genetischen Suszeptibilität wird eine unterschiedlich starke Immunreaktionen und somit die variable Krankheitsausprägung getriggert (Noor und Knox, 2007). CD4+-T-Helferzellen und Makrophagen spielen dabei die wichtigste Rolle. In verschiedenen Studien konnte man in der BAL der Betroffenen einen stark erhöhten Anteil an CD4+-Zellen gewinnen, mit einer im Vergleich zum Normalkollektiv höheren CD4+/CD8+-Ratio. Gesunde Patienten weisen eine typische CD4+/CD8+-Ratio von maximal 2 auf, wohingegen man bei Sarkoidosepatienten Ergebnisse von 3,5 bis über 10 finden kann (Hunninghake und Crystal, 1981; Semenzato et al., 1996; Winterbauer et al., 1993; Yeager et al., 1977). Bei den untersuchten CD4+-Zellen handelt es sich vor allem um Typ1-T-Helferzellen (TH1-Lymphozyten). In der nachfolgenden Abbildung 1 wird die Kaskade einer Immunantwort durch einen TH1-Lymphozyten dargestellt und erläutert.

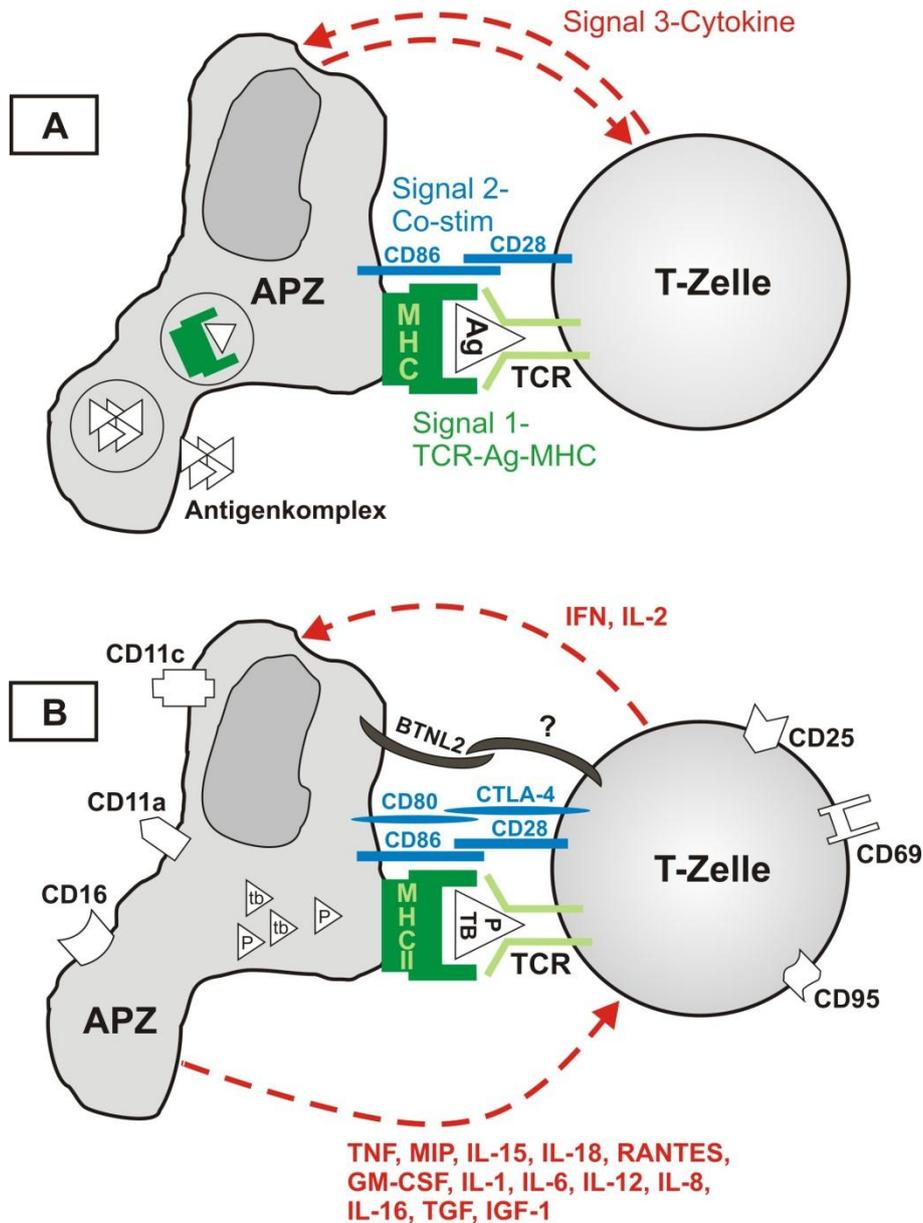


Abbildung 1: Induktion einer antigenspezifischen T-Zellantwort bei der Sarkoidose (modifiziert nach Noor und Knox, 2007)

Die noch unbekanntenen Antigene werden von Makrophagen (APZ) durch Phagozytose aufgenommen, gespalten und als MHC2-Antigenkomplex präsentiert. Dieser Komplex in einer Verbindung mit der variablen Region (V) des T-Zell Rezeptors (TCR) führt zur Aktivierung der T-Zellen (grün: Signal 1 in Abb. 1). Es kommt zur klonischen Vermehrung der T-Helferzellen mit einer bestimmten variablen Region des TCRs (V- α oder V- β) und zur Ausschüttung von Cytokinen (vor allem IL-2 und INF- γ). Gleichzeitig unterdrücken TH1-Zellen die Produktion der TH2-Cytokine, wie IL-4 und IL-5 (Agostini et al., 2002; Moller, 1999; Pinkston et al., 1983; Robinson et al., 1985). Für eine optimale Initiierung einer immunologischen Antwort in der T-

Zelle ist ebenfalls die Bindung costimulierender Moleküle von Bedeutung. Vor allem das CD28 Molekül der T-Helferzellen in Interaktion mit dem CD80 oder 86 Molekül auf APZs tragen zur Stimulierung der T-Zellen bei (blau: Signal 2 in Abb. 1) (Bour-Jordan and Blueston, 2002). Die Makrophagen werden durch die von der TH1-Zelle ausgeschütteten Cytokine, vor allem das $\text{INF-}\gamma$, rückkoppelnd aktiviert, so dass diese weitere proinflammatorische Mediatoren ausschütten (rot: Signal 3 in Abb. 1) (z.B. IL-1, IL-6, IL-8; IL-12, IL15, IL18, $\text{TNF-}\alpha$, GM-CSF). Letztendlich entsteht ein immunologischer Kreislauf, welcher bei Gesunden sowohl von hemmenden als auch von aktivierenden Faktoren reguliert wird. Eine Fehlfunktion dieser Mechanismen könnte bei Sarkoidosepatienten zu der persistierenden inflammatorischen Reaktion führen (Noor und Knox, 2007).

Funktion der Cytokine

T-Helferzellen werden in TH1- und TH2-Zellen in Abhängigkeit von den ausgeschütteten Cytokinen eingeteilt. Bei Sarkoidosepatienten wurden vermehrt die von TH1-Zellen sezernierten Cytokine gefunden, woraus zu schließen ist, dass sie eine wichtige Funktion in der Pathogenese einer Sarkoidose haben müssen. Im Folgenden soll die Funktion der bedeutsamen Cytokine erläutert werden.

Das von TH1-Zellen ausgeschüttete Cytokin $\text{INF-}\gamma$ (Interferon- γ) ist ein entscheidender Faktor bei der Stimulierung einer inflammatorischen Reaktion in der Sarkoidose. Es aktiviert Makrophagen und steigert die Expression costimulierender Moleküle (CD_{80} und CD_{86}) auf Entzündungszellen (Agostini et al., 1999). Des Weiteren hat es auch eine antifibrotische Funktion, die sich in einer Proliferationshemmung endothelialer Zellen und Fibroblasten äußert. Andererseits hat $\text{INF-}\gamma$ ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf die Zellapoptose. Dabei wird die Hemmung des Zelltodes durch das von $\text{INF-}\gamma$ induzierte p21 vermittelt (Xaus et al., 1999; Xaus et al., 2001). In einer Studie von Xaus et al. (2003) wurden in Sarkoidoselungen hohe Konzentrationen an p21 gefunden, wodurch die andauernde Inflammation und die persistierenden Granulome erklärt werden könnten. Eine weitere Funktion des $\text{INF-}\gamma$ ist die Rekrutierung verschiedener Chemokine, welche vor allem für die Chemotaxis in entzündetem Gewebe verantwortlich sind.

Auch Interleukin-2, ein weiteres von TH1-Zellen ausgeschüttetes Cytokin, wurde vermehrt in der BAL von Sarkoidosepatienten gefunden. Durch seine Funktion als lokaler Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten und deren vermehrte Infiltration, verstärkt es die Proliferation der Granulome (Hunninghake et al., 1983; Pinkston et al., 1983; Müller-Quernheim et al., 1996).

Die von TH2-Helferzellen ausgeschütteten Cytokine (z.B. IL4; IL-5; IL-10) findet man erst bei Patienten mit einer progressiven Sarkoidose. IL-4 fördert die Proliferation der Fibroblasten, was im Endeffekt eine Fibrose begünstigen kann (Lukas et al., 2001; Moller, 1999; Wallace und Howie, 1999). Ein weiteres Cytokin, das Interleukin-10, hat einen antiinflammatorischen Effekt und stellt damit ein immunregulatorisches Cytokin dar. In einer Studie von Bingisser et al. (2000) konnte gezeigt werden, dass IL-10 zur spontanen Remission einer Alveolitis bei Sarkoidosepatienten beitragen kann. Man vermutet, dass eine eher niedrige Konzentration von IL-10 die Entwicklung sarkoider Granulome begünstigt (Whittington et al., 2004).

IL-1, ein von den Makrophagen sezerniertes Cytokin, stimuliert die Granulombildung, die Fibroblastenproliferation und die Kollagenproduktion. Ein weiteres, von den Makrophagen ausgeschüttetes proinflammatorisches Cytokin, ist TNF- α (Tumour necrosis factor α), der durch die Induktion von IL-6 das Fibroblastenwachstum anregt. Außerdem reguliert TNF- α IL-1 hoch, zieht neutrophile Granulozyten an, stimuliert die Phagozytose der Makrophagen und aktiviert T-Lymphozyten (Dai et al., 2005; Zheng et al., 1995). Aus einigen Daten geht hervor, dass erhöhte Spiegel von TNF- α die Dauerhaftigkeit der Entzündungsreaktionen verlängern und somit eine hemmende Funktion bei der Apoptose besitzen (Agostini et al., 1996; Agostini, 2001; Baugham et al., 1990; Wahlstrom et al., 2003). Laut einer Studie von Lukacs et al. (1994) wird eine erhöhte Konzentration von TNF- α allerdings mit einem Rückgang der Granulome in Verbindung gebracht. Trotz kontroverser Ergebnisse könnte Anti-TNF- α als Therapiestrategie in der Zukunft eine Rolle spielen.

Weitere wichtige, von den Makrophagen sezernierte Cytokine, sind die IL-12 und -18. In verschiedenen Studien wurde die Beteiligung von IL-12 und IL-18 sowohl an der TH1-Zell Differenzierung und Aktivierung als auch an der Granulomentwicklung gezeigt (Fukami et al., 2001; Shigehara et al., 2001; Minshall et al., 1997). IL-12 regt vor allem die Proliferation aktivierter TH1-Zellen sowie sarkoider Makrophagen an und stimuliert die Bildung von Chemokinrezeptoren auf T-Zellen. (Minshall et al., 1997; Moller et al., 1996; Shigehare et al., 2000). IL-18 induziert die Ausschüttung der Faktoren IFN- γ und GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Durch die Aktivierung des Proteins 1 und des Transkriptionsfaktors NF- κ B induziert es die IL-2 Produktion bei Sarkoidosepatienten (Greene et al., 2000). NF- κ B kann ebenfalls über das NOD2 Protein, welches vom *CARD15* Gen kodiert wird, aktiviert werden. Da es bei Sarkoidosepatienten in einer erhöhten Konzentration gefunden wurde, scheint es bei der Pathogenese eine wichtige Rolle zu spielen (Drent et al., 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wahrscheinlich ein Ungleichgewicht zwischen regulatorischen und proinflammatorischen Faktoren bei der Sarkoidose vorliegt, das den Grad zwischen Remission und Persistenz bestimmt (Noor und Knox, 2007).

2.8 Molekulargenetischer Hintergrund

2.8.1 Molekulargenetische Untersuchungen

Seit Jahren wird in der Sarkoidose-Forschung nach positiven Assoziationen mit bestimmten Genvarianten gesucht. Da es sich bei der Sarkoidose um eine komplexe multifaktorielle Erkrankung handelt, ist das Auffinden der genetischen Varianten mit konventioneller PCR (Polymerase Chain Reaction) und/oder der RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Methode äußerst arbeitsintensiv und langwierig. Durch moderne Hochdurchsatzverfahren, die in den letzten Jahren entwickelt wurden, ist das Auffinden von krankheitsrelevanten Genen erleichtert worden (Freudenberg et al., 2002).

Das Humangenomprojekt wurde im Jahre 1990 vom US Department of Energy (DOE) und dem National Institute of Health (NIH) in Kooperation mit anderen internationalen Forschungszentren ins Leben gerufen. Das Vorhaben dieses Projektes war die Bestimmung der Basenabfolge des haploiden Genoms und die Lokalisierung aller Gene mit der Identifizierung ihrer speziellen Aufgaben (Cichon et al., 2002). Im April 2003 wurde das Projekt erfolgreich beendet mit der Verkündung die DNA (Desoxyribonukleinsäure) sei vollständig entschlüsselt (Koch, 2003). Die Bedeutung dieser Information beinhaltete die Sequenzierung von 3,2 Millionen Basen und Identifizierung von 30 000 bis 40 000 Genen. Die genaue Funktion vieler dieser Gene blieb allerdings noch ungeklärt, was zur Folge hatte, dass man nun in neuen Folgeprojekten des HGPs (Human Genome Project) versucht, dies rauszufinden. Des Weiteren ist mit der Sequenzierung zwar die Abfolge der meisten Basen, nicht aber die Variabilität des menschlichen Genoms entschlüsselt worden, die bei der Suche nach Krankheitsdispositionen eine wichtige Rolle spielt.

Laut dem International HapMap Consortium (2003) unterscheiden sich menschliche Individuen untereinander in 0,1 % der Basenabfolge und sind dementsprechend in 99,9 % identisch. Bei insgesamt 3,2 Milliarden Basenpaaren in einem Genom bedeutet es, dass ca. 3 Millionen Stellen der DNA polymorph sind. Von Polymorphismen spricht man, wenn für eine Position in der DNA-Sequenz zwei oder mehrere Allele in der Bevölkerung vorkommen. Die genetische Abweichung von 0,1 % trägt zur individuellen Variabilität bei, die phänotypisch im Aussehen, Charakter und persönlichen Neigungen, aber auch in Krankheitsdispositionen zum Ausdruck

kommt. Wahrscheinlich spielt ein großer Teil dieser genetischen Sequenzunterschiede keine Rolle für den Phänotyp. Trotzdem sind diese DNA-Abschnitte genauso bedeutsam für die Humangenetik wie die phänotypisch wirksamen. Sie haben als genetische Marker in der Erforschung von Krankheiten einen wichtigen Beitrag geleistet. Bei genetischen Markern handelt es sich um Polymorphismen, dessen Loci auf einem bestimmten Chromosom bekannt sind und dessen unterschiedliche Allele verhältnismäßig häufig in der Population vorkommen (Cichon et al., 2002). Die Ursachen der genetischen Variabilität zwischen verschiedenen Menschen und verschiedenen Populationen liegen in folgenden Mechanismen. Die sexuelle Reproduktion und damit die Rekombination (Crossing over) zwischen väterlichem und mütterlichem Allel tragen zum einen zur Entstehung der Sequenzunterschiede im menschlichen Genom bei. Zweitens findet durch die seit dem Anfang der Menschheitsgeschichte bestehende Migration stets ein Auseinanderdriften und wieder Zusammenkommen von Genvarianten statt. Ebenso führen spontane Veränderungen der DNA-Sequenz, die Mutationen, immer wieder zu neuen Polymorphismen (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/originhaplotype.html.en>).

Es gibt 2 Haupttypen genetischer Variabilität, die in der Abb. 2 veranschaulicht und im Folgenden näher erläutert werden.

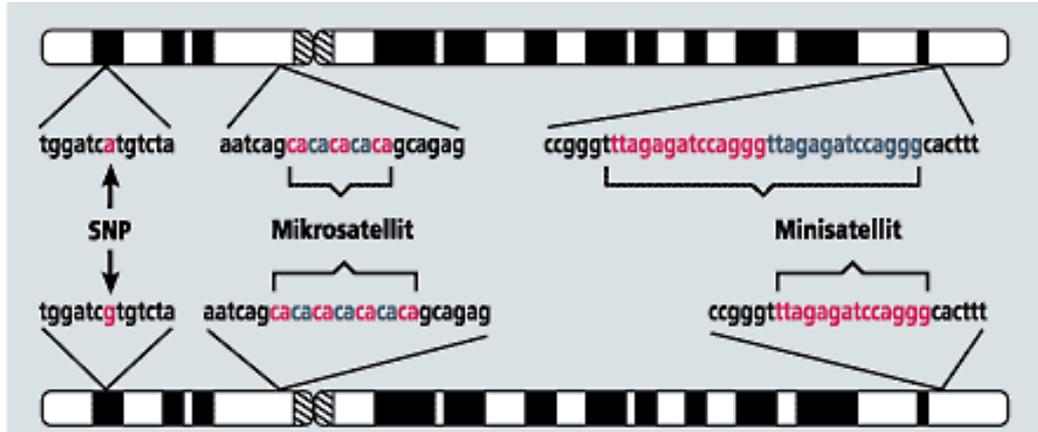


Abbildung 2: Typen genetischer Variabilität: Polymorphe Stellen in der DNA-Sequenz im Vergleich zweier Chromosomen. Ein SNP ist durch den Austausch einer einzelnen Base gekennzeichnet, Mini- und Mikrosatelliten haben Sequenzmotive, die unterschiedlich oft wiederholt sind (die einzelnen Wiederholungseinheiten sind farbig markiert) (Cichon et al., 2002)

1. Simple Sequenzwiederholungen: Minisatelliten und Mikrosatelliten

Die simplen Sequenzwiederholungen bestehen aus tandemartigen Sequenzmotiven, die beliebig oft wiederholt werden und in der Regel in nichtkodierenden Bereichen der Chromosomen liegen. Die genaue Bedeutung dieser Marker ist zum größten Teil nicht bekannt (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Die interindividuelle Variabilität für diese Marker ist sehr groß, d.h. dass bis zu 80 % der Menschen heterozygot für die Minisatelliten und fast so viele auch für die Mikrosatelliten sind. Besonders Mitte der 80er Jahre waren sie für die Humangenetik von großer Bedeutung. Zum Beispiel wurden kleine Wiederholungen von Trinukleotid-Repeats als Ursache bestimmter Krankheiten entdeckt, wie der Chorea Huntington.

Minisatelliten (VNTRs, variable number of tandem repeats) befinden sich in euchromatischen Regionen der DNA, bestehen aus Grundmotiven, die ca.12-500 bp lang sind und wiederholen sich beliebig oft. Der Nachteil dieser Marker ist, dass sie meistens im telomerischen Bereich der Chromosomen lokalisiert sind.

Mikrosatelliten (STR, short tandem repeats) befinden sich ebenfalls in euchromatischen Regionen, haben allerdings kürzere Grundmotive zwischen 2 bis 11 bp. Der Vorteil der Mikrosatelliten besteht darin, dass sie gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt sind. Ein wichtiger Marker besteht in der CA Dinukleotidwiederholung (Cichon et al., 2002).

2. Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs)

Bei diesen Polymorphismen handelt es sich um einen Austausch einer einzelnen Base, die entwicklungsgeschichtlich vorwiegend durch eine Spontanmutation entstanden sind.

SNPs befinden sich in kodierenden, als auch in nicht kodierenden Bereichen der DNA und sind über das gesamte Genom verteilt. Durchschnittlich kommt nach der International SNP Map Working Group (2001) 1 SNP pro 1331bp vor. Die Nukleotid-Diversität ist nicht in allen Abschnitten des Genoms gleich verteilt. Von einem SNP pro 333bp bis hin zu einem SNP pro 10000 bp reicht die Variabilität zwischen und auf den Chromosomen. Seit Ende der 90er Jahre haben die SNPs an Bedeutung gewonnen und werden sehr häufig in der Genforschung eingesetzt. Eine Untergruppe der SNPs, die schon Mitte der 70er Jahre beschrieben wurde, sind die *RFLPs (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus)*. Es handelt sich um bestimmte SNPs, die in der Erkennungssequenz für bakterielle Restriktionsenzyme liegen und lediglich durch die Methode der Darstellbarkeit definiert sind, aber keinen eigenen Typ genetischer Variabilität bilden (Cichon et al., 2002). Da diese Methode für diese Arbeit keine Rolle spielt, wird im Folgenden nicht mehr auf die RFLPs eingegangen.

SNPs stellen den häufigsten Typ genetischer Marker beim Menschen dar (Collins, 1998).

Ca 90 % der genetischen Variabilität wird durch sie verursacht, was bedeutet, dass sie beim Verständnis der Evolutionsgeschichte, der Entstehung von Krankheiten aber auch der individuellen menschlichen Eigenschaften eine große Rolle spielen. 2001 wurde von der International SNP Map Working Group veröffentlicht, dass das Erbgut der gesamten Menschheit schätzungsweise 10 Millionen SNPs beinhaltet, dessen Allelfrequenz mindestens ein Prozent beträgt. SNPs mit einer niedrigeren Frequenz haben keine große Relevanz für genetische Fragestellungen, weswegen sie nicht berücksichtigt werden.

Haplotypen

Die 10 Millionen SNPs in der gesamten Population sind nicht willkürlich auf den Chromosomen der Menschen verteilt und werden nicht rein zufällig weitervererbt. Sie sind in Blockstrukturen organisiert, die zum großen Teil während der Rekombination zusammen bleiben. Zwei SNPs auf einem Chromosom werden umso wahrscheinlicher gemeinsam weiter vererbt, je näher sie aneinander liegen (Freudenberg et al., 2002). Dieses Phänomen nennt man Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium, LD). Es hat zur Folge, dass über Generationen einzelne Segmente der DNA erhalten bleiben, ohne durch biologische Mechanismen geteilt zu werden.

Eine bestimmte Variante einer Nukleotidsequenz mit den dazugehörigen SNPs auf einem Chromosom wird als Haplotyp bezeichnet (Freudenberg et al., 2002).

Auf demselben Abschnitt eines Chromosoms findet man in der gesamten Population ca. drei häufige Varianten eines Haplotypen, die bei 70-90 % der Bevölkerung identifiziert werden können (siehe Abbildung 3). Durch die relativ geringe Zahl an Haplotyp-Varianten können krankheitsassoziierte Polymorphismen leichter identifiziert werden (Cavalli-Sforza, 1991).

Sequenz haplotypspezifisch ist, reicht es aus, 1-3 dieser SNPs in einem Block zu bestimmen, um auf die restlichen SNPs und den dazugehörigen Haplotyp zu schließen. Dieses Verfahren wird Haplotyp-tagging und die speziellen SNPs werden Tag SNPs genannt (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/whatishapmap.html.en>). Bei der Untersuchung möglicher Kandidatengene in genetisch komplexen Erkrankungen, wie der Sarkoidose, kann man nun statt aller SNPs nur die Tag SNPs der Gene identifizieren und so viel schneller und effizienter auf eine Assoziation schließen als mit anderen Methoden (Collins, 1997; Freudenberg et al., 2002).

In einem groß angelegten Projekt haben amerikanische Forschungseinrichtungen 2002 das HapMap Projekt initiiert, wonach eine öffentlich zugängliche Karte mit den häufigen Haplotyp-Varianten und den dazugehörigen Tag SNPs entstehen sollte (The International HapMap Consortium, 2003).

2005 wurde Phase 1 veröffentlicht, 2007 wurden die Ergebnisse der 2. Phase bekannt gegeben (The International HapMap Consortium, 2005; The International HapMap Consortium, 2007). Über 3,1 Millionen SNPs wurden charakterisiert und insgesamt 1 Million Tag SNPs definiert, die für die Öffentlichkeit zugänglich gemacht wurden (The International HapMap Consortium, 2007). Mit diesen Daten kann man nun auf effiziente Art und Weise bei systemischen Untersuchungen eines Gens auf Krankheitsbeteiligung die gesamte Variabilität erfassen (Freudenberg et al., 2002).

2.8.2 Der genetische Hintergrund der Sarkoidose

Die aktuelle Studienlage zum genetischen Hintergrund der Sarkoidose ist nicht eindeutig. Es ist bis jetzt kein für die Sarkoidose allein verantwortliches Gen gefunden worden. Vielmehr deuten die Ergebnisse auf Assoziationen zwischen genetischen Varianten und bestimmten Formen der Sarkoidose oder bestimmten Populationen hin (Smith et al., 2008). Auf Grund der pathogenetischen Erkenntnisse haben sich die meisten durchgeführten Arbeitsgruppen mit immunmodulierenden Zellen und dessen Genvarianten beschäftigt, die im Folgenden näher erläutert werden.

Human lymphocyte antigens (HLAs)

HLAs spielen eine Hauptrolle bei der Antigenpräsentation und Immunmodulation, weshalb die verschiedenen Untergruppen ausgiebig in diversen Studien auf eine Assoziation mit der Sarkoidose untersucht worden sind. Die HLAs werden in drei Hauptklassen eingeteilt, die alle von Genen des major-histocompatibility-Komplexes (MHC) auf Chromosom 6 kodiert werden. Auch wenn sich die Ergebnisse der Untersuchungen nicht immer decken, geht man davon aus,

dass bestimmte Sub- und Verlaufsformen sowie die Prognose der Sarkoidose mit bestimmten HLA Polymorphismen assoziiert werden können. In Tabelle 2 werden die wichtigsten Ergebnisse kurz dargestellt.

Cytokine

Da vor allem die von TH1-Zellen und Makrophagen sezernierten Cytokine an der Pathogenese der Sarkoidose beteiligt sind, waren diese auch häufig Gegenstand molekulargenetischer Studien. Der TNF-308A Polymorphismus wurde in verschiedenen Untersuchungen mit einer akuten Form der Sarkoidose assoziiert (Seitzer et al., 1997).

IFN- α stellt ein weiteres Cytokin dar, welches in einer Studie von Akahoshi et al. (2004) mit der Sarkoidose bei Japanern assoziiert wurde. IFN- α ist im Wesentlichen ein antivirales Protein, welches bei einer Infektion von Virus-infizierten Zellen vermehrt sezerniert wird. Im Zusammenhang mit granulomatösen Erkrankungen, wie der Sarkoidose wurden ebenfalls erhöhte Konzentrationen dieses Cytokins vorgefunden. Durch die therapeutische Anwendung des INF- α bei viralen und malignen Erkrankungen kann sogar eine Sarkoidose stimuliert werden. (Poletti et al., 2005; Yoshimoto et al., 1998).

IL-23 wurde in einer kürzlich durchgeführten Studie von Fischer et al. (2011) mit der chronischen Form der Sarkoidose assoziiert (Fischer et al., 2011). Dabei wurden 1996 Sarkoidosepatienten genotypisiert. IL-23 gehört zu den proinflammatorischen Cytokinen und wird von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen produziert.

Rezeptorgene

Die Toll-like Rezeptoren (TLRs) binden bestimmte mikrobielle Strukturen oder Lipide, wodurch es nach einer Aktivierungskaskade zur Expressierung einiger Cytokine und zur Hochregulierung membranständiger Moleküle kommt. Diese immunologische Reaktion könnte ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung der Sarkoidose spielen (Smith et al., 2008). Unsere Arbeitsgruppe konnte eine Assoziation zwischen der chronischen Form der Sarkoidose und zwei Toll-like Rezeptor (TLR)-4 Polymorphismen zeigen (Pabst et al., 2006). Diese Ergebnisse ließen sich jedoch in einer vergleichbaren, holländischen Studie nicht bestätigen (Velkamp et al., 2006).

Das *Butyrophilin-like 2 Gen (BTNL2)* gehört zu der Immunglobulin Superfamilie und zählt, wie CD80 und CD86, zu den co-stimulierenden Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen. Es wurde in unterschiedlichen Studien eine Assoziation zwischen Polymorphismen dieses Gens und dem Vorliegen einer Sarkoidose gefunden, wobei diese bei Weißen signifikanter war als bei Afro-Amerikanern (Rybicki et al., 2005; Velkamp et al., 2005). Die Ergebnisse unserer

Arbeitsgruppe zeigten ebenfalls eine Assoziation, die allerdings stärker bei der chronischen Form ausgeprägt war (Li et al., 2006).

Andere Gene

VEGF (Vascular endothelial growth factor) ist ein Cytokin, welches für die Angiogenese und Gefäßpermeabilität verantwortlich ist und vermehrt in sarkoiden Granulomen vorgefunden wurde (Tolnay et al., 1998). In einer aktuellen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *VEGF* und seine Rezeptoren einen Einfluss auf den Ausbruch und Verlauf von Sarkoidose nehmen können (Pabst et al., 2009). Aus den Ergebnissen einer japanischen Studie geht jedoch hervor, dass der *VEGF* 813 Polymorphismus eher mit einer positiven Prognose, d.h. mit einem erniedrigten Risiko an Sarkoidose zu erkranken, assoziiert ist (Morohashi et al., 2003).

Bei den Untersuchungen des *ACE-Gens* fand man heraus, dass ein Insertion(I)/Deletion(D)-Polymorphismus im diesem Gen den ACE-Spiegel beeinflusst, wahrscheinlich aber keine Auswirkung auf die Suszeptibilität einer Sarkoidose hat (Alia et al., 2005; Tomita et al., 1997). Andere Studien kamen zu gegenteiligen Ergebnissen, wonach das ACE-D-Allel mit einem erhöhten Risiko für Sarkoidose assoziiert war (Maliarik et al., 1998; Papadopoulos et al., 2000; Pietinalho et al., 1999a; Schürmann et al., 2001a).

In einer im Jahre 2008 durchgeführten Studie von Hofmann et al. mit 499 Sarkoidosepatienten und 490 Kontrollpersonen wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem *Annexin A11 (ANXA11)*-Gen und Sarkoidosepatienten gefunden. Desweiteren hat eine tschechische Studie eine reduzierte Häufigkeit einer *ANXA* Variante bei Sarkoidosepatienten beobachten können. (Mrazek et al., 2011) Dieses Gen spielt eine wichtige Rolle bei diversen biologischen Vorgängen, wie der Apoptose und Zellproliferation.

Die Arbeitsgruppe um Hofmann et al. (2011) haben in einer Assoziationsstudie einen Einfluss des *RAB23* Gens auf Chromosom 6 auf die Sarkoidose nachweisen können. Dieses Gen spielt eine Rolle bei der antibakteriellen Abwehrreaktion und der Regulierung des Hedgehog-Signalwegs.

An dieser Stelle wurde nur ein Teil aller bis heute untersuchten Gen-Varianten zusammengefasst, in Tabelle 2 werden nochmal in Kürze alle gefundenen Assoziationen aufgeführt.

Genetischer Marker	Assoziation
HLA Gene	
<i>HLA-B8/-DR3</i>	Schwedische Patienten mit Arthritis (Hedfors und Lindstrom, 1983)
<i>HLA-DR5J</i>	Chronische Form bei Japanern (Abe et al., 1987)
<i>HLA-B35</i>	Krankheitsausbruch vor dem 36. Lebensjahr bei Italienischen Pat (Pasturenzi et al., 1993)
<i>HLA-A1, -B8, and -DR3</i>	Italienische und tschechische Patienten (Martinetti et al., 1995)
<i>HLA-DRB1*11, *14, and *08</i>	Japanische Patienten (Ishihara et al., 1996)
<i>HLA-DRB1*1101</i>	Weiß- and afroamerikanische Patienten (Rossman et al., 2003)
<i>HLA-DQB1*0201</i>	Gute Prognose bei Afroamerikanern (Iannuzzi et al., 2003), britischen und holländischen Patienten (Sato et al., 2002)
<i>HLA-DQB1*0602</i>	Fortgeschrittene pulmonare Erkrankung bei Afroamerikanern (Iannuzzi et al., 2003) und holländischen Patienten (Voorter et al., 2005)
Zytokingene	
<i>TNF-308A</i>	Deutsche mit Löfgren Syndrom (Seitzer et al., 1997) sowie englische und holländische Patienten (Grutters et al., 2002)
<i>TNF-857T</i>	Britische und holländische Patienten (Grutters et al., 2002)
<i>IFN-α</i>	Japanische Patienten (Akahoshi et al., 2004)
<i>TGF-β3 14875A</i>	Pulmonare Fibrose bei holländischen Patienten (Kruit et al., 2006)
<i>IL23</i>	Chronische Form bei deutschen Patienten (Fischer et al., 2011)
Rezeptorgene	
<i>TLR4</i>	Chronische Erkrankung bei deutschen Patienten (Pabst et al., 2006)
<i>BTNL2</i>	Deutsche (Valentonyte et al., 2005) und US Amerikanische (Rybicki et al., 2005) Patienten
<i>CR1</i>	Italienische Patienten (Zorzetto et al. 2002)
<i>CCR2</i>	Holländer mit Löfgren Syndrom (Spagnolo et al., 2003). CCR2-64I Allel Protektiv bei japanischen Patienten (Hizawa et al., 1999)
<i>CCR5D32</i>	Schwere Erkrankung bei tschechischen (Petrek et al., 2000), holländischen sowie britischen Patienten (Spagnolo et al., 2005)
Andere Gene	
<i>CARD15</i>	Assoziation mit einem schweren Verlauf einer Lungensarkoidose bei Engländern (Sato et al., 2009)
<i>ANXA11</i>	Deutsche Patienten (Hofmann et al., 2008), Tschechische Patienten (Mrazek et al., 2011)
<i>HSP70 12437C</i>	Polnische Patienten (Ishihara et al., 1995)
<i>VEGF 1813T</i>	Sinkendes Risiko bei japanischen Patienten (Morohashi et al., 2003)
<i>CC10 G38A</i>	Deutsche Patienten (Pabst et al., 2009)
<i>CC10 G38A</i>	Progressive Erkrankung in Hokkaido, Japan (Ohchi et al., 2004) aber nicht Kyoto, Japan (Janssen et al., 2004)
<i>NRAMP1</i>	(CA) _n Wiederholung: Gute Prognose bei afroamerikanischen Patienten (Maliarik et al., 2000) and (GT) _n Wiederholung assoziiert mit Erkrankung bei polnischen Patienten (Dubaniewicz et al., 2005)
<i>ACE</i>	Deletion der Allele assoziiert mit steigendem Risiko bei Afroamerikanern (Maliarik et al., 1998) und schlechte Prognose bei Finnen (Pietinalho et al., 1999a), Schweden (Papadopoulos et al., 2000), und Deutschen (Schurmann et al., 2001a)
<i>RAB23</i>	Assoziation mit der Entstehung einer Sarkoidose bei Deutschen (Hoffmann et al., 2011)
<i>HERC2</i>	Assoziation mit der Entstehung einer Sarkoidose bei Deutschen (Fischer et al., 2011)

Tabelle 2: Überblick der genetischen Assoziationen mit der Sarkoidose (modifiziert nach Smith et al., 2008)

2.9 Kandidatengen *CARD15* und seine Polymorphismen

Das *CARD15* Gen (caspase recruitment domain 15 gene) ist auf dem langen Arm des Chromosoms 16 nahe des Centromers lokalisiert. Es kodiert für das zytosolische Protein NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain); welches zur Familie der NLR (NACHT-LRR) Proteine gehört (Martinon und Tschopp, 2005; Ting und Davis, 2005). Im Allgemeinen bestehen die Mitglieder der NLR Familie aus drei Domänen, der amino-(N)terminalen Effektor bindenden Domäne, wie der CARD oder der Pyrin Domäne, der zentralen Nukleotid bindenden Oligomerisierungsdomäne (NOD) und der C-terminalen Liganden Erkennungsdomäne, die meistens aus LRR (Leucine-rich-repeat domain) besteht.

NOD2 hat am N-terminalen Ende eine Effektordomäne, welche 2 CARDS beinhaltet (siehe Abbildung 4) (Inohara et al., 2005; Strober et al., 2006).



Abbildung 4: Aufbau eines NOD2 Proteins (Inohara et al., 2005)

NOD2 Proteine sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität. Vor allem im Cytosol von antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen und Dendritische Zellen) und von Epithelzellen werden sie exprimiert (Gutierrez et al., 2002; Inohara et al., 2003b; Ogura et al., 2001a). Die Signalkaskade bis zur Immunantwort, an der NOD2 beteiligt ist, wird in Abbildung 5 veranschaulicht und im Folgenden erläutert.

Die LRR Domäne erkennt und bindet Peptidoglykane (PGN), Komponenten aus der bakteriellen Zellwand (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003; Inohara et al., 2003a; Li und Verma, 2002). Dieser Prozess führt durch komplexe Konformationsänderungen zur Aktivierung der NOD Region (Inohara et al., 2000; Tanabe et al., 2004). Den Untersuchungen von Inohara et al. (2005) zufolge kommt es anschließend durch eine Oligomerisation der NOD Region zu einer Aktivierung der Caspase-recruitment domain (CARD), was wiederum zu einer CARD-CARD Interaktion mit gleichzeitiger Rekrutierung der Serin/Threonin Kinase (RICK) führt. Diese Reaktion induziert über weitere Zwischenschritte die Freisetzung mehrerer Transkriptionsfaktoren, u.a. NF- κ B sowie Kaspasen. Aus der erhöhten Aktivität der Transkriptionsfaktoren resultiert eine vermehrte Produktion proinflammatorischer Cytokine und Oberflächen-Proteine (Strober et al., 2006).

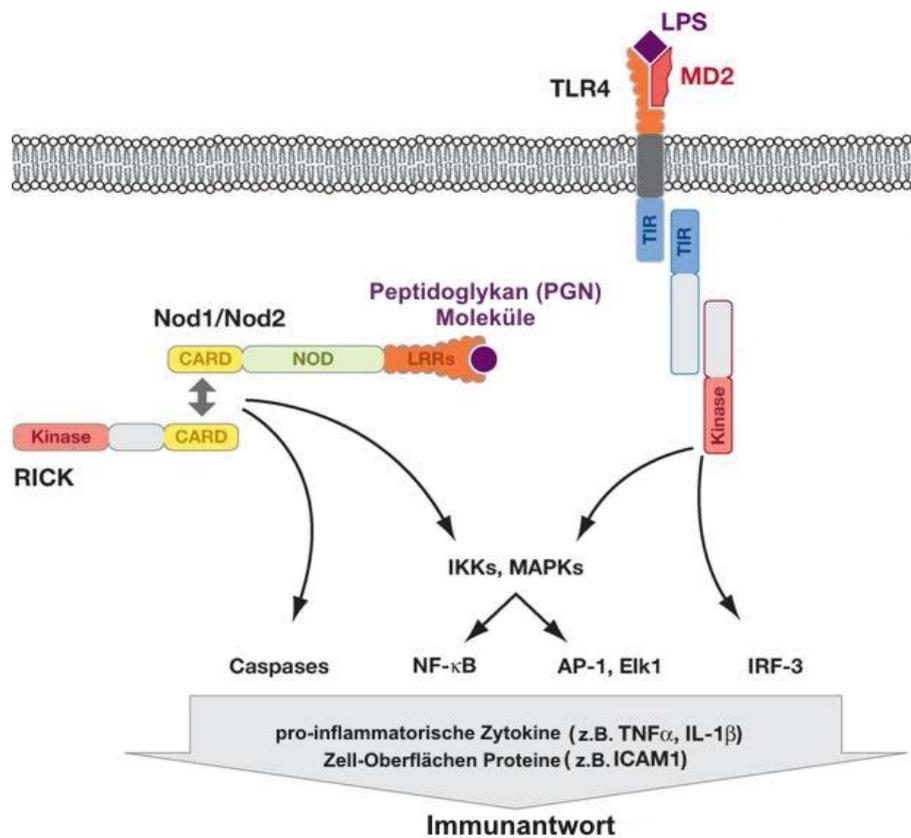


Abbildung 5: Signalkaskade von Nod1, Nod2 und TLR4 (Inohara et al., 2005)

Im Hinblick auf die Sarkoidose spielt der Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor- κ B) eine wichtige Rolle. Die Aktivierung dieses Moleküls erfolgt durch Phosphorylierung des Inhibitors I κ B im Cytosol, woraufhin NF- κ B freigesetzt wird und in den Kern transloziert. Aus Abbildung 5 kann weiterhin entnommen werden, dass es neben dem Weg über NOD2 auch andere Mechanismen zur Aktivierung von NF- κ B gibt, die an dieser Stelle nicht näher erläutert werden (Inohara et al., 2005; Strober et al., 2006).

Sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunabwehr hat NF- κ B eine kontrollierende Aufgabe. Im Kern erhöht es die Transkriptionrate vieler für die Immunantwort wichtiger Cytokine, Chemokine und anti-apoptischer Proteine. Besonders erwähnt seien hier die Mediatoren IL-1, IL-6, IL-8 und TNF, welche bei der Granulombildung eine wichtige Rolle spielen (Li und Verma, 2002). Aus den Studien von Sentleben et al. (2001) und Hettmann et al. (1999) geht hervor, dass NF- κ B auch einen Einfluss auf die Proliferation und Aktivität der T-Lymphozyten, vor allem der TH1-Zellen, hat.

Anhand dieser Erkenntnisse wurde die Aktivität von NF- κ B bei inflammatorischen Erkrankungen untersucht. Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression dieses Transkriptionsfaktors bei

Morbus Crohn, rheumathoider Arthritis, Asthma, Multiple Sklerose (MS), *Early-onset sarcoidosis* (EOS) und auch bei der Sarkoidose (Drent et al., 2001; Kanazawa et al., 2005; Li und Verma, 2002; Schreiber et al., 1998).

Dieses Ergebnis berechtigt zu der Hypothese, dass Polymorphismen im *CARD15* Gen Einfluss auf den Verlauf der Sarkoidose haben könnten.

Ein weiterer Hinweis, der für eine Mutation im *CARD15* Gen bei Sarkoidosepatienten spricht, ist die Ähnlichkeit der Sarkoidose mit der granulomatösen Systemerkrankung Morbus Crohn (MC), bei der eine positive Assoziation zu *CARD15* schon nachgewiesen wurde (Cavanaugh et al., 2001; Hampe et al., 1999; Hampe et al., 2001; Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001b). Beide Erkrankungen sind durch eine erhöhte inflammatorische Aktivität auf einen noch unbekanntem Trigger gekennzeichnet. Die Entzündungsreaktion ist in beiden Fällen vor allem durch eine Monozyten und T-Zell Akkumulation sowie durch Granulombildungen in den betroffenen Organen charakterisiert (ATS/ERS/WASOG Committee, 1999; Müller-Quernheim, 1998; Podolsky, 1991). Eine weitere Gemeinsamkeit dieser zwei Erkrankungen ist das vorwiegende Auftreten bei jungen, weiblichen Erwachsenen. Des Weiteren wurde eine höhere Koinzidenz von MC und Sarkoidose in einer Familie und sogar in einem Individuum festgestellt als man durch Zufall erwarten würde, woraus man auf eine gleiche oder ähnliche genetische Ursache schließen könnte (Wirnsberger et al., 1998). In unabhängigen Studien wurden die mit Morbus Crohn assoziierten Polymorphismen hauptsächlich auf der LRR Region lokalisiert (Hugot et al., 2001; Lesage et al., 2002; Ogura et al., 2001b). Es wurden vier hauptsächliche Genvarianten beschrieben (C802T (P268S), C2104T (R702W), G2722C (G908R), 3020insC (1007fs)), welche schon in mehreren Studien im Hinblick auf eine Assoziation mit der Sarkoidose untersucht wurden, allerdings ohne eindeutige Ergebnisse (Lesage et al., 2002).

Ferner sind zwei weitere granulomatös entzündliche Systemerkrankungen bekannt, welche mit Mutationen im *CARD15* Gen assoziiert werden. Das Blau Syndrom stellt eine seltene autosomal dominant hereditäre Erkrankung dar, die durch einen Ausbruch in der Kindheit mit granulomatöser Arthritis, Uveitis und Erythema charakterisiert wird und damit einer Sarkoidose ähnelt (Blau, 1985; Miceli-Richard et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um Miceli-Richard et al. (2001) konnte drei Polymorphismen in der NOD Region des *CARD15* Gens identifizieren (C1405T (L469F), G1001A (R334Q), C1000T (R334W)), die für das Blau Syndrom verantwortlich zu sein scheinen. Ein Jahr später haben Wang et al. (2002) zwei dieser Varianten in einer unabhängigen Studie bestätigen können (G1001A (R334Q), C1000T (R334W)).

Die EOS (Early-onset-Sarcoidosis) äußert sich klinisch mit ähnlicher Symptomatik wie das Blau Syndrom. Es kommt bei der EOS meistens bei Kleinkindern unter 4 Jahren zu einer ausgeprägten Trias bestehend aus Haut-, Gelenk- und Augenbeteiligung, die oft auch progressiv und komplikationsreich enden kann (Kanazawa et al., 2005). Die EOS muss man von der Sarkoidose im Kindesalter abgrenzen, da es sich nicht um dieselbe Erkrankung handelt. Die Sarkoidose tritt meistens erst bei älteren Kindern auf und äußert sich durch Lungen-, Lymphknoten und Augenbefall. Oft haben diese Kinder eine milde Symptomatik mit spontan ausheilenden Verläufen im Gegensatz zu den Kindern mit EOS (Shetty und Gedalia, 1998). Kanazawa et al. (2005) haben in einer 2005 durchgeführten Studie 7 Polymorphismen in der NOD Region des *CARD15* Gens identifiziert, die mit der EOS assoziiert sein könnten. (A1487T (H496L), A1813C (T605P), C2010A (N670K), T1538C (M513T), C1000T (R334W), G1834A (A612T) und C1146G (D382E)). Nach diesen Daten hätte das Blau Syndrom und die EOS eine gemeinsame Mutation (C1000T (R334W)). Die Erkenntnis, dass drei verschiedene granulomatöse entzündliche Krankheiten mit Polymorphismen auf unterschiedlichen Domänen des *CARD15* Gens assoziiert sind, lässt die Hypothese zu, dass dieses Gen einen Einfluss auf den Verlauf oder die Ausprägung der Sarkoidose haben könnte.

In verschiedenen unabhängig von einander durchgeführten Studien wurde bereits nach *CARD15* Polymorphismen bei Sarkoidosepatienten geforscht, allerdings mit kontroversen Ergebnissen.

In einer griechischen Studie von Gazouli et al. (2006) wurden die mit dem Morbus Crohn assoziierten Genvarianten auf eine Suszeptibilität für die Sarkoidose untersucht. Nur für den SNP G2722C (G908R) konnte hinsichtlich der Entstehung einer Sarkoidose eine Signifikanz festgestellt werden. Die Arbeitsgruppe um Schürmann et al. (2003) hat in einer großangelegten Studie mit zwei unterschiedlichen Sarkoidosekollektiven genetische Analysen durchgeführt und keine eindeutigen Assoziationen feststellen können. Es wurden ebenfalls die mit Morbus Crohn assoziierten Polymorphismen in einer Fall-Kontrollstudie, einer genetischen Kopplungsanalyse und einer familienbasierten Assoziationsanalyse untersucht. In der Fall-Kontrollstudie zeigten sich signifikante p-Werte für zwei SNPs (C802T (P268S) und G2722C (G908R)), die in den weiteren Analysen jedoch nicht bestätigt werden konnten. Im Endeffekt konnte ein geringer Einfluss des *CARD15* auf den Verlauf der Sarkoidose nicht ganz ausgeschlossen werden. Die Arbeitsgruppe um Fischer et al. (2011) hat in einer sehr großen Studie bei 1996 Sarkoidosepatienten 106 SNPs untersucht, die schon mit Morbus Crohn assoziiert wurden. Neben vielen anderen Genen wurden auch die SNPs des *CARD15* Gens in die Analyse

miteinbezogen. Es konnte weder für die Entstehung noch für einen Verlauf einer Sarkoidose ein Zusammenhang geschlossen werden.

In fünf weiteren Studien wurden ebenfalls keine bedeutenden Unterschiede in den *CARD15* Polymorphismen zwischen Sarkoidosekollektiven und der Kontrollgruppe gefunden (Akahoshi et al., 2008; Ho et al., 2005; Martin et al., 2003; Milman et al., 2005; Rybicki et al., 1999). Martin et al. (2003) haben Sarkoidosepatienten mit und ohne Uveitis nach *CARD15* Polymorphismen gescreent und keine Besonderheiten in den Untergruppen feststellen können.

Die Arbeitsgruppe um Sato et al. (2009) verglichen in einer aktuellen Studie Verlaufsformen der Sarkoidose untereinander und fanden Korrelationen zwischen Polymorphismen im *CARD15* Gen und schweren Verläufen der pulmonalen Sarkoidose.

Allerdings hat die gleiche Arbeitsgruppe im Vergleich zwischen der gesamten Sarkoidose-Kohorte und dem Normalkollektiv keine bedeutsamen Differenzen nachweisen können.

Sato et al. (2009) folgerten daraus, dass das *CARD15* Gen wahrscheinlich den Verlauf und den Schweregrad einer ausgebrochenen Sarkoidose beeinflusst („disease modifying gene“), aber nicht für die Suszeptibilität verantwortlich ist („susceptibility gene“).

Patienten mit der C2104T Variante, die auch mit der Entstehung des MC in Bezug gebracht wird, hatten zum einen sehr schlechte FEV1 Werte und wurden zum anderen öfter dem radiographisch Stadium IV im Vergleich zu den Nicht-Trägern zugeordnet. Erkrankte mit dem Polymorphismus T1761G zeigten deutlich bessere Ergebnisse bei der Lungenfunktionsuntersuchung und hatten seltener diffuse Lungenerkrankungen. Bei Morbus Crohn wurde diese Genvariante auch als protektiv identifiziert (Lesage et al., 2002).

In einer aktuellen Studie von Wiken et al. (2009) deuten die Ergebnisse ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen *CARD15* und der Sarkoidose hin. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von NOD2 und TLR2 eine höhere Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen TNF α und IL-1 β bei Sarkoidosepatienten auslöst als bei gesunden Probanden.

Die verschiedenen Ergebnisse lassen einen möglichen Zusammenhang zwischen der Sarkoidose und Polymorphismen im *CARD15* Gen zu, der unsere Arbeitsgruppe bekräftigte dies genauer zu untersuchen.

2.10 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit ist die Untersuchung der Haplotypblockstruktur des *CARD15* Gens im Hinblick auf eine Assoziation mit der Entstehung oder der Modifizierung einer Sarkoidose. In einer großen genetischen Fall-Kontrollstudie werden sowohl eine SNP-Analyse als auch eine Haplotypanalyse des Gens durchgeführt. Der Einfluss von *CARD15* wird sowohl auf die Sarkoidose allgemein als auch auf den akuten und den chronischen Verlauf evaluiert. Der Vergleich folgender Genotypenverteilungen wird zu der vorliegenden Fragestellung herangezogen:

1. In einer Assoziationsstudie soll die Verteilung der SNPs zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe aller Sarkoidosepatienten, der mit akutem Verlauf und der mit chronischem Verlauf verglichen werden.
2. Weiterhin werden in der Haplotypanalyse Kombinationen der SNPs des Kontrollkollektivs den Sarkoidosekollektiven (alle, akut, chronisch) gegenübergestellt und auf Assoziationen hin untersucht.
3. Zusätzlich sollen in einer Pseudo-Fall-Kontrollstudie die einzelnen Marker und die Haplotypen zwischen den akut und chronisch erkrankten Patienten verglichen werden.

Die Ergebnisse der bislang durchgeführten Studien zu diesem Thema zeigten kontroverse Ergebnisse. Die Suche konzentrierte sich allerdings meistens auf Assoziationen mit einzelnen SNPs und nicht auf Kombinationen verschiedener SNPs im Sinne einer Haplotyp-Analyse. In dieser Forschungsarbeit soll mit der Genotypisierung von acht Tag SNPs die gesamte Haplotypblockstruktur des *CARD15* Gens erfasst und damit eine eventuelle Assoziation mit der Sarkoidose oder deren Verlauf ermittelt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probanden

Unsere Studiendurchführung erfolgte nach den Vorgaben der revidierten Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki (1983) mit Zustimmung der Ethikkommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (080/05). Alle Teilnehmer waren zum Zeitpunkt des Studienbeginns volljährig und haben eine Einverständniserklärung zur Durchführung der Untersuchungen abgegeben. Patienten mit schweren Erkrankungen einschließlich einer COPD (chronic obstructive pulmonary disease), Asthma bronchiale oder einer immunologischen Erkrankung wurden von dieser wissenschaftlichen Studie ausgeschlossen. Unser Sarkoidosekollektiv umfasste 300 Patienten kaukasischer Herkunft mit klinisch gesicherter Diagnose. Das Teilnehmerfeld bestand aus 172 (57,3 %) Frauen und 128 (42,7 %) Männern, mit einem Durchschnittsalter von 51,73 (+/-13,59). Die Diagnose der Sarkoidose erfolgte nach den Richtlinien des ATS/ERS/WASOG-Komitees. Ein histologischer Beweis nichtverkäsender Granulome und ein Röntgen-Thorax wurden zur Bestätigung herangezogen. Des Weiteren wurde mittels Anamnese, körperlicher Untersuchung, einer Lungenfunktionsuntersuchung, einem CT und einer BAL die Diagnostik vervollständigt. Das Sarkoidosekollektiv wurde in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe wurde durch einen akuten, spontan ausheilenden und im Beobachtungszeitraum von zwei Jahren nicht rezidivierenden Verlauf charakterisiert. Die zweite Gruppe war durch einen chronisch rezidivierenden Verlauf in der Anamnese oder im Beobachtungszeitraum gekennzeichnet. Diese phänotypische Einteilung spiegelt nach unserer Einschätzung neben dem komplexen Organbefall am besten die unterschiedliche Ausprägung der Erkrankung wider. Nach dieser Definition hatten 70 (23,3 %) der Sarkoidosepatienten unserer Studie einen akuten Verlauf, 171 (57,0 %) litten an einer chronischen Form und bei 59 (19,67 %) Teilnehmern war der Verlauf unklar. Dies liegt zum einen daran, dass die Patienten nicht mehr zu erreichen waren, zum anderen war es nicht möglich, an alle Krankenakten zu gelangen, wenn die Patienten außerhalb unserer Abteilung behandelt wurden. Darüber hinaus konnte bei Patienten, die unter 2 Jahren beobachtet wurden, keine Stadienzuordnung stattfinden.

Durch standardisierte krankheitsspezifische Fragebögen sowie den Quality of Life (WHOQOL-Bref)-Fragebogen und den Fatigue Assesement Scale (FAS)-Fragebogen wurden zusätzliche Informationen der Teilnehmer erfasst. Unsere Kontrollgruppe mit 381 Probanden setzte sich aus 206 (51,5 %) weiblichen und 175 (45,9 %) männlichen kaukasischen Teilnehmern zusammen.

Das durchschnittliche Alter lag bei 51,50 \pm 18,351 Jahren. Sowohl das Alter als auch die Geschlechterverteilung der beiden Kollektive entsprechen einander, wie in Tabelle 3 dargestellt. Keiner der Teilnehmer der Kontrollgruppe war mit einem Sarkoidosepatienten verwandt oder litt selbst an einer Lungenerkrankung. Röntgen-Thorax- und Laboruntersuchungen zeigten keine pathologischen Befunde. Die Rekrutierung der insgesamt 681 Teilnehmer fand an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn sowie über das Sarkoidose Netzwerk Bonn und die Sarkoidose-Selbsthilfegruppen Altenkirchen, Köln, Leipzig und Wuppertal statt.

Merkmal	Sarkoidose (n=300)	Kontrollen (n=381)
Alter	51,73 \pm 13,585	51,50 \pm 18,351
weiblich/männlich	172 (57,3 %)/128 (42,7 %)	206 (54,1 %)/175 (45,9 %)
akut	70 (23,3 %)	
chronisch	171 (57,0 %)	
Verlauf unklar	59 (19,67 %)	
Stadium 0	80 (26,67 %)	
Stadium I	53 (17,67 %)	
Stadium II	65 (21,67 %)	
Stadium III	21 (7,0 %)	
Stadium IV	13 (4,33 %)	
Stadium unklar	68 (22,67 %)	

Tabelle 3: Charakteristische Daten der Sarkoidosepatienten und der Kontrollgruppe (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen und die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der stetigen Variablen)

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien für die DNA-Extraktion:

0,1 % Triton X 100- Lösung, Lysis-Puffer (Natriumchlorid-Lösung, EDTA, Aqua dest.), 10 % Natrium-Dodecyl-Sulfat-Lösung, Proteinase-K-Lösung (20mg/ml), 6M Natriumchlorid-Lösung, TE8-Puffer (Tris-HCl, EDTA, Aqua dest.).

3.2.2 Geräte für die DNA-Extraktion:

Zentrifuge: Mikrofuge ETM (Firma Beckmann, München, Deutschland);

Vortexgerät: Vortex Genie (Firma Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz); Überkopfschüttler;

Wasserbad/Inkubator.

3.2.3 Software für die iPLEX Reaktion:

- Assay Design 3.0.0
- Services 2.0.8
- Assay Editor 3.1.4
- Plate Editor 3.1.4
- TYPER Analyzer 3.3.0
- Acquire 3.3.1
- Caller 3.3.0

Chip Übersicht

Darstellung der Genotypen

Projekt Explorer

Erlaubt einen Überblick über einzelne oder multiple Chips

Ampel

Kurze Darstellung der aktuellen erfolgreich durchgeführten Durchsätze

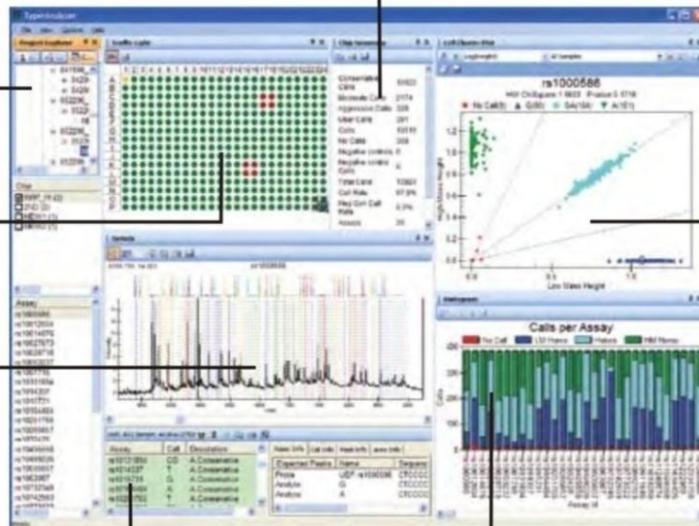
Vier definierte Farben geben den Prozentsatz der abgeschlossenen Vorgänge an

Spektrum

Zeigt die Signale der Analyte, den Massenbereich und die Genotypen

Datenspeicherung

Alle Informationen bezüglich der Versuchsdurchführung und der Proben werden hier gespeichert und können jederzeit abgerufen werden



Histogramm

Zeigt vier Kategorien: kein Durchsatz, niedrige Masse homozygot, heterozygot, hohe Masse homozygot

Cluster Plot

Darstellung niedriger Massen vs. hoher Massen

Hardy-Weinberg Gleichgewicht Berechnung

Beim Anklicken jedes Punktes im Cluster enthält man einen vollständigen Überblick über Spektrum und die Qualität der individuellen Analyse

Enthält die gesamte Datenerhebung

Abbildung 6: Überblick über das MassARRAY System (Sequenom, Inc., 2007)

3.2.4 Reagenzien für die iPLEX-Reaktion (nach Sequenom Standard 2007):

- iPLEX Reagent Kit (SEQUENOM Katalog # 10116)
- Clean Resin (SEQUENOM Katalog # 10053)
- 384-Well SpectroCHIP bioarray (SEQUENOM Katalog # 00601)
- 384 Proben Mikrotiter Platten

3.3 Durchführung der Untersuchung

3.3.1 Blutentnahme

Jedem Teilnehmer unserer Studie wurden 9ml venöses Blut mit dem Vacutainer System entnommen. Aus dem EDTA-Vollblut wurde nach der Aussalzmethode von Miller et al. (1988) die DNA isoliert.

3.3.2 MassARRAY System-iPLEX Verfahren

Die Durchführung der Genotypisierung des *CARD15* Gens erfolgte mittels der MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry) im Rahmen der iPLEX Reaktion gemäß des MassARRAY Systems (Sequenom, Inc., 2007, www.sequenom.com). In der Genomics-Plattform des Life&Brain Centers Bonn (Prof. Dr. M. M. Nöthen, Prof. Dr. S. Cichon) hatten wir die Möglichkeit dieses Hochdurchsatzverfahren anzuwenden. Mit dem MassARRAY System können durch die Verbindung aus einer einfachen Primer Extension Reaktion und MALDI-TOF MS täglich mehrere Hundert bis zu 100.000 Genotypen schnell und kostengünstig identifiziert werden (Sequenom, Inc., 2007; Tang et al., 2002). Insertionen, Deletionen, Substitutionen und andere Polymorphismen werden mit einer sehr hohen Genauigkeit erkannt. Laut Gabriel et al. (2002) liegt diese bei dem iPLEX Verfahren bei über 99,7 %.

Schritte des iPLEX Verfahrens:

1. SNP Auswahl und Assay Design
2. DNA Isolierung
3. PCR Amplifikation
4. SAP Verfahren
5. iPLEX Reaktion-Primer Extension
6. Entsalzung und SpectroCHIP Bioarray
7. MALDI-TOF MS

Überblick über das iPLEX Verfahren:

Das Konzipieren des Assays stellt die Grundlage für alle Schritte des iPLEX-Verfahrens dar. Nach Auswahl der zu untersuchenden Tag SNPs wird zunächst eine PCR-Amplifizierung der genomischen DNA durchgeführt. Anschließend werden die noch nicht verbrauchten dNTPs durch die SAP (shrimp alkaline phosphatase) zu dNDPs dephosphoryliert und so reaktionsunfähig gemacht. Der folgende Schritt beinhaltet die iPLEX Reaktion und die Einzelbasen-Extensions (SBE)-Reaktion. Dabei wird die iPLEX Reaktionsmischung bestehend aus SNP-spezifischen

Extensionsprimern, Enzym, Puffer und massenmodifizierten Didesoxynukleotiden zu den Amplifikationsprodukten beigemischt. Das Ganze wird thermozykliert, um die Anlagerung des Primers und der masseveränderten ddNTPs (siehe Tabelle 4) an die diagnostische Stelle der DNA durchzuführen. Die veränderten Basen werden bei der Synthese eines neuen DNA-Strangs wie ganz normale DNA-Nukleotide eingebaut, jedoch führt das Fehlen der Hydroxylgruppe zum Abbruch der Reaktion, da keine weiteren Nukleotide am 3'-Ende angehängt werden können. So entstehen allelspezifische Produkte mit unterschiedlicher Masse in Abhängigkeit von der Allelsequenz. In Abbildung 7 werden die Arbeitsschritten nochmal bildlich dargestellt.

Terminierende Base	A	C	G	T
A	0	-24	16	55,9
C	24	0	40	79,9
G	-16	-40	0	39,9
T	-55,9	-79,9	39,9	0

Tabelle 4: Massenunterschiede zwischen den Basen aus dem iPLEX Produkt

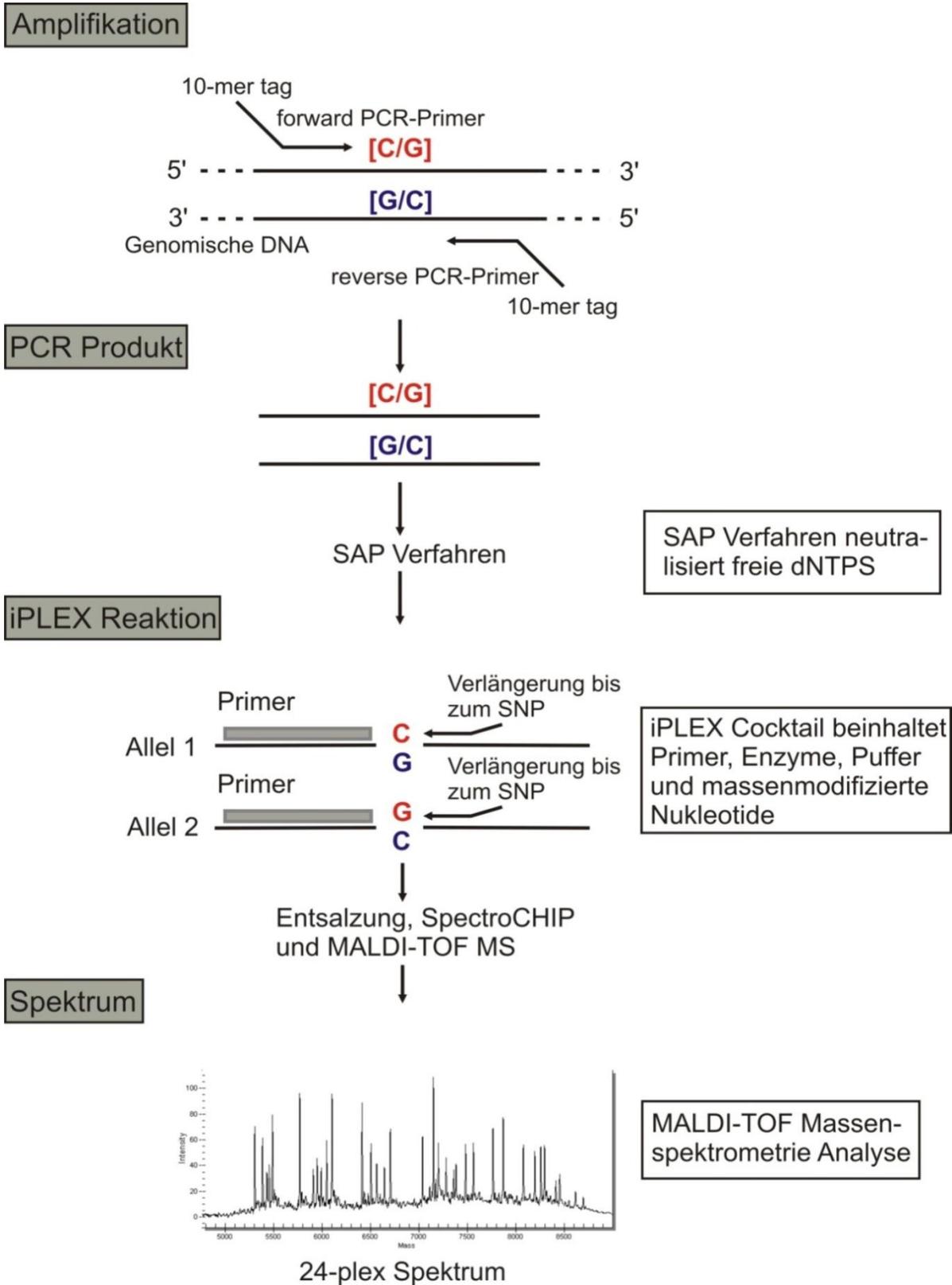


Abbildung 7: Versuchsschritte des iPLEX Verfahrens (Sequenom. Inc., 2007)

Mit der MALDI-TOF MS kann im letzten Arbeitsschritt aus den Massenunterschieden der Produkte nach der iPLEX Reaktion der Genotyp ermittelt werden (siehe Abbildung 8). Um Analysefehler zu vermeiden, werden die iPLEX Produkte vor der MS entsalzt und auf einen SpectroCHIP durch den MassARRAY Nondispenser überführt.

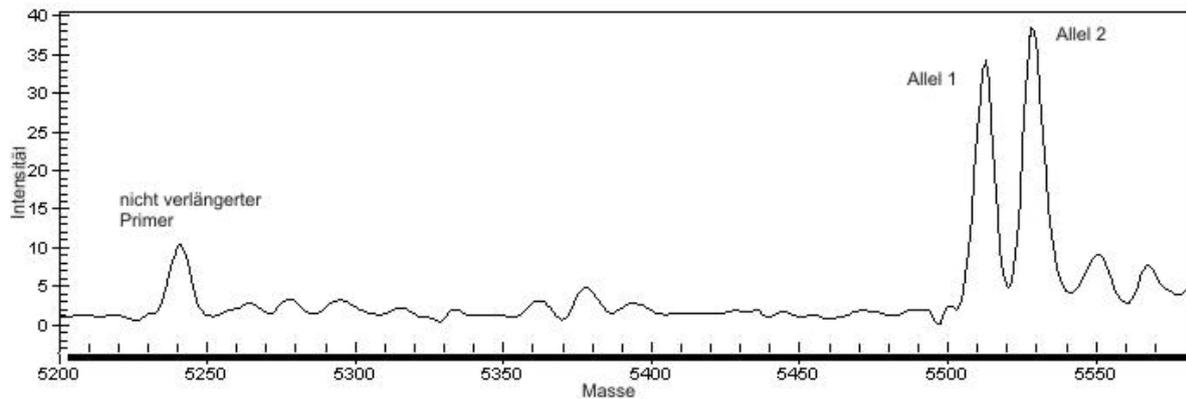


Abbildung 8: Spektrum der Extensionsprodukte jeweils beendet durch massenmodifizierte A und G Nukleotide (Sequenom, Inc., 2007)

Im folgendem wird die genaue Durchführung der einzelnen Schritte der iPLEX Stufen nach Sequenom Standard (2007) dargestellt (für ausführlichere Erläuterungen siehe iPLEX Guide, Sequenom Homepage)

3.3.2.1 SNP- Auswahl und Assay Design

Die SNP-Wahl zur Genotypisierung des *CARD15* Gens wurde anhand der Ergebnisse des HapMap Projekts Phase 2 vorgenommen. In dem HapMap Projekt wurden 270 Probanden aus vier unterschiedlichen geographischen Regionen genotypisiert. 2007 wurden die Ergebnisse der zweiten Phase bekannt gegeben, wonach 3,1 Millionen SNPs identifiziert und öffentlich zugänglich gemacht wurden (The International HapMap Consortium, 2007).

Die Struktur des Kopplungsungleichgewichts (Linkage-Disequilibrium = LD) des *CARD15* Gens wurde mit dem Programm HaploView evaluiert, welches von der Arbeitsgruppe um Gabriel et al. (2002) beschrieben wurde. In Abbildung 9 ist anhand eines LD-Plots das Kopplungsungleichgewicht der verschiedenen Marker zueinander im *CARD15* Gen dargestellt. Je intensiver die Farbe der Kästchen, desto größer ist das Kopplungsungleichgewicht der SNPs zu einander, was bedeutet, dass sie mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zusammen vererbt worden sind und einen Haplotypblock bilden. Die Daten des LD-Plots in Abbildung 9 wurden aus unserem Kontrollkollektiv generiert.

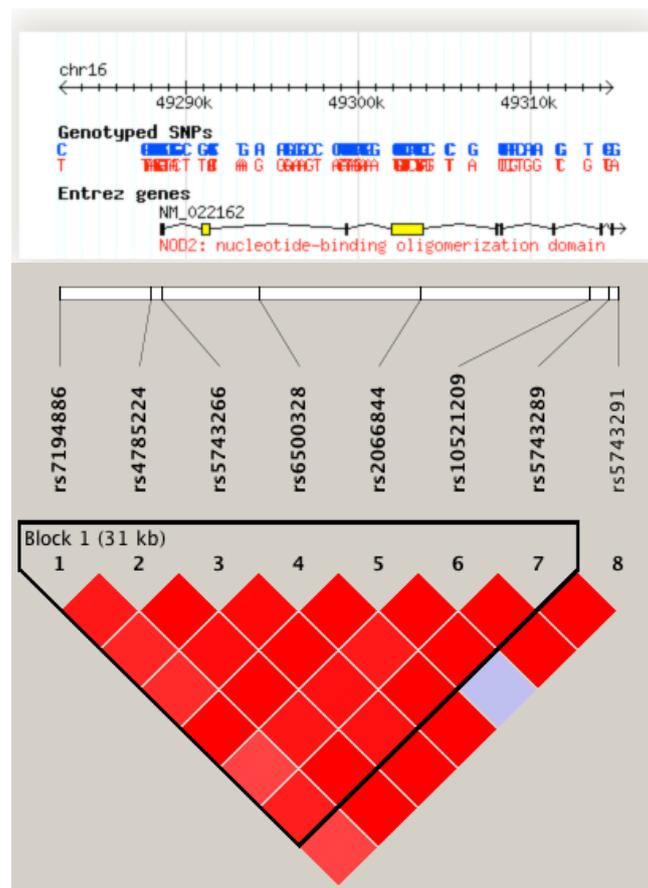


Abbildung 9: LD Plot des *CARD15* Gens unserer Kontrollgruppe. Darüber ist das *CARD15* Gen mit den Introns und Extrons dargestellt.

Das *CARD15* Gen befindet sich auf dem Chromosom Nr. 16 nahe des Centromers (16q12). Es besteht insgesamt aus 35,938 kbp, von denen 131 als Einzelbasen Polymorphismen (SNPs) identifiziert wurden. Acht dieser SNPs wurden als Tag SNPs ausgewählt, welche aufgrund des nahen Kopplungsungleichgewichts zu den übrigen Markern ausreichen, um die Haplotypblockstruktur des gesamten Gens wiederzugeben. Diese Marker werden in Tabelle 5 dargestellt.

Marker-Nr.	Chromosom	Gen	SNP-ID	Position
1	16	<i>CARD15</i>	rs7194886	49282694
2	16	<i>CARD15</i>	rs4785224	49287947
3	16	<i>CARD15</i>	rs5743266	49288597
4	16	<i>CARD15</i>	rs6500328	49294157
5	16	<i>CARD15</i>	rs2066844	49303427
6	16	<i>CARD15</i>	rs10521209	49313210
7	16	<i>CARD15</i>	rs5743289	49314275
8	16	<i>CARD15</i>	rs5743291	49314777

Tabelle 5: Auswahl der *CARD15* SNPs

Auf Grund von sample errors und verschiedenen Problemen mit der Chipaufteilung musste die Anzahl des zu untersuchenden Materials reduziert werden. Von den 300 Sarkoidosepatienten des Grundkollektivs wurden 269 Proben und vom Kontrollkollektiv 322 Proben mit dem MassARRAY System genotypisiert.

SNPs in der Kontrollgruppe ab einer minoren Allelfrequenz größer als 4 % wurden erst in die statistische Datenanalyse eingeschlossen. Die Qualitätskontrolle zeigte bei keinem der Marker eine Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht.

Die Auswahl der Amplifikations und Extensions Primer erfolgte lokal mit dem Assay Design 3.1. Programm von Sequenom. Eine Validierung über einen Webdienst von Sequenom wurde ergänzend durchgeführt.

3.3.2.2 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut nach der Aussalzmethode (Miller et al., 1988)
Zur Gewinnung der DNA wurden die 9 ml EDTA-Vollblut mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt und für 30 Minuten bei 4°C in Ruhe gelassen. Anschließend wurde der Ansatz 20 Minuten bei 3000 rpm ($r = 20$ cm, 3500xg) zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und verworfen. Dieser Arbeitsschritt wurde analog wiederholt. Das Sediment wurde entsprechend mit Aqua dest. lysiert, zentrifugiert und vom Überstand getrennt. Das entstandene Pellet aus Leukozyten wurde mit 30 ml einer 0,1 %igen Triton-Lösung versetzt und durchmischt. Im Anschluss wurde das Gemisch erneute zentrifugiert und vom Überstand getrennt. Der Rückstand wurde mit 5 ml Lysis-Puffer aufgenommen und resuspendiert (Vortex). Die nachfolgende Zugabe von 250 µl 10 % Natrium-Dodecyl-Sulfat führte schlussendlich zur Fragmentierung der Zellkerne. Zu diesem Zeitpunkt lag die DNA in freier Form vor. Die übrigen Zellfragmente wurden durch die Gabe von 100 µl Proteinase-K-Lösung enzymatisch gespalten. Der Reaktionsansatz wurde anschließend bei 37°C

im Wasserbad über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde der Ansatz in eine 15 ml Falcon-Tube gefüllt, mit 1,5 ml 6M NaCl-Lösung versetzt und 90 Minuten lang auf einem Überkopfschüttler durchmischt. In diesem Arbeitsschritt wurden die Proteine ausgefällt (ausgesalzen). Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand in eine 50 ml Falcon-Tube überführt. Durch Zugabe von 25 ml 100 % EtOH wurde die DNA gefällt. Die fadenförmige DNA konnte dann mittels geschmolzener Spitzen von Pasteur Pipetten aus dem Ansatz entnommen und an der Luft getrocknet werden. Nach einer Waschung in 70 % EtOH wurde sie abschließend in 250 µl TE8-Puffer gelöst.

3.3.2.3 PCR Amplifikation

Mullis und Faloona (1987) entwickelten die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR), welche eine Methode zur exponentiellen Amplifikation kurzer DNA-Sequenzen (meist 100 bis 600 Basen) innerhalb eines längeren doppelsträngigen DNA-Moleküls darstellt. Folgende drei Schritte sind nötig, um eine PCR Amplifikation durchzuführen:

1. Hitzenaturierung des DNA-Doppelstrangs

Die gesamte DNA wird im ersten Arbeitsschritt denaturiert und anschließend auf ca. 94°C erhitzt. Dadurch lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen beider Stränge, so dass man zwei einzelsträngige DNA-Moleküle erhält.

2. Anlagerung (Annealing) der Oligonukleotidprimer

Im zweiten Arbeitsschritt werden zwei spezifische Oligonukleotidprimer (Amplifikation Primer) der DNA zugefügt, welche das zu amplifizierende DNA-Fragment eingrenzen. Dieser Vorgang findet bei Abkühlen des Reaktionsansatzes auf eine Temperatur zwischen 50°C und 70°C statt. Die Schmelztemperatur der Primer bestimmt diese Annealing-Temperatur.

3. Extension der Oligonukleotidprimer durch die hitzestabile DNA-Polymerase

Im letzten Schritt verlängert die DNA-Polymerase den Primer entlang der einzelsträngigen Matrizen-DNA durch die Anlagerung der jeweils komplementären dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate: dATP, dGTP, dCTP und dTTP).

Reagenzien	Konzentration in 5 µl	Volumen /µl (1 rxn)	Volumen/µl (384rxns)*
H ₂ O		1,850	888
PCR Puffer (10x)	1,25x	0,625	300
MgCl ₂ (25mM)	1,626mM	0,325	156
dNTP mix (je25 mM)	500mM	0,100	48
Primer mix (je500 nM)	100nM	1,000	480
Genomische DNA (5-10ng/µl)	1-10ng/rxn	1,000	480
Hotstar Taq(5 U/µl)	0,5U/rxn	0,100	48
	Total	5,000	2400

Tabelle 6: PCR-Cocktail Mix (*Volumen beinhaltet einen 25 %igen Überhang, rxn: Mikrotitterplatten)

Um die PCR Amplifikation durchzuführen wurden die Komponenten aus Tabelle 6 auf 384 Mikrotitterplatten vorsichtig vermischt und nach Standard thermozykliert:

1. 94°C für 15 Minuten
 2. 94°C für 20 Sekunden
 3. 56°C für 30 Sekunden
 4. 72°C für 1 Minuten
 5. 72°C für 3 Minuten
 6. 4°C bis zur weiteren Verarbeitung
- } 45 Zyklen

3.3.2.4 SAP(shrimp alkalinephosphatase) Verfahren

Im folgenden Arbeitsschritt wurden die freien dNTPs des PCR Produkts dephosphoryliert.

Reagenzien	Volumen/µl (1 rxn)	Volumen/µl (384rxns) *
H ₂ O	1,530	734,4
10x SAP Puffer	0,170	81,6
SAP Enzyme (1U/ µl)	0,300	144,0
Total	2,000	960,0

Tabelle 7: SAP Mix (*Volumen beinhaltet einen 25 %igen Überhang, rxn: Mikrotitterplatten)

Die Komponenten aus Tabelle 7 wurden erneut auf 384 Mikrotiterplatten vermischt und anschließend zu 5 µL des PCR Produkts aus dem vorherigen Schritt hinzugefügt. Die Proben wurden im Folgenden vorsichtig gevortext und im Thermozykler nach Standard inkubiert:

1. 37° C für 40 Minuten
2. 85° C für 5 Minuten
3. 4° C bis zur weiteren Verarbeitung

3.3.2.5 iPLEX Reaktion- Primer Extension

Reagenzien	Konzentration in 9 µl	Volumen/µl (1 rxn)	Volumen/µl (384rxns)*
H ₂ O		0,755	362,40
iPLEX Puffer (10x)	0,222X	0,200	96,00
iPLEX Extension Mix (modifizierte Basen)	1X	0,200	96,00
Primer Mix (7µM:14µM)**	0,625µM: 1,25µM	0,804	385,92
iPLEX Enzym	1X	0,041	19,68
	Total	2,000	960,00

Tabelle 8: iPLEX Cocktail Mix (*Volumen beinhaltet einen 25 %igen Überhang, **Primer mit der niedrigeren Masse sind mit einer niedrigeren Konzentration von 0,625 µM und Primer mit der höheren Masse sind mit einer Konzentration von 1,25 µM in der 9 µl Lösung enthalten, rxn: Mikrotiterplatten)

Die Reagenzien aus Tabelle 8 wurden wie in den vorherigen Arbeitsschritten zusammengefügt, mit dem Reaktionsansatz vorsichtig vermischt und in einem 2 Stufen System thermozykliert:

1. 94° C für 30 Sekunden
 2. 94° C für 5 Sekunden
 3. 52° C für 5 Sekunden
 4. 80° C für 5 Sekunden
 5. 72° C für 3 Minuten
 6. 4° C bis zur weiteren Verarbeitung
- } 5 Zyklen } 40 Zyklen

3.3.2.6 Entsalzung und SpectroCHIP Bioarray

Die Entsalzung diente zur Optimierung der massenspektrometrischen Analyse. Dabei wurden die Proben in 16 µl Wasser und 6mg Harz verdünnt und anschließend bei 4000rpm zentrifugiert.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Reaktionslösungen auf einen 384-SpectroCHIP Bioarray dispensiert, um die abschließende MALDI-TOF MS durchzuführen.

3.3.2.7 MALDI-TOF MS

Die MALDI-TOF MS ist mit der MassARRAY Workstation Version 3.3 software durchgeführt worden (weitere Erläuterungen zur Einstellung eines Spektrums siehe MassARRAY Typer User's Guide, Sequenom Homepage)

Theoretischer Hintergrund

Eine massenspektrometrische Analyse ist ein analytisches Verfahren zur Ermittlung der chemischen Zusammensetzung von Verbindungen oder Molekülen anhand der errechneten Massen. Die Vorgehensweise bei der Massenspektrometrie ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt. Das Prinzip dieser Methode besteht aus der Ionisierung der zu untersuchenden Probe, wodurch geladene Moleküle oder Fragmente generiert werden. Die geladenen Teilchen werden anschließend mit Hilfe des Massen-Analysators durch ein elektrisches und/oder magnetisches Feld geleitet. Über die Geschwindigkeit der Teilchen wird das Masse/Ladungszahl-Verhältnis ermittelt. Das Letzte Modul, der Detektor, eruiert schließlich aus dem berechneten Verhältnis, um welche Ionen es sich handelt. (Sparkman, 2000).

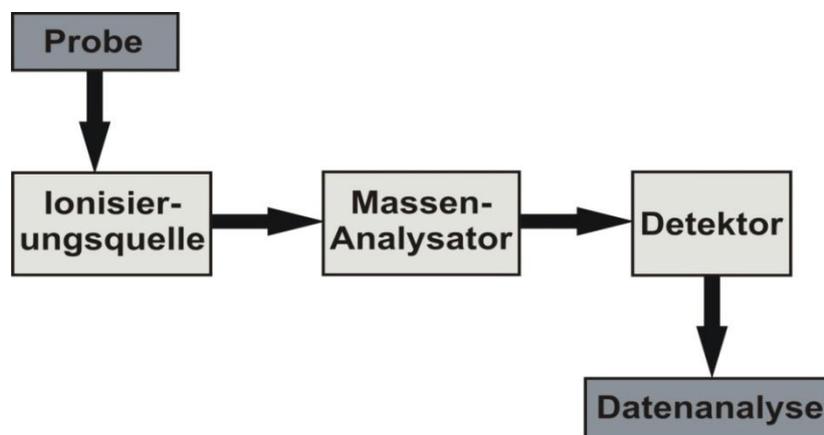


Abbildung 10: Die drei Arbeitsmodule einer Massenspektrometrie

Das konventionelle Verfahren kommt allerdings bei der Analyse von großen Biomolekülen oder organischen Molekülen an seine Grenzen. Der Grund dafür liegt in der niedrigen Geschwindigkeit und Instabilität dieser Moleküle.

Eins der weiterentwickelten Verfahren der massenspektrometrischen Analyse ist die von Karas et al. 1987 entwickelte MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry), welches wir in unserer Studie zur Genotypisierung genutzt haben. MALDI

wird meistens mit einem TOF Analysatoren kombiniert, möglich ist auch eine Kopplung mit anderen Analyseverfahren, die in dieser Arbeit aber nicht erläutert werden.

Initial fand die MALDI-TOF Massenspektrometrie Anwendung bei der Massenanalyse von großen Biomolekülen, heutzutage wird diese Methode allerdings vielfältig zur Quantifizierung von sowohl leichten als auch schweren Analyten eingesetzt. Oligonucleotide, Lipide, Aminosäuren, Peptide und Proteine, Metaboliten oder Toxine sind einige Stoffe, die mit Hilfe dieses vielseitigen Systems analysiert werden können (Cerpa-Poljak A. et al., 1995; Wallace WE., 2007). Des Weiteren ist ein Hochdurchsatzverfahren möglich, das eine schnelle und genaue Analyse eines vergleichsweise großen Massenbereichs zulässt (Duncan et al., 2008).

Messverfahren

Die Analyte werden zunächst in eine Matrix eingebettet und auf einem metallischen Träger kokristallisiert. Dadurch bleibt der Analyt geschützt und wird durch den Laser nicht direkt zerstört. Durch den anschließenden Laserbeschuss verdampft die Matrix und die Analyte werden ionisiert. Nachfolgend werden die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt. Der TOF-Analysator berechnet die Masse (m) in Abhängigkeit von der Flugzeit (time of flight) und der Ladungszahl (z).

$$tof \propto \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Im letzten Arbeitsschritt wandelt ein Ionendetektor die ankommenden Ionen in ein elektrisches Signal um. Die Ergebnisse einer massenspektrometrischen Analyse werden durch ein x/y Diagramm dargestellt, wo das Masse/Ladungs Verhältnis (x-Achse) in Abhängigkeit zur Intensität (y-Achse) demonstriert wird (siehe Abbildung 8) (Duncan et al., 2008).

3.4 Statistik

Mit Hilfe des EDV-Programms SPSS® (Version 17,0 Chicago, IL, USA) wurden die deskriptiven statistischen Analysen durchgeführt.

3.4.1 Statistische Variablen

Die verwendeten diskreten Variablen mit nominalem Messniveau, die die Bedingungen der Reflexivität, Symmetrie und Transitivität erfüllen, sind:

- SNPs und Haplotypen des Gens *CARD15*
- Krankheitsverlauf (akut/chronisch/unklar)

3.4.2 Statistische Verfahren

Analytische Statistik: Im Hinblick auf eine Assoziation mit einem Phänotyp der Sarkoidose wurden sowohl eine SNP-Analyse als auch eine Haplotyp-Analyse durchgeführt.

Die Untersuchung und Evaluierung der 8 Marker erfolgte mit dem Program FAMHAP (Becker und Knapp, 2004). Zur Berechnung der p-Werte und möglicher Assoziationen mit der Sarkoidose wurde der *Cochran-Armitage Trend Test* angewandt (Armitage, 1955).

Die Suche nach Haplotypen, die bei der Entstehung oder Verlauf einer Sarkoidose eine Rolle spielen könnten, wurde mit dem weiterentwickelten FAMHAP Programm durchgeführt (Becker et al., 2005). Des Weiteren wurden die Haplotypfrequenzen der Fälle und Kontrollen mit dem EM-Algorithmus (Expectation-Maximization-Algorithmus) berechnet und mit dem global likelihood ratio test verglichen.

Um korrekte p-Werte zu erhalten und statistische Fehler zu minimieren, haben wir zum einen das Permutationsverfahren und zum anderen die Monte Carlo Simulation (FAMHAP Option: hapcc maxmarker 1) angewandt.

Die Arbeitsgruppe um Becker und Knapp stellte erstmals 2004 das FAMHAP Programm vor, mit dessen Hilfe das Analysieren einer hohen Anzahl von Markerkombinationen möglich gemacht wurde. Dabei wird die maximale Wahrscheinlichkeit (Maximum-Likelihood) der Haplotyp Frequenzen in genetisch erkrankten Familien mittels des EM-Algorithmus (Expectation-Maximization-Algorithmus) berechnet. Bei dieser Analyse werden 20 SNPs, mit erweiterten Einstellungen bis zu 63 SNPs, untersucht. 2005 wurde das weiterentwickelte Programm veröffentlicht (Becker et al., 2005). Damit können großangelegte Haplotyp Analysen für jegliche Fall-Kontroll Studien durchgeführt und verschiedene Verfahren zur p-Wert Korrektur angewandt werden.

Deskriptive Statistik: Mithilfe von Kreuztabellen und LD-Plots wird der Zusammenhang zwischen SNPs/Haplotypen und Phänotypen der Sarkoidose veranschaulicht. Statistische Signifikanz wird erreicht mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 0,05$, d.h. mit einem $p \leq 0,05$.

4 ERGEBNISSE

4.1 Studienaufbau und -ziel

Das Ziel dieser Studienarbeit war es den Einfluss von 8 Taq-SNPs und von 13 Haplotypen des *CARD15* Gens auf die Suszeptibilität und den Verlauf der Sarkoidose zu untersuchen. In einer großangelegten Fall-Kontroll-Studie mit 300 Probanden und 381 Kontrollen haben wir eine Assoziationsanalyse der einzelnen Marker und der Haplotypen durchgeführt. Zur Evaluation der Wirkung von *CARD15* auf die verschiedenen Verläufe der Sarkoidose wurden die Genotypen sowohl aller Sarkoidosepatienten, als auch die der Untergruppen: akuter und chronischer Erkrankter mit dem Kontrollkollektiv verglichen. Desweiteren wurden in einer Pseudo- Fall-Kontrollstudie sowohl die SNPs als auch die Haplotypen der akut und chronisch erkrankten Patienten gegenübergestellt und ausgewertet.

4.2 Statistische Datenanalyse

4.2.1 *Demographische Basisdaten*

Das Sarkoidose-Gesamtkollektiv umfasste 300 Personen mit klinisch gesicherter Diagnose einer Sarkoidose entsprechend den Richtlinien des ATS/ERS/WASOG Komitees. Die Kontrollgruppe, bestehend aus 381 Probanden, wurde entsprechend der Fall-Kohorte nach Geschlecht, Alter und Herkunft ausgewählt.

Es zeigte sich ein leichtes Überwiegen des weiblichen Geschlechts mit 57,3 % zu 42,7 % in unserem Sarkoidosekollektiv. Die Altersspanne unserer Patienten bei Studienantritt reichte von 19-83 Jahren mit einem Mittelwert von 51,73, dessen Standardabweichung $\pm 13,585$ betrug. Das Kollektiv bestand ausschließlich aus kaukasischen Sarkoidosepatienten deutscher Herkunft. Die Geschlechterverteilung des Kontrollkollektivs war äquivalent zu der des Sarkoidosekollektivs mit einer leichten zahlenmäßigen Dominanz der Frauen (54,1 % zu 45,9 %). Der Mittelwert des Alters war verglichen mit der Sarkoidosegruppe fast identisch mit durchschnittlichen 51,50 Jahren. Lediglich die Standardabweichung war in der Kontrollgruppe mit $\pm 18,351$ etwas höher auf Grund einer höheren Altersspanne, die zwischen 19 und 94 Jahren lag (siehe Tabelle 3).

Von den 300 Sarkoidosepatienten des Grundkollektivs wurden letztendlich 269 Proben und vom Kontrollkollektiv 322 Proben mit dem MassARRAY System genotypisiert. Auf Grund von *sample errors* und verschiedenen Problemen mit der Chipaufteilung musste die Anzahl des zu untersuchenden Materials reduziert werden. Unter den 269 Sarkoidosepatienten waren 62 akut

und 157 chronisch erkrankt. Bei 50 Teilnehmern der Studie war der Verlauf unklar. Gemäß der Ergebnisse des HapMap Projektes Phase 2 wurden acht Tag SNPs sowohl einzeln als auch in verschiedenen Kombination als Haplotypen analysiert und die Ergebnisse der entsprechenden Gruppen mit einander verglichen. Mit Hilfe des FAMHAP-Programms erfolgte die statistische Evaluierung der Daten.

Die p-Werte der SNP-Analyse wurden mit dem Cochran-Armitage Trend Test ermittelt (Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$). Die Genotypen aller SNPs wurden in der Kontrollgruppe auf eine Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht überprüft.

Um die korrekten Haplotypen und Tag SNPs des *CARD15* Gens zu eruieren wurden mit Hilfe von HaploView und dem HapMap Programm LD-Plots (Linkage-disequilibrium Plots) für die Kontrollgruppe und die Fallgruppen erstellt. Der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den Daten der HapMap CEU Gruppe erwies keine großen Differenzen (Gabriel et al., 2002; The International HapMap Consortium, 2007). Ebenso entsprachen die Strukturen der LD Plots in den Sarkoidosekollektiven dem LD-Plot der Kontrollgruppe. Um die Kombinationsmöglichkeiten der acht *CARD15*-Marker einzugrenzen, wurde die Methode der sogenannten Sliding Windows angewandt. Dabei wurde ein „Schiebefenster“ jeweils über zwei oder drei Marker immer um eine Stelle weitergeschoben. So sind 13 Kombinationen entstanden, die alle zwischen der Kontrollgruppe und sowohl dem gesamten Sarkoidosekollektiv als auch den Untergruppen mit akutem und chronischem Verlauf verglichen wurden. Um eine hohe Genauigkeit der p-Werte zu erzielen, wurden diese mit dem Permutaionsverfahren und der im Rahmen des Famhap Programm durchgeführten Monte-Carlo Simulation (hapcc maxmarker 1) nochmal korrigiert.

4.2.2 Verteilung von Genotypen, Allelfrequenzen und Haplotypen

Sowohl bei der Analyse der einzelnen Marker als auch bei der Haplotypanalyse konnte keine signifikante Assoziation festgestellt werden.

4.2.2.1 SNP- Analyse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Assoziationsanalyse der einzelnen Marker dargestellt: Tabellen 11a und 11b zeigen die prozentualen Genotypenverteilungen der 8 Marker, die Allelfrequenzen und die p-Werte immer im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

Nr.	Position	SNP-ID	Allele	Probe	Genotypen (%)*			Allelfreq (%)		p-Armitage ^a
					AA	AG	GG	A	G	
1	49282694	rs7194886	A/G		AA	AG	GG	A	G	
				Alle	21,2	48,3	30,5	45,4	54,6	0,918
				Akut	27,4	37,1	35,5	46	54	0,949
				Chron.	18,5	54,1	27,4	45,5	54,5	0,973
				Unklar	22,0	44,0	34,0	44	56	0,755
				Kontr.	19,9	51,6	28,6	45,7	54,3	
2	49287947	rs4785224	A/G		AA	AG	GG	A	G	
				Alle	18,6	44,2	37,2	40,7	59,3	0,518
				Akut	22,6	33,9	43,5	39,5	60,5	0,887
				Chron.	15,9	50,3	33,8	41,1	58,9	0,5
				Unklar	22	38	40	41	49	0,683
				Kontr.	15,2	47,2	37,6	38,8	61,2	
3	49288597	rs5743266	A/G		AA	AG	GG	A	G	
				Alle	10,4	42	47,6	31,4	68,6	0,766
				Akut	12,9	38,7	48,4	32,3	67,7	0,723
				Chron.	9,6	43,9	46,5	31,5	68,5	0,772
				Unklar	10	40	50	30	70	0,908
				Kontr.	10,9	39,4	49,7	30,6	69,4	
4	49294157	rs6500328	A/G		AA	AG	GG	A	G	
				Alle	37,5	43,9	18,6	59,5	40,5	0,753
				Akut	41,9	35,5	22,6	59,7	40,3	0,883
				Chron	33,1	51	15,9	58,6	41,4	0,592
				Unklar	46	32	22	62	38	0,768
				Kontr.	37	46,9	16,1	60,4	39,6	

Tabelle 11a: Statistischen Analyse der Varianten des CARD15 Gens auf Chromosom 16, die Sarkoidosekollektive wurden immer mit der Kontrollgruppe verglichen, (^ap-Werte wurden nicht mit multiple testing (Permutationsverfahren und Monte Carlo Simulation) korrigiert, *alle SNPs wurden in der Kontrollgruppe auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht untersucht)

Legende:

Gesamtes Sarkoidosekollektiv = Alle

Sarkoidosepatienten mit akutem Verlauf = Akut;

Sarkoidosepatienten mit chronischem Verlauf = Chron.;

Sarkoidosepatienten mit unklarem Verlauf = Unklar

Kontrollgruppe = Kontr.

Nr.	Position	SNP-ID	Allele	Probe	Genotypen (%)*			Allelfreq (%)		p-Armitage ^a
5	49303427	rs2066844	C/T		CC	CT	TT	C	T	
				Alle	90,3	9,7	0	95,2	4,8	0,297
				Akut	85,5	14,5	0	92,7	7,3	0,658
				Chron.	92,4	7,6	0	96,2	3,8	0,122
				Unklar	90	10	0	95	5	0,634
				Kontr.	87,9	11,8	0,3	93,8	6,2	
6	49313210	rs1052129	G/T		GG	GT	TT	G	T	
				Alle	19,3	43,9	36,8	41,3	58,7	0,844
				Akut	22,6	35,3	41,9	40,3	59,7	0,942
				Chron.	17,2	50,3	32,5	42,4	57,6	0,624
				Unklar	22	34	44	39	61	0,758
				Kontr.	17,4	46,6	36	40,7	59,3	
7	49314275	rs5743289	C/T		CC	CT	TT	C	T	
				Alle	69,1	27,5	3,3	82,9	17,1	0,349
				Akut	64,5	32,3	3,2	80,6	19,4	0,98
				Chron.	71,3	25,5	3,2	84,1	15,9	0,219
				Unklar	68	28	4	82	18	0,771
				Kontr.	65,8	29,8	4,3	80,7	19,3	
8	49314777	rs5743291	A/G		AA	AG	GG	A	G	
				Alle	0,4	16	83,6	8,4	91,6	0,236
				Akut	0	14,5	85,5	7,3	92,7	0,291
				Chron.	0,6	17,8	81,5	9,6	90,4	0,686
				Unklar	0	12	88	6	94	0,177
				Kontr.	1,6	17,7	80,7	10,4	89,6	

Tabelle 11b: Statistische Analyse der Varianten des *CARD15* Gens auf Chromosom 16, die Sarkoidosekollektive wurden immer mit der Kontrollgruppe verglichen, (^ap-Werte wurden nicht mit multiple testing (Permutationsverfahren Monte Carlo Simulation) korrigiert, *alle SNPs wurden in der Kontrollgruppe auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht untersucht)

Legende:

Gesamtes Sarkoidosekollektiv = Alle

Sarkoidosepatienten mit akutem Verlauf = Akut;

Sarkoidosepatienten mit chronischem Verlauf = Chron.;

Sarkoidosepatienten mit unklarem Verlauf = Unklar

Kontrollgruppe = Kontr.

Wie aus den Tabellen 11a und 11b ersichtlich ist, kann zwischen keinem der SNPs und einer Verlaufsform der Sarkoidose eine signifikante Assoziation festgestellt werden.

Der Vergleich zwischen dem Sarkoidose-Gesamtkollektiv und dem Kontrollkollektiv ergibt im Hinblick auf die Häufigkeitsverteilung der 8 SNPs p-Werte $\geq 0,297$ und damit keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

Die größte Schwankung in der Häufigkeitsverteilung der Genotypen zeigt sich im Marker Nr. 8 (rs5743291) mit einem p-Wert von 0,236, der allerdings nicht ausreicht um eine Signifikanz festzustellen. Der Anteil des Genotyps AA liegt im Gesamtkollektiv der Sarkoidosepatienten viel niedriger mit 0,4 % als in der Kontrollgruppe mit 1,6 %. AG zeigt eine Häufigkeit von 16 % in der Sarkoidosegruppe und 17,7 % in der Kontrollgruppe. Der Genotyp GG ist bei 88,6 % der 269 Sarkoidosepatienten und nur bei 80,7 % der 322 Kontrollen zu finden. Vergleicht man die Allelfrequenzen in den beiden Gruppen, so ergeben sich allerdings keine nennenswerten Differenzen.

Aus der Gegenüberstellung der Patienten mit einem akuten Verlauf der Sarkoidose und der Kontrollgruppe resultieren ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse. Alle p-Werte sind $\geq 0,291$ und damit über dem Signifikanzniveau von 0,05. Dieses Resultat spiegelt die fehlende Assoziation zwischen den SNPs und einem akuten Verlauf der Sarkoidose wider.

Die Analyse der prozentuellen Angaben der Genotypenverteilung ergibt allerdings in den SNPs Nr. 1, 2, 4 und 6 Abweichungen von den Werten der Kontrollgruppe. Der Genotyp AA des SNPs Nr. 1 ist bei 27,4 % der Sarkoidosepatienten mit akutem Verlauf vorzufinden, aber nur bei 19,9 % der Kontrollgruppe. Der heterozygote Genotyp AG überwiegt hingegen bei den Kontrollen mit 51,6 % zu 37,1 % bei den Sarkoidosepatienten mit akutem Verlauf. Den homozygoten GG-Genotyp weisen 35,5 % der Erkrankten und nur 28,6 % der Vergleichsgruppe auf. Ein ähnlicher Verlauf mit höheren Häufigkeiten der beiden homozygoten Genotypen in der Untergruppe „Akut“ und einem geringeren Anteil des heterozygoten Genotyps im Vergleich zum gesunden Kollektiv lässt sich ebenfalls bei SNP 2, 4 und 6 feststellen. Trotz dieser Variationen ist keiner der dazugehörigen p-Werte kleiner als 0,883. Die Erklärung dafür liegt in der Verteilung der Allele. Aus den Tabellen 11a und b kann entnommen werden, dass die Allelfrequenzen bei diesen 4 SNPs fast identische Werte annehmen und somit keine signifikanten Assoziationen geschlossen werden können. Im 1. SNP beträgt die Allelfrequenz von A bei den Patienten mit akutem Verlauf 46 %, im Normalkollektiv kommt diese auf fast identische 45,7 %. Dementsprechend liegt die Frequenz des anderen Allels G bei 54 % im Sarkoidosekollektiv und bei 54,3 % in der Vergleichsgruppe.

Die Betrachtung eines möglichen Einflusses der Polymorphismen des *CARD15* Gens auf die Entstehung einer chronischen Form der Sarkoidose lässt durch die resultierenden p-Werte keine signifikanten Ergebnisse zu. Aus dem Vergleich des SNPs Nr. 5 zwischen der Kontrollgruppe und dem Sarkoidosekollektiv mit chronischem Verlauf kann man mit einem p-Wert von 0,122 lediglich einen Trend erkennen.

Besonders auffallend ist der Unterschied des homozygoten TT-Genotyps, welcher überhaupt nur in der Kontrollgruppe zu finden ist mit 0,3 %. Der homozygote CC-Genotyp überwiegt nicht erheblich in der Gruppe mit chronischem Verlauf mit 92,4 % zu 87,9 % in der Kontrollgruppe. Der Anteil der heterozygoten Träger liegt in der Gruppe der Erkrankten bei 7,6 % und bei den gesunden Probanden bei 11,8 %. Die Zahlen der Allelfrequenzen zeigen den Trend dieses SNPs etwas deutlicher. Das Allel T kommt mit 6,2 % knapp doppelt so häufig in der Kontrollgruppe vor, verglichen mit 3,8 % in der Sarkoidosegruppe mit chronischem Verlauf.

4.2.2.2 Haplotypanalyse

In der Haplotypanalyse wurden verschiedene Kombinationen der 8 *CARD15*-Polymorphismen des Sarkoidose-Gesamtkollektivs und der zwei Untergruppen („Akut“ und „Chronisch“) mit dem Kontrollkollektiv verglichen und bezüglich eventueller Assoziationen analysiert. Von großem Interesse war dabei sowohl ein möglicher Einfluss auf die Entstehung als auch auf eine Modifizierung der Erkrankung. Aus den Ergebnissen, welche in den Sliding-Window Tabellen 12-14 dargestellt werden, lässt sich auch hier kein signifikanter Zusammenhang zwischen Markerkombinationen des *CARD15* Gens und der Sarkoidose feststellen.

Die Gegenüberstellung des gesamten Sarkoidosekollektivs und der Kontrollgruppe ergibt im Hinblick auf Unterschiede in der Verteilung der Marker-Kombinationen mit p-Werten $\geq 0,2396$ keine signifikanten Ergebnisse (siehe Tabelle 16). Die größten Abweichungen finden sich bei der Analyse der Markerkombination 7-8 (p-Wert = 0,2396). Auch die Einzelmarker-Untersuchung erweist im Bezug auf die gleichen Gruppen den kleinsten p-Wert im SNP Nr. 8.

0,3425 1-2-3	0,4340 2-3-4	0,4159 3-4-5	0,8685 4-5-6	0,7507 5-6-7	0,3836 6-7-8		
0,3321 1-2	0,6041 2-3	0,8287 3-4	0,6177 4-5	0,6294 5-6	0,6553 6-7	0,2396 7-8	
0,9520 1	0,5196 2	0,8078 3	0,7706 4	0,3023 5	0,8618 6	0,3731 7	0,2753 8
rs7194886	rs4785224	rs5743266	rs6500328	rs2066844	rs10521209	rs5743289	rs5743291

Tabelle 12: Sliding-Window Methode zur Haplotypanalyse der 8 *CARD15*-Polymorphismen im Vergleich zwischen dem gesamten Sarkoidosekollektiv und der Kontrollgruppe (Famhap-Programm: Funktion hapcc maxmarker 3)

Aus dem Vergleich der Sarkoidosepatienten mit akutem Verlauf gegenüber der Vergleichsgruppe bezüglich der Markerkombinationen ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang. Die resultierenden p-Werte bewegen sich zwischen 0,5678 und 1,0, was die fehlende Assoziation der *CARD15* Haplotypen mit der Entstehung einer akuten Form der Sarkoidose erhärtet.

0,9687 1-2-3	0,9802 2-3-4	0,9291 3-4-5	0,9250 4-5-6	0,9714 5-6-7	0,7792 6-7-8		
0,9797 1-2	0,8468 2-3	0,8097 3-4	0,8859 4-5	0,9151 5-6	0,9970 6-7	0,5678 7-8	
1,0000 1	0,9210 2	0,7600 3	0,9232 4	0,6833 5	1,0000 6	1,0000 7	0,3382 8
rs7194886	rs4785224	rs5743266	rs6500328	rs2066844	rs10521209	rs5743289	rs5743291

Tabelle 13: Sliding-Window Methode zur Haplotypanalyse der 8 *CARD15*-Polymorphismen im Vergleich zwischen dem Sarkoidosekollektiv mit akutem Verlauf und der Kontrollgruppe (Famhap-Programm: Funktion hapcc maxmarker 3)

Die Analyse eines möglichen Zusammenhangs zwischen bestimmten Haplotypen des *CARD15* Gens und dem chronischen Verlauf einer Sarkoidose ergibt ebenfalls im Vergleich zum Normalkollektiv keine signifikanten Resultate. Der kleinste p-Wert mit 0,3384 findet sich bei der Markerkombination 4-5. Bei dem Vergleich der einzelnen Polymorphismen zeigt sich im SNP Nr. 5 ein Trend mit einem p-Wert von 0,122, welcher jedoch in Kombination mit anderen SNPs nicht bestätigt werden kann.

0,6781 1-2-3	0,6418 2-3-4	0,3413 3-4-5	0,5443 4-5-6	0,5005 5-6-7	0,5717 6-7-8		
0,5462 1-2	0,6137 2-3	0,7218 3-4	0,3384 4-5	0,3454 5-6	0,5139 6-7	0,3510 7-8	
1,0000 1	0,5268 2	0,8269 3	0,6226 4	0,1303 5	0,6275 6	0,2244 7	0,7361 8
rs7194886	rs4785224	rs5743266	rs6500328	rs2066844	rs10521209	rs5743289	rs5743291

Tabelle 14: Sliding-Window Methode zur Haplotypanalyse der 8 *CARD15*-Polymorphismen im Vergleich zwischen dem Sarkoidosekollektiv mit chronischem Verlauf und der Kontrollgruppe (Famhap-Programm: Funktion hapcc maxmarker 3)

4.2.2.3 Pseudofallkontroll Analyse

In der Pseudo-Fall-Kontrollstudie wurden sowohl die acht *CARD15* Polymorphismen einzeln als auch die Haplotypblöcke zwischen der Sarkoidose-Untergruppe mit chronischem und der mit akutem Verlauf analysiert. Auch aus diesem Vergleich zwischen verschiedenen Phänotypen der Sarkoidose kann weder für einen einzelnen Marker noch für eine Markerkombination eine signifikante Assoziation geschlossen werden.

In der SNP-Analyse kann im rs2066844-Polymorphismus Nr. 5 mit einem p-Wert von 0,12 ein Trend angenommen werden. Schon aus der Gegenüberstellung des Sarkoidosekollektivs mit chronischem Verlauf und der Kontrollgruppe resultiert für diesen SNP Nr. 5 ebenfalls ein p-Wert mit Trendcharakter ($p = 0,122$), was einen möglichen Einfluss dieses Polymorphismus auf den chronischen Verlauf einer Sarkoidose unterstützt. Dennoch reichen die Ergebnisse nicht aus, um eine statistische Signifikanz zu sichern. Auch in Kombination mit anderen SNPs setzt sich dieser Trend nicht fort.

Die Ergebnisse der Haplotypanalyse ergeben p-Werte $\geq 0,3312$ und damit keinen Zusammenhang zwischen *CARD15* Haplotypen und einer Verlaufsform der Sarkoidose.

Nr.	SNP-ID	Position	Allele	Chronisch	Akut (Kontr.)	p-Armitage
1	rs7194886	49282694	A/G	157	62	0,936
2	rs4785224	49287947	A/G	157	62	0,77
3	rs5743266	49288597	A/G	157	62	0,884
4	rs6500328	49294157	A/G	157	62	0,839
5	rs2066844	49303427	C/T	157	62	0,12
6	rs10521209	49313210	G/T	157	62	0,705
7	rs5743289	49314275	C/T	157	62	0,394
8	rs5743291	49314777	A/G	157	62	0,438

Tabelle 15: Vergleich der einzelnen Marker zwischen den Sarkoidosekollektiven mit chronischem und akutem Verlauf

0,9535	0,9322	0,6574	0,4191	0,5126	0,8328		
1-2-3	2-3-4	3-4-5	4-5-6	5-6-7	6-7-8		
0,9035	0,9638	0,9972	0,3312	0,3277	0,7100	0,7045	
1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	
1,0000	0,8358	0,9093	0,9180	0,1326	0,7561	0,4056	0,4585
1	2	3	4	5	6	7	8
rs7194886	rs4785224	rs5743266	rs6500328	rs2066844	rs10521209	rs5743289	rs5743291

Tabelle 16: Sliding-Window Methode zur Haplotypanalyse der 8 CARD15-Polymorphismen im Vergleich zwischen dem Sarkoidosekollektiv mit chronischem Verlauf und dem mit akutem Verlauf (Famhap-Programm: Funktion hapcc maxmarker 3)

5 DISKUSSION

Das Vorhaben dieser Dissertation war die Analyse der gesamten Haplotypblockstruktur des *CARD15* Gens im Hinblick auf eine Assoziation mit der Entstehung oder der Modifizierung einer Sarkoidose. Ein Hauptaugenmerk wurde auf den Einfluss der Genotypen auf die Verlaufsformen der Erkrankung gelegt.

Das Sarkoidosekollektiv wurde in Bezug auf einzelne Marker sowie auf gesamte Haplotypen mit einem entsprechenden Kontrollkollektiv verglichen. Ebenfalls wurden die Ergebnisse der gesunden Probanden dem akuten und dem chronischen Subkollektiv gegenübergestellt. Des Weiteren wurde ein Vergleich zwischen der Gruppe mit chronischem Verlauf und der mit akutem Verlauf durchgeführt, um eine eventuelle Modifizierung des Verlaufs durch *CARD15* zu evaluieren. Nach unserem Wissensstand wurde eine Haplotypanalyse des gesamten *CARD15* Gens in diesem Rahmen hier zum ersten Mal durchgeführt.

Das Ergebnis der vorliegenden Genotyp-Phänotyp-Assoziationsstudie zeigt weder bei der SNP-Analyse noch bei der Untersuchung der Haplotypen des *CARD15* Gens einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Entstehung oder dem Verlauf der Sarkoidose.

Die Analyse der einzelnen Marker ergibt lediglich für einen Fall eine Tendenz. Im SNP Nr.5 (rs2066844) besteht eine Abweichung der Genotypverteilung zwischen der Kontrollgruppe und der Sarkoidosegruppe mit chronischem Verlauf. Der resultierende p-Wert von 0,122 lässt jedoch keine Schlussfolgerung auf eine statistisch signifikante Assoziation zu.

Die Analyse der gesamten Haplotypblockstruktur erfolgte mittels acht Tag SNPs des *CARD15* Gens. Diese wurden anhand der HaploView und HapMap Daten Phase 2 ermittelt (Gabriel et al., 2002; The International HapMap Consortium, 2007). Die Ergebnisse zeigen jedoch erneut das Fehlen eines Zusammenhangs zwischen Genvarianten des *CARD15* Gens und bestimmten Verlaufsformen der Sarkoidose. Die Haplotypanalyse stellt eine besonders gute Möglichkeit dar, versteckte und schwer auffindbare, genetische Risikovarianten aufzuspüren, die zwischen getesteten SNPs liegen. Aus diesem Grund können wir nicht nur auf eine fehlende Assoziation zwischen einzelnen, hier getesteten SNPs in *CARD15*, sondern des gesamten Gens und der Sarkoidose schließen.

In der Pseudo-Fall-Kontrollstudie wurden sowohl die Ergebnisse der SNP-Analyse als auch der Haplotypanalyse zwischen den unterschiedlichen Phänotypen (akuter und chronischer Verlauf)

verglichen. Auch hier kann in Bezug auf die Beeinflussung einer Verlaufsform kein Zusammenhang zu dem *CARD15* Gen evaluiert werden.

Morbus Crohn, Blau Syndrom und EOS stellen komplexe granulomatös entzündliche Systemerkrankungen dar, die auffallend viele Überschneidungen mit der Sarkoidose aufweisen und mit Mutationen im *CARD15* Gen assoziiert wurden. Bisherige Arbeiten haben im Hinblick auf einen eventuellen Zusammenhang zwischen *CARD15* und Sarkoidose genau diese Polymorphismen untersucht. Mit Morbus Crohn wurden hauptsächlich vier Polymorphismen assoziiert (C802T (P268S), C2104T (R702W), G2722C (G908R), 3020insC (1007fs)), die auf der LRR-Domäne des *CARD15* Gens lokalisiert wurden (Hugot et al., 2001; Lesage et al., 2002; Ogura et al., 2001). Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe um Miceli-Richard et al. (2001) drei Mutationen in der NOD Region mit dem Blau Syndrom in Zusammenhang bringen (C1405T (L469F), G1001A (R334Q), C1000T (R334W)). Kanazawa et al. (2005) haben in einer 2005 durchgeführten Studie sieben Polymorphismen ebenfalls in der NOD Region des *CARD15* Gens identifiziert, die mit der EOS assoziiert sein könnten. (A1487T (H496L), A1813C (T605P), C2010A (N670K), T1538C (M513T), C1000T (R334W), G1834A (A612T) und C1146G (D382E).

Aus der Beobachtung, dass verschiedene granulomatös entzündliche Erkrankungen mit SNPs auf unterschiedlichen Regionen des *CARD15* Gens in Zusammenhang gebracht wurden, erschien es uns sinnvoller, die gesamte Haplotypblockstruktur zu untersuchen.

Bei den Tag SNPs, die wir benutzt haben, handelt es sich um „synonyme SNPs“, die nicht unbedingt zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen müssen. Sie sind als Marker zu verstehen, die in Kombination mit anderen, im Kopplungsungleichgewicht stehenden, SNPs zu Funktionsänderungen beitragen können. Auf Grund des nahen Kopplungsungleichgewichts zu den übrigen Markern reicht die Analyse der acht Tag SNPs und deren Haplotypen aus, um eine Aussage über das gesamte Gen machen zu können. Vor allem die funktionelle Wertigkeit der *CARD15* Polymorphismen im Bezug auf die Sarkoidose konnten wir mit unserem Verfahren überprüfen.

Außer SNP Nr. 5 (rs2066845, C2104T) ist keiner dieser Tag SNPs von anderen Arbeitsgruppen bis jetzt untersucht worden. Lediglich dieser Tag SNP Nr. 5 gehört zu der Gruppe der mit Morbus Crohn assoziierten Varianten und ergab in unserer SNP-Analyse kein statistisch signifikantes Ergebnis. Trotz einer Tendenz im Hinblick auf das Auftreten einer chronischen Sarkoidose, konnten wir keinen Einfluss dieses SNPs weder auf den Verlauf noch auf das Auftreten einer

Sarkoidose feststellen. Die Arbeitsgruppe um Sato et al. (2009) hat erst kürzlich den gleichen SNP mit einer schweren Verlaufsform einer pulmonalen Sarkoidose bei Briten assoziieren können. Sato et al. (2009) haben ihr Sarkoidosekollektiv, bestehend aus 185 britischen Patienten, basierend auf röntgenologischen Stadien und den Ergebnissen aus Lungenfunktionsuntersuchungen in Untergruppen eingeteilt. Ihre Ergebnisse weisen darauf hin, dass *CARD15* Polymorphismen einen Einfluss auf den Verlauf der Sarkoidose haben und zeigen somit die Bedeutung der Unterteilung des Kollektivs in einer so komplexen Erkrankung. Idealerweise sollten die Untergruppen exakt gewählt werden, um verantwortliche Genvarianten nicht zu übersehen. Auf der anderen Seite müssen sie groß genug sein, um aussagekräftige Daten zu generieren. Neben der Einteilung nach Stadien und Lungenfunktionsparametern wie bei Sato et al. (2009) gibt es auch weitere Möglichkeiten ein Sarkoidosekollektiv zu gliedern.

Unser Kollektiv wurde in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe wurde durch einen akuten, spontan ausheilenden und im Beobachtungszeitraum von zwei Jahren nicht rezidivierenden Verlauf charakterisiert. Die zweite Gruppe war durch einen chronisch rezidivierenden Verlauf in der Anamnese oder im Beobachtungszeitraum gekennzeichnet.

Mit dieser Einteilung in einem viel größeren Gesamtkollektiv aus 300 Sarkoidosepatienten, ebenfalls kaukasischer Herkunft, konnten wir im Gegensatz zu der Arbeitsgruppe um Sato et al. keine Assoziationen zwischen dem SNP Nr. 5 (rs2066844, C2104T) und einer chronischen Form feststellen. Aus der aussagekräftigen Haplotypanalyse konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen Kombinationen mit dem SNP Nr. 5 (rs2066844, C2104T) und einer Verlaufsform hergeleitet werden.

Vier weitere Arbeitsgruppen haben ebenfalls denselben SNP (rs2066844, C2104T) untersucht und keine signifikanten Assoziationen festgestellt (Gazouli et al., 2006; Ho et al., 2005; Milman et al., 2007; Schürmann et al., 2003). Die Studie von Gazouli et al. (2006) zeigte erhöhte Frequenzen für diesen SNP in einer griechischen Sarkoidosegruppe aus 100 Probanden, die allerdings nicht ausreichten, um signifikante Ergebnisse zu erhalten.

Da die Kollektive von Gazouli et al., Schürmann et al. und Ho et al. nicht nach Phänotypen unterteilt wurden, ist es schwierig die Daten auf die schwere Verlaufsform einer pulmonalen Sarkoidose zu beziehen und somit mit unserem und dem Ergebnis von Sato et al. zu vergleichen.

Unser Schema war an die SCAC (sarcoid clinical activity classification) Einteilung angelehnt, nach der drei spezielle Punkte herangezogen werden, um Sarkoidosepatienten einzustufen (Prasse et al., 2008). Erstens wird der Verlauf bewertet, wobei wie in unserer Studie eine Grenze nach

zwei Jahren zwischen einem akuten und chronischen Verlauf gezogen wird. Zweitens wird die Notwendigkeit einer medikamentösen Behandlung und drittens die Notwendigkeit einer Langzeitbehandlung bewertet. Nach genau diesem Schema wären aus unserem Kollektiv mit 300 Patienten zu kleine Subgruppen entstanden, um eine ausreichende statistische Aussagekraft zu gewährleisten. In einem weitaus größeren Kollektiv könnte diese Einteilung sinnvoll sein, da nicht nur ein chronischer Verlauf, sondern auch die Progressivität des chronischen Verlaufs betrachtet wird. Wir haben von den drei Punkten nur den Verlauf der Patienten nach zwei Jahren herangezogen, was sich allerdings schon in anderen Studien als sinnvoll erwies. Das zeigen die Ergebnisse zum *BTNL-2 Gen (butyrophilin-like 2)*, welches bis heute das am besten mit der Sarkoidose assoziierte Gen darstellt und mit einer chronischen Verlaufsform assoziiert werden konnte (Li et al., 2006; Valentonyte et al., 2005). Des Weiteren hat unsere Arbeitsgruppe kürzlich auch einen Zusammenhang zwischen *VEGF* Varianten und den unterschiedlichen Verläufen im gleichen Kollektiv mit gleicher Einteilung nachweisen können (Pabst et al., 2009).

Die Arbeitsgruppe um Fischer et al. (2011) hat in einer überdurchschnittlich großen Studie 1996 deutsche Sarkoidosepatienten genotypisiert und ebenfalls dieses Kollektiv nach denselben Kriterien wie wir in eine akute und eine chronische Verlaufsform eingestuft. Es wurden 106 SNPs analysiert, bei denen schon ein Zusammenhang mit der Entstehung von Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa nachgewiesen wurde. Trotz der umfangreichen Anzahl an Probanden wurden keine weiteren Unterteilungen z.B. nach Behandlungsnotwendigkeit oder Lungenfunktion in die Statistik mit einbezogen. Die Untergruppen mit 648 akut und 1161 chronisch erkrankten Patienten waren immer noch so groß, dass sie aussagekräftige Subkollektive hätten bilden können. Von den 1161 chronisch kranken Patienten sind 427 mit oder ohne Therapie genesen. 734 zeigten trotz Cortisontherapie einen fortbestehenden Krankheitsverlauf. Anscheinend erschien es der Arbeitsgruppe um Fischer et al. (2011) nicht sinnvoll sowohl diese oder weitere Unterteilungen vorzunehmen und in die statistische Datenauswertung zu integrieren.

Der fehlende Zusammenhang zwischen *CARD15* SNPs und der Sarkoidose mit ihren Verläufen in dieser großen aussagekräftigen Studie unterstützt noch einmal sowohl unser Ergebnis als auch die Einteilung, die wir vorgenommen haben. Fischer et al. (2011) haben allerdings andere Gene mit Sarkoidoseverläufen und der Entstehung in Verbindung bringen können. *HERC2* wurde als Suzeptibilitätsgen identifiziert, *IL-23* konnte mit der chronischen Form in Zusammenhang gebracht werden und der SNP rs12035082 auf Chromosom 1q24.3 scheint auf den akuten Verlauf Einfluss zu nehmen.

Eine positive Assoziation mit einem anderen *CARD15* Polymorphismus hat die schon oben erwähnte Arbeitsgruppe um Gazouli et al. (2006) herausgefunden. In dieser Studie wurde das genetische Material von 100 griechischen Sarkoidosepatienten und 150 Kontrollen mittels PCR und RFLP auf folgende, mit Morbus Crohn assoziierte, *CARD15* Polymorphismen C2104T (R702W), G2722C (G908R), 3020insC (1007fs) und zusätzlich auf Mutationen im CD14 Gen untersucht. Der SNP rs2066844 G2722C (G908R) wurde von Gazouli et al. (2006) mit dem Auftreten einer Sarkoidose in Verbindung gebracht. Interessanterweise konnte eine Koexistenz des SNPs G2722C (G908R) und einer CD14 Mutation eine höhere Signifikanz in Bezug auf das Auftreten einer Sarkoidose erreichen als die Mutationen alleine. Dieses Resultat unterstützt die Hypothese einer multifaktoriellen Ätiologie der Sarkoidose und unterstreicht die Bedeutung genetischer Studien. Wir können allerdings das Ergebnis von Gazouli et al. (2006) in Bezug auf *CARD15* nicht verifizieren. In einem weitaus größeren Patientenkollektiv konnten wir keinerlei signifikante Ergebnisse generieren. Zwar haben wir nicht die gleichen SNPs untersucht, jedoch mit der Methode der Haplotypanalyse theoretisch das gesamte Gen analysiert.

Die Ergebnisse von vier weiteren Studien mit kaukasischen Sarkoidosepatienten erbrachten auch keine signifikanten Ergebnisse für denselben SNP (Ho et al., 2005; Milman et al., 2007; Sato et al., 2009; Schürmann et al., 2003). Da das Kollektiv von Gazouli et al. (2006) ausschließlich aus Griechen bestand, müsste man weiter evaluieren, ob der Polymorphismus G2722C (G908R) eventuell nur in dieser Bevölkerungsgruppe eine bestimmte Rolle spielt.

Die Arbeitsgruppe um Schürmann et al. (2003) hat in einer großangelegten Studie bestehend aus 429 Sarkoidosepatienten deutscher Herkunft zunächst signifikante Werte für den besagten Marker G2722C (G908R) in der Fall-Kontroll Studie gefunden. Weder die darauffolgende genetische Kopplungsanalyse noch die familienbasierte Assoziationsstudie konnte die erste Annahme bestätigen. Mit diesem sehr großen Kollektiv konnte auch die Arbeitsgruppe um Schürmann et al. (2003) keinen Einfluss von *CARD15* Polymorphismen auf die Entstehung einer Sarkoidose schlussfolgern. Schürmann et al. (2003) konnten allerdings nur zu den mit Morbus Crohn assoziierten Polymorphismen Aussagen machen. Die Beteiligung des gesamten *CARD15* Gens wurde in dieser Studie nicht evaluiert, da es sich bei den untersuchten Markern nicht um Tag SNPs gehandelt hat. Des Weiteren kann auf Grund fehlender Einteilung der Einfluss von *CARD15* auf Stadien oder Verläufe der Sarkoidose mit dieser Studie nicht analysiert werden.

CARD15 kodiert für NOD2 Proteine, welche einen wichtigen Bestandteil zur angeborenen Immunität leisten. Sie sind in der Lage, Komponenten aus der bakteriellen Zellwand mit der

LRR-Domäne zu erkennen und daraufhin die Freisetzung mehrerer Transkriptionsfaktoren, u.a. NF- κ B sowie Kaspasen zu induzieren (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003; Inohara et al., 2003; Li und Verma, 2002). Aus der erhöhten Aktivität der Transkriptionsfaktoren resultiert eine vermehrte Produktion proinflammatorischer Cytokine und Oberflächen-Proteine (Strober et al., 2006). Im Hinblick auf die Sarkoidose spielt der Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor- κ B) eine wichtige Rolle. Sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunabwehr hat NF- κ B eine kontrollierende Aufgabe. Im Zellkern erhöht es die Transkriptionsrate vieler für die Immunantwort wichtiger Cytokine, Chemokine und anti-apoptischer Proteine. Besonders erwähnt seien hier die Mediatoren IL-1, IL-6, IL-8 und TNF, die bei der Granulombildung beteiligt sind (Li und Verma, 2002).

Anhand dieser Erkenntnisse wurde der Zusammenhang von NF- κ B mit inflammatorischen Erkrankungen untersucht. Es zeigte sich eine deutlich höhere Expression dieses Transkriptionsfaktors bei Morbus Crohn, rheumathoider Arthritis, Asthma bronchiale, Multipler Sklerose, EOS und auch bei der Sarkoidose (Drent et al., 2001; Kanazawa et al., 2005; Li und Verma, 2002; Schreiber et al., 1998). Die Arbeitsgruppe um Drent et al. (2001) untersuchte bei 12 Sarkoidosepatienten und 5 gesunden Kontrollen die NF- κ B Expression in mononukleären Zellen. Trotz der geringen Probandenanzahl konnte ein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Alle Sarkoidosepatienten, sowohl Behandelte als auch die Unbehandelte, wiesen einen doppelt so hohen NF- κ B Gehalt im Vergleich zum Normalkollektiv auf. Damit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Inflammation bei der Sarkoidose und der NF- κ B Aktivität nachgewiesen werden. Hier stellt sich die Frage, welcher Mechanismus bei der Sarkoidose zur Induzierung von NF- κ B führt. Der Weg über NOD2 und damit über das *CARD15* Gen stellt nur eine Variante der Aktivierungskaskaden von NF- κ B dar. Um zu evaluieren, ob es wirklich einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Aktivität dieses Transkriptionsfaktors und Genvarianten des *CARD15* Gens gibt, müssten genetische Analysen mit einer Untersuchung der NF- κ B Expression in mononukleären Zellen gekoppelt werden. Damit könnte man die funktionelle Wertigkeit von bestimmten *CARD15* Polymorphismen bestimmen.

Aus einer aktuellen Studie von Wiken et al. (2009) geht hervor, dass die Co-Stimulation von NOD2 und TLR2 eine höhere Freisetzung der proinflammatorischen Cytokinen TNF- α und IL-1 β bei Sarkoidosepatienten auslöst. Eine Stimulation von NOD2 könnte nach Wiken et al. (2009) in der Pathogenese einer Sarkoidose eine Rolle spielen. Auch in diesem Fall wäre es interessant,

durch Folgestudien zu erfahren, inwieweit *CARD15* Genvarianten die Stimulation von NOD2 beeinflussen und wie sich dies bei den verschiedenen Verläufen verhält.

Wir haben in unserer Studie weder den Gehalt von NF- κ B noch die Aktivität von NOD2 mit der genetischen Analyse gekoppelt. Die hier vorliegende genetische Phänotyp-Genotyp-Assoziationsstudie hatte in erster Linie das Ziel, Kandidatengene zu finden, um in weiterführenden Expressionsstudien auf diese näher einzugehen. Aus diesem Grund war es aus unserer Sicht nicht sinnvoll, im ersten Schritt diese Messungen durchzuführen.

Unser Patientenkollektiv, bestehend aus 300 Teilnehmern, stellt eines der größeren Sarkoidosekollektive dar und müsste ausreichen, um eine große statistischen Aussagekraft zu generieren. Durch die Einteilung in die Untergruppen „chronisch“ und „akut“ entstehen jedoch kleine Kollektive, die eventuell bei einer so komplexen Erkrankung nicht ausreichen, um die verantwortlichen Genvarianten zu erfassen.

Ein Defizit stellen die Patienten mit einem unklaren Verlauf dar, deren Daten für die Analyse der Untergruppen nicht genutzt werden konnten. Der unklare Verlauf resultiert daraus, dass diese Patienten entweder nach der Erstrekutierung nicht mehr zu erreichen waren oder der Zugang zu den Krankenakten nicht möglich war, wenn die Patienten außerhalb unserer Abteilung behandelt worden sind. Des Weiteren könnte es sich bei dieser Gruppe um Patienten mit akutem Verlauf handeln, die auf Grund des oft limitierenden Verlaufs keiner Behandlung mehr bedurften. Die Ergebnisse der SNP-Analyse in der Gruppe mit unklarem Verlauf zeigen nämlich verblüffende Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen in der Gruppe mit akutem Verlauf. In zukünftigen Studien müsste dieser Störfaktor eliminiert werden und die Patientenverläufe besser verfolgt werden, um größere Subgruppen zu erhalten.

Die Zahl der Patienten mit akutem Verlauf im Vergleich zu den Erkrankten mit chronischem Verlauf ist niedriger als es aus den Daten der Epidemiologie zu vermuten wäre. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass Patienten mit akutem Verlauf eher durch niedergelassene Ärzte behandelt werden. Die Rekrutierung unseres Kollektivs erfolgte zudem auch in Selbsthilfegruppen, die von Patienten mit einer selbstlimitierenden Form in der Regel nicht aufgesucht werden.

Die Geschlechterverteilung unseres Sarkoidosekollektivs mit einer leichten zahlenmäßigen Dominanz der Frauen (57,3 % zu 42,7 %) ist allerdings repräsentativ für die Ergebnisse internationaler epidemiologischer Studien.

Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse weder auf eine Assoziation von *CARD15* mit der Suszeptibilität noch mit dem Verlauf einer Sarkoidose hin. In den bisher durchgeführten Studien zu einzelnen SNPs im *CARD15*-Gen wurden ebenfalls überwiegend keine Assoziationen zu einer Sarkoidose gefunden (Akahoshi et al., 2008; Ho et al., 2005; Martin et al., 2003; Milman et al., 2007; Rybicki et al., 1999; Schürmann et al., 2003). Zwei Arbeitsgruppen haben allerdings einen Einfluss von *CARD15* Polymorphismen auf die Sarkoidose eruieren können (Gazouli et al., 2005; Sato et al., 2009). Zur weiteren Abklärung müssten größere Patientenkollektive untersucht werden, die in weitere Subgruppen nach einer standardisierten Phänotypisierung aufgeteilt werden müssten. Darüber hinaus sollten ähnliche Untersuchungen in anderen ethnischen Gruppen durchgeführt werden, da nur Kaukasier an unserer Studie teilgenommen haben und die Ergebnisse somit nicht auf andere Bevölkerungsgruppen übertragbar sind. Wie bereits erwähnt, wäre es darüberhinaus sinnvoll, die funktionelle Wertigkeit von *CARD15* Polymorphismen in Bezug auf die NF- κ B zu evaluieren. Eine gezieltere Analyse der SNPs hätte zu Folge, dass man die Ergebnisse im Hinblick auf diagnostische sowie therapeutische Methoden besser nutzen könnte.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Sarkoidose stellt eine multifaktorielle Systemerkrankung dar, die sich durch eine erhöhte Immunreaktion des Körpers auf einen noch unbekanntem Auslöser auszeichnet und durch das Vorkommen nichtverkäsender Granulome charakterisiert ist. In ca. 90 % der Fälle liegt ein pulmonaler Befall vor. Obgleich die genaue Ätiologie unbekannt ist, wird die übersteigerte inflammatorische Reaktion mit einer genetischen Suszeptibilität in Zusammenhang gebracht. Eine unterschiedliche Prävalenz in ethnisch verschiedenen Bevölkerungsgruppen und das familiär gehäufte Auftreten der Sarkoidose haben zu dieser Annahme geführt.

Auf diese Hypothese stützt sich auch die hier vorliegende Arbeit, in der die Haplotypblockstruktur des *CARD15* Gens hinsichtlich eines Einflusses auf Entstehung und Verlauf der Sarkoidose untersucht worden ist.

Wissenschaftliche Studien mit sarkoidoseähnlichen Erkrankungen haben signifikante Zusammenhänge mit dem *CARD15* Gen ergeben. Des Weiteren wurde der durch *CARD15* aktivierte Transkriptionsfaktor NF- κ B in erhöhten Konzentrationen bei Sarkoidosepatienten vorgefunden. Verschiedene Arbeitsgruppen haben einen möglichen Einfluss des *CARD15*-Gens auf die Sarkoidose mit nicht eindeutigen Ergebnissen untersucht, obgleich die meisten Studien keinen Zusammenhang zwischen *CARD15* und der Sarkoidose gezeigt haben.

Vor diesem Hintergrund haben wir in einem Sarkoidosekollektiv aus 300 Patienten und einem Kontrollkollektiv aus 381 gesunden Probanden eine Genotyp-Phänotyp-Assoziationsstudie durchgeführt. Die Genotypisierung und Haplotypanalyse des *CARD15* Gens erfolgte mittels der MALDI-TOF MS im Rahmen der iPLEX Reaktion gemäß des MassARRAY Systems (Fa. Sequenom). Mit dieser Methode konnten wir die gesamte Haplotypblockstruktur des Gens erfassen und somit versteckte, bisher noch nicht untersuchte, Genvarianten analysieren.

Es konnte kein statistisch signifikanter Einfluss bestimmter Polymorphismen oder Haplotypen des *CARD15* Gens auf die Sarkoidose oder deren Verlaufsformen nachgewiesen werden. Es sind weitere Studien mit größeren Kollektiven, unter Berücksichtigung des Krankheitsverlaufs, erforderlich, um eine endgültige Aussage über den Einfluss dieses Gens und seiner Polymorphismen treffen zu können.

7 PUBLIKATIONEN

1. Pabst S, Golebiewski M, Herms S, Karpushova A, Diaz-Lacava A, Walier M, Zimmer S, Cichon S, Wienker TF, Nöthen MM, Nickenig G, Meyer R, Skowasch D, Grohé C. *Caspase recruitment domain 15* gene haplotypes in sarcoidosis. *Tissue Antigens* 2011; 77, 333–337
2. Pabst S, Golebiewski M, Skowasch D, Grohé C. *CARD15* gene haplotypes in sarcoidosis. *Pneumologie* 2011; 65: P83

8 LITERATURVERZEICHNIS

ACCESS Research Group. Design of a case control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *J Clin Epidemiol* 1999; 52: 1173-1186

Agostini C, Zambello R, Sancetta R, Cerutti A, Milani A, Tassinari C, Facco M, Cipriani A, Trentin L, Semenzato G. Expression of tumor necrosis factor-receptor superfamily members by lung T lymphocytes in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1359-1367

Agostini C, Semenzato G. Cytokines in sarcoidosis. *Semin Respir Infect.* 1998;13: 184-196

Agostini C, Trentin L, Perin A, Facco M, Siviero M, Piazza F, Basso U, Adami F, Zambello R, Semenzato G. Regulation of alveolar macrophage-T cell interactions during Th1-type sarcoid inflammatory process. *Am J Physiol* 1999; 277: 240-250

Agostini C. Cytokine and chemokine blockade as immunointervention strategy for the treatment of diffuse lung diseases. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2001; 18: 18-22

Agostini C, Meneghin A, Semenzato G. T-lymphocytes and cytokines in sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8: 435-440

Akahoshi M, Ishihara M, Namba K, Kitaichi N, Ando Y, Takenaka S, Ishida T, Ohno S, Mizuki N, Nakashima H, Shirakawa T. Mutation screening of the CARD15 gene in sarcoidosis. *Tissue Antigens* 2008; 7: 564-567

Alhamad EH, Lynch JP 3rd, Martinez FJ. Pulmonary function tests in interstitial lung disease: what role do they have? *Clin Chest Med* 2001; 22: 715-750

Alia P, Mana J, Capdevila O, Alvarez A, Navarro MA. Association between ACE gene I/D polymorphism and clinical presentation and prognosis of sarcoidosis. *Scand J Clin Lab Invest* 2005; 65: 691-697

Annema JT, Veselic M, Rabe KF. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration for the diagnosis of sarcoidosis. *Eur Respir J* 2005; 25: 405-409

Armitage P. Tests for Linear Trends in Proportions and Frequencies. *Biometrics* 1955; 11: 375-386

ATS/ERS/WASOG Committee. Statement on sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: 736-755

Baughman RP, Strohofer SA, Buchsbaum J, Lower EE. Release of tumor necrosis factor by alveolar macrophages of patients with sarcoidosis. *J Lab Clin Med* 1990; 115: 36-42

Baughman RP, Winget DB, Bowen EH, Lower EE. Predicting respiratory failure in sarcoidosis patients. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1997; 14: 154-158

Baughman RP, Teirstein AS, Jdson MA, Rossman MD, Yeager JR H, Bresnitz EA, DePalo L, Hunninghake G, Iannuzzi MC, Johns CJ, McLennan G, Moller DR, Newman LS, Rabin DL, Rose C, Rybicki BA, Weinberger SE, Terrin ML, Knatterud GL, Cherniak R, and A Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS) Research Group. Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1885-1889

Baughman RP, Lower EE, du Bois R. Sarcoidosis. *Lancet* 2003; 361: 1111-1118

Baughman R, Costabel U. Markers of sarcoidosis. In: Baughman R, editor. *Sarcoidosis*. New York: Taylor & Francis; 2006. pp. 435-462

Becker T, Knapp M. Maximum-likelihood estimation of haplotype frequencies in nuclear families. *Genet Epidemiol.* 2004; 27: 21-32

Becker T, Cichon S, Jönson E, Knapp M. Multiple testing in the context of haplotype analysis revisited: application to case-control data. *Ann Hum Genet* 2005; 69: 747-756

Benatar SR, Clark TJ. Pulmonary function in a case of endobronchial sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1974; 110: 490-496

Bingisser R, Speich R, Zollinger A, Russi E, Frei K. Interleukin-10 secretion by alveolar macrophages and monocytes in sarcoidosis. *Respiration* 2000; 67: 280-286

Bjerner L, Engstrom-Laurent A, Thunell M, Hallgren R. The mast cell and signs of pulmonary fibroblast activation in sarcoidosis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82: 298-301

Blau EB. Familial granulomatous arthritis, iritis, and rash. *J Pediatr* 1985; 107: 689-693

Boglioli LR, Taff ML, Funke S, Mihalakis I. Sudden death due to sarcoid heart disease. *J Forensic Sci* 1998; 43: 1072-1073

Bost TW, Riches DW, Schumacher B, Carré PC, Khan TZ, Martinez JA, Newman LS. Alveolar macrophages from patients with beryllium disease and sarcoidosis express increased levels of mRNA for tumor necrosis factor- α and interleukin-6 but not interleukin-1 β . *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10: 506-513

Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature Genet* 2003; 33: 228-237

Bour-Jordan H, Blueston JA. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol* 2002; 22: 1-7

Byg KE, Milman N., Hansen S. Sarcoidosis in Denmark 1980- 1994. A registry-based incidences study comprising 5536 patients. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2003; 20: 46-52

Cavalli-Sforza LL, Wilson AC, Cantor CR, Cook-Deegan RM, King MC: Call for a worldwide survey of human genetic diversity: a vanishing opportunity for the Human Genome Project. *Genomics* 1991; 11: 490-491

Cavanaugh J and The IBD International Genetics consortium. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1165-1171

Cavazza A, Harari S, Caminati A, Barbareschi M, Carbonelli C, Spaggiari L, Paci M, Rossi G. The histology of pulmonary sarcoidosis: a review with particular emphasis on unusual and underrecognized features. *Int J Surg Pathol* 2009; 17: 219-230

Cerpa-Poljak A, Jenkins A, Duncan MW. Recovery of peptides and proteins following matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1995; 233-239

Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nuñez G, Inohara N. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature Immunol* 2003; 4: 702-707

Chambellan A, Turbie P, Nunes H, Brauner M, Battesti JP, Valeyre D. Endoluminal stenosis of proximal bronchi in sarcoidosis: bronchoscopy, function, and evolution. *Chest* 2005; 127: 472-481

Chappell AG, Cheung WY, Hutchings HA. Sarcoidosis: a long-term follow up study. *Sarcoidosis Vasc Lung Dis* 2000; 17: 167-173

Cheung OY, Muhm JR, Helmers RA, Aubry MC, Tazelaar HD, Koor A, Leslie KO, Colby TV. Surgical pathology of granulomatous interstitial pneumonia. *Ann Diagn Pathol*. 2003; 7: 127-138

Churg A, Carrington CB, Gupta R. Necrotizing sarcoid granulomatosis. *Chest* 1979; 76: 406-413

- Cichon S, Freudenberg J, Propping P, Nöthen MM: Variabilität im menschlichen Genom. Bedeutung für die Krankheitsforschung. *Dtsch Arztebl* 2002; 99: 3091–3101
- Colby TV. Interstitial lung diseases. In: Thurlbeck W, Churg A, HRSG. *Pathology of the Lung*, 2nd Edn. New York: Thieme Medical Publishers, 1995: 589-737
- Collins FS, Guyer MS, Chakravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 1997; 278: 1580–1581
- Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 1998; 8: 1229–1231
- Costabel U, Hunninghake GW. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Statement Committee. American Thoracic Society. European Respiratory Society. World Association for Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. *Eur Respir J*. 1999; 14: 735-737
- Costabel U, Guzman J, Drent M. Diagnostic approach to sarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis*. Wakefield UK: Eur Respir Mon 2005: 259-264
- Costabel U, Guzman J, Bonella F, Oshimo S. Bronchoalveolar lavage in other interstitial lung diseases. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28: 514-524
- Costabel U, Oshimo S, Guzman J. Diagnosis of sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14: 455-461
- Dai H, Guzman J, Chen B, Costabel U. Production of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor- α by alveolar macrophages in sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Chest* 2005; 127: 251-256
- Drake WP, Newman LS. Mycobacterial antigens may be important in sarcoidosis pathogenesis. *Curr Opin Pulm Med* 2006; 12: 359-363
- Drent M, Wirnsberger RM, de Vries J, van Dieijen-Visser MP, Wouters EF, Schols AM. Association of fatigue with an acute phase response in sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999; 13: 718-722
- 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
- Duncan MW, Roder H, Hunsucker SW. Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2008; 7: 355-370

Dunn TL, Watters LC, Hendrix C, Cherniack RM, Schwarz MI, King TE Jr. Gas exchange at a given degree of volume restriction is different in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med* 1988; 85: 221-224

Facchetti F, Vermi W, Fiorentini S, Chilosi M, Caruso A, Duse M, Notarangelo LD, Badolato R. Expression of inducible nitric oxide synthase in human granulomas and histiocytic reactions. *Am J Pathol* 1999; 154: 145-152

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 inflammatory bowel disease risk loci with sarcoidosis, and its acute and chronic subphenotypes. *Eur Respir J* 2011; 37:610-616

Freiman DG, Hardy HL. Beryllium disease. The relation of pulmonary pathology to clinical course and prognosis based on a study of 130 cases from the U.S. beryllium case registry. *Hum Path* 1970; 1: 25-44

Freudenberg J, Cichon S, Nöthen MM, Propping P. Blockstruktur des menschlichen Genoms: Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität. *Dtsch Arztebl* 2002; 99: 3190-3195

Fukami T, Miyazaki E, Matsumoto T, Kumamoto T, Tsuda T. Elevated expression of interleukin-18 in the granulomatous lesions of muscular sarcoidosis. *Clin Immunol* 2001; 101: 12-20

Futamatsu H, Suzuki J, Adachi S, Okada H, Otomo K, Ohara T, Hashimoto Y, Kakuta T, Iesaka Y, Yamaguchi H, Sakurada H, Sato A, Obayashi T, Niwa A, Hirao K, Isobe M. Utility of gallium-67 scintigraphy for evaluation of cardiac sarcoidosis with ventricular tachycardia. *Int J Cardiovasc Imaging* 2006 ; 22: 443-448

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296: 2225-2229

Garwood S, Judson MA, Silvestri G, Hoda R, Fraig M, Doelken P. Endobronchial ultrasound for the diagnosis of pulmonary sarcoidosis. *Chest* 2007; 132: 1298-1304

Gazouli M, Koundourakis A, Ikonopoulou 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; 1: 23-29

Gideon NM, Mannino DM. Sarcoidosis mortality in the United States 1979-1991: an analysis of multiple-cause mortality data. *Am J Med* 1996; 100: 423-427

Gilman MJ, Wang KP. Transbronchial lung biopsy in sarcoidosis: an approach to determine the optimal number of biopsies. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 721-724

Girardin, SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jéhanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zähringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ. Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003; 300: 1584-1587

Green CM, Meachery G, Taggart CC, et al. Role of IL-18 in CD4+ T lymphocytes activation in sarcoidosis. *J Immunol* 2000, 165: 4718-4724

Grönhagen-Riska C. Angiotensin-converting enzyme. I. Activity and correlation with serum lysozyme in sarcoidosis, other chest or lymph node diseases and healthy persons. *Scand J Respir Dis* 1979; 60: 83-93

Grunewald J, Eklund A, Olerup O. Human leukocyte antigen class I alleles and the disease course in sarcoidosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 696-702

Grunewald J, Eklund A. Sex-specific manifestations of Löfgren-Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 40-44

Grunewald J, Eklund A. Lofgren's Syndrome: Human Leukocyte Antigen Strongly Influences the Disease Course. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2009; 179: 307-312

Grutters JC, Sato H, Pantelidis P, Lagan AL, McGrath DS, Lammers JW, van den Bosch JM, Wells AU, du Bois RM, Welsh KI. Increased frequency of the uncommon tumor necrosis factor - 857T allele in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1119-1124

Grutters JC, Fellrath JM, Mulder L, Janssen R, van den Bosch JM, van Velzen-BladH. Serum soluble interleukin-2 receptor measurement in patients with sarcoidosis: a clinical evaluation. *Chest* 2003; 124: 186-195

Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor- κ B activation. *J. Biol. Chem* 2002; 277: 41701-41705

Hägerstrand I, Linell F. The prevalence of sarcoidosis in the autopsy material from a Swedish town. *Acta Med Scand Suppl.* 1964; 425: 171-174

Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Buckler A, Hall J, Stokkers P, van Deventer SJ, Nürnberg P, Mirza MM, Lee JC, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 808-816

Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001; 357: 1925-1928

Hettmann T, DiDonato J, Karin M, Leiden JM. An essential role for nuclear factor- κ B in promoting doublepositive thymocyte apoptosis. *J Exp Med* 1999; 189: 145-158

Hillerdal G, Niou E, Osterman K, Schmekel B. Sarcoidosis: epidemiology and prognosis. A 15-year European study. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 29-32

Ho LP, Merlin F, Gaber K, Davies RJ, McMichael AJ, Hugot JP. CARD 15 gene mutations in sarcoidosis. *Thorax* 2005; 4: 354-355

Hoffmann AL, Milman N, Byg KE. Childhood sarcoidosis in Denmark 1979-1994: incidence, clinical features and laboratory results at presentation in 48 children. *Acta Paediatr* 2004; 93: 30-36

Hofmann S, Franke A, Fischer A, Jacobs G, Nothnagel M, Gaede KI, Schürmann M, Müller-Quernheim J, Krawczak M, Rosenstiel P, Schreiber S. Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis. *Nat Genet* 2008; 40: 1103-1106

Hofmann S, Fischer A, Till A, Müller-Quernheim J, Häsler R, Franke A, Gäde KI, Schaarschmidt H, Rosenstiel P, Nebel A, Schürmann M, Nothnagel M, Schreiber S. A genome-wide association study reveals evidence of association with sarcoidosis at 6p12.1. *Eur Respir J* 2011, 38: 1127-1135

Hoitsma E, Sharma OP. Neurosarcoidosis. *Eur Respir J Monogr* 2005; 10: 164-187

Homma S, Nagaoka I, Abe H, Takahashi K, Seyama K, Nukiwa T, Kira S. Localization of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor I in the fibrotic lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 2084-2089

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603

Hours S, Nunes H, Kambouchner M, Uzunhan Y, Brauner MW, Valeyre D, Brillet PY. Pulmonary cavitory sarcoidosis: clinico-radiologic characteristics and natural history of a rare form of sarcoidosis. *Medicine* 2008; 87: 142-151

Hunninghake GW, Crystal RG. Pulmonary sarcoidosis: a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. *N Engl J Med* 1981; 305: 429-434

Hunninghake GW, Bedell GN, Zavala DC, Monick M, Brady M. Role of interleukin-2 release by lung T-cells in active pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 634-638

Hunninghake GW, Costabel U, Ando M, Baughman R, Cordier JF, du Bois R, Eklund A, Kitaichi M, Lynch J, Rizzato G, Rose C, Selroos O, Semenzato G, Sharma OP. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis: American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999; 16: 149-173

Inohara N, Koseki T, Lin J, del Peso L, Lucas PC, Chen FF, Ogura Y, Núñez G. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem* 2000; 275: 27823-27831

Inohara, N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003a; 278: 5509-5512

Inohara, N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature Rev Immunol* 2003b; 3: 371-382

Inohara N, Chamailard M, McDonald C, Nuñez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 355-383

Inoue Y, King TE Jr, Tinkle SS, Dockstader K, Newman LS. Human mast cell basic fibroblast growth factor in pulmonary fibrotic disorders. *Am J Pathol* 1996 Dec; 149: 2037-2054

Ishioka S, Saito T, Hiyama K, Haruta Y, Maeda A, Hozawa S, Inamizu T, Yamakido M. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, platelet-derived growth factor-B and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA in cells of bronchoalveolar lavage fluids from patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1996; 13: 139-145

James DG, Sharma OP. Neurosarcoidosis. *Proc R Soc Med* 1967; 60: 1169-1170

- James DG. A worldwide review of sarcoidosis. *Ann NY Acad Sci* 1976; 276: 335-346
- James DG. Life-threatening situations in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1998; 15: 134-139
- James G. Blau syndrome and sarcoidosis. *Lancet* 1999; 354: 1035
- Jannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS. Sarcoidosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 2153-2165
- Jarnier D, Seriès C. Neurosarcoidosis. Review of the literature. *Neurochirurgie* 1999; 45: 214-218
- Jørgensen G. Die Genetik der Sarkoidose. *Acta Med Scand* 1964; 425: 209-212
- Judson MA, Baughman RP, Thompson BW, Teirstein AS, Terrin ML, Rossman MD, Yeager H Jr, McLennan G, Bresnitz EA, DePalo L, Hunninghake G, Iannuzzi MC, Johns CJ, Moller DR, Newman LS, Rabin DL, Rose C, Rybicki BA, Weinberger SE, Knatterud GL, Cherniak R; ACCESS Research Group. Two year prognosis of sarcoidosis: the ACCESS experience. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2003; 20: 204-211
- Judson MA. The management of sarcoidosis by the primary care physician. *Am J Med* 2007; 120: 403-407
- Judson MA. Sarcoidosis: clinical presentation, diagnosis, and approach to treatment. *Am Med Sci* 2008; 335: 26-33
- Kaira K, Oriuchi N, Otani Y, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Ishizuka T, Endo K, Mori M. Diagnostic usefulness of fluorine-18-alpha-methyltyrosine positron emission tomography in combination with 18F-fluorodeoxyglucose in sarcoidosis patients. *Chest* 2007; 131: 1019–1027
- Kanazawa N, Okafuji I, Kambe N, Nishikomori R, Nakata-Hizume M, Nagai S, Fuji A, Yuasa T, Manki A, Sakurai Y, Nakajima M, Kobayashi H, Fujiwara I, Tsutsumi H, Utani A, Nishigori C, Heike T, Nakahata T, Miyachi Y. Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor-kappaB activation: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood* 2005; 105: 1195-1197
- Karas M, Bachmann D, Bahr U, et al. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *IntJ Mass Spectrom Ion Process* 1987; 78: 53
- Kieszko R, Krawczyk P, Chocholska S, Bojarska-Junak A, Jankowska O, Król A, Roliński J, Milanowski J. Tumor necrosis factor receptors (TNFRs) on T lymphocytes and soluble TNFRs in different clinical courses of sarcoidosis. *Respir Med*. 2007a; 101: 645-654

- Kieszko R, Krawczyk P, Jankowska O, Chocholska S, Król A, Milanowski J. The clinical significance of interleukin 18 assessment in sarcoidosis patients. *Respir Med* 2007b; 101: 722-728
- Kim DS. Sarcoidosis in Korea: report of the Second Nationwide Survey. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2001; 18: 176-180
- Kirsten D. Sarkoidose in Deutschland: Analyse einer Fragebogenaktion im Jahre 1992 bei Patienten der Deutschen Sarkoidose-Vereinigung. *Pneumologie* 1995; 49: 378-385
- Koch K. Human-Genom: Entschlüsselung „abgeschlossen“. *Dtsch Arztebl* 2003; 100: 1029
- Koonitz CH, Joyner LR, Nelson RA. Transbronchial lung biopsy via the fiberoptic bronchoscope in sarcoidosis. *Ann Intern Med* 1976; 85: 64-66
- Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP; EPWG-IBD Group; EPIMAD Group; GETAID Group. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 845-857
- Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 725-734
- Li Y, Wollnik B, Pabst S, Lennarz M, Rohmann E, Gillissen A, Vetter H, Grohé C. BTNL2 gene variant and sarcoidosis. *Thorax* 2006; 61: 273-274
- Lieberman J. Elevation of serum angiotensin-converting-enzyme (ACE) level in sarcoidosis. *Am J Med* 1975; 59: 365-372
- Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Warmington K, Kunkel SL. Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF- α -inducible intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 1994; 152: 5883-5889
- Lukacs NW, Hogaboam C, Chensue SW, Blease K, Kunkel SL. Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis. *Chest* 2001;120: 5-8
- Lympany PA, du Bois RM. Diffuse lung disease: product of genetic susceptibility and environmental encounters. *Thorax* 1997; 52: 92-94
- Lynch 3rd JP, Kaszeroni EA, Gay SE. Pulmonary sarcoidosis. *Clin Chest Med* 1997; 18: 755-785

- Lynch 3rd JP, Baughman R, Sharma O. Extrapulmonary Sarcoidosis. *Semin Respir Infect* 1998; 13: 229-254
- Maliarik MJ, Rybicki BA, Malvitz E, Sheffer RG, Major M, Popovich J Jr, Iannuzzi MC. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and risk of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1566-1570
- Mana J, Gomez-Vaquero C, Montero A, Salazar A, Marcoval J, Valverde J, Manresa F, Pujol R. Lofgren's syndrome revisited: a study of 186 patients. *Am J Med* 1999; 107: 240-245
- Martin TM, Doyle TM, Smith JR, Dinulescu D, Rust K, Rosenbaum JT. Uveitis in patients with sarcoidosis is not associated with mutations in NOD2 (CARD15). *Am J Ophthalmol* 2003; 136: 933-935
- Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* 2005; 13: 323-335
- McGrath DS, Goh N, Foley PJ, du Bois RM. Sarcoidosis: genes and microbes--soil or seed? *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2001; 18: 149-164
- Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, Prieur AM, Manouvrier-Hanu S, Häfner R, Chamaillard M, Zouali H, Thomas G, Hugot JP. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet* 2001; 29: 19-20
- Michael H, Ho S, Pollack B, Gupta M, Gress F. Diagnosis of intra-abdominal and mediastinal sarcoidosis with EUS-guided FNA. *Gastrointest Endosc* 2008; 67: 28-34
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988; 16: 1215
- Milman N, Nielsen OH, Hviid TV, Fenger K. CARD15 single nucleotide polymorphisms 8, 12 and 13 are not increased in ethnic Danes with sarcoidosis. *Respiration* 2007; 74: 76-79
- Minshall EM, Tsiropoulos A, Yasruel Z, Wallaert B, Akoum H, Vorng H, Tonnel AB, Hamid Q. Cytokine mRNA gene expression in active and nonactive pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 1997; 10: 2034-2039
- Moller DR, Forman JD, Liu MC, Noble PW, Greenlee BM, Vyas P, Holden DA, Forrester JM, Lazarus A, Wysocka M, Trinchieri G, Karp C. Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1996; 156: 4952-4960

- Moller DR. Cells and cytokines involved in the pathogenesis of sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999; 16: 24-31
- Morohashi K, Takada T, Omori K, Suzuki E, Gejyo F. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in Japanese patients with sarcoidosis. *Chest* 2003; 123: 1520-1526
- Mrazek F, Stahelova A, Kriegova E, Fillerova R, Zurkova M, Kolek V, Petrek M. Functional variant ANXA11 R230C: true marker of protection and candidate disease modifier in sarcoidosis. *Genes Immun* 2011; 12: 490-494
- Müller-Quernheim L, Pfeifer S, Strausz J, Ferlinz R. Correlation of clinical and immunologic parameters of the inflammatory activity of pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1322-1329
- Müller-Quernheim J, Pfeifer S, Kienast K, Zissel G. Spontaneous interleukin 2 release of bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis is a codeterminator of prognosis. *Lung* 1996; 174: 243-253
- Müller-Quernheim J. Sarcoidosis: immunopathogenetic concepts and their clinical application. *Eur Respir J* 1998; 12: 716-738
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350
- Neville E, Walker AN, James DG. Prognostic factors predicting the outcome of sarcoidosis: an analysis of 818 patients. *Q J Med* 1983; 52: 525-533
- Nishiyama Y, Yamamoto Y, Fukunaga K, Takinami H, Iwado Y, Satoh K, Ohkawa M. Comparative evaluation of 18F-FDG PET and 67Ga scintigraphy in patients with sarcoidosis. *J Nucl Med* 2006; 47:1571-1576
- Noor A, Knox KS. Immunopathogenesis of sarcoidosis. *Clin Dermatol* 2007; 25: 250-258
- Nowack D, Goebel KM. Genetic aspects of sarcoidosis: class II antigens and a family study. *Arch Intern Med* 1987; 147: 481-483
- Nunes H, Soler P, Valeyre D. Pulmonary sarcoidosis. *Allergy* 2005; 60: 565-582
- Nunes H, Bouvry D, Soler P, Valeyre D. Sarcoidosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2007; 2: 46

Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem*. 2001a; 16: 276: 4812-4818

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001b; 411: 603-606

Papadopoulos KI, Melander O, Orho-Melander M, Groop LC, Carlsson M, Hallengren B. Angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism in sarcoidosis in relation to associated autoimmune diseases. *J Intern Med* 2000; 247: 71-77

Papaoannides D, Fotinou M, Korantzopoulos P, Latsi P, Sinapidis D, Akritidis N, Orphanidou D. Sarcoidosis associated with interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *Med Sci Monit* 2004; 10: 5-7

Pabst S, Baumgarten G, Stremmel Lennarz M, Knüfermann P, Gillissen A, Vetter H, Grohé C. A. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms are associated with a chronic course of sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 420-426

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

Pietinalho A, Hiraga Y, Hosoda Y, Löfroos AB, Yamaguchi M, Selroos O. The frequency of sarcoidosis in Finland and Hokkaido, Japan. A comparative epidemiological study. *Sarcoidosis* 1995; 12: 61-67

Pietinalho A, Furuya K, Yamaguchi E, Kawakami Y, Selroos O. The angiotensin-converting enzyme DD gene is associated with poor prognosis in Finnish sarcoidosis patients. *Eur Respir J* 1999a; 13: 723-726

Pietinalho A, Ohmichi M, Hirasawa M, Hiraga Y, Löfroos AB, Selroos O. Familial sarcoidosis in Finland and Hokkaido, Japan: a comparative study. *Respir Med* 1999b; 93: 408-412

Pinkston P, Bitterman PB, Crystal RG. Spontaneous release of interleukin-2 by lung T lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis. *N Engl J Med* 1983; 308: 793-800

Planck A, Katchar K, Eklund A, Gripenback S, Grunewald J. T-lymphocyte activity in HLA-DR 17 positive patients with active and clinically recovered sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2003; 20: 110-117

- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991; 325: 928–937
- Poletti V, Casoni G, Chilosi M. Pathology. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis*. Wakefield, UK: Eur Respir Mon, 2005; 32: 82-91
- Prasse A, Katic C, Germann M, Buchwald A, Zissel G, Müller-Quernheim J. Phenotyping sarcoidosis from a pulmonary perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 330-336
- Reich JM, Johnson RE. Course and prognosis of sarcoidosis in a nonreferral setting. Analysis of 86 patients observed for 10 years. *Am j Med* 1985; 78: 61-67
- Reich DE, Lander ES. On the allelic spectrum of human disease. *Trends Genet* 2001; 17: 502-510
- Reich JM. Mortality of intrathoracic sarcoidosis in referral vs population-based settings: influence of stage, ethnicity, and corticosteroid therapy. *Chest* 2002; 121: 32-39
- Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273, 1516-1517
- Roberts WC, McAllister HA Jr, Ferrans VJ. Sarcoidosis of the heart: a clinicopathologic study of 35 necropsy patients (group 1) and review of 78 previously described necropsy patients (group 2). *Am J Med* 1977; 63: 86-108
- Rømer FK. Case 7-1982: sarcoidosis and cancer. *N Engl J Med* 1982; 306: 1490
- Rosen Y. Sarcoidosis. In: Dail DH, Hammer SP, HRSG. *Pulmonary Pathology*, 2nd Edn. New York: Springer-Verlag, 1994: 13-645
- Rothkrantz-Kos S, van Dieijen-Visser MP, Mulder PG, Drent M. Potential usefulness of inflammatory markers to monitor respiratory functional impairment in sarcoidosis. *Clin Chem*. 2003; 49: 1510-1517
- Rybicki BA, Harrington D, Major M, Simoff M, Popovich J, Maliarik M, Iannuzzi MC. Heterogeneity of familial risk in sarcoidosis. *Genet Epidemiol* 1996; 13: 23-33
- Rybicki BA, Major M, Popovich J Jr, Maliarik MJ, Iannuzzi MC. Racial differences in sarcoidosis incidence: a 5-year study in a health maintenance organization. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 234-241
- Rybicki BA, Maliarik MJ, Bock CH, Elston RC, Baughman RP, Kimani AP, Sheffer RG, Chen KM, Major M, Popovich J Jr, Iannuzzi MC. The Blau syndrome gene is not a major risk factor for sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999; 16: 203-208

Rybicki BA, Iannuzzi MC, Frederick MM, Thompson BW, Rossman MD, Bresnitz EA, Terrin ML, Moller DR, Barnard J, Baughman RP, DePalo L, Hunninghake G, Johns C, Judson MA, Knatterud GL, McLennan G, Newman LS, Rabin DL, Rose C, Teirstein AS, Weinberger SE, Yeager H, Cherniack R; ACCESS Research Group. Familial aggregation of sarcoidosis: a case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 2085-2091

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

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

Sartwell PE, Edwards LB. Epidemiology of sarcoidosis in the U.S. Navy. *Am J Epidemiol* 1974; 99: 250-257

Scadding J. Prognosis of intrathoracic sarcoidosis in England: a review of 136 cases after five years' observation. *Br Med J* 1961; 2: 1165-1172

Scharkoff T. Epidemiology of Sarcoidosis. *Pneumology* 1993; 47: 588-592

Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 477-484

Schürmann M, Reichel P, Müller-Myhsok B, Dieringer T, Wurm K, Schlaak M, Müller-Quernheim J, Schwinger E. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms and familial occurrence of sarcoidosis. *J Intern Med* 2001a; 249: 77-83

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*. 2001b; 164:840-846.

Schürmann M, Valentonyte R, Hampe J, Müller-Quernheim J, Schwinger E, Schreiber S. CARD15 gene mutations in sarcoidosis. *Eur Respir J* 2003; 5: 748-754

Scott TF, Yandora K, Valeri A, Chieffe C, Schramke C. Aggressive therapy for neurosarcoidosis: long-term follow-up of 48 treated patients. *Arch Neurol* 2007; 64: 691-696

Sequenom.Inc., 2007: iPLEX Application Guide.

<http://www.sequenom.com/Files/Genetic-Analysis-Graphics/iPLEX-Application-PDFs/iPLEX-Gold-Application-Guide-v2r1> (10.10.2007)

Seitzer U, Swider C, Stüber F, Suchnicki K, Lange A, Richter E, Zabel P, Müller-Quernheim J, Flad HD, Gerdes J. Tumour necrosis factor alpha promoter gene polymorphism in sarcoidosis. *Cytokine* 1997; 9: 787-790

Semenzato G, Chilosi M, Agostini C. Sarcoidosis: Immunology and immunohistology. In: *Sarcoidosis and other granulomatous disorders*. James DG, HRSG. Lung Biology in Health and Disease. New York: Marcel Dekker, 1994: 153-179

Semenzato G, Bortolin M, Facco M, Tassinari C, Sancetta R, Agostini C. Lung lymphocytes: origin, biological functions, and laboratory techniques for their study in immune-mediated pulmonary disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996; 33: 423-455

Semenzato G, Bortoli M, Brunetta E, Agostini C. Immunology and pathophysiology. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis*. XXX: European Respiratory Monograph, 2005: 49-63

Senftleben U, Li Z. W, Baud V, Karin M. IKK β is essential for protecting T cells from TNF α -induced apoptosis. *Immunity* 2001; 14, 217-230

Sharma OP, Neville E, Walker AN, James DG. Familial sarcoidosis: a possible genetic influence. *Ann NY Acad Sci* 1976; 278: 386-400

Sharma OP, Johnson R. Airway obstruction in sarcoidosis. A study of 123 nonsmoking black American patients with sarcoidosis. *Chest* 1988; 94: 343-346

Sharma OP, Maheshwari A, Thaker K. Myocardial sarcoidosis. *Chest* 1993; 103: 253-258

Sharma OP. Definition and history of sarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis*. XXX: European Respiratory Monograph, 2005: 1-12

Shetty AK, Gedalia A. Sarcoidosis: a pediatric perspective. *Clin Pediatr (Phil)* 1998; 37: 707-717

Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, Yamada G, Takahashi R, Okamura H, Kurimoto M, Hiraga Y, Tatsuno T, Abe S, Sato N. Increased levels of interleukin-18 in patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1979-1982

Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, Takahashi R, Kon S, Okamura H, Kurimoto M, Hiraga Y, Tatsuno T, Abe S, Sato N. IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN- γ production in sarcoid lungs. *J Immunol* 2001; 166: 642-649

Shikuwa C, Kadota J, Mukae, Iwashita T, Kaida H, Ishii H, Ishimatsu Y, Kohno S. High concentration of soluble Fas ligand in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *Respiration* 2002; 69: 242-246

Shirodaria CC, Nicholson AG, Hansell DM, Wells AU, Wilson R. Necrotizing sarcoid granulomatosis with skin involvement. *Histopathology* 2003; 43: 91

Siltzbach LE, James DG, Neville E, Turiat J, Battesti JP, Sharma OP, Hosoda Y, Mikami R, Odaka M. Course and prognosis of sarcoidosis around the world. *Am J Med* 1974; 57: 847-852

Silverman KJ, Hutchins GM, Bulkley BH. Cardiac sarcoid: a clinicopathological study of 84 unselected patients with systemic sarcoidosis. *Circulation* 1978; 58: 1204-1211

Smith G, Brownell I, Sanchez M, Prystowsky S. Advances in the genetics of sarcoidosis. *Clin Genet.* 2008; 73: 401-412

Spagnolo P, du Bois RM. Genetics of sarcoidosis. *Clin Dermatol* 2007; 25: 242-249

Sparkman OD. Mass spectrometry PittCon 2009. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009; 20: 3-17

Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, Jiang R, Messer CJ, Chew A, Han JH, Duan J, Carr JL, Lee MS, Koshy B, Kumar AM, Zhang G, Newell WR, Windemuth A, Xu C, Kalbfleisch TS, Shaner SL, Arnold K, Schulz V, Drysdale CM, Nandabalan K, Judson RS, Ruano G, Vovis GF. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science* 2001; 293: 489-493

Stern BJ, Krumholz A, Johns C, Scott P, Nissim J. Sarcoidosis and its neurological manifestations. *Arch Neurol* 1985; 42: 909-917

Strober W, Murray P, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 9-20

Sulica R, Teirstein AS, Kakarla S, Nemani N, Behnegar A, Padilla ML. Distinctive clinical, radiographic, and functional characteristics of patients with sarcoidosis-related pulmonary hypertension. *Chest* 2005; 128: 1483-1489

Sverrild A, Backer V, Kyvik KO, Kaprio J, Milman N, Svendsen CB, Thomsen SF. Heredity in sarcoidosis: a registry-based twin study. *Thorax.* 2008; 63: 894-896

Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, Ghosh P, Moran A, Predergast MM, Tromp G, Williams CJ, Inohara N, Núñez G. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J* 2004; 23: 1587-1597

Tang K, Shahgholi M, Garcia BA, Heaney PJ, Cantor CR, Scott LG, Williamson JR. Improvement in the apparent mass resolution of oligonucleotides by using ¹²C/¹⁴N-enriched samples. *Anal Chem* 2002; 74: 226-231

Teirstein AS, Machac J, Almeida O, Lu P, Padilla ML, Iannuzzi MC. Results of 188 whole-body fluorodeoxyglucose positron emission tomography scans in 137 patients with sarcoidosis. *Chest* 2007; 132: 1949-1953

The International HapMap Consortium. 2002: International HapMap Project. The Origins of Haplotypes. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/originhaplotype.html.en> (05.08.2009)

The International HapMap Consortium. 2002: International HapMap Project. What Is the HapMap? <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/whathapmap.html.en> (05.08.2009)

The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426: 289-296

The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437: 1299-1320

The International HapMap Consortium. A second hand generation human haplotype map of over 3,1 million SNPs. *Nature* 2007; 449: 851-862

The International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921

The International SNP Map Working Group. A map of the human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409: 928-933

Ting JP, Davis BK. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 387-414

Tolnay E, Kuhnen C, Voss B, Wiethage T, Müller KM. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptor flt in pulmonary sarcoidosis. *Virchows Arch* 1998; 432: 61-65

Tomita H, Ina Y, Sugiura Y, Sato S, Kawaguchi H, Morishita M, Yamamoto M, Ueda R. Polymorphism in the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 255-259

Trisolini R, Lazzari Agli L, Cancellieri A, Poletti V, Candoli P, Paioli D, Alifano M, Tinelli C, Patelli M. Transbronchial needle aspiration improves the diagnostic yield of bronchoscopy in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004; 21: 147-151

Tuder RM. A pathologist's approach to interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 1996; 2: 357-363

Uemura A, Morimoto S, Hiramitsu S, Kato Y, Ito T, Hishida H. Histologic diagnostic rate of cardiac sarcoidosis: evaluation of endomyocardial biopsies. *Am Heart J* 1999; 138: 299-302

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

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

Wahlstrom J, Katcher K, Wigzell H, Olerup O, Eklund A, Grunewald J. Analysis of intracellular cytokines. *Thorax* 2003; 58: 519-524

Wallace WA, Howie SE. Immunoreactive interleukin 4 and interferon- γ expression by type 2 alveolar epithelial cells in interstitial lung disease. *J Pathol* 1999; 187: 475-480

Wallace WE. Reactive MALDI mass spectrometry: application to high mass alkanes and polyethylene. *Chem Commun* 2007; 43: 4525-45257

Wiken M, Grunewald J, Eklund A, Wahlstrom J. Higher monocyte expression of TLR2 and TLR4, and enhanced pro-inflammatory synergy of TLR2 with NOD2 stimulation in sarcoidosis. *J Clin Immunol* 2009; 29: 78-89

Wiman LG. Familial occurrence of sarcoidosis. *Scand J Respir Dis* 1972; Suppl. 80:115-119

Winterbauer RH, Lammert J, Selland M, Wu R, Corley D, Springmeyer SC. Bronchoalveolar lavage cell populations in the diagnosis of sarcoidosis. *Chest* 1993; 104: 352-361

Wirnsberger RM, de Vries J, Wouters EF, Drent M. Clinical presentation of sarcoidosis in The Netherlands: An epidemiological study. *Neth J Med* 1998; 53: 53-60

Whittington HA, Armstrong L, Uppington KM, Millar AB. Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 220-226

Wong M, Yasufuku K, Nakajima T, Herth FJ, Sekine Y, Shibuya K, Iizasa T, Hiroshima K, Lam WK, Fujisawa T. Endobronchial ultrasound: new insight for the diagnosis of sarcoidosis. *Eur Respir J* 2007; 29: 1182-1186

Wurm K, Kehler E, Reichelt H. Zur Pathogenese der Sarkoidose (Morbus Boeck): Gehäuftes Sarkoidosevorkommen in tuberkulösen Sippen. *Med Klin* 1962; 57:1760-1764

Xaus J, Cardo M, Valledor AF, Soler C, Lloberas J, Celada A. Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity* 1999; 11: 103-113

Xaus J, Comalada M, Cardo M, Valledor AF, Celada A. Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27 (Kip1) and p21 (Waf1). *Blood* 2001; 98: 2124-2133

Yanardag H, Pamuk ON, Karayel T. Cutaneous involvement in sarcoidosis: analysis of the features in 170 patients. *Respir Med* 2003; 97: 978-982

Yeager Jr H, Williams MC, Beekman JF, Bayly TC, Beaman BL. Sarcoidosis: analysis of cells obtained by bronchial lavage. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116: 951-954

Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K. IL-12 upregulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 1998; 161: 3400-3407

Zheng L, Teschler H, Guzman J, Hubner K, Striz I, Costabel U. Alveolar macrophage TNF-alpha release and BAL cell phenotypes in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1061-1066

Ziegler A. Genetische Epidemiologie – Gegenwart und Zukunft. *Dtsch Arztebl* 2002; 99: 2342-2346

Zoneraich S, Gupta MP, Metha J, Zoneraich O, Wessely Z. Myocardial sarcoidosis presenting as acute mitral insufficiency. *Chest* 1974; 66: 452-454

9 DANKSAGUNG

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christian Grohé für die Hilfestellungen sowie die zuverlässige Betreuung.

Meinem Betreuer Dr. med. Stefan Pabst möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken für die jahrelange ausgezeichnete Unterstützung sowohl in Bezug auf die praktische Durchführung als auch die theoretische Ausarbeitung dieser Studie. Vielen Dank für die Anregungen, Korrekturen und Ratschläge, die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit sehr geholfen haben.

Martina Lennarz und Imke Beier möchte ich für die Einführung die Laborarbeit, für ihre Hilfsbereitschaft und Zuverlässigkeit danken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Nickenig, Herrn Prof. Dr. med. Vetter und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Meyer für die gelungene Zusammenarbeit und grosszügige Unterstützung durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. M. M. Nöthen, Prof. Dr. S. Cichon, Anna Karpushowa sowie Stefan Herms bedanken. Erst mit ihrer Unterstützung hatten wir die Möglichkeit unsere Untersuchungen in der Genomics-Plattform des Life&Brain Centers Bonn durchzuführen. Ganz besonders möchte ich nochmal Stefan Herms meinen Dank aussprechen, der mir immer gerne bei fachlichen Schwierigkeiten zur Seite stand.

Nicht zu vergessen sind alle freiwilligen Probanden, die Sarkoidosepatienten der Klinik aber auch alle Mitglieder der Sarkoidoseselbsthilfegruppen, die sich freundlicherweise bereit erklärt haben an unserer Studie teilzunehmen. Ohne ihre Bereitwilligkeit wäre diese Arbeit niemals entstanden.

Schließlich gilt der Dank vor allem meiner Familie und meinem Freund, die es mir erst möglich gemacht haben zu promovieren. Meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle nicht nur Dank sondern meinen größten Respekt und Anerkennung aussprechen. Sie haben mir durch ihre immerwährende Arbeit und Mühe nicht nur die Voraussetzungen für eine Promotion geschaffen sondern auch als wichtiges Vorbild gedient.