

BTNL2-Genanalyse bei Sarkoidose

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

Shanti Lokhande
aus Aachen

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Grohé
2. Gutachter: Prof. Dr. Natalija Novak

Tag der Mündlichen Prüfung: 14. Januar 2010

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

Für meine Eltern

*Euch aber, die ihr meinen Namen ehrt,
soll aufgehen die Sonne der Gerechtigkeit und ihre Flügel bringen Heilung.*

Maleachi 3, 20

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1 Definition der Sarkoidose	10
1.2 Geschichte des Krankheitsbildes Sarkoidose	10
1.3 Epidemiologie der Sarkoidose	11
1.4 Klinisches Bild der Sarkoidose	12
1.4.1 Symptomatik, klinische Befunde und Verlaufsformen	12
1.4.2 Immunopathogenese	15
1.4.3 Diagnostik	17
1.4.4 Therapie und Prognose	19
1.5 Ätiologie: Sarkoidose als ein interagierendes Geschehen multipler Faktoren	20
1.5.1 Infektionserreger	21
1.5.2 Umweltfaktoren	21
1.5.3 Genetische Disposition	22
1.6 Molekulargenetischer Hintergrund	24
1.6.1 <i>BTNL2</i> und Sarkoidose	24
1.6.2 Somatische Mutationen	26
1.7 Fragebogen zur Sarkoidose	27
1.8 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	28
2. Methoden	30
2.1 Erstellen des Sarkoidose-Fragebogens	30
2.2 Personenkollektiv	30
2.3 Material, Lösungen und Substanzen	31
2.3.1 Substanzen zur Isolierung und molekulargenetischen Analyse der DNA	31
2.3.2 Primer	31
2.3.3 Restriktionsenzym	32
2.3.4 Verwendete Kits	32

2.3.5	Zusammensetzung der Lösungen und Puffer	33
2.3.6	Arbeitsgeräte	33
2.3.7	Computerprogramme	34
2.3.8	Datenbanken	34
2.4	Methoden	34
2.4.1	Blutentnahme	35
2.4.2	DNA-Isolierung	35
2.4.2.1	DNA-Isolierung aus Vollblut	35
2.4.2.2	DNA-Isolierung aus Lymphknoten-Gewebe	35
2.4.3	DNA-Konzentrationsbestimmung	36
2.4.4	Whole Genome Amplification	36
2.4.5	Primerdesign	37
2.4.6	Polymerase-Kettenreaktion	38
2.4.7	Enzymatischer Verdau zur Untersuchung der Deletion c.450delC	41
2.4.8	Agarosegelelektrophorese	42
2.4.9	Produktaufreinigung und Sequenzierung	43
2.4.9.1	Aufreinigung von PCR-Produkten	43
2.4.9.2	Sequenzierung	43
3.	Ergebnisse	45
3.1	Sarkoidose-Fragebogen	45
3.2	Molekulargenetische Untersuchungen von <i>BTNL2</i>	45
3.2.1	Basisdaten des Kollektivs	45
3.2.2	Qualitätstestung der DNA	46
3.2.3	Somatische Mutation	47
3.2.4	Anhäufung verschiedener Veränderungen auf einem G-Allel	49
3.2.4.1	Darstellung der Polymorphismen	49
3.2.4.2	Haplotypanalyse	53
3.2.5	Untersuchung der Deletion c.450delC im erweiterten Kollektiv	54
3.2.5.1	Ergebnisse der Testung der Deletion c.450delC mittels RFLP	54
3.2.5.2	Genotypverteilung und Allelfrequenz	56

4. Diskussion	58
4.1 Genomweite Assoziationsstudien	58
4.1.1 Genomweite Assoziationsstudien bei komplexgenetischen Erkrankungen	58
4.1.2 Genomweite Assoziationsstudien bei Sarkoidose	61
4.2 Sarkoidose-Fragebogen	61
4.3 Mutationsanalyse in <i>BTNL2</i>	62
4.3.1 Somatische Mutationen	63
4.3.2 Die Besonderheit von vier Mutationen auf einem G-Allel	66
4.3.3 Relevanz des Exon 3 für <i>BTNL2</i>	67
4.4 Ausblick	68
5. Zusammenfassung	70
6. Anhang	72
7. Literaturverzeichnis	78
8. Danksagung	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ACE	Angiotensin converting enzyme, Angiotensin-Konvertierungs-Enzym
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaar
BTNL2	Butyrophilin-like 2
C	Cytosin
cM	centiMorgan
CO	Kohlenstoffmonoxid
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxy-Nukleotidtriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dH ₂ O	Demineralisiertes Wasser
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde, Einsekundenkapazität
G	Guanin
h	Stunde
HLA	Human leukocyte antigen, Humanes Leukozytenantigen
H ₂ O	Wasserstoffhydroxid, Wasser
IL	Interleukin
kb	Kilobase
l	Liter
Mb	Megabase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute

ml	Milliliter
Mrd	Milliarden
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
rpm	Rotation per Minute
sec	Sekunden
SNP	Single nucleotide polymorphism, Einzel-Nukleotid-Polymorphismus
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
μl	Mikroliter

1. EINLEITUNG

1.1 Definition der Sarkoidose

Sarkoidose, auch bekannt als *Benigne Lymphogranulomatose* oder *Morbus Besnier-Boeck-Schaumann*, ist eine entzündliche Multisystemerkrankung ungeklärter Ätiologie, die in akuter oder in chronischer Form verlaufen kann. Vor allem Erwachsene jungen und mittleren Alters sind betroffen und zeigen meist eine bilaterale Lymphadenopathie und Manifestation der Lunge, wobei jedoch nahezu jedes Organ involviert sein kann (ATS, ERS, WASOG, 1999). Costabel (2001) definierte die Krankheit als eine multisystemische Dysfunktion mit gesteigerter zellulärer Immunantwort am befallenen Locus bei für Sarkoidose prädisponierten Personen, verbunden mit einer Exposition bisher unbekannter Umweltfaktoren. Histologisch zeigen sich typischerweise nicht-verkäsende, epitheloidzellige Granulome mit Langhansschen Riesenzellen und einem Lymphozytensaum (Sharma, 2005).

1.2 Geschichte des Krankheitsbildes Sarkoidose

Nachdem der britische Dermatologe Jonathan Hutchinson erstmalig im Jahre 1871 eine über 2 Jahre fortgeschrittene „gerötet symmetrische Hautläsion ohne Schmerzen auf Armen und Beinen“ beobachtete, beschrieb Ernest Besnier 1888 aufgrund dem klinischen Bild einer rötlichen Schwellung an Nase, Augen und Fingern die Hautmanifestation der Sarkoidose als „lupus pernio“. Bereits kurze Zeit später, im Jahre 1897, präsentierte der Norweger Caesar Boeck einen Patienten mit Lymphknotenadenopathie, welche er als sarkomähnliche Hautveränderung darstellte, eine Bezeichnung, die bis heute unzutreffenderweise auf den Namen der Krankheit verweist. Boeck war auch der Erste, der das histologische Bild der Sarkoidose erkannte (Sharma, 2007). Auf den multiorganischen Charakter der Erkrankung wies 1914 der Schwede Joergen Schaumann hin. Um die Sarkoidose vom malignen Hodgkin Granuloma abzugrenzen, bezeichnete er sie als „Lymphogranulomatosis benigna“, wobei er wie Besnier und Boeck von einer tuberkuloseartigen Ätiologie ausging. Obwohl das Symptom des „Erythema nodosum“ erstmals um 1800 von Robert Willian dargestellt wurde, machte sich schließlich Sven Löfgren 1946 durch die Beschreibung der akuten Verlaufsform des Morbus Boeck einen Namen (Sharma, 1983; Löfgren, 1953). Anfang der sechziger Jahre wurde die These des tuberkulösen Ursprungs überwiegend verworfen und es wird weiterhin nach der Ätiologie der Sarkoidose geforscht.

1.3 Epidemiologie der Sarkoidose

Die Sarkoidose zeigt hinsichtlich ihrer Prävalenz, Geschlechterverteilung und dem Schweregrad weltweit ein heterogenes Bild. Epidemiologische Aussagen werden erschwert durch die wenig präzise und einheitliche Definition des Krankheitsbildes, den Mangel an spezifischen diagnostischen Tests und einer oftmals subklinischen Manifestation, so dass mit einer höheren Dunkelziffer und Zahl von Fehldiagnosen gerechnet wird (ATS, ERS, WASOG, 1999).

Insgesamt reicht die Prävalenz von unter 1 (Spanien, Portugal) bis zu über 60/100.000 Einwohnern, wobei die Prävalenz die Inzidenz meist um das zwei- bis fünffache übertrifft. Die höchsten Zahlen erreichen nach Kummer (2000) die Bewohner der Isle of Man mit 137/100.000, Schweden und Afroamerikaner mit beide je 64/100.000 Einwohnern. Aber auch in den zentraleuropäischen Regionen, in Japan und den USA ist die Krankheit verbreitet, wohingegen sie in den südlichen Ländern Europas weitaus seltener auftritt. Autoptisch diagnostizierte Sarkoidose-Fälle verweisen jedoch auf fünf- bis zehnfach höhere Prävalenzzahlen.

Eine signifikante Heterogenität bzgl. dem Auftreten und Schweregrad der Sarkoidose fällt zwischen den Geschlechtern und verschiedenen ethnischen Gruppen auf. Dabei betonte Costabel (2001) die schwereren, chronischen Verläufe der Afroamerikaner, während Kaukasier sich oftmals asymptomatisch präsentieren. Das mit einer meist sehr günstigen Prognose assoziierte Löfgren-Syndrom zeigt sich vermehrt bei finnischen (18%) und britischen (30%) Patienten. Rybicki (1997) zeigte in einer 5-Jahresstudie die erhöhte Inzidenz afroamerikanischer Frauen (39,1/100.000) auf, noch vor männlichen Schwarzen (29,8/100.000) und weißen US Amerikanern (19,7/100.000). Somit liegt das Lebenszeitrisiko für Sarkoidose bei 0,85% für Weiße und um nahezu ein Drittel höher für schwarze US Amerikaner (2,4%). Der Altersgipfel der Sarkoidose-Inzidenz liegt geschlechtsunabhängig bei 20-29 Jahren (Costabel, 2001), bei Skandinaviern, Deutschen und Japanern besteht ein zweiter Gipfel bei Frauen über 50 Jahren (ATS, ERS, WASOG, 1999). Auch ist nach ebendiesem Autor das weibliche Geschlecht in größerer Anzahl betroffen. Kummer (2000) hingegen beschrieb keine wesentlichen Unterschiede zwischen Männern und Frauen. So überwiegt nach seiner Annahme in Neuseeland das männliche, in den USA das weibliche Geschlecht, jeweils im Verhältnis 3:2.

Die Mortalität wird für alle Regionen auf 1-5% beziffert, wobei die Herz-Sarkoidose bei Japanern die häufigste Todesursache darstellt, in fast allen anderen Regionen dagegen Lungenversagen mit Cor pulmonale zum Tode führt. Kummer (2000) zeigte, dass sich unter den Sarkoidose-Erkrankten signifikant weniger Raucher finden als in der Allgemeinbevölkerung. Außerdem

spielen die geographische Nähe und familiäre Häufung eine Rolle, was auf den Einfluss einer Interaktion von Umweltfaktoren und genetischer Disposition auf die Krankheitsentstehung hindeutet.

1.4 Klinisches Bild der Sarkoidose

1.4.1 Symptomatik, klinische Befunde und Verlaufsformen

Bedingt durch die Krankheitsdauer, Lokalisation und das Ausmaß der Organbeteiligung und die Aktivität des granulomatösen Prozesses zeigen an Sarkoidose Erkrankte ein variables klinisches Bild. Costabel (2001) unterscheidet drei Arten der klinischen Präsentation: Asymptomatische Sarkoidose, unspezifische Symptome und Symptome aufgrund spezifischer Organbeteiligung, wobei 30-50% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose symptomfrei sind und durch ungezieltes Röntgenscreening des Thorax befundet werden.

Prinzipiell kann die Sarkoidose jedes Organ betreffen, zu 95-98% sind jedoch mediastinale Lymphknoten beteiligt. Typischerweise zeigt sich die Lymphadenopathie bilateral und symmetrisch in vor allem hilär und paratracheal pathologisch vergrößerten Lymphknoten (s. Abb.1). Ebenso ist die Lunge in über 90% involviert mit prominenten Beschwerden wie Atemnot, trockenem Husten und Brustschmerzen in 30-50% der Fälle. Im weiteren Verlauf der Erkrankung zeigt das Lungengewebe oftmals eine vermehrte retikulo-noduläre Zeichnung, die sich bis hin zur Lungenfibrose (Stadium IV, s. Tabelle 1) entwickeln kann. Auch die Atemwege (Larynx, Trachea und Bronchien) können, wenn auch viel seltener (5-10%), beteiligt sein und zur Obstruktion und zu Bronchiektasien führen.

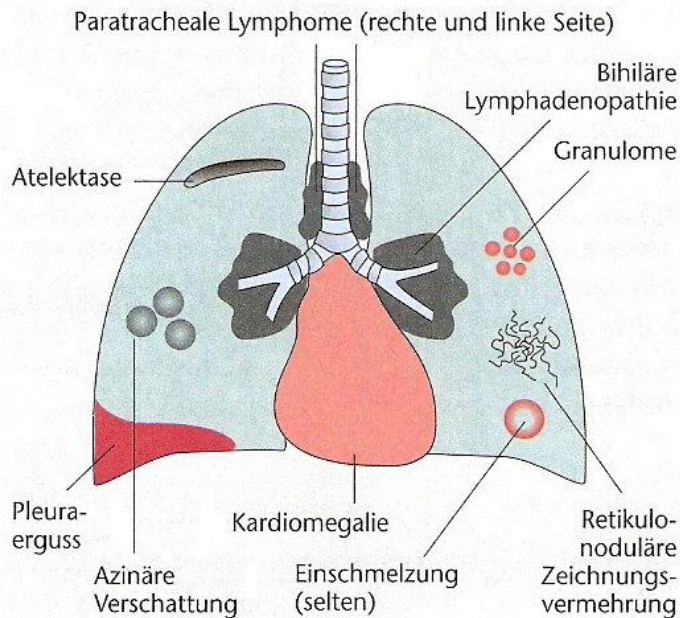


Abbildung 1. Mögliche radiologisch sichtbare Veränderungen bei Sarkoidose (aus: Renz-Polster, 2004)

Weitere Organotropien sind charakteristisch: So befällt die Erkrankung nach Vagal (2007) und Ohara (2005) bevorzugt die Leber (40-60%), Milz (bis zu 50%), Augen (10-50%) und periphere Lymphknoten (30%), seltener sind dagegen Manifestationen der Haut, des Nervensystems, des Herzen oder der Speicheldrüsen. Moller (2005) beschreibt weiterhin Erscheinungen in den Gelenken, Nieren, im Knochen, Skelettmuskelsystem und Gastrointestinaltrakt.

Die Sarkoidose wird in eine akute und eine chronische Form unterteilt. Dabei richtet sich die Klassifizierung nach dem anfänglichen Auftreten und der klinischen Symptomatik, und nicht nach dem jeweiligen Stadium (Ferlinz, 1994).

Akute Sarkoidose

Die akute Sarkoidose betrifft 70-90% aller Erkrankten und stellt sich abrupt mit lang anhaltendem, hohem Fieber und einem ausgeprägtem Krankheitsgefühl ein. Die Patienten empfinden unspezifische Symptome wie Gewichtsverlust, Müdigkeit und Nachtschweiß bis hin zu organspezifischen Beschwerden. Nach 4-8 Wochen, in denen eine max. erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit beobachtet werden kann, stellt sich eine Besserung ein, die der Rückbildung der im Thoraxröntgenbild erkennbaren Adenopathie in der Regel voraus geht (Kirsten und Magnussen, 2000). Eine Sonderform der akuten Sarkoidose stellt das Löfgren-Syndrom dar, welches mit der Symptomtrias aus Sprunggelenksarthritis, Erythema nodosum und

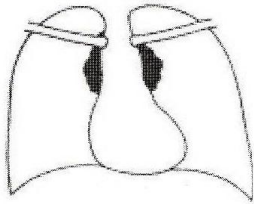
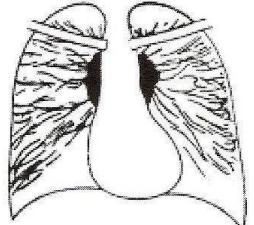
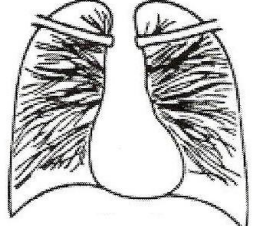
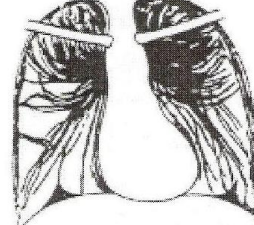
einer bilhilären Lymphadenopathie auftritt. Insgesamt zeigt die akute Verlaufsform eine gute Prognose: Innerhalb von 1-2 Jahren kommt es bei 90% der Patienten zur spontanen Remission, selten kommt es zu Rezidiven. Nur in ca. 5-10% der Fälle entwickelt sich die Erkrankung progredient und geht in die chronische Form über.

Chronische Sarkoidose

Die chronische Sarkoidose besteht bei 10-30% aller Fälle und beginnt fast unbemerkt bis schleichend. Sie kann abgeschwächte unspezifische Beschwerden (s. Akute Sarkoidose) und organbezogene Symptome aufweisen, oft assoziiert mit pulmonaler Infiltration wie Belastungsdyspnoe, Husten und Abgeschlagenheit. Im progressiven Verlauf kommt es zum unaufhaltsamen Verlust der Lungenfunktion und schließlich zur Zerstörung der pulmonalen Architektur. Die chronische Form ist durch ein mindestens zweimaliges Auftreten einer Sarkoidose-Episode im Leben bzw. durch eine länger als 2 Jahre andauernde Symptomatik definiert. Sie wird entweder zufällig oder symptomgebunden diagnostiziert, und da die Lunge nahezu regelhaft betroffen ist, kommt der Röntgenuntersuchung der Thoraxorgane eine überragende Bedeutung zu (Lynch, 2007).

Die internationale Einteilung der (pulmonalen) Sarkoidose, erstellt nach Wurm (1983) und modifiziert nach de Remée (1983), wird wie folgt gehandhabt:

Tabelle 1. Internationale Stadieneinteilung der Sarkoidose mit Frequenz (Costabel, 2001) und schematischer Darstellung der jeweils typischen Röntgenveränderungen (aus: Kirsten und Magnussen, 2000)

Stadium nach Thoraxröntgenbefund	Frequenz	Typische Röntgenveränderungen
0 – Normalbefund bei isolierter extrapulmonaler Organsarkoidose	5-10%	Keine Röntgenveränderungen
I – Bihiläre Lymphadenopathie <u>ohne</u> parenchymatöse Herdsetzungen	50%	
II – Bihiläre Lymphadenopathie <u>mit</u> parenchymatösen Herdsetzungen	25%	
III – Lungenbefall ohne Lymphadenopathie	15%	
IV – Lungenfibrose mit irreversibler Funktionsminderung	5-10%	

Zu den nicht typischen Röntgenveränderungen der Thoraxorgane gehören Ergussbildungen, die für eine Pleurabeteiligung sprechen, primäre Hohlrumbildungen (kavitäre Sarkoidose) und tumorartige oder noduläre Veränderungen. Selten werden Verkalkungen der Sarkoidoseherde beobachtet (s. auch Abb.1).

1.4.2 Immunopathogenese

Die bei der Sarkoidose teils histologisch-radiologisch sichtbaren Gewebeveränderungen treten gestuft in drei Phasen auf (*Frühe Alveolitis, Granulom, Fibrose*) und stellen ein komplexes

immunopathologisches Geschehen dar: Ein vermeintliches Antigen wird von (vorwiegend alveolaren) Makrophagen erkannt, phagozytiert und CD4+ Th1-Lymphozyten verstärkt präsentiert. Auf diesen Stimulus hin und unter Einfluss von durch Makrophagen sezerniertem Interleukin-12 (IL-12) proliferieren die Th1-Lymphozyten. Neben dem Makrophagen aktivierenden Interferon- (IFN-) setzen sie Interleukin-2 (IL-2) und weitere chemotaktische Faktoren zur Akkumulation von mononuklearen Zellen (vorwiegend Monozyten) frei. IL-2 bewirkt außerdem einen Zuwachs der verschiedenen T-Lymphozyten-Klone. Beim Versuch, das Antigen oder Pathogen abzuwehren, kommt es sowohl zur lokalen Ansammlung aktivierter Lymphozyten und Makrophagen, als auch zur aktiven Rekrutierung dieser Zellen aus dem peripheren Blut in die Alveolen. Die Stimulation der B-Lymphozyten in der Lunge durch die aktivierten T-Lymphozyten führt zur gesteigerten Bildung von unspezifischen Antikörpern mit der Konsequenz eines erhöhten Serum-Immunglobulin-G-Spiegels (Alveolitis).

Monozyten und Makrophagen reichern sich am Ort des aktiven Krankheitsgeschehens mit einer gesteigerten Expression von Aktivierungsmarkern (HLA-DR, HLA-DQ, CD71) und Adhäsionsmolekülen (CD49a, CD54, CD102) an, wo sie schließlich vermehrt Zytokine und Chemokine freisetzen. Zusammen mit IFN- bewirken besonders die Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- die Differenzierung der Makrophagen in mehrkernige Riesenzellen und Epitheloidzellen, und tragen so zur Bildung der Granulomstruktur bei.

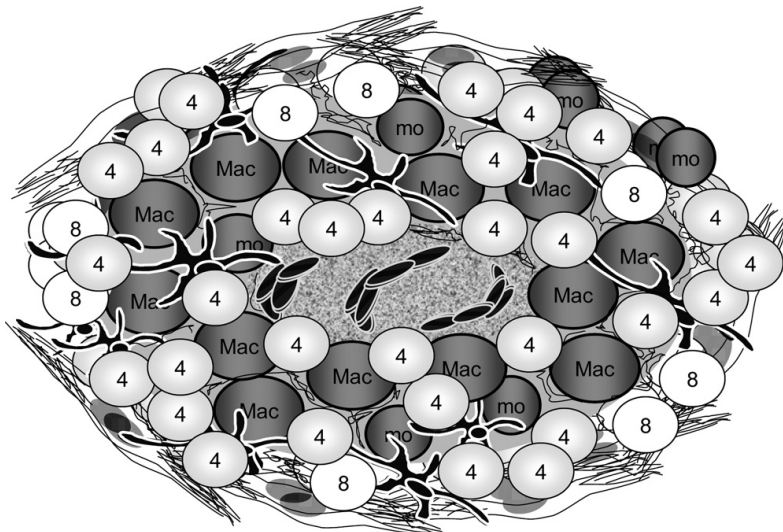


Abbildung 2. Schematische Struktur des Sarkoidose-Granuloms mit epitheloiden Makrophagen (Mac), Monozyten (mo), CD4+ T-Lymphozyten (4) und CD8+ T-Lymphozyten (8) (aus: Noor und Knox, 2007)

Das Sarkoidose-Granulom besteht zentral vorwiegend aus CD4+ T-Lymphozyten und epitheloiden Makrophagen mit gelegentlich mehrkernigen Riesenzellen. Diese besitzen mitunter zytoplasmatische Einschlüsse wie Asteroid-Körper und Schaumann-Körper. Monozyten kommen initial reichlich als Vorläufer der Makrophagen vor. CD8+ T-Lymphozyten erscheinen weniger und typischerweise in der Peripherie des Granuloms.

Der Prozess der Fibrose als Endstadium der Sarkoidose ist noch wenig aufgeklärt. Wahrscheinlich wird er begünstigt durch die von aktivierten Makrophagen sezernierten fibroblastischen Wachstumsfaktoren, die zur Proliferation der Fibroblasten, Kollagensynthese und Fibrosierung der Granulome beitragen. Ob sich die granulomatöse Entzündung zurückbildet, sie andauert oder zur Fibrose entwickelt, hängt von der Interaktion proinflammatorischer (TNF- , IFN- u.a.) und regulierender (TGF- , IL-10 u.a.) Zytokine und Zellen, der Apoptose und der Antwort auf TH1/TH2-Zytokine ab. Aber auch ein lokaler Überfluss an Transforming growth factor- (TGF-) kann eine Fibrose verursachen. Bislang bleibt unklar, warum bei einigen Patienten das Granulomstadium jahrelang persistieren und sich dann wieder vollständig zurückbilden kann, wohingegen bei anderen die Krankheit zur progredienten Fibrose führt (Costabel, 2000; Noor und Knox, 2007).

1.4.3 Diagnostik

Zur Befunderhebung werden bildgebende Verfahren, histologische und zytologische Untersuchungen von Gewebeproben, Blutbildanalysen sowie Lungenfunktionstests eingesetzt.

Da die Lunge vorwiegend betroffen ist, bildet die radiologische Untersuchung der Thoraxorgane nach wie vor den häufigsten Zugangsweg zur Diagnose. Fast immer wird eine klassische Röntgenaufnahme erstellt. Computertomogramme in normaler bzw. hochauflösender Technik werden eher bei atypischer Befundkonstellation und zur Abgrenzung anderer interstitieller Lungenerkrankungen zur Hilfe genommen.

Ein weiteres essentielles Kriterium zur Bestätigung insbesondere der chronischen Sarkoidose und zum Ausschluss maligner Entitäten ist der histologische Nachweis von typischen nicht-verkäsenden Epitheloidzellgranulomen. Dieser Nachweis gelingt mithilfe transbronchialer Biopsien oder, bei atypischem Verlauf, durch die Mediastinoskopie oder Endosonographie mit Punktion mediastinaler Lymphknoten bzw. Biopsien betroffener Organe. Grundlegend ist ebenso der Ausschluss bakterieller oder mykologischer Befunde wie z.B. die Tuberkulose (Kirsten und Magnussen, 2000).

Die Bronchoalveoläre Lavage (BAL) ist definiert als die Zellgewinnung durch Spülung des Bronchialsystems und Alveolarraumes im Rahmen der Bronchoskopie und dient der gezielten Untersuchung der CD4⁺ T-Lymphozyten und CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten. Bei 90% aller Sarkoidose-Patienten weist die Spülflüssigkeit eine erhöhte Lymphozytenzahl auf, die aber zur Abgrenzung von anderen entzündlichen Erkrankungen nicht aussagekräftig ist. Wegweisend für eine aktive Sarkoidose ist jedoch nach Drent et al. (2001) ein CD4/CD8-Quotient von >3,5 (Referenzwert: 2) mit einer geringeren Sensitivität von 52-59%, aber hohen Spezifität von 94-96%.

Die Lungenfunktionsuntersuchung zeigt nur eine mäßige Korrelation mit den Befunden der Thoraxröntgenaufnahme, aber sie dient bei pulmonalem Befall als Verlaufskontrolle im weiteren Prozess der Erkrankung. Die vorherrschende Funktionsstörung der chronischen Verlaufsform ist hierbei die Restriktion.

Zum Ausschluss einer Hyperkalzämie, die durch die erhöhte Bildung einer Vitamin-D-Variante in den Granulomen entsteht, und einer hepatischen, renalen oder hämatologischen Beteiligung wird eine Blutuntersuchung durchgeführt. Ebenso obligatorisch ist die routinierte ophthalmologische Untersuchung, um eine sich schleichend entwickelnde Uveitis frühzeitig zu erkennen, die im schlimmsten Fall zur Erblindung führt.

Das Labor dient außerdem der Beobachtung bestimmter Verlaufsparemeter, die die Aktivität der Sarkoidose besser abschätzen lassen. Aktivität bedeutet in diesem Zusammenhang ein noch andauernder Fortbestand der Entzündung mit Wirkung von T-Lymphozyten und Makrophagen und die Bildung von Granulomen mit einer potentiellen Progression der Erkrankung. Aus der Reihe der Parameter verhelfen am ehesten die Bestimmung des Serum-Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) und des löslichen IL-2-Rezeptors zu einer besseren Beurteilung des Verlaufs und der Krankheitsaktivität. IL-2 wird von aktivierten T-Lymphozyten freigesetzt (s.o.) und verweist so auf die gestörte T-Zell-Interaktion bei der Sarkoidose (Prasse et al., 2008). ACE wird von Epitheloidzellen und Makrophagen gebildet, die bei der Granulombildung mitwirken, und reflektiert die Höhe der Granulomlast. Allerdings kann der Wert auch bei anderen Granulomatosen (Tuberkulose, Aspergillose, exogen-allergische Alveolitis) erhöht sein oder dagegen beim Löfgren-Syndrom und unter Kortikosteroidbehandlung erniedrigt vorliegen. Daher muss weiterhin immer vorrangig die klinische Symptomatik in Verbindung mit Röntgenbefunden und Ergebnissen der Lungenfunktion beachtet werden (Costabel, 2005).

1.4.4 Therapie und Prognose

Therapie

Da die Ätiologie der Sarkoidose unbekannt und bislang kein Antigen erforscht ist, gibt es keine kausalen Behandlungsoptionen. Somit sind die Wege der Therapie auf die Symptomlinderung, Rückbildung der radiologischen Veränderungen und das Verhindern der Entwicklung einer Lungenfibrose begrenzt.

Nicht in jedem Fall ist eine Therapie erforderlich, da in 30-70% eine spontane Rückbildung zu erwarten ist. Eine Behandlung sollte bei der akuten und prognostisch günstigen Form (z.B. Löfgren-Syndrom) an den Beschwerden orientiert sein. Hierbei werden in erster Linie antipyretische und antiphlogistische Analgetika eingesetzt.

Bei der prognostisch ungünstigeren, chronischen Form hängt die spontane Rückbildungstendenz vom vorliegenden Stadium ab. Je fortgeschrittener das Stadium, desto geringer die Aussicht auf eine spontane Remission und desto notwendiger ein medikamentöses Gegenwirken. Kortikosteroide gelten als Eckstein der Therapie für die schwerwiegende oder fortgeschrittene Sarkoidose und bewirken durch ihren immunsupprimierenden Charakter oftmals eine drastische Remission der Erkrankung. Ihr Einsatz ist selten im Stadium I indiziert, sofern nicht extrapulmonale Organe in ihrer Funktion bedroht sind. Bei symptomatischen Patienten im Stadium II oder III sollte - nach einer initialen Beobachtungsphase von 6-12 Monaten - eine Kortikosteroidbehandlung (z.B. mit Prednison) bedacht werden. Eine sofortige Therapie ist dagegen bei Patienten mit schwerwiegenden extrapulmonalen Symptomen (okuläre, kardiale, renale und neurologische Störungen, Hyperkalzämie), pulmonaler Dysfunktion und aktiver Alveolitis angebracht.

Dabei muss beachtet werden, dass sowohl ausreichend lange als auch mit hinreichend hoher Dosierung behandelt wird. Durch ein vorzeitiges Absetzen der Therapie oder eine zu frühe Dosisreduktion kann ein Rückfall der Erkrankung riskiert werden; manche Patienten benötigen eine niedrig dosierte Langzeittherapie über Jahre. Das Medikament wird, vorwiegend systemisch, in oraler Form verabreicht. Auch eine lokale Applikation ist möglich, z.B. bei Befall der Haut (kutan), Augen oder bei bronchialer Hyperreaktivität mit Husten (inhalativ). Nachteilig bringen Kortikosteroide zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen mit sich, wie z.B. Osteoporose, Gastritis oder Ulkus bei bekannter Anamnese, denen zu ihrer Vermeidung präventiv vorgebeugt werden sollte. Jedoch können Kortikosteroide der Progredienz in das Stadium IV mit

Fibrosierung nicht vorbeugen bzw. können diese, wenn schon eingetreten, nicht mehr rückgängig machen.

Alternativ werden bei langwierigen Verläufen zunehmend immunsuppressive, zytotoxische und immunmodulierende Mittel eingesetzt, die z.T. aus der Behandlung rheumatischer Erkrankungen bekannt sind, wie z.B. Methotrexat, Azathioprin, Chloroquin, Cyclophosphamid und TNF- - Inhibitoren. Während der oft mehrmonatigen Behandlung sind wiederholte Funktionsprüfungen und Untersuchungen der betroffenen Organe notwendig.

Eine Lungen-, Leber- oder Herztransplantation stellt eine lebenserhaltende Option für Patienten im Endstadium der Sarkoidose dar, die sich refraktär gegen jegliche medikamentöse Therapie zeigen (Lynch et al., 2007; Nunes et al., 2007).

Prognose

Generell ist die Sarkoidose eine zeitlich begrenzte Erkrankung, die in der Hälfte der Fälle für 12-36 Monate, in den meisten übrigen Fällen unter 5 Jahren andauert und nur gelegentlich über mehrere Jahrzehnte verlaufen kann. Bei rund 70% der Betroffenen heilt die Erkrankung spontan aus (Lynch et al., 2007). Allerdings kann es über ein Jahr dauern, bis der Betroffene sich wieder vollständig erholt hat. Die Rückbildung von röntgenologisch nachgewiesenen Veränderungen in der Lunge kann bis zu 2 Jahren dauern. Dabei sollten mindestens 3 Jahre nach Absetzen der Therapie beobachtet werden, bevor eine Heilung begründet wird.

Prognostische Faktoren orientieren sich nach der Art des Ausbruchs, der Krankheitsdauer und den röntgenologischen Stadien. Ein akuter Beginn mit Löfgren-Syndrom oder asymptomatischer bilateraler Lymphadenopathie gewährt fast immer einen selbstbegrenzten Verlauf. Dagegen sind eine schwarze Herkunft, Erkrankungsalter >40 Jahren, Lupus pernio, chronische Uveitis, sinonasale oder ossale Manifestation, zentralnervöse oder kardiale Beteiligung, eine chronische Hyperkalzämie, Nephrokalzinose und die Stadien III und IV mit einem schwerwiegenden und langdauernden Prozess verbunden.

Bis zu 5% der Betroffenen sterben an den Folgen der Erkrankung, insbesondere bei Gehirn- und Herzbeteiligung oder schweren Strukturveränderungen der Lunge (Nunes et al., 2007).

1.5 Ätiologie: Sarkoidose als ein interagierendes Geschehen multipler Faktoren

Obwohl das Krankheitsbild vor nahezu 140 Jahren erstmals beschrieben wurde, ist die Ursache der Sarkoidose noch immer nicht aufgeklärt. Mögliche Gründe hierfür werden in der Komplexität

des klinischen Bildes und dem Einfluss regionaler, ethnischer und genetischer Faktoren gesehen. Jüngste Vermutungen legen nahe, dass die Ursache in der Interaktion einer umweltbedingten bzw. infektiösen Antigenexposition mit den genetischen Faktoren eines Individuums liegt (Culver et al., 2007).

1.5.1 Infektionserreger

Eine infektiöse Ätiologie der Sarkoidose wurde seit Beginn der Krankheitsbeschreibung vermutet. Aufgrund der pathologischen Ähnlichkeit mit mykobakteriellen Infekten nahm man lange Zeit an, dass *Mykobakterien* eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen. Mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase chain reaction, PCR) gelang es inzwischen vereinzelt mykobakterielle DNA in Gewebebiopsien nachzuweisen, so z.B. Drake et al. (2002) in 60% eines amerikanischen Kollektivs oder Fité et al. (2006) in 39% ihrer spanischen Patienten im Vergleich zu nur 4% der gesunden Kontrollkohorte. Direkt aus sarkoidoseinduzierten Granulomen oder bronchoalveolärer Flüssigkeit konnten Mykobakterien dagegen nicht isoliert werden, so dass bislang keine exakte Assoziation gefolgert werden konnte.

Viel eher werden die *Propionibakterien acnes* und *granulosum* als pathogenetischer Kofaktor der Sarkoidose in Betracht gezogen, da sie sowohl in einer japanischen Studie bei allen untersuchten Fällen (Ebe, 2000) als auch in einer deutsch-japanischen Studie bei 106 von 108 Patienten (Eishi, 2002) nachgewiesen werden konnten. Gazouli et al. (2002) bestätigten diese Beobachtung auch bei griechischen Patienten.

Außerdem weisen die saisonale Häufung der Sarkoidose-Inzidenz mit einem Hoch im Frühjahr und die Übertragung der Erkrankung von Organspender auf Empfänger auf eine potentiell infektiöse Ursache hin (Ezzie und Crouser, 2007; Heyll et al., 1994). Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die These der infektiösen Ätiologie zu bestätigen und eindeutigere Hinweise zu erhalten.

1.5.2 Umweltfaktoren

Mehrere Studien sprechen für eine durch Umweltfaktoren bedingte Ursache und beweisen eine erhöhte Prävalenz für Sarkoidose bei Gruppen mit gemeinsamer beruflicher Exposition. So beschrieb Edmondstone (1988) ein vermehrtes Auftreten bei Krankenschwestern einer Londoner Klinik, das mit 15,4% das der Normalbevölkerung um den Faktor 7,5 übertrifft. Unter den New Yorker Feuerwehrleuten, die im Rahmen der Rettungsmaßnahmen nach dem World Trade Center-

Zusammensturz 2001 einer besonders hohen Staubexposition ausgesetzt waren, erkrankten in den folgenden fünf Jahren 26 Personen an Sarkoidose. Im Vergleich zu den 15 Jahren vor dem Zusammensturz (15/100.000) zeigte sich nun eine erhöhte jährliche Inzidenz von 22/100.000 (Izbicki, 2007). Die Studien basieren auf der Vermutung, dass die erkrankten Personengruppen den gleichen beruflichen oder ökologischen Bedingungen unterlagen und somit derselben Exposition an noch unbekanntem Antigenen ausgesetzt waren, die zur Sarkoidose-Entstehung beitragen. In einer großräumigen Studie (ACCESS, A case control etiologic study of sarcoidosis) untersuchten Newman et al. (2004) 706 an Sarkoidose Erkrankte auf ihre beruflichen Bedingungen. Dabei zeigten der Umgang mit Insektiziden und Schimmel, mit der potenziellen Exposition mikrobieller Bioaerosole, und landwirtschaftliche Beschäftigung eine positive Assoziation. Es konnte jedoch kein dominanter Risikofaktor differenziert werden. Auch Kreider et al. demonstrierten eine positive Korrelation zwischen landwirtschaftlichem, organischem Staub, Holzverbrennung und der Lungen-Sarkoidose.

Ein weiteres Merkmal für eine umweltbedingte Ätiologie liegt in der regionalen Nähe. In den USA erkrankten 3 von 10 Feuerwehrschülern, die während ihrer Ausbildung das gleiche Quartier bewohnten, wobei unter den restlichen 990 nur ein einziger Sarkoidosefall beobachtet wurde (Kern et al., 1993). Parkes et al. (1987) beobachteten unter 65.000 Einwohnern der Isle of Man 96 Sarkoidosefälle, von denen 39,6% vor ihrer Erkrankung bereits Kontakt mit Erkrankten hatten, im Vergleich zu nur 1-2% der Kontrollpersonen. War die räumliche Entfernung vom Erkrankten kürzer als 100m und lag der Kontakt weniger als drei Jahre zurück, so zeigte sich ebenfalls ein gehäuftes Auftreten. Auch in örtlicher Nähe zu Spitälern wurde eine erhöhte Inzidenz für Sarkoidose beobachtet.

1.5.3 Genetische Disposition

Culver et al. (2007) erwägten, dass verschiedene Gene nicht eine primäre ätiologische Rolle bei der Entstehung der Sarkoidose spielen, sondern die individuelle Antwort auf entsprechende umweltbedingte Antigene modulieren. Das Individuum besitze ein Spektrum an genetischen Polymorphismen, die die Anfälligkeit der Erkrankung beeinflussen und sich nur bei relevanter Exposition phänotypisch auswirken. Die Relevanz ökologischer Faktoren wird bestimmt durch die Dauer, Intensität und den Kontext der Exposition.

Dass eine genetische Prädisposition besteht, zeigt sich deutlich in der familiären und ungleichen ethnischen Häufung der Erkrankung. Die genetischen Faktoren beeinflussen außerdem die

Vielseitigkeit des klinischen Bildes, die Progression und Prognose der Sarkoidose. Eine familiäre Häufung wurde 1923 erstmals bei zwei deutschen Schwestern beobachtet. Insbesondere Studien mit erhöhten Konkordanzraten bei mono- sowie dizygoten Zwillingen und deren ähnlicher Krankheitsverlauf bestärken die Bedeutung der genetischen Determinante im Entstehungsprozess der Sarkoidose (Kneitz et al., 1995; Nakamura et al., 2000). Pietinaho et al. (1999) erkannten die familiäre Sarkoidose mit einer Prävalenz von 3,6% unter Finnen und von 4,3% unter japanischen Patienten. In ACCESS (Newman et al., 2004) wurde ein familiäres, relatives Risiko von 2,8 unter Afroamerikanern und 16,6 unter Weißen beobachtet. Somit zeigte sich ein insgesamt fünffach höheres Erkrankungsrisiko für Familienmitglieder mit einem betroffenen Geschwister- oder Elternteil. Die höchste Sarkoidosefrequenz unter der Familie ersten Grades erwies sich in Irland: Unter 114 Patienten fanden sich 9,6% mit einem oder mehr betroffenen Geschwisterkindern (Brennan, 1984).

In einer ersten genomweiten Untersuchung wurde eine hohe Assoziation zur Haupthistokompatibilitätskomplex-Region (Major histocompatibility complex, MHC) auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 und eine genetische Kopplung nahe der Klasse II der MHC-Region gefunden (Schürmann et al., 2001). Eine daraufhin folgende Studie erschloss einen Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) im Butyrophilin-like 2-Gen (*BTNL2*), einem 15kb langen Segment auf Chromosom 6p21. Valentonyte et al. (2005) zeigten, dass das A-Allel mit Sarkoidose assoziiert ist und einen Funktionsverlust des Proteins verursacht, der die T-Zell-Aktivierung kostimuliert. Unabhängig von anderen Allelen der MHC-Klasse II und trotz nahezu kompletten Kopplungsungleichgewichts (Linkage disequilibrium, LD) mit HLA-DRB stellt dieses *BTNL2*-Allel einen Risikofaktor für Sarkoidose dar (s. 1.6.1).

Verschiedene HLA-Typen stehen in Verbindung zu Autoimmunerkrankungen und spielen eine wichtige Rolle bei immunologischen Abwehrreaktionen. In der Kenntnis, dass die HLA-Klasse II-Gene für spezifische Antigenpeptide kodieren, die getriggert durch einen exogenen Stimulus vermehrt auf aktivierten alveolären Makrophagen exprimiert werden und die granulomatöse Immunantwort initiieren (s. 1.4.2), wurde besonders diese Region in verschiedenen Studien näher untersucht. Das autosomal-kodominant vererbte System von Gewebeantigenen ist durch zahlreiche eng gekoppelte Genloki mit multipler Allelie gekennzeichnet. Dabei erschwert das hohe und variable Kopplungsungleichgewicht mit der MHC-Region exakte Aussagen zur Korrelation zwischen häufig auftretenden Allelen und der Erkrankung. Deutlich ist aber die Assoziation zu HLA-DRB1 und HLA-DQB1. Weiterhin sind HLA-DR5, 14 und 15 mit einem

schwerwiegenden Verlauf und HLA-DR3 und 17 mit der akuten Form verbunden, HLA-DR6, 8 und 9 zeigen generell eine Assoziation zur Sarkoidose. Dagegen scheinen HLA-DR1, 4 und 9 unter Skandinaviern protektiv zu wirken.

Unter den HLA-Klasse I Allelen zeigen HLA-A, HLA-B7 und HLA-B8 konsistent eine positive Korrelation zur Sarkoidose, wobei HLA-B7 besonders hoch bei Afroamerikanern und niedrig unter Japanern ausfiel, und HLA-B8 generell mit einem akuten und günstigeren Verlauf verbunden ist (Spagnolo und Du Bois, 2007).

Neben den Genen der HLA-Klassen sind weitere Polymorphismen und Genorte beschrieben, die mit der Erkrankung unterschiedlich stark in Verbindung stehen. Bedeutsam sind darunter das Angiotensin converting enzym (ACE), der Chemokin Rezeptor 2 (CCR2), der in die Interaktion von Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten involviert ist, Interleukin-1 (IL-1), der Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) assoziiert mit chronischem Verlauf (Pabst et al., 2006), das natürliche widerstandsassoziierte Makrophagen-Protein-1-Gen (*NRAMP1*- bzw. *SLC11A1*), der Tumornekrosefaktor- (TNF-) und Transforming growth factor- (TGF-) (Iannuzzi und Rybicki, 2007). Iannuzzi (2007) weist außerdem auf ein potenziell mit Sarkoidose assoziiertes Gen auf Chromosom 5p hin, welches bei der Untersuchung von Afroamerikanern gefunden wurde und auf seine genaue Bedeutung in Zukunft näher untersucht werden soll.

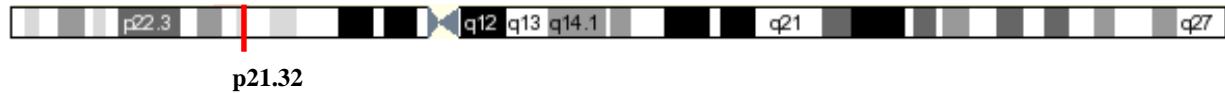
1.6 Molekulargenetischer Hintergrund

1.6.1 *BTNL2* und Sarkoidose

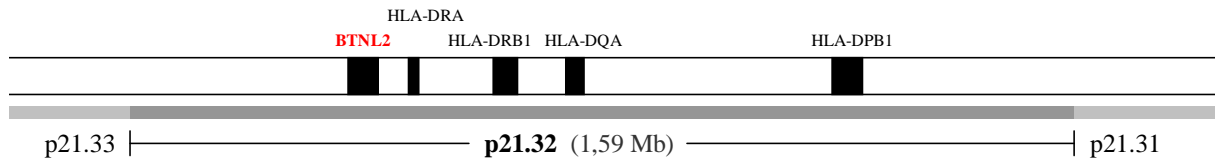
BTNL2, auch bekannt als „Butyrophilin-like 2“ und „BTL-2“, ist ein Butyrophilin Gen, das zur Gruppe der Immunglobuline gehört. Stammers et al. (2000) beschrieben das Gen erstmalig und benannten es aufgrund seiner hochgradigen Homologie zur B7-Familie (CD80 and CD86) und der regionalen Nähe zur MHC-Klasse II. Das Segment umfasst etwa 14kb mit 7 Exons auf Chromosom 6p21.32 (s. Abb. 3). *BTNL2* ist nur 180kb perizentromer von der HLA-DRB Region (MHC II) und über 5Mb von der homologen Butyrophilin-Familie (Chromosom 6p22) entfernt.

A

Chromosom 6



B



C

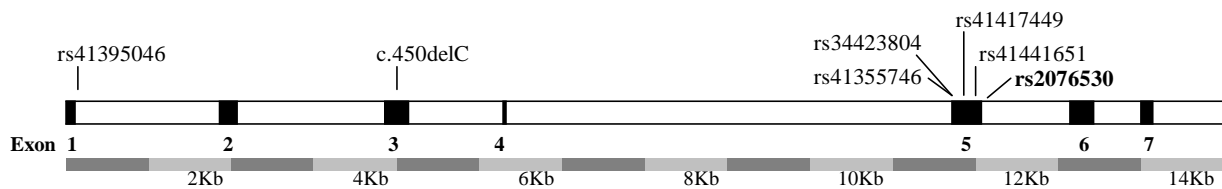


Abbildung 3A. Position des Gens *BTNL2* auf Chromosom 6 (p21.32) **B.** *BTNL2* mit angrenzenden Regionen **C.** Exon-Intron Struktur mit exemplarischen SNPs

Basierend auf der genomweiten Kopplungsanalyse der Sarkoidose, die ein hohes Bindungssignal auf dem Chromosom 6p21 ergab (Schürmann et al., 2001), identifizierten Valentonyte et al. (2005) neben weiteren funktionellen Mutationen in *BTNL2* den signifikant mit Sarkoidose assoziierten Polymorphismus rs2076530 an der Donor-Spleißstelle von Exon 5. Im Wildtyp des beschriebenen SNP (G-Allel) befindet sich Guanin als letzte Base des Exon 5. Die G>A Transition (A-Allel) bewirkt auf mRNA-Ebene eine Deletion von 4bp und verursacht folglich eine Leserasterverschiebung (*frameshift*) mit vorzeitigem Stopp der Transkription im nachfolgenden Exon und einem Funktionsverlust des resultierenden Proteins. Es fehlt nun die C-terminale Transmembranhelix, mit der sich das Protein auf der Membran antigen-präsentierender Zellen verankern und deren Aktivität beeinflussen kann.

Trotz der regionalen Nähe (ca. 200kb) zum genetischen Risikofaktor HLA-DRB1 und eines vermeintlichen Kopplungsungleichgewichts prädisponiert das A-Allel unabhängig von HLA-DRB1 für Sarkoidose (Rybacki et al., 2005). Li et al. (2006) zeigten, dass die A-Allel Häufigkeit von rs2076530 signifikant mit einem erhöhten Sarkoidoserisiko in kodominanter und dominanter

Form korreliert, nicht jedoch in rezessiver Form. So liegt die Odds Ratio (das Quotenverhältnis der Allelkombinationen als Assoziationsmaß) für eine Sarkoidose-Erkrankung bei deutschen A-Allel Trägern (A-homozygot oder AG-heterozygot) bei 2,31 (95% CI), und damit mehr als zweimal so hoch als bei G-homozygoten Trägern. Unter den 210 deutschen Patienten (und 202 Kontrollpersonen) des oben genannten Autors befanden sich 47% (41% Gesunde) A-homozygote und 44% (41% Gesunde) AG-heterozygote Träger. Dagegen waren nur 9% (18% Gesunde) G-homozygot, was eine für Sarkoidose protektive Funktion des G-Allels vermuten lässt.

Die mRNA von *BTNL2* wird sowohl im Intestinaltrakt als auch in Lymphgewebe auf aktivierten T- und B-Zellen und Makrophagen verstärkt exprimiert. Als einziges Mitglied der Butyrophilin-Familie zeigt das Gen eine deutliche immunregulatorische Funktion. *BTNL2* bindet an einen vermeintlichen Rezeptor auf aktivierten T-Lymphozyten und hemmt die T-Zell-Proliferation (Nguyen et al., 2006). Ein Funktionsverlust des Proteins dagegen unterbindet die natürliche T-Zell-Regulation und trägt somit indirekt fördernd zum Immunprozess bei, was die Funktion und Auswirkung von *BTNL2* im immunpathologischen Geschehen der Sarkoidose näher erklären könnte.

1.6.2 Somatische Mutationen

Im Gegensatz zur Keimbahnmutation, die in den Vorläufern von Eizellen und Spermien stattfindet und sich auf alle Zellen des Individuums auswirkt, verändert die somatische Mutation lediglich die betroffene Körperzelle (Somazelle) und ihre Nachkommen. Sie kann sowohl frühzeitig in der Embryonalgenese als auch später in der postnatalen Entwicklung entstehen. Per definitionem sind die Zellen der Keimbahn nicht davon betroffen. Da nur Gameten die genetische Information weiter geben, erstreckt sich die Auswirkung einer somatischen Mutation begrenzt auf einzelne Organbereiche oder Zellgruppen des Organismus. Sie wird nicht an die folgende Generation vererbt. Ein Individuum mit Zellen unterschiedlichen Genotyps bezeichnet man als genetisches Mosaik (Janning und Knust, 2004).

Somatische Mutationen werden immer öfter als Ursache sporadischer Fälle verschiedener Erkrankungen identifiziert. Ihre Folgen sind bisher am besten bekannt auf dem Feld der Onkologie. Die Anhäufung von Mutationen in Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und genetisch un stabilem Material bahnt den Weg der Tumorgenese. Aktuelle Studien bestätigen jedoch zunehmend die Präsenz somatischer Mutationen unter nichtmalignen Erkrankungen wie z.B. der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) und der Neurofibromatose 1 und 2 (Erickson,

2003; Puck und Straus, 2004). So vermuteten auch Gollob et al. (2006) eine der genetischen Ursachen des idiopathischen Vorhofflimmerns in einer prädisponierenden Mutation somatischer Natur. Ihre Untersuchung richtete sich auf Veränderungen im Gen *GJA5*, welches für das Gap-junction-Protein Connexin 40 codiert und eine entscheidende Rolle im atrialen Reizleitungssystem spielt. 3 der 15 untersuchten Patienten mit Vorhofflimmern wiesen Mutationen in genomischer DNA und RNA aus Herzgewebeproben auf. Dagegen zeigte die Untersuchung der genomischen DNA aus isolierten Lymphozyten dieser drei Patienten keine Mutationen, was auf einen somatischen Ursprung des genetischen Defekts hindeutet.

Einige somatische Zellen sind mehr Mutagenen (z.B. UV-Licht, Stäuben, Aerosolen) ausgesetzt als Keimbahnzellen. Folglich ist die Mutationsrate in diesen Zellen höher. Die spontanen somatischen Mutationen stellen neben den vererbaren Mutationen eine hochbedeutende potenzielle Erklärung für die Entstehung nichtmaligner Erkrankungen dar und werden in Zukunft näher untersucht.

1.7 Fragebogen zur Sarkoidose

Ein Fragebogen dient als Mittel für die Datenerhebung bei Statistiken. Dabei kann dieser "offene" oder "geschlossene" Fragen enthalten. Offene Fragen liefern frei formulierte Antworten und damit qualitative Daten, geschlossene Fragen mit Mehrfachwahlantworten können direkt in quantitative Daten überführt und statistisch ausgewertet werden. Mit der Quantifizierung relevanter Untersuchungsmerkmale in Tests, Umfragen oder Beobachtungen wird das Ziel verfolgt, die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten und sie in statistischen Auswertungsverfahren im Hinblick auf mögliche Vergleiche und Abhängigkeiten zu prüfen. Um die hierfür erforderliche Vergleichbarkeit gewährleisten zu können, wurden verschiedene Gütekriterien entwickelt. Nach Lienert (1989) unterscheidet man die drei Hauptkriterien Objektivität, Reliabilität und Validität. Unter der Objektivität versteht man das Maß, wie weit in der diagnostischen Situation eine Standardisierung des gesamten Testvorgangs gelingt. Damit ist auch die Unabhängigkeit der Testergebnisse in Durchführung, Auswertung und Interpretation vom Anwender gemeint. Die Reliabilität charakterisiert einen Test hinsichtlich seiner Messgenauigkeit bzw. Verlässlichkeit. Ein Test wird dann als verlässlich bezeichnet, wenn es bei einer Wiederholung der Messung unter denselben Bedingungen zum selben Resultat kommt. Reliabilität gilt somit auch als Bestimmung des Messfehlers. Die Validität ist das wichtigste Testgütekriterium und bezeichnet den Grad der Genauigkeit, mit dem ein Testverfahren

tatsächlich das misst, was es messen soll. Sie betrifft also die Frage, wie sich vom (numerischen) Testergebnis auf das (empirische) Zielmerkmal schließen lässt (Fisseni, 2004).

Bislang wurden einige Fragebögen zur Erforschung der Sarkoidose eingesetzt, z.B. im Rahmen von ACCESS (A Case Controlled Etiologic Study of Sarcoidosis). Newman et al. (2004) konstatieren, wie essenziell eine komplette und valide Fallerfassung sowie die akkurate medizinische, berufliche und soziale Anamnese für die ätiologische Suche einer Erkrankung sind. Der Schwerpunkt ihrer Studie lag in der Suche nach beruflichen, umweltbedingten und infektiösen Trigger. Es wurde ein Fragebogen entwickelt, mit dem an je 704 Sarkoidose-Patienten und Kontrollpersonen demographische Daten (Alter, Geschlecht, Rasse, Aufenthaltsort, Familienstand, usw.), eine Eigen- und Familienanamnese sowie berufliche und ökologische Expositionen erfasst wurden. Mittels PCR prüften die Forscher das Blut auf infektiöse Erreger. Außerdem wurde die gesundheitsbezogene Lebensqualität und medizinische Versorgung mithilfe eines Fragebogens untersucht. Alle Sarkoidose-Patienten wurden auf Röntgenstatus, Blutbild und Lungenfunktion untersucht. Der klinische Verlauf der ersten 215 Patienten selbiger Studie bezüglich Organbefall, Aktivität und Behandlung wurde nach einer Zeitspanne von 24 Monaten bewertet (Rossman und Kreider, 2007). Zugi et al. (2005) wendeten den „St. George’s respiratory questionnaire“ (SGRQ) bei Sarkoidose-Patienten an, um den Einfluss der respiratorischen Funktionsstörung auf die allgemeine gesundheitsbezogene Lebensqualität („Health-related quality of life“ (HRQL)) einzuschätzen. In diversen Studien wurde der Einfluss der Erkrankung auf die Faktoren Müdigkeit und Lebensqualität anhand des „Fatigue Assessment Scale“ (FAS) und des „WHOQOL-100 scale“ (World Health Organization Quality of Life Assessment Instrument-100) untersucht (Michielsen et al., 2006; De Vries et al., 2004). Auch Cox et al. (2003) untersuchten die Lebensqualität von Sarkoidose-Erkrankten im „Sarcoidosis Health Questionnaire“ anhand der drei Domänen tägliche, körperliche und emotionale Funktionsfähigkeit.

1.8 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

1) Die multifaktorielle Genese der Sarkoidose, ihre oft subklinische und unspezifische Symptomatik und vor allem die ungeklärte Ätiologie erschweren die Diagnose und Klassifizierung der Erkrankung. Eine Aufgabe der Arbeit bestand in der Erstellung eines Fragebogens, der am Beispiel der Sarkoidose zukünftig die Erhebung von Kollektiven für die

Analyse komplexgenetischer Erkrankungen erlaubt. Dabei sollten folgende Kriterien bezüglich Inhalt und Form berücksichtigt werden:

- Demographische Daten und Anamnese der familiären granulomatösen Erkrankungen
- Beginn und Verlauf der Erkrankung, initiale Symptome
- Indikation für und Umgang mit immunsuppressiver Therapie
- Detaillierte Befragung der Organbeteiligung und Prüfung bedeutender Lungenfunktions- und Laborparameter; dabei soll eine zweizeitige Beurteilung zu Beginn der Beobachtungszeit und nach mindestens 24 Monaten den Verlauf näher charakterisieren
- röntgenologischer Status, Laboruntersuchung, Ergebnisse der Bronchoalveolären Lavage (BAL) und des Hochoflösenden Computertomogramms (HRCT), wenn durchgeführt
- In englischer Sprache soll der Fragebogen eine internationale Anwendung ermöglichen.

2) Die Sarkoidose ist eine multifaktorielle Erkrankung mit genetischer Prädisposition. Nur wenige Genorte zeigten bislang in Kopplungs- oder Assoziationsstudien signifikante und replizierbare Ergebnisse. *BTNL2* repräsentiert das Gen, für welches die bisher publizierbaren Daten deutlich auf eine bedeutende Rolle bei der genetischen Prädisposition für Sarkoidose hindeuten. Hieraus leitet sich die grundlegende Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit ab, weitere Mechanismen von *BTNL2*-Veränderungen zu identifizieren, die für die Sarkoidose prädisponieren. Dabei lag das Augenmerk der molekularen Untersuchung auf der somatischen Mutation. Zu diesem Zweck sollte an 20 ausgewählten Sarkoidose-Patienten DNA sowohl aus Blut-Leukozyten als auch aus befallenen Lymphknotengewebe hinsichtlich des Gens *BTNL2* untersucht und verglichen werden.

2. METHODEN

2.1 Erstellen des Sarkoidose-Fragebogens

Der Fragebogen wurde in Zusammenarbeit mit der Pneumologischen Abteilung der Universitätsklinik Freiburg entwickelt und mit Hilfe des Computerprogramms Microsoft Excel in digitaler Form erstellt.

2.2 Personenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasste 210 an Sarkoidose erkrankte Personen deutsch-kaukasischer Abstammung. Mittels klinischer, radiologischer und histologischer Untersuchung wurde die Diagnose der Patienten in der Pneumologischen Ambulanz der Universitätsklinik Bonn, den Abteilungen für Pneumologie und Thoraxchirurgie des Malteser Krankenhaus Bonn sowie in der Abteilung Innere Medizin II des Johanniter Krankenhaus Bonn gestellt. Aus diesem Kollektiv wurden exemplarisch 20 für den Polymorphismus rs2076530 G-Allel homo- oder heterozygote Träger ausgewählt. Dabei wurden ausschließlich Patienten in die Studie eingeschlossen, von denen Biopsien aus an Sarkoidose befallenen Lymphknoten zur Verfügung standen. Die Kontrollkohorte setzte sich aus 201 gesunden Personen zusammen, wobei eine Erkrankung an Sarkoidose, Tuberkulose oder anderen Lungenerkrankungen definitiv ausgeschlossen wurde.

Alle Probanden nahmen freiwillig teil und gaben vor Aufnahme in die Studie ihr schriftliches Einverständnis. Die Studiendurchführung erfolgte auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki (1983) des Weltärztebundes und mit Zustimmung der Ethikkommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn nach Approbation des Versuchsprotokolls. Den Probanden wurde für die Untersuchung der genomischen DNA venöses Blut entnommen.

2.3 Material, Lösungen und Substanzen

2.3.1 Substanzen zur Isolierung und molekulargenetischen Analyse der DNA

Agarose	SeaKem LE Agarose	<i>Cambrex</i>
DNA-Längenstandards	GeneRuler 100bp DNA Ladder	<i>Fermentas</i>
	GeneRuler 1kb DNA Ladder	<i>Fermentas</i>
dNTPs	Desoxynukleotide gemischt, je 10mM	
	dATP, dGTP, dCTP, dTTP	<i>Fermentas</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure	
	Dinatriumsalz-Dihydrat	<i>Merck</i>
EtBr	1%ige Ethidiumbromid-Lösung	<i>Roth</i>
EtOH	Ethanol	<i>Roth</i>
Isopropanol	2-Propanol	<i>Roth</i>
Ladepuffer	6 x Loading Dye Solution	<i>Fermentas</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	<i>Fermentas</i>
NaCl	Natriumchlorid	<i>VWR</i>
Polymerase	Taq-DNA-Polymerase, 5U/μl	<i>Fermentas</i>
Primer	Oligonukleotidstartermoleküle	<i>Metabion</i>
Proteinase K		<i>Roche</i>
Puffer	10x Taq Puffer	<i>Fermentas</i>
	10x Puffer Tango	<i>Fermentas</i>
Restriktionsenzym	BstFI (BseGI)	<i>Fermentas</i>
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat	<i>Merck</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer (10x)	<i>Invitrogen</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	<i>Roth</i>
TritonX100		<i>Merck</i>
Xylol		<i>Appli Chem</i>

2.3.2 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind zur Untersuchung der *BTNL2*-Genpolymorphismen eigens dafür entworfen worden. Alle Sequenzen der verwendeten Primer befinden sich in der folgenden Tabelle.

Tabelle 2. Sequenzen der verwendeten Primer für die PCR

Gen	Exon	Primersequenzen
<i>BTNL2</i>	Exon 1	forward: 5'-CAAGCCCATTTCCTGACTG-3' reverse: 5'-ACTCAGCTAGGAGTGGAGGAG-3'
<i>BTNL2</i>	Exon 2	forward: 5'-TCTTCTAGTTGCCTCCATTTTG-3' reverse: 5'-GCTTGAAGACTCCAGAACCAC-3'
<i>BTNL2</i>	Exon 3	forward: 5'-GGGAGACTGAGGTCGACTTTC-3' reverse: 5'-AGGCGCCATAACAGCTATTC-3'
<i>BTNL2</i>	Exon 4	forward: 5'-ATTGGGTAATCTGTGGGAAAG-3' reverse: 5'-AGGCCATTACTTTGCTGGTC-3'
<i>BTNL2</i>	Exon 5	forward: 5'-CCCACCTCACCTAAGGATGAC-3' reverse: 5'-AGTTTCACACACTGGAGGATTTG-3'
<i>BTNL2</i>	Exon 6	forward: 5'-AGCCAGCCTCATCCCTAAG-3' reverse: 5'-GATAGCAGGAGACCTCGTCAG-3'
<i>BTNL2</i>	Exon 7	forward: 5'-GCATGTGTACATTTCTGAGACG-3' reverse: 5'-TGACTGCCTCCCATAGGTG-3'

2.3.3 Restriktionsenzym

Zur Untersuchung der deletierten Base C an Position 450 auf genomischer Ebene (c.450delC), welche sich im Exon 3 von *BTNL2* befindet, wurde das Restriktionsenzym BstF5I eingesetzt.

Tabelle 3. Sequenz des verwendeten Restriktionsenzym

Gen	Polymorphismus	Restriktionsenzym	Erkennungssequenz
<i>BTNL2</i>	c.450delC	BstF5I (<i>Fermentas: BseGI</i>)	

2.3.4 Verwendete Kits

Aufreinigungskit	QIAquick PCR Purification Kit	
	QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i>
DNA-Extraktionskit	DNA All Tissue Kit	<i>Genial</i>
Amplifikationskit	REPLI-g Mini Kit	<i>Qiagen</i>
Sequenzierkit	Big Dye Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit	<i>Applied Biosystems</i>

2.3.5 Zusammensetzung der Lösungen und Puffer

Agarosegel (1,5 %):	3g Agarose, 200ml 1x TBE-Puffer, 10µl EtBr
1 x TBE Puffer:	1l 10x TBE-Puffer, 9l H ₂ O
TE ⁻⁴ -Puffer:	1ml 1M Tris/pH 8,0, 20µl 0,5M EDTA/pH 8,0, ad 100ml H ₂ O
TritonX100-Lösung (0,1%):	935µl TritonX100, ad 1000ml H ₂ O
Lysis-Puffer:	50ml 1M NaCl, 12,5ml 0,1M EDTA/pH 8,0, ad 500ml H ₂ O
SDS-Lösung (10%):	2,5g Sodium Dodecyl Sulfat, ad 25ml H ₂ O
Proteinase K-Lösung:	20mg Proteinase K, ad 1ml H ₂ O
6M NaCl-Lösung:	35,064g NaCl, ad 100ml H ₂ O
TE8-Puffer:	5ml 0,1M Tris/pH 8,0, 0,5ml 0,1M EDTA/pH 8,0, 50ml H ₂ O

2.3.6 Arbeitsgeräte

Agarosegel-Laufkammer	MGU-402T, MGU602T	<i>C.B.S. Scientific</i>
Feinwaage	TE214S	<i>Sartorius</i>
Gel-Dokumentationsgerät	Chemidoc XRS	<i>Bio-Rad</i>
Heizblock	Thermomixer comfort	<i>Eppendorf</i>
Konzentrator	Concentrator 5301	<i>Eppendorf</i>
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	<i>PeqLab</i>
Magnetrührer	MR 3100	<i>Heidolph</i>
Mikrotom	Thermo Shandon	<i>Finesse</i>
Mikrowelle	Micro-chef FM 2915Q	<i>Moulinex</i>
Netzgerät (Gelkammer)	EC250-90	<i>Thermo Electron Corporation</i>
PCR-Maschine	Dyad	<i>MJ Research</i>
Pipetten		<i>Eppendorf</i>
Sequenziergerät	ABI PRISM 3100–Avant Genetic Analyzer	<i>Applied Biosystems</i>
Vortexer	M10	<i>VWR</i>
Zentrifugen	Centrifuge 5415D	<i>Eppendorf</i>
	Centrifuge 5415R	<i>Eppendorf</i>
	Galaxy Mini	<i>VWR</i>

2.3.7 Computerprogramme

Tabelle 4. Übersicht der verwendeten Computerprogramme mit ihren Anwendungen

Computerprogramm	Anwendung	Adresse
DNASTAR-Lasergene - Editseq - Seqbuilder - PrimerSelect - Seqman	Verwalten von DNA- und Proteinsequenzen, Erstellen von linearen und zirkulären DNA-Karten, Veranschaulichung von Domänen in Aminosäuresequenzen, Auffinden von Primern für PCR	http://dnastar.com
Microsoft Office XP - Word - Excel - Powerpoint	Schreibprogramm Datenverarbeitung Graphikerstellung	http://www.microsoft.com
SPSS 13.0	Statistische Datenverarbeitung	http://www.spss.com/de

2.3.8 Datenbanken

Tabelle 5. Übersicht der verwendeten Datenbanken

Datenbank	Adresse
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org
PubMed	http://www.pubmed.gov
The GDB Human Genome Database	http://www.gdb.org
UCSC Genome Bioinformatics	http://www.genome.ucsc.edu
Deutsche Zentralbibliothek für Medizin (ZB MED)	http://www.zbmed.de

2.4 Methoden

Für sämtliche im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten Analysen wurde genomische DNA von an Sarkoidose erkrankten Patienten aus Deutschland verwendet.

Die DNA-Isolierung aus EDTA-Blut (2.3.2.1) wurde in der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Bonn durchgeführt. Alle weiteren experimentellen Untersuchungen fanden im Institut für Humangenetik der Universität zu Köln statt.

2.4.1 Blutentnahme

Unter sterilen Laborbedingungen wurde allen Patienten mit Hilfe des Vacutainersystems (Sarstedt) venöses Blut entnommen. Auf diese Weise standen pro Proband 10ml EDTA-Blut für die DNA-Extraktion zur Verfügung.

2.4.2 DNA-Isolierung

2.4.2.1 DNA-Isolierung aus Vollblut

Zur Gewinnung genomischer DNA aus Vollblut wurde die von Miller et al. (1988) etablierte Aussalzmethode angewandt. Hierfür wurden 10ml EDTA-Blut unter sterilen Bedingungen mit 40ml H₂O zum Lysieren versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C wurde der Ansatz 20 min bei 3000rpm zentrifugiert, der Überstand anschließend abdekantiert und verworfen. Der Rückstand, das erhaltene Pellet aus Leukozyten, wurde mit 30ml einer 0,1%igen Triton-Lösung versetzt und durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen und anschließender Separation des Rückstands wurde dieser mit 5ml Lysis-Puffer versetzt und resuspendiert. Die Zugabe von 250µl 10% Natrium-Dodecyl-Sulfat-Lösung brachte die Zellkerne zur Fragmentierung, so dass die DNA nun in freier Form vorlag. Zellfragmente wurden durch 100µl Proteinase-K-Lösung enzymatisch gespalten. Darauf hin wurde der Reaktionsansatz bei 37°C im Wasserbad über Nacht inkubiert. Um die in der Probe enthaltenen Proteine „auszusalzen“ (=auszufällen), wurde der Ansatz am Folgetag in ein 15ml Falcon-Tube überführt, mit 1,5ml 6M NaCl-Lösung versetzt und 90 min auf einem Rotationsschüttler durchmischt. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 3750rpm wurde der Überstand (ca. 6,5ml) in ein 50ml Falcon-Tube überführt. Durch Zugabe von 25ml 100% EtOH wurde die DNA gefällt, so dass die nun fadenförmige DNA mit einer Pasteurpipette aufgenommen werden konnte. Die DNA wurde nach kurzem Trocknen an der Luft in 70% EtOH gewaschen und schließlich während dreitägigem Ruhen bei 37°C in 250µl TE8-Puffer gelöst.

2.4.2.2 DNA-Isolierung aus Lymphknoten-Gewebe

Mit Hilfe des Mikrotoms wurden den Paraffinblöcken 4-6 jeweils 8µm dünne Schnitte entnommen. Diese wurden in separaten Eppendorf-Gefäßen mit je 1ml Xylol bedeckt und für 15 min bei 65°C inkubiert, um das Paraffin aufzulösen und das Gewebe weich und flexibel zu machen. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 13000rpm wurde das Xylol abpipettiert, die

Reste wurden im Vakuumkonzentrator verdampft. Daraufhin wurde das Gewebe in 200µl Ethanol reinst gewaschen, anschließend das Ethanol abpipettiert und die Reste wiederum im Vakuumkonzentrator verdampft. Dem nun getrockneten Pellet wurden 200µl Lyse 1 und 20µl Lyse 2 (DNA All Tissue Kit, *Genial*), welche Zellmembran und Zellkerne auflösen, und 10µl Enzym (DNA All Tissue Kit, *Genial*) zugegeben. Der Ansatz wurde für 1-2 Tage bei 37°C inkubiert.

Um die Proteine zu fällen, wurden 150µl Lyse 3 (DNA All Tissue Kit, *Genial*) hinzugefügt, und der Ansatz für 20 sec vorsichtig gevortext. Nach 5 minütiger Inkubationszeit bei -20°C wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 13000rpm zentrifugiert und der die DNA enthaltende Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Diesem wurde nun 300µl Isopropanol zugefügt, der Ansatz wurde invertiert und zur Pelletierung der DNA für 15 min bei 13000rpm zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand vollständig entfernt, das Pellet mit 300µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und daraufhin für 5 min bei 13000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet, restliches Ethanol verdampft und in 50µl TE⁴-Puffer gelöst.

2.4.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration der isolierten bzw. amplifizierten DNA zu bestimmen, wurde ihre Extinktion mittels Spektrophotometrie (NanoDrop) bei einer Wellenlänge von 260nm (A_{260}) gemessen. Als Leerwert diente eine nukleasefreie Probe H₂O. Die Reinheit einer DNA-Lösung ergibt sich aus dem Verhältnis ihrer Extinktionswerte bei 260nm und 280nm. Reine DNA zeigt dabei einen A_{260}/A_{280} -Wert von etwa 2,0. Aus jeder DNA-Probe wurde 1,5µl in das Spektrophotometer geladen und jede Probe 3mal gemessen, um Mittelwerte und Mittelwertabweichungen berechnen zu können. Das Gerät gibt die DNA-Konzentration in ng/µl an. Die Proben wurden ausgehend von den Messwerten auf 20-40ng/µl DNA-Lösungen in DNase freiem Wasser (*Invitrogen*) verdünnt und die Konzentration, wie beschrieben, zur Validierung erneut gemessen.

2.4.4 Whole Genome Amplification

Die molekulargenetische Analyse der DNA aus klinischen Geweben kann limitiert sein durch den geringen Gehalt an DNA, der im verfügbaren Material vorhanden ist. Mögliche Gründe für eine Schmälerung der DNA-Qualität liegen vor allem in der dauerhaften Behandlung des Gewebes mit Formalin.

Um die Konzentration der aus dem Lymphknotengewebe isolierten DNA zu erhöhen und ihre Qualität zu verbessern, wurde noch vor der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine Amplifikation des gesamten Genoms vorgenommen, die so genannte „Whole Genome Amplification“. Zu Beginn wurden 2,5µl der isolierten DNA in eine Mikrozentrifugentube mit 2,5µl Puffer D1 (REPLI-g Mini Kit, *Qiagen*) versetzt, um das Material zu lysieren und die DNA zu denaturieren. Nach Inkubation über 3 min bei 20°C wurde dieser Prozess durch Zugabe von 5µl Puffer N1 (REPLI-g Mini Kit, *Qiagen*) gestoppt. Anschließend wurde dem Reaktionsansatz 40µl des Master Mix (REPLI-g Mini Kit, *Qiagen*) beigemischt, der neben H₂O Puffer und DNA-Polymerase enthielt. Der Ansatz wurde für 16h bei 30°C inkubiert, währenddessen die DNA amplifiziert wurde. Um die DNA-Polymerase nachfolgend zu inaktivieren wurde der Reaktionsmix für 3 min bei 65°C erhitzt, und die vervielfältigte DNA schließlich bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.4.5 Primerdesign

Für die in-vitro Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz im Rahmen der PCR werden so genannte „Primer“ benötigt. Diese sind Oligonukleotide, die den Polymerasen als Startstelle für die DNA-Replikation dienen. Mit Hilfe der Primer lässt sich das zu amplifizierende DNA-Fragment festlegen: Der Forward-Primer beschreibt die Nukleotidsequenz zu Beginn des Amplikons, während der Reverse-Primer komplementär und invers zur Nukleotidsequenz am Ende des Fragments wirkt.

Die für die PCR (s. 3.3.6) benötigten Primer wurden mit dem Programm PrimerSelect (*Lasergene*) nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- Primerlänge von 17-23 Nukleotiden
- GC-Gehalt von 50-60%, dabei unter den letzten fünf Basen am 3'Ende max. 3 Guanin- bzw. Cytosin-Basen
- Schmelztemperatur (T_m) zwischen 55°C und 68°C, diese sollte für beide Primer möglichst gleich sein ($T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$)
- Vermeidung potentieller Ausbildung von Hairpin-Strukturen innerhalb der Primer
- Ausschluss repetitiver Basenabfolgen (z.B. Poly-A oder Poly-GC)
- keine Selbst-Dimerisierung bzw. Dimerisierung mit dem jeweils anderen Primer

Für die kommerziell erhältlichen Primer wurden zunächst die optimalen PCR-Bedingungen etabliert, bei denen die Produkte im Idealfall nach ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung einzelne definierte Banden ohne Schmier und mit ausreichend Intensität aufzeigten.

2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die 1985 von Kary Mullis (Mullis und Faloona, 1987) entwickelte Methode der PCR (polymerase chain reaction) dient der selektiven Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte, die so für weitere Untersuchungen (wie z.B. die in dieser Arbeit erfolgte direkte Sequenzierung, siehe 3.3.9.3) zur Verfügung stehen. Das Verfahren wirkt auf Grundlage der DNA-abhängigen thermostabilen Polymerase, die durch Verknüpfung einzelner Desoxynukleotide (dNTPs) DNA in-vitro semikonservativ synthetisieren kann. Die PCR ist ein zyklischer Prozess dreier sich wiederholender Arbeitsschritte:

1. Denaturierung des DNA-Doppelstrangs

Durch Erhitzen der DNA auf 94°C lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen der beiden Stränge, wodurch der Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufgetrennt wird. Der Arbeitsschritt der initialen Denaturierung wird dabei den Amplifikationszyklen vorgeschaltet, um die gesamte vorgelegte DNA zu denaturieren.

2. Anlagerung (Annealing) der Primer

Um der DNA-Polymerase kurze doppelsträngige Bereiche mit Hydroxylgruppen zu schaffen, als Ansatzstelle für die erste Verknüpfungsreaktion am Anfangs- und Endstück des zu amplifizierenden Bereiches, werden komplementäre Oligonukleotide (Primer) von durchschnittlich 18-23bp Länge hinzugegeben. Während die Temperatur zügig auf 50-70°C abgekühlt wird, binden die beiden Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) gegenläufig an ihre komplementären DNA-Stränge. Dabei wird die Hybridisierungstemperatur entscheidend von der Basenzusammensetzung und damit der Schmelztemperatur der Primer bestimmt.

3. Extension der Primer durch die thermostabile DNA-Polymerase

Die Synthese des komplementären Stranges findet bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Polymerase, statt. Nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung verlängert die DNA-Polymerase den Primer durch Verknüpfung der jeweils komplementären Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP und dTTP). Die Länge des Extensionsschrittes ist abhängig von der Syntheserate der Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden Abschnittes. Meist wird eine thermostabile, genetisch modifizierte DNA-

Polymerase aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus*, die so genannte Taq-Polymerase, genutzt.

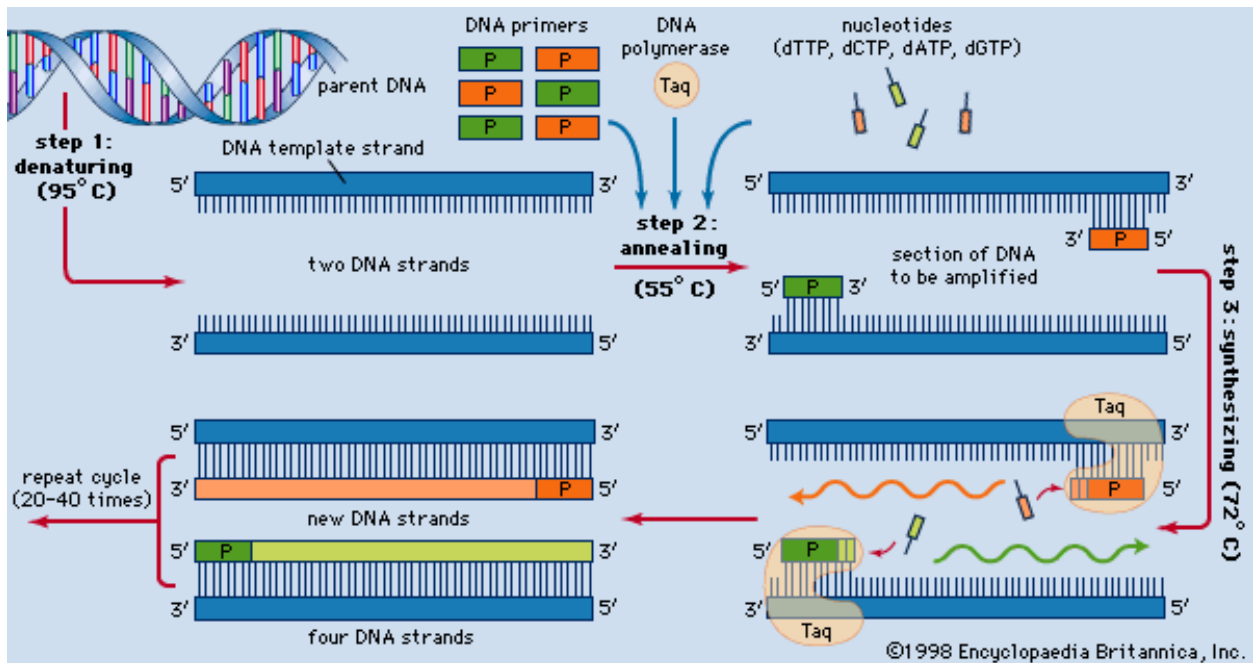


Abbildung 4. Schematische Darstellung der PCR-Reaktion: 1) Denaturierung 2) Anlagerung der Primer 3) Primer-Extension 4) Wiederholung der PCR-Zyklen, P = Primer, Taq = DNA-Polymerase. Aus: Encyclopædia Britannica, Inc., 2008: Polymerase chain reaction. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/468736/18071/The-three-step-process-of-the-polymerase-chain-reaction> (Zugriffsdatum: 10.01.2008)

Ein PCR-Zyklus wird in der Regel 25-35mal wiederholt. In jedem Zyklus dienen die neu synthetisierten DNA-Stränge des vorangegangenen Zyklus wiederum selbst als DNA-Matrize, so dass die Zielsequenz exponentiell vervielfältigt wird. Nach etwa 35 Zyklen wird eine Sättigung des Amplifikationsprozesses erreicht, da nun die Enzyme inaktivieren und die dNTPs und Primer im Reaktionsansatz verbraucht sind.

Tabelle 6. PCR-Programm für die untersuchten Exons von *BTNL2*. Dabei variierte die Annealing-Temperatur folgendermaßen: 62°C in Zyklus 1-4, 60°C in Zyklus 5-8 und 58°C in Zyklus 9-35

Arbeitsschritte	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	94°C	3 min
2. Denaturierung	94°C	10 sec
3. Annealing	62/ 60/ 58°C	15 sec
4. Extension	72°C	30 sec
Zyklenanzahl (Schritt 2-4)		35
5. Finale Extension	72°C	10 min
6. Abkühlphase	4°C	unendlich

Der Optimierung der Reaktionsbedingungen dient die im Konzentrationsverhältnis angepasste Zugabe von Magnesiumchlorid und Pufferlösung. Hierbei beeinflusst $MgCl_2$ die Hybridisierung der Primer, die Trennung der Stränge während der Denaturierung, die Produktspezifität, die Bildung von Primerdimeren und die Fehlerrate der Polymerase. Außerdem benötigt die Polymerase freies Mg^{2+} für ihre Aktivität. Die Salzkonzentration des Puffers beeinflusst die Ausbeute an PCR-Produkt, da das Aktivitätsoptimum der Polymerase bei pH 8,8 liegt.

Tabelle 7. PCR-Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25µl

Reagenz	Menge [µl]
dNTPs (4x2,5nM)	2
Puffer 10x	2,5
$MgCl_2$ (25mM)	1,5
Forward-Primer (10pmol/µl)	1
Reverse-Primer (10pmol/µl)	1
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,15
DNA (20-30ng/µl)	1
H ₂ O	15,85

Zur Durchführung der PCR wurden die einzelnen Reagenzien nach Lagerung bei -18°C aufgetaut, kräftig durchmischt und zentrifugiert. Um eine optimale Durchmischung der einzelnen Reagenzien zu gewährleisten, wurde auch der nach Tabelle 7 angesetzte Reaktionsansatz

gemischt und zentrifugiert. Jedem Ansatz wurde 1µl genomische DNA der zu untersuchenden Probe zugegeben und die PCR im Thermocycler gestartet.

Um Kontaminationen des Reaktionsansatzes mit Fremd-DNA auszuschließen, wurde bei jeder PCR eine Leerkontroll-Probe einbezogen, bei der ein PCR-Ansatz ohne DNA-Matrizen eingesetzt wurde. Der Erfolg und die Spezifität der PCR-Amplifikation ließen sich anschließend durch das Verfahren der Gelelektrophorese feststellen.

2.4.7 Enzymatischer Verdau zur Untersuchung der Deletion c.450delC

Restriktionsenzyme (genauer Restriktionsendonukleasen) erkennen spezifische Sequenzmotive, meist palindromische Tetra- bis Oktamere, und spalten dort den DNA-Doppelstrang entweder glatt („*blunt ends*“) oder mit überlappenden Enden („*sticky ends*“). Sie entstammen dem bakteriellen Restriktions-Modifikations-System, das eine wichtige Rolle bei der Abwehr artfremder (viraler) DNA spielt. In der Molekularbiologie ermöglichen sie die gezielte Herstellung von DNA-Fragmenten und den Nachweis von Mutationen in bestimmten DNA-Sequenzen durch Hydrolyse der Phosphorsäurediester-Bindung in beiden Strängen. Dabei ist die Namensgebung der Restriktionsenzyme Ausdruck ihrer Herkunft: Der erste Buchstabe steht für die Gattung, der zweite und dritte für die Art, ergänzt durch Namenszusätze und die chronologische Abfolge ihrer Entdeckung. Das in dieser Arbeit verwendete Restriktionsenzym BstF51 wird aus dem *Geobacillus stearothermophilus* gewonnen, einem endosporenbildenden grampositiven Stäbchenbakterium.

Zum Nachweis von Mutationen in den durch die PCR amplifizierten DNA-Abschnitten wurde der Verdau mit Restriktionsenzymen angewandt. Dabei basiert die Untersuchung von Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) auf dem Wegfall oder der Neuentstehung einer Restriktionsenzymchnittstelle, die durch die Mutation hervorgerufen wird (Ziemssen et al., 2001). Dies führt zu einem veränderten Spaltpattern der DNA, wobei unterschiedlich lange Fragmente entstehen, die dann durch ihr verändertes Laufverhalten gelelektrophoretisch sichtbar gemacht werden können.

Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Restriktionsenzym BstF5I erkennt die Sequenz 5'-GGATGNN -3' (N = A, G, C oder T) und besitzt bei Vorliegen des Wildtyps 3 Schnittstellen im Exon 3 von *BTNL2*. Zur Detektion der Schnittstellen wurde das PCR-Produkt mit Restriktionsenzym und Puffer versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Mittels

Gelelektrophorese wurden die erstellten DNA-Fragmente aufgetrennt und schließlich im ultravioletten Licht sichtbar gemacht (s. 2.4.8).

Tabelle 8. Reaktionsansatz des enzymatischen Verdaus mit einem Gesamtvolumen von 10µl

Reagenz	Menge [µl]
PCR-Produkt	7
Restriktionsenzym	0,4
Puffer Tango	1
H ₂ O	1,6

2.4.8 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden verschieden lange DNA-Abschnitte entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Grundlage hierfür ist das konstante Verhältnis der Größe einer Sequenz zu ihrer Ladung, welche durch das anionische Phosphat des Zucker-Phosphat-Rückgrates der DNA hervorgerufen wird. Die Quervernetzungen innerhalb eines Agarosegels hindern größere DNA-Fragmente stärker in ihrer Wanderung als Kleine. Die Wanderungsbewegung der DNA wird durch Anlegen einer Spannung hervorgerufen, die bewirkt, dass die negativ geladene DNA zur Anode wandert.

Für ein 1,5%iges Gel wurden 2g Agarose mit 150ml 1x TBE-Puffer gemischt. Die Agarose wurde durch Aufkochen in einer Mikrowelle vollständig gelöst. Um die DNA sichtbar machen zu können, wurden nach kurzem Abkühlen 8µl EtBr beigemischt. EtBr ist ein interkalierendes Reagenz, das sich spezifisch zwischen den Basen anlagert und aufgrund seiner aromatischen Ringsysteme UV-Licht absorbiert. Das noch flüssige Gel wurde in eine Gelkammer mit einem darin hängenden Kamm, der die Probestaschen bildet, gegossen. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer verwendet. Von jedem PCR-Produkt wurden 5µl, versetzt mit 1µl Ladepuffer, in eine Geltasche gefüllt. Zur Längenbestimmung wurden 4µl eines DNA-Längenstandards (100bp) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 150V für 30-40 min durchgeführt. In einem Dokumentationsgerät konnten die Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.4.9 Produktaufreinigung und Sequenzierung

2.4.9.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Bevor ein PCR-Produkt für Folgeexperimente verwendet werden kann, müssen die im Reaktionsgemisch enthaltenen Enzyme, Puffer, Nukleotide und Primer entfernt werden. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit von *Qiagen*. Die Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen sowie das Protokoll sind der Beschreibung des Herstellers zu entnehmen. Zur Kontrolle wurden 4µl des aufgereinigten Produkts auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.4.9.2 Sequenzierung

In diesem letzten experimentellen Schritt wurde die DNA-Sequenz, also die Basenabfolge im DNA-Molekül, bestimmt, um auf der Grundlage der Sequenzanalyse eine Aussage über mögliche (somatische) Mutationen zu treffen. Die hier angewandte Sequenzierungsmethode folgt dem 1977 von Sanger entwickelten Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977). Im Gegensatz zur PCR wird bei der Sequenzierung nur ein Primer eingesetzt und die DNA linear amplifiziert, um ein spezifisches Ergebnis zu erreichen. Neben den normalen dNTPs werden zusätzliche fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) als Bausteine eingesetzt (Ansorge et al., 1987). Der Einbau eines ddNTPs bewirkt den Abbruch der Synthese, da die für die Kettenverlängerung notwendige 3'-Hydroxylgruppe fehlt. Dies geschieht zufallsmäßig an jeder Stelle des Fragments, so dass eine Kollektion unterschiedlich langer Fragmente entsteht. Die Synthese-Produkte werden ihrer Länge nach kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Da die vier Basen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können die vier Markierungsreaktionen in einer einzigen PCR durchgeführt werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden im DNA-Sequenziersystem (ABI Prism 3100, Applied Biosystem) mittels Laser angeregt und entsenden infolge Fluoreszenz-Markierung Licht verschiedener Wellenlänge, welches detektiert wird.

Vor der Sequenzierung wurden die PCR-Produkte nach folgenden Bedingungen aufgereinigt:

Tabelle 9. Bedingungen zur Aufreinigung der PCR-Produkte mit einem Gesamtvolumen von 20µl

Reagenz	Menge [µl]
PCR-Produkt	1
Primer	1
5X Puffer v1.1	3
Big Dye v1.1	1
dH ₂ O	14

Tabelle 10. Reaktionsansatz zur Aufreinigung der PCR-Produkte

Arbeitsschritte	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	30 sec
2. Denaturierung	95°C	10 sec
3. Annealing	55°C	5 sec
4. Extension	60°C	4 min
Zyklenanzahl (Schritt 2-4)		26
5. Abkühlphase	4°C	15 min

Die Aufreinigung der Sequenzierproben und die Sequenzierung wurde vom Sequenzierservice des Cologne Center for Genomics (Universität Köln) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Sarkoidose-Fragebogen

Der Fragebogen wurde am Beispiel der Sarkoidose zur Erhebung von Kollektiven für die Analyse komplexgenetischer Erkrankungen erstellt. Er ist computergestützt als Excel-Datei angelegt, die eine digitale Eingabe der Daten und ihre direkte statistische Auswertung ermöglicht. Durch seine englische Sprache ist er international anwendbar.

Der Sarkoidose-Fragebogen ist unterteilt in einen ersten Abschnitt mit demographischen und anamnestischen Fragen und sechs nachfolgenden Modulen, die sich auf die klinischen Befunde beziehen.

Neben personenbezogenen Daten fokussiert der erste Abschnitt auf die Eigen- und Familienanamnese bezüglich der Herkunft, granulomatöser und anderer Erkrankungen, den Raucherstatus, die Typ1-Allergie und den histologischen Nachweis der Sarkoidose. Weiterhin werden das Auftreten und der Verlauf der Erkrankung, der radiologische Status und die Lungenfunktion am Anfang und Ende der Beobachtungszeit befragt und eine Medikamentenanamnese hinsichtlich der Behandlung mit Prednisolon und Immunsuppressiva durchgeführt. Modul 1 befragt unspezifische Symptome, die typischerweise initial auftreten können (vgl. 1.4.1). Modul 2 führt eine detaillierte Befragung der Organbeteiligung zum Zeitpunkt der Diagnose und im Verlauf der Erkrankung (frühestens jedoch nach 24 Monaten) durch. Modul 3 notiert verschiedene Parameter der Lungenfunktionsprüfung am Anfang und zum Ende der Beobachtungszeit. In Modul 4 werden die für die Sarkoidose charakteristischen Laborparameter befragt, wiederum am Anfang und zum Ende der Beobachtungszeit. Modul 5 erfasst die Ergebnisse der Bronchoalveolären Lavage und Modul 6 mögliche Befunde des Hochauflösenden Computertomogramms (HRCT).

Der Sarkoidose-Fragebogen ist im Anhang vollständig abgebildet.

3.2 Molekulargenetische Untersuchungen von *BTNL2*

3.2.1 Basisdaten des Kollektivs

Das untersuchte Patientenkollektiv wurde in seiner Gesamtheit charakterisiert. Im Folgenden ist die Verteilung einiger bedeutender Variablen - Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Stadien - tabellarisch festgehalten.

Tabelle 11. Basisdaten des Sarkoidose-Kollektivs, dargestellt sind jeweils die Prozentsätze der diskreten Variablen und den fehlenden Werten in Klammern

	Sarkoidose-Kollektiv	
Gesamtzahl	210 Patienten	(Kontrollkollektiv: 201 Personen)
Geschlecht (w/m)	54,3% w / 45,7% m	(Kontrollkollektiv: 66,7%w / 33,3% <i>m</i>)
Alter bei Erstdiagnose	<= 20 Jahre 2,5%	51-60 Jahre 17,3%
	21-30 Jahre 19,1%	61-70 Jahre 3%
	31-40 Jahre 28,2%	>= 71 Jahre 2,5%
	41-50 Jahre 24,7%	(fehlende Werte 3,3%)
Stadium bei Erstdiagnose ¹	Stadium 0 4,8%	Stadium III 8,6%
	Stadium Ia 20%	Stadium IV 0,5%
	Stadium Ic 17,6%	(fehlende Werte 3,8%)
	Stadium II 44,8%	
Akut/Chronisch ²	Akut 38,1% / Chronisch 58,1%	(fehlende Werte 3,8%)
Stadienverlauf ³	Stadium bleibt gleich 57,4%	
	Progress 24,7%	
	Regress/Symptomfreiheit 17,9%	

¹ Stadieneinteilung siehe Tabelle 1

² Chronisch ist definiert als ein mindestens zweimaliges Auftreten einer Sarkoidose-Episode im Leben bzw. durch eine länger als 2 Jahre andauernde Symptomatik

³ Der Stadienverlauf wurde beobachtet über einen Zeitraum von mindestens 24 Monaten

Um ethnische Einflüsse zu minimieren, wurden die Genotypisierungsergebnisse von Probanden, die nicht deutsch-kaukasischer Abstammung waren, von der statistischen Datenauswertung ausgeschlossen.

3.2.2 Qualitätstestung der DNA

Für die genetische Untersuchung des erkrankten Lymphknotengewebes wurde die DNA aus dem Biopsiematerial 20 selektierter Patienten gewonnen. Die Biopsien stammen aus den Jahren 1999-2006 und lagen in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet vor. Die darin enthaltene DNA wurde nach der in 2.4.2.2 beschriebenen Methode extrahiert. Die Konzentration des gewonnenen genetischen Materials war ausreichend hoch und lag bei einem Mittelwert von 337ng/µl (Minimum: 72ng/µl, Maximum: 545ng/µl) vor. Die Amplifizierung längerer Abschnitte erfordert

eine hochmolekulare, intakte DNA als Grundlage. Die Qualität der DNA, die aus in Paraffin eingebettetem Gewebe extrahiert wurde, ist bekanntlich oft nicht gut. Hierfür sind keine technischen Vorgehensweisen verantwortlich, sondern der Grund liegt in der Art der Fixierung und Aufbewahrung der Biopsien. Daher konnte, wie erwartet, in einigen Fällen das Material trotz wiederholter Versuche nicht amplifiziert werden. Auch eine long-PCR (Exon 5 und 6) ließ sich nicht durchführen.

Trotz dieser erschwerten Bedingungen ließen sich 9 der 20 DNA-Proben in ausreichender Qualität amplifizieren und sequenzieren, so dass sie hinsichtlich der Fragestellung bewertet werden konnten.

3.2.3 Somatische Mutation

Die kodierenden Exons und angrenzenden Spleißstellen („*splice-sites*“) in *BTNL2* wurden, wie in 2.4.9.2 beschrieben, in den somatischen DNA-Proben der Patienten sequenziert.

Bei einem der 9 Probanden fand sich eine putative somatische Mutation an c.849G>A (NM_019602) im Exon 6. Bei der somatischen Punktmutation handelt es sich um eine Substitution des im Wildtyp vorhandenen Guanin zur Base Adenin. Das für die Aminosäure Methionin (Met) kodierende Basentriplett ATG verändert sich somit zu ATA und bewirkt eine „missense Mutation“, d.h. während der Translation kommt es zum Einbau einer abweichenden Aminosäure im entsprechenden Protein. Anstatt Methionin wird die ebenfalls hydrophobe Aminosäure Isoleucin (Ile) eingesetzt (p.M283I) und das Protein hierdurch in der Zusammensetzung und Struktur verändert.

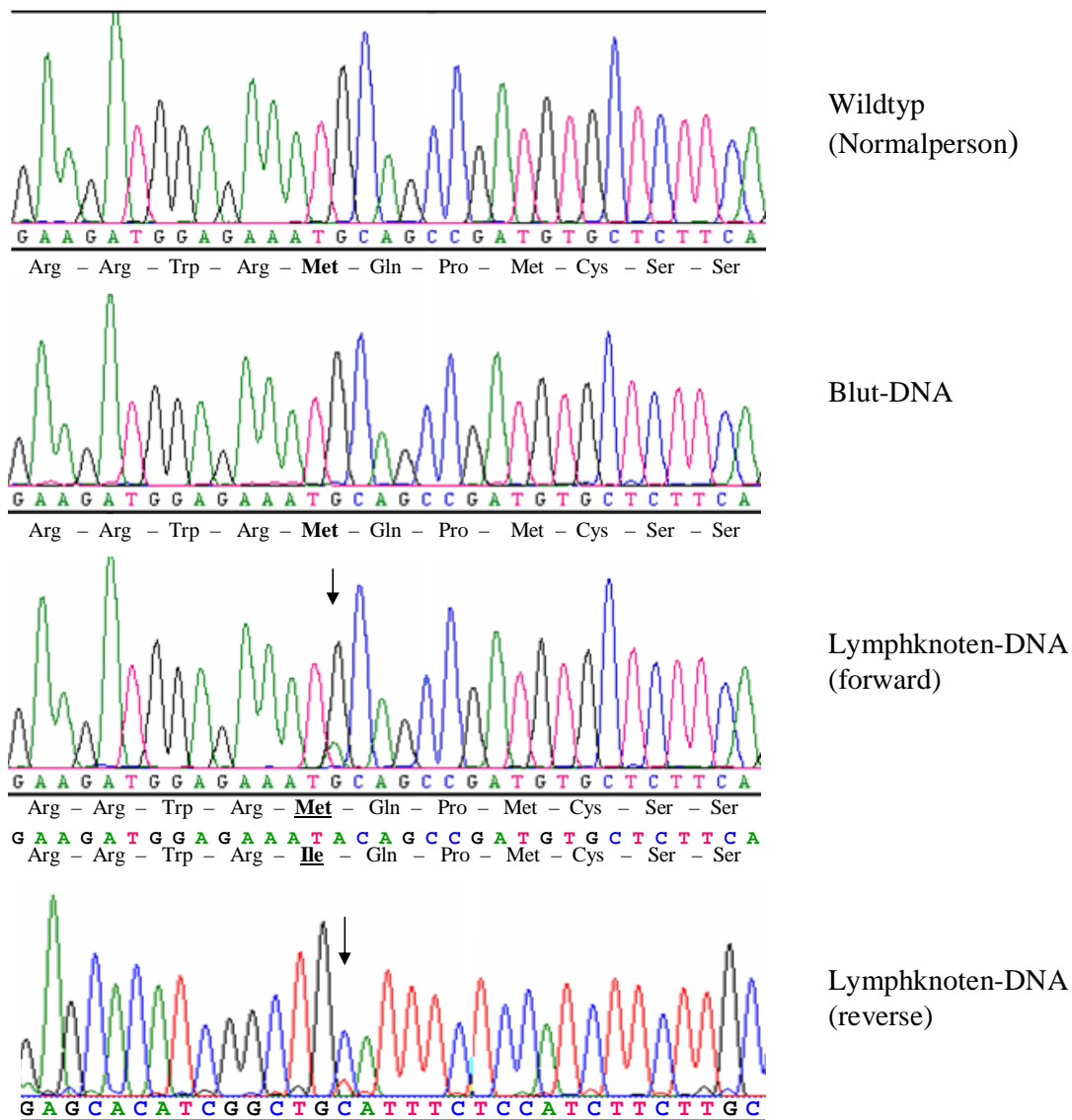


Abbildung 5. Ausschnitt der Basensequenz in Exon 6 von *BTNL2*, DNA aus Blut-Leukozyten und von Sarkoidose befallendem Lymphknotengewebe im Vergleich

Wie in Abbildung 5 erkennbar, zeigt die Basenfolge der aus Blut-Leukozyten gewonnenen DNA im dargestellten Genabschnitt des Exon 6 bei diesem Patienten durchgehend einheitliche Peaks und ist homozygot für das G-Allel in der oben beschriebenen Veränderung. Ihre Sequenz entspricht dem Wildtyp.

Dagegen weist die DNA-Sequenz des befallenen Lymphknotengewebes sowohl in der Hinsequenz (forward) als auch im komplementären Basenstrang (reverse) ein heterozygotes Bild auf, was die zwei basenspezifischen Erhebungen an derselben Stelle demonstrieren. So weist die

Sequenz des fortlaufenden Strangs am beschriebenen Ort jeweils einen Peak für Guanin und Adenin, der komplementäre Strang dementsprechend je eine Erhebung für Cytosin und Thymin auf (siehe Pfeilmarkierung). Dabei ist die Höhe der Peaks erwartungsgemäß nicht gleich, denn nur in einem minimalen Teil der Körperzellen liegt diese somatische Mutation vor. Entsprechend stellt der im Vergleich zu Guanin viel kleinere Peak von Adenin diese Zellpopulation dar.

3.2.4 Anhäufung verschiedener Veränderungen auf einem G-Allel

Eine der 9 Patienten fällt mit vier Keimbahnmutationen auf, die sich alle im Exon 5 befinden. Sie werden im Folgenden detailliert beschrieben.

3.2.4.1 Darstellung der Polymorphismen

Bei den ersten beiden Veränderungen, dargestellt in Abbildung 6, handelt es sich um die Polymorphismen rs41355746 und rs34423804. Rs41355746 liegt auf c.560G>A (NM_019602) im Exon 5 und ist durch den linken der beiden Pfeile in Abbildung 6 markiert. Die Substitution von Guanin zu Adenin wirkt sich im Protein auf eine Veränderung der Aminosäuresequenz aus: Das Basentriplett AGG wird zu AAG, so dass anstatt Lysin (Lys) die ebenfalls basische Aminosäure Arginin (Arg) eingesetzt wird (p.K187R). Die beiden jeweils für Guanin und Adenin spezifischen Peaks weisen auf die Heterozygotie dieses genetischen Merkmals hin, das Gen liegt in zwei verschiedenen Allelen vor. Der Wildtyp dagegen ist homozygot für das G-Allel.

Der rechte Pfeil in Abbildung 6 markiert den Polymorphismus rs34423804 auf c.566A>T (NM_019602), bei dem die Substitution von Adenin zu Thymin einen Austausch der hydrophoben Aminosäure Valin (Val) zur sauren Asparaginsäure (Asp) bestimmt (p.V189N). Die Patientin trägt für dieses Merkmal ein A- und ein T-Allel.

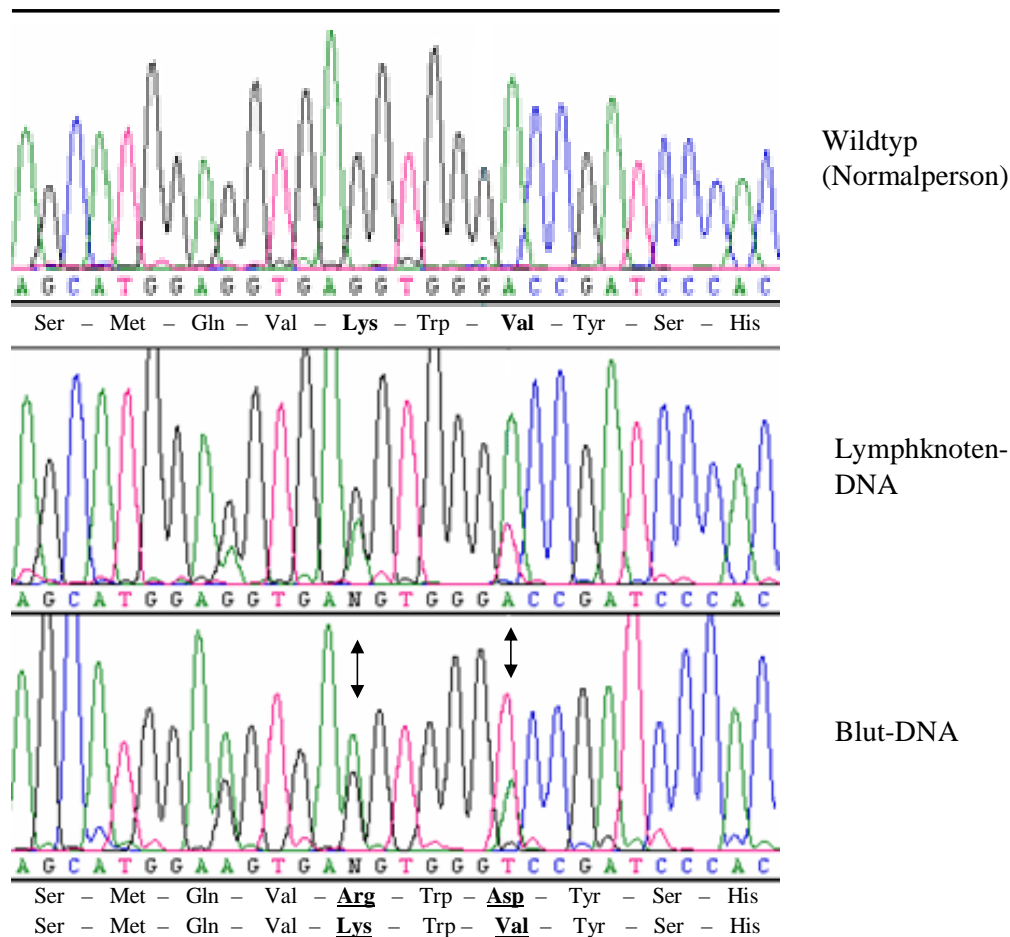


Abbildung 6. Basensequenz und Darstellung der Polymorphismen rs41355746 (c.560G>A) und rs34423804 (c.566A>T), N = Guanin bzw. Adenin

Fünf Basenstellen 3' wärts von rs41355746 findet sich eine weitere G>A Punktmutation (s. Abb. 6), die jedoch keinen Aminosäureaustausch mit sich zieht, denn die Triplets GAG und GAA kodieren beide für Glutaminsäure. Es handelt sich hierbei um eine stille Mutation, die keine funktionelle Bedeutung für das entsprechende Protein hat.

Der dritte Polymorphismus rs41417449 befindet sich ebenfalls im Exon 5 auf c.601A>G (NM_019602). Adenin wird hier durch Guanin substituiert und verursacht eine Veränderung der Aminosäurekodierung. Das für Valin (Val) kodierende Triplett ATG wird zu GTG ausgetauscht, welches auf Ebene der Translation den Einsatz der Aminosäure Methionin (Met) bewirkt (p.V201M). Die Trägerin ist heterozygot für den beschriebenen Polymorphismus, wohingegen der Wildtyp homozygot für das A-Allel ist (s. Abb. 7).

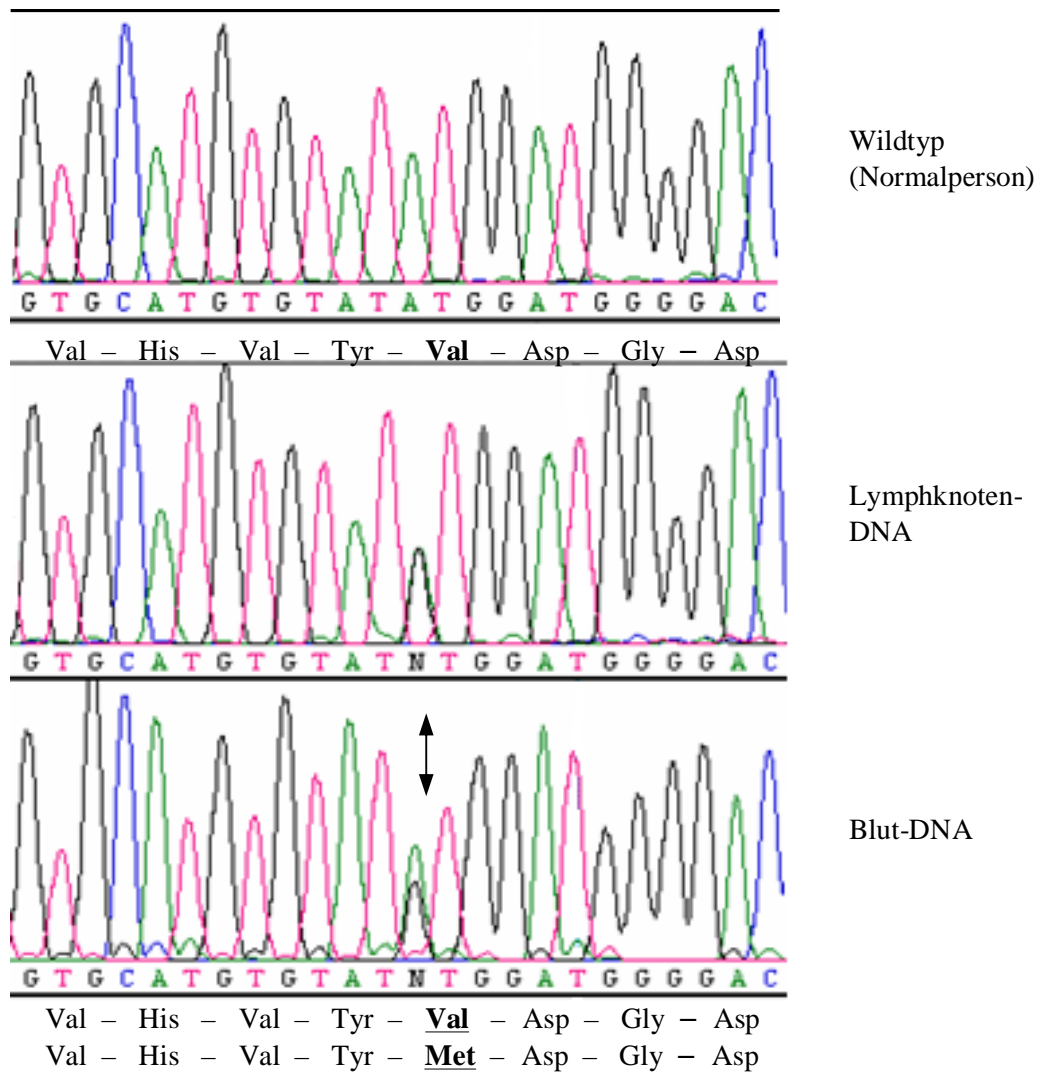


Abbildung 7. Basensequenz und Darstellung der Polymorphismen rs41417449 (c.601A>G), N = Adenin bzw. Guanin

Die Patientin besitzt einen vierten Polymorphismus rs41441651 auf c.724G>A (NM_019602) im Exon 5. Hier kommt es zum Basenaustausch von Guanin zu Adenin, was das kodierende Triplet von GAC zu AAC verändert. Folglich wird im Protein anstatt der sauren Asparaginsäure (Asp) die polare ungeladene Aminosäure Asparagin (Asn) eingebaut (p.D241N). Die zwei basenspezifischen Peaks an der markierten Stelle stehen für die Heterozygotie in diesem genetischen Merkmal, der Wildtyp dagegen ist homozygot für das G-Allel (s. Abb. 8).

In allen vier beschriebenen Mutationen bestehen die genetischen Veränderungen sowohl im Lymphgewebe als auch in den Blut-Leukozyten, was für eine Keimbahnmutation spricht.

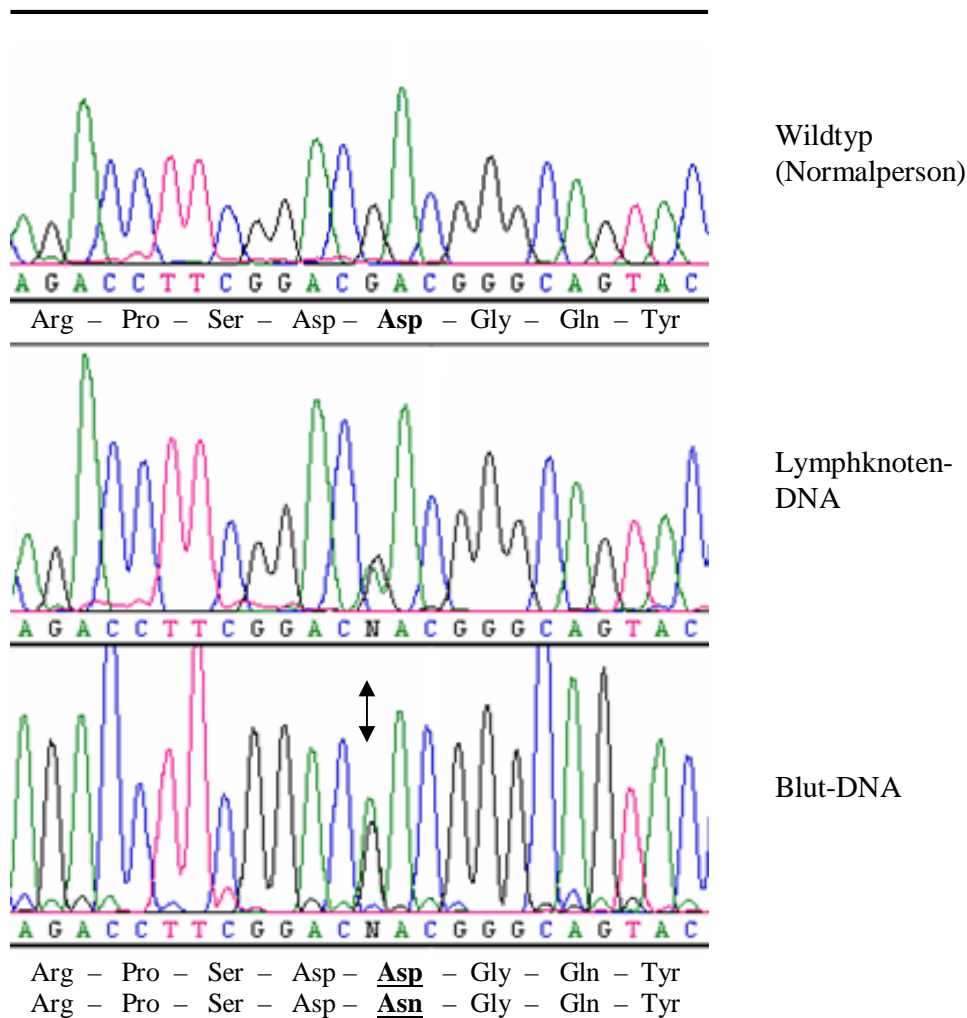


Abbildung 8. Basensequenz und Darstellung des Polymorphismus rs41441651 (c.724G>A), N = Guanin bzw. Adenin

Mit Hilfe des Programms „PolyPhen“ (=Polymorphism Phenotyping) wurde bei jeder der vier Veränderungen geprüft, ob bzw. welche mögliche funktionelle Auswirkung die Aminosäuresubstitution auf das Protein hat. Dabei wurde mittels physikalischen und komparativen Methoden der Effekt vorausberechnet, den nsSNPs (d.h. nicht synonyme SNPs, die in kodierenden Regionen lokalisiert sind) und Aminosäurevariationen auf die Struktur und Funktion ihres Proteins auslösen. Von den vier Polymorphismen im Exon 5 wirken sich die Sequenzveränderungen in c.560G>A und c.601A>G wahrscheinlich schädigend auf die Funktion des Proteins aus, c.566A>T und c.724G>A haben dagegen vermutlich keinen funktionellen Effekt. Diese Vorausberechnungen geben eine mögliche, letztlich jedoch nicht verlässliche Einschätzung der funktionellen Auswirkungen der Polymorphismen auf das Protein.

3.2.4.2 Haplotypanalyse

Um der Frage näher zu kommen, ob die vier Polymorphismen verteilt auf beiden oder alle auf einem einzigen Allel liegen, wurde auch das Blut der beiden gesunden Geschwister der Patientin untersucht. Eine Bestimmung der Eltern war nicht mehr möglich, da diese bereits verstorben sind. Der Haplotyp (aus „haploid“ und „Genotyp“) bezeichnet den genetischen Aufbau eines individuellen Chromosoms und gibt die allelische Zusammensetzung an. Die Allele können z.B. durch die Abfolge mehrerer SNPs entlang eines einzelnen Chromosoms definiert und bestimmt werden. Anhand der vier oben beschriebenen Polymorphismen (blau markiert in Abb. 9), des assoziierten Polymorphismus rs2076530 (s. 1.6.1) und 7 weiteren stillen Mutationen (schwarz markiert in Abb. 9) als polymorphe DNA-Marker wurde die Vererbung des Genabschnitts im Bereich des Intron 4, Exon 5 und Intron 5 unter den drei Geschwistern analysiert. Auf diese Weise konnte indirekt auf die allelische Vererbung der vier Polymorphismen geschlossen werden.

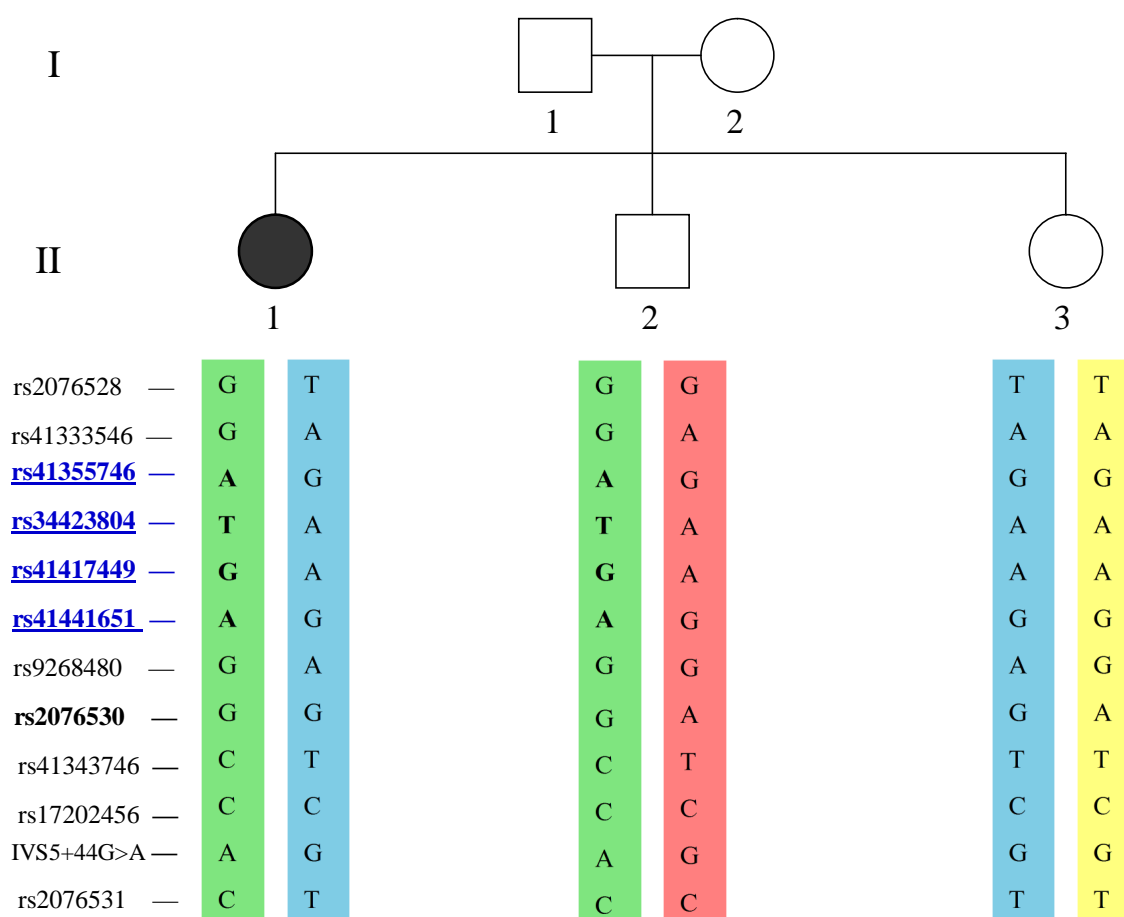


Abbildung 9. Stammbaum der Familie ersten Grades und Haplotypanalyse der Patientin mit Geschwistern

Wie in Abbildung 9 ersichtlich, trägt die Patientin (1) alle vier Polymorphismen auf einem Allel (markiert in grün). Auch der gesunde Bruder (2) hat dieses Allel geerbt. Die ebenfalls bisher gesunde Schwester (3) dagegen ist Träger zweier diesbezüglich mutationsfreier Allele. In dem von Valentonyte et al. (2005) beschriebenen SNP rs2076530 ist die Patientin homozygote Trägerin des G-Allels, beide Geschwister sind jedoch heterozygot.

3.2.5 Untersuchung der Deletion c.450delC im erweiterten Kollektiv

In ihren Untersuchungen um das Gen *BTNL2* erhielten Valentonyte et al. (2005) keine cDNA-Produkte für das Exon 3, so dass sie annahmen, dass dieses Exon doch nicht wie ursprünglich beschrieben für die mRNA des Transkriptes genutzt wird. In unseren Untersuchungen fielen drei der neun Probanden mit einer heterozygoten Cytosin-Deletion auf, die sich genomisch an Position 450 (NM_019602) in ebendiesem putativen Exon 3 befindet. Falls das Exon 3 für einige Isoformen von *BTNL2* eine Rolle spielen sollte, würde es nicht zu einer Tripletteränderung mit potenziellem Aminosäureaustausch führen, sondern zu einer Leserasterverschiebung („frameshift“) mit fortlaufend abweichender Aminosäuresequenz und Sinnveränderung des entsprechenden Proteins. Da gleich 3 von 9 Patienten diese Veränderung tragen, stellte sich die Frage, ob diese Deletion zu einer beeinträchtigten Proteinfunktion von *BTNL2* führt und mitwirkend für die Sarkoidose prädisponiert. Bestärkt durch Valentonyte et al. (2005) bestand zudem die Vermutung, dass das Exon 3 womöglich kein kodierender Abschnitt ist.

Mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) sollte die Mutation exakter untersucht werden und es wurde geprüft, ob die Deletion c.450delC mit einer erhöhten Sarkoidoserate korreliert. Um diesbezüglich eine allgemeingültigere Aussage treffen zu können, wurde die Kohorte der Sarkoidose Erkrankten auf 210 erweitert und ihr ein Normalkollektiv von 201 gesunden Personen gegenüber gestellt. Alle Probanden wurden hinsichtlich der Deletion c.450delC genotypisch untersucht.

3.2.5.1 Ergebnisse der Testung der Deletion c.450delC mittels RFLP

Die Abbildung 10 gibt das Exon 3 (in Großbuchstaben, Intron 2 bzw. Intron 3 in Kleinbuchstaben) mit der Deletion c.450delC im Verlauf der Basenfolge wieder. Mithilfe des Restriktionsenzym BstF5I, welches im Wildtyp drei Schnittstellen vorweist (s. 2.2.3), konnte der Genotyp bzgl. oben beschriebener Mutation bestimmt werden. Da die von der Deletion betroffene Base innerhalb der Erkennungssequenz des Enzyms liegt (s. Abb. 10), verändert eine Deletion die

Basenfolge soweit, dass die Erkennungssequenz abgeändert wird und das Restriktionsenzym die Schnittstelle übergeht. Folglich wird die DNA lediglich an zwei Stellen geschnitten.

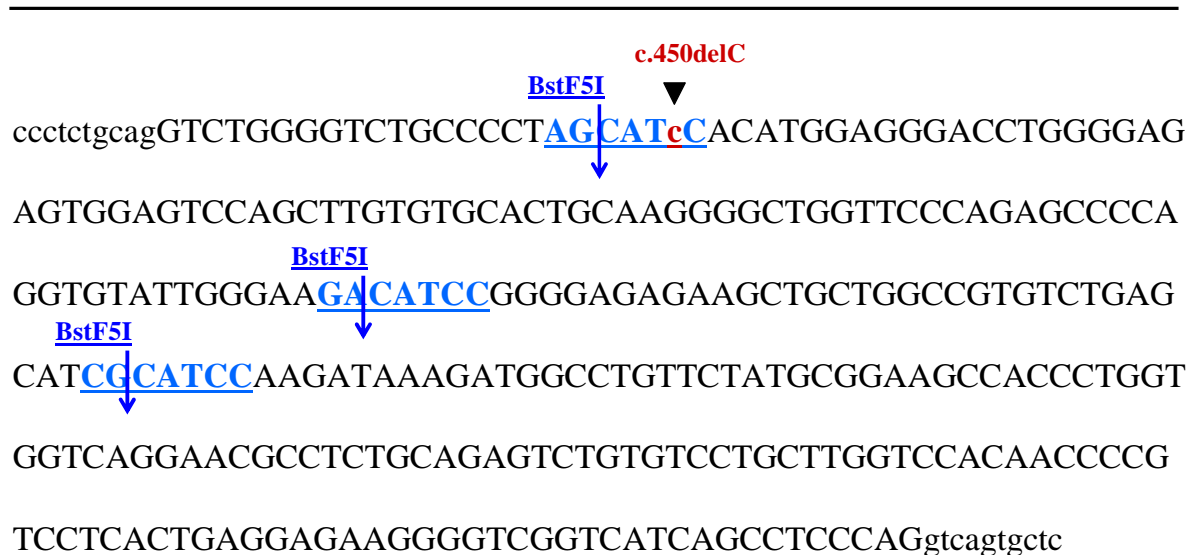


Abbildung 10. Basensequenz des Exon 3 (in Großbuchstaben) mit drei Schnittstellen des Restriktionsenzym BstF5I; die Erkennungssequenz ist in hellblau, die Deletion c.450delC mit einem schwarzem Pfeil markiert

Die Restriktionsfragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und im UV-Licht sichtbar gemacht. Folgende Abbildung zeigt exemplarisch für die Untersuchung 47 verdaute DNA-Proben.

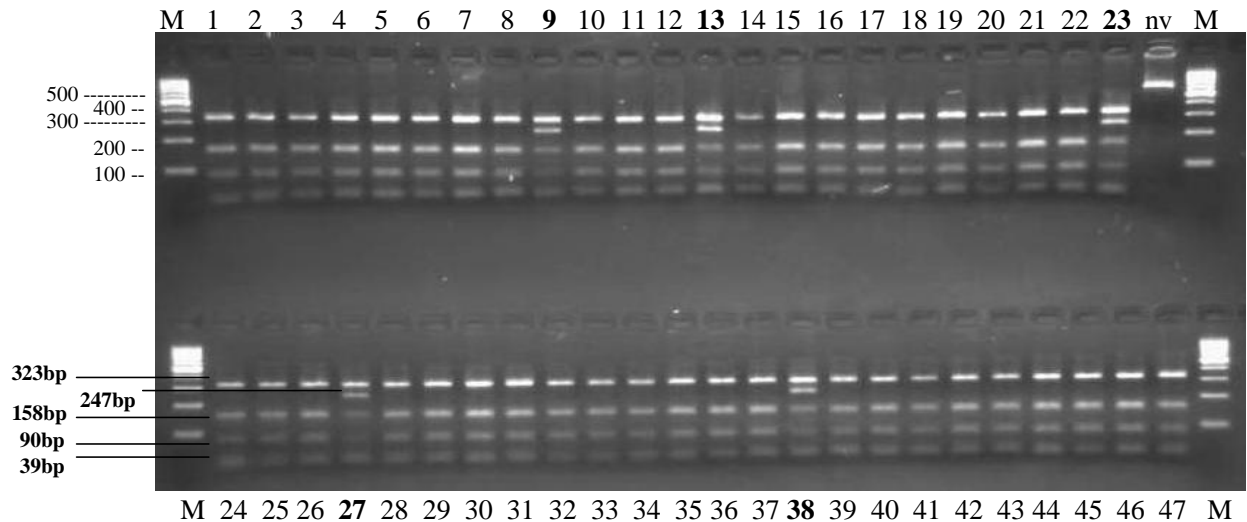


Abbildung 11. Gelelektrophoretische Darstellung der Deletion c.450delC im Exon 3 nach Restriktionsverdau mit BstF5I; M = 100bp Marker, nv = nicht verdaut, Negativprobe ohne Restriktionsenzym

Die Wildtyp-Sequenz, bei dem das Enzym an den markierten drei Stellen schneidet, besitzt 4 Fragmente, so dass elektrophoretisch 4 Banden sichtbar sind (s. zum Beispiel Nr. 1 in Abb. 11). Dabei wird das 610bp lange Exon in vier Fragmente von 323bp, 158bp, 90bp und 39bp Länge geschnitten. Der für die c.450delC heterozygote Genotyp zeigt 5 Banden (s. Nr. 9, 13, 23, 27 und 38 in Abb. 11): Das gesunde Allel besitzt die vier Fragmente bekannter Länge, das zweite mutierte Allel (mit einer Base weniger) wird in drei Fragmente von 323bp, 247bp und 39bp Länge geschnitten, sodass eine zusätzliche Bande von 247bp sichtbar ist.

3.2.5.2 Genotypverteilung und Allelfrequenz

Die Probanden wurden hinsichtlich der Deletion c.450delC untersucht und genotypisiert. Entsprechend der Zugehörigkeit zu ihrem Kollektiv konnte die Aussage zur Häufigkeit der drei Genotypen und der Allelfrequenz getroffen werden. Anhand des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson wurden durch Bestimmung des p-Werts die Genotypenverteilung im Sarkoidose- und

Kontrollkollektiv miteinander verglichen und auf signifikante Unterschiede hin untersucht (Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,05$).

Von den 210 Sarkoidose-Patienten sind 177 (84,3%) C-Allel homozygot, 32 (15,2%) C0-heterozygot und nur eine Person (0,5%) für die Deletion homozygot. Diesem Verteilungsmuster ähnlich finden sich in der Kontrollkohorte mit 172/201 Personen 85,5% homozygote C-Allel und mit 29/201 Personen 14,4% heterozygote C0-Allel Träger.

Tabelle 12. Verteilung der Genotypen und Allelfrequenz der Deletion c.450delC

	Gesamtzahl	CC	C0	00	Allelfrequenz	² -Test
Sarkoidose	210	177	32	1	p= 0,919 q= 0,081	
Kontrolle	201	172	29	0	p= 0,928 q= 0,072	p= 0,4996

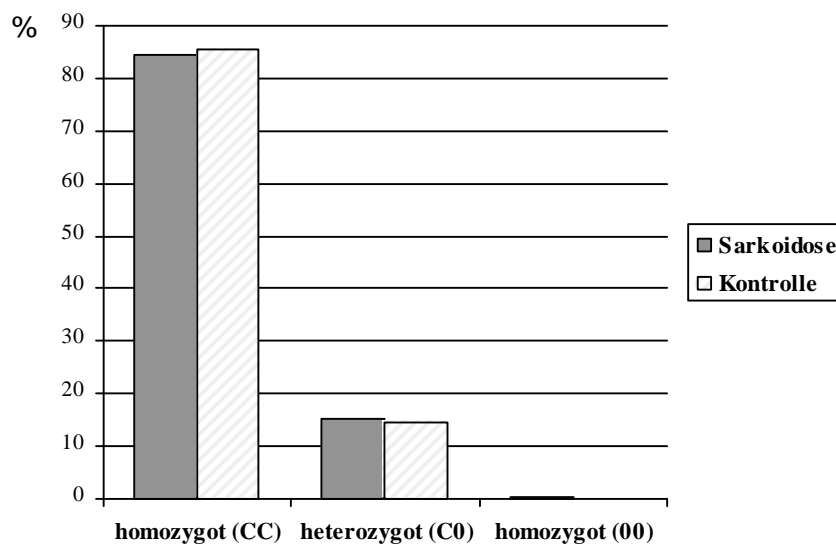


Abbildung 12. Graphische Darstellung der Allelhäufigkeitsverteilung am Genort der Deletion c.450delC

Somit kommen in der Population das nicht mutierte C-Allel mit einer relativen Häufigkeit von 0,92 und das um Cytosin deletierte Allel mit einer relativen Häufigkeit von 0,08 vor. Der Vergleich dieser beiden Kollektive ergibt einen p-Wert von 0,5 und hat damit kein statistisch signifikantes Ergebnis.

4. DISKUSSION

Der Begriff der Sarkoidose bezeichnet eine multisystemische Erkrankung, die durch eine übersteigerte zelluläre Immunreaktion und die Bildung nicht-verkäsender Granulome charakterisiert ist. Typischerweise befällt sie Lunge und Lymphknoten, doch auch nahezu jedes andere Organ kann betroffen sein. Die oftmals unspezifische und fehlende obligate Symptomatik der Sarkoidose, der mitunter schwerwiegende Verlauf und ein Mangel an adäquaten therapeutischen Maßnahmen zeigen die Notwendigkeit der Erforschung der zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen auf. Nur so können adäquate und effektive Therapien entwickelt werden, die der Entstehung und Progression der Erkrankung entgegenwirken und die Lebensqualität der Patienten verbessern.

4.1 Genomweite Assoziationsstudien

4.1.1 Genomweite Assoziationsstudien bei komplexgenetischen Erkrankungen

Eine Vielzahl von Studien resultiert in der Vermutung, dass die Sarkoidose ein polyätiologisches Geschehen darstellt. So wird die Sarkoidose zu den so genannten komplexgenetischen Erkrankungen gezählt, die durch eine mögliche Interaktion multipler endogener und exogener Faktoren bedingt werden. Sowohl mehrere genetische Faktoren als auch die infektiöse bzw. umweltbedingte Exposition können einen gemeinsamen Einfluss auf die Krankheitsentstehung ausüben. Monogene erbliche Erkrankungen, so genannte Mendel'sche Krankheiten, werden durch spezifische Mutationen, so genannte private Mutationen, in den kausalen Genen bedingt, die oft eine große Funktionsveränderung des Gens bzw. Proteins hervorrufen. Dieses klassische Vererbungsmuster war z.B. bei der Genidentifikation des Blau-Syndroms, das klinische und histopathologische Ähnlichkeiten mit der Sarkoidose aufweist, sehr hilfreich (Tromp et al., 1996).

Dagegen vermutet man, dass komplexe Erkrankungen zu einem nicht geringen Teil durch in der Bevölkerung vorkommende Variationen (Polymorphismen) bedingt sein können, die evt. nur einen leichten funktionellen Effekt ausüben. Es wird weiter vermutet, dass das Zusammenspiel verschiedener funktioneller Polymorphismen in mehreren Genen die Grundlage einer genetischen Prädisposition für eine komplexe Erkrankung bilden könnte (Spagnolo und du Bois, 2007). Dies kann z.B. über additive Effekte geschehen, indem jedes Allel einen unabhängigen Beitrag zur

Erkrankungswahrscheinlichkeit liefert. In diesem Fall ist das Konzept der genetischen Determination aufgegeben, da es keine Allele oder Allelkombinationen gibt, die allein notwendig für die Krankheitsentstehung wären. Stattdessen verändert ein Allel die Krankheitsanfälligkeit (Risch, 2000). Ein solches polygenes Modell kann z.B. Prävalenz, Wiederholungsrisiko und den Beitrag der Umwelt bezüglich Volkskrankheiten gut erklären, und experimentelle Untersuchungen vermögen dieses Modell zu stützen. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass das Auftreten von privaten Mutationen und so genannten „copy number variations“ (CNV) in Genen gehäuft bei bestimmten komplexen Erkrankungen auftritt, so dass vermutet wird, dass letztendlich ein Zusammenspiel von häufig auftretenden Polymorphismen und privaten Veränderung mit großer funktioneller Relevanz die genetische Prädisposition ausmachen. Auch bei der Sarkoidose wird vermutet, dass kein einzelner genetischer Faktor für die Erkrankung prädisponiert, sondern eine Reihe verschiedener Faktoren, die bis heute zum großen Teil nicht bekannt sind. Ebenso sind metabolische Volkskrankheiten wie Hypertonie und Adipositas, neurologische Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Alzheimer und Multiple Sklerose, Immunerkrankungen wie Morbus Crohn und Asthma bronchiale und viele systemische Krebsleiden als komplexgenetische Erkrankungen anzusehen.

Verschiedene methodische Ansätze zur genetischen Analyse ermöglichen die Lokalisation spezifischer genetischer Komponenten in komplexen Erkrankungen. Unter diesen wurden in letzter Zeit insbesondere genomweite Assoziationsstudien (GWA) erfolgreich angewandt. Als Standarddesign für die Assoziationsstudie dient die Fall-Kontroll-Studie (case-control study) mit unabhängigen und unverwandten Stichproben. Von der Assoziation eines genetischen Markers (bei modernen Assoziationsstudien SNPs) mit einer Erkrankung spricht man, wenn die relative Häufigkeit des SNP bei Erkrankten gegenüber gesunden Kontrollen signifikant unterschiedlich ist. Es wird also untersucht, ob ein Allel eines SNPs in der einen Gruppe häufiger vorkommt als in der anderen. Dabei ist sowohl eine genomweite Analyse mittels neuer Chip-Array Technologien möglich, als auch die Untersuchung einer ausgewählten Kandidatenregion oder eines Kandidatengens. Bei letzterem werden oft so genannte tagging SNPs benutzt, um alle in der untersuchten Population beschriebenen Haplotypen auf mögliche Assoziationen zu testen (Victor, 2007).

Kürzlich wurden die Ergebnisse der ersten genomweiten Assoziationsstudien publiziert, zum Beispiel zu Diabetes mellitus Typ 2 von Sladek et al. (2007), die 392.935 SNPs in einer französischen Fall-Kontroll-Kohorte untersuchten und darunter vier neue Loci identifizieren und

eine bereits bekannte Assoziation bestätigen konnten. Auch Li et al. (2008) führten eine genomweite Assoziationsstudie zur Alzheimer Erkrankung durch und lokalisierten unter 469.438 SNPs ein hoch assoziiertes Gen. Mit 753 Alzheimer Patienten und 736 gesunden Individuen in ihrer Fall-Kontroll-Studie erzielten sie ein Ranking der SNPs basierend auf der Stärke der statistischen Assoziation mit Alzheimer bzw. dem Erkrankungsalter. 120 SNPs mit dem niedrigsten p-Wert für eine genetische Assoziation mit Alzheimer wurden daraufhin in einem zweiten Schritt ausgewertet, um falsch positive Resultate zu reduzieren und die Verallgemeinerbarkeit einzuordnen. In drei unabhängigen genomweiten Assoziationsstudien mit insgesamt 1406 Niederländern und einer genomweiten Kopplungsstudie mit 1292 niederländischen Verwandten identifizierten Kayser et al. (2008) das Gen *HERC2* auf dem Chromosom 15 als prädominanten Faktor für die menschliche Irisfarbvariation. Plenge et al. (2007) genotypisierten in ihrer Assoziationsstudie 397 Patienten mit Rheumatoider Arthritis auf 116.204 SNPs und verglichen sie mit den Daten von 1211 verwandten Individuen. Sie ermittelten einen mit Rheumatoider Arthritis assoziierten SNP auf Chromosom 6q23. Außerdem konnten sie zeigen, dass dieser und ein weiterer kürzlich lokalisierter 3,8kb entfernter SNP statistisch unabhängig voneinander risikohafte und protektive Haplotypen auf 6q23 für die Rheumatoide Arthritis bestimmen.

Die Signifikanz der genetischen Assoziationen in solchen Studien wird vor allem bemessen am p-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit, Kennzahl zur Auswertung statistischer Tests). Je kleiner dieser ist, desto eher würde die zuvor festgelegte Nullhypothese verworfen und für eine Assoziation der untersuchten Komponenten gesprochen werden. Wie auch in unserer Studie wird vor dem Test ein Signifikanzniveau festgelegt, das meist bei 5% ($p = 0,05$) liegt.

Generell bergen Assoziationsstudien eine Reihe statistischer Schwierigkeiten, die es zu beachten gilt. Eine gezeigte Assoziation zwischen Marker und Krankheit ist noch kein Beweis für eine kausale Beziehung und sollte mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) hinsichtlich des Linkage Disequilibrium (LD) geprüft werden. An den Nachweis einer Assoziation zwischen Krankheit und Gen sollte sich die Feinkartierung anschließen, bei welcher nun der genaue Polymorphismus auf dem Genom lokalisiert wird. Eine weitere wichtige Störvariable liegt in der Populationsstratifikation bzw. im ethnischen Confounding. Wenn sich Populationen verschieden ethnischer Herkunft mit unterschiedlichen Erkrankungsraten mischen, können sich Verzerrungen bei der statistischen Auswertung ergeben (Cardon und Palmer, 2003). Assoziationsstudien erfordern zudem eine große Zahl an Probanden, die besonders hinsichtlich Geschlecht und

ethnischer Herkunft gut klassifiziert sind. Nur so kann ein aussagekräftiges Ergebnis entstehen, dass für die allgemeine Population gültig ist.

4.1.2 Genomweite Assoziationsstudien bei Sarkoidose

Um die genetische Basis der Sarkoidose zu untersuchen, haben die meisten bisher durchgeführten Studien die Analyse von Kandidatengenen oder Kandidatenregionen vorgenommen, während die wenigen genomweiten Scans zusätzliche Einblicke lieferten. In Anbetracht der charakteristischen übersteigerten Immunreaktion bei Sarkoidose wurde besonders auf die Identifikation von Kandidatengenen fokussiert, die in einer Dysregulation der T-Zell-Antwort folgern könnten. Darunter fallen v.a. Gene, die in die Antigenpräsentation, Zytokinantwort oder Zellsignalgebung involviert sind. Hierbei wurden von verschiedenen Forschungsgruppen mehrere Assoziationen zu Humanen Leukozytenantigenen (HLA), Zytokingenen, verschiedenen Rezeptorgenen (*BTNL2*, *TLR4* u.a.) und einigen anderen (Smith et al., 2008) aufgedeckt. In einer der neusten Publikationen zeigen Lopez-Campos et al. (2008) die Assoziation zwischen dem Polymorphismus 3050G>C im Cyclooxygenase 2-Gen (*COX2*) und systemischer Sarkoidose.

Im Gegensatz dazu gibt es bislang nur eine erfolgreiche genomweite Assoziationsstudie zur Sarkoidose: Schürmann et al. (2001) prüften an 63 deutschen Familien mit Sarkoidose die Assoziation von 225 Mikrosatelliten Markern. Sie konnten mit 6 benachbarten Markern, die eine Region von 16cM eingrenzen, ein hohes Bindungssignal auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 (6p21-6p22) identifizieren. Dabei fand sich der höchste Peak in der MHC III Region. Außerdem zeigten 6 weitere chromosomale Regionen (3p21, 1p22, 9q33, langer Arm des Chromosom X, 7q22 und 7q36) schwächere Peaks. Dieser genomweite Scan zeigte eine richtungweisende Region auf, da sich *BTNL2* im Genabschnitt mit dem höchsten Peak befindet. Valentonyte et al. (2005) untersuchten daraufhin die so erwiesene Kandidatenregion 6p21 in einer dreistufigen SNP Feinkartierung und identifizierten *BTNL2* als hochassoziiertes Sarkoidose-Gen. Dennoch ist die Aussagekraft für *BTNL2* als alleinig ausschlaggebendes Gen nur klein durch die weiteren wenn auch schwach assoziierten Kandidatenregionen, die in der genomweiten Assoziationsstudie lokalisiert wurden.

4.2 Sarkoidose-Fragebogen

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fragebogen erstellt, der das Erfassen großer Kohorten der komplexgenetischen Erkrankung Sarkoidose ermöglicht. Auch Newman et al. (2004)

entwickelten mit ACCESS einen Fragebogen, um damit mögliche berufliche, ökologische und infektiöse Expositionen an Sarkoidose-Patienten zu erfassen. Zudem wurde ein Anteil ihrer Patienten zur Diagnose und nach einer Zeitspanne von 24 Monaten hinsichtlich des Organbefalls bewertet.

Die Besonderheit unseres Fragebogens liegt in der sehr detaillierten Befragung der Organbeteiligung (Module 2). ACCESS ähnlich werden die klinischen Befunde (Organbeteiligung, Lungenfunktion und Blutwerte) zum Zeitpunkt der Diagnose und nach einer Dauer von mindestens 24 Monaten registriert. Da die statistischen Daten bezüglich der extrapulmonalen Organbeteiligung in der Literatur schwanken, trägt der Fragebogen dazu bei, durch den Vergleich eine möglichst realistische Einschätzung des Krankheitsverlaufs zu gewinnen. Die Aufnahme in die Kohorte erfordert eine histologisch bewiesene Sarkoidose, mit Ausnahme des klinisch eindeutigen Löfgren-Syndroms. Eine strikte Definition der verschiedenen Verlaufsformen (akuter bzw. subakuter Beginn, akuter bzw. chronischer Verlauf, Löfgren-Syndrom, Heerfordt-Syndrom) gewährleistet die sichere Klassifizierung der Patienten. Im Gegensatz zu ACCESS fokussiert der Fragebogen weniger auf die beruflichen und ökologischen Expositionsfaktoren, sondern konzentriert sich verstärkt auf die Therapie, Organbeteiligung und grundlegende klinische Untersuchungen (Lungenfunktion, Labor, BAL, HRCT). Auf diese Weise ermöglicht er eine Verlaufsbeurteilung sowohl des einzelnen Patienten als auch der Kohorte in seiner Gesamtheit. Der Fragebogen soll zukünftig praktisch eingesetzt werden, um ihn an größerer Patientenzahl anzuwenden und ggf. weitere relevante Faktoren einzufügen.

4.3 Mutationsanalyse in *BTNL2*

Die molekulare Untersuchung der Sarkoidose ist momentaner Gegenstand der Forschung und hat mit *BTNL2* bereits ein richtungweisendes Gen identifiziert. So kann nach Valentonyte et al. (2005) der Polymorphismus eines einzigen spezifischen Basenpaares in *BTNL2* das Krankheitsrisiko um 60% erhöhen. Sind beide Genkopien betroffen, so verdreifacht sich sogar die Wahrscheinlichkeit an Sarkoidose zu erkranken. Die große funktionelle Auswirkung dieses einen Polymorphismus zeigt sich darin, dass ein homozygoter Träger des assoziierten SNP rs2076530 die Funktion seiner beiden Genkopien verliert und damit als Konsequenz die Funktion des kompletten Gens. Der funktionelle Verlust von *BTNL2* folgert in der Prädisposition für Sarkoidose. Etwa 65% der deutschen Bevölkerung sind (homo- oder heterozygote) rs2076530 Träger (Valentonyte et al., 2005; Li et al., 2006). Somit ist der Polymorphismus substantiell auf

der Bevölkerungsebene vertreten, aber hat nur einen gemäßigten Einfluss auf das individuelle Erkrankungsrisiko.

4.3.1 Somatische Mutationen

Schon vor zwei Jahrzehnten prognostizierte Robert Weinberg die Bedeutung somatischer Mutationen als Krankheitsbahnenden Mechanismus. Die Besonderheit somatischer Mutationen liegt darin, dass sie im Gegensatz zu Keimbahnmutationen spontan auftreten und lediglich eine Veränderung der betroffenen Körperzelle und ihrer Nachkommen bewirken. Sie können nicht vererbt werden. Ihre Auswirkungen sind vor allem aus der Onkologie bei der Entstehung des Kolonkarzinoms und anderen malignen Erkrankungen bekannt. Die Krebserkrankung geht dabei aus einzelnen durch somatische Mutation veränderten Zellen hervor, die das Wachstum und den Überlebensvorteil dieser Zellen ermöglichen.

Zunehmend werden auch bei benignen Erkrankungen somatische Mutationen als ursächlicher Pathomechanismus vermutet bzw. erkannt. Hier kommt es jedoch nicht zum ungehemmten Zellwachstum wie bei malignen Erkrankungen, sondern die Mutation führt zu einer jeweils spezifischen Funktionsveränderung eines Gens und seines Proteins. So beschreiben Tinschert et al. (2000) bei einem Patienten mit segmentaler Neurofibromatose erstmalig eine somatische Mutation in Form einer NF1-Mikrodeletion. Gollob et al. (2006) untersuchten in ihrer Studie 15 Patienten mit Vorhofflimmern. Sie stellten die Hypothese auf, dass die idiopathische atriale Fibrillation einen genetischen Ursprung hat und dass eine gewebespezifische Mutation in *GJA5*, dem für Connexin 40 kodierenden Gen, den Herzvorhof zum Flimmern prädisponiert. So untersuchten sie genomische DNA, extrahiert sowohl aus kardialem Gewebe als auch aus peripheren Leukozyten, auf *GJA5*-Mutationen und ihre funktionellen Auswirkungen. Dabei weisen drei der 15 Patienten eine somatische Mutation und ein vierter Patient eine Keimbahnmutation auf, die als Folge alle einen verminderten intrazellulären Transport oder eine reduzierte intrazelluläre elektrische Kopplung aufzeigen. Holzelova et al. (2004) konnten in ihrer Studie um das Autoimmun-Lymphoproliferative Syndrom an 2 von 6 erkrankten Kindern zeigen, dass somatische Mutationen auch sporadische Formen der Autoimmunerkrankung bewirken können. Die geschädigten Zellen kodieren hier für abnormale Fas-Proteine bzw. werden unfähig den Oberflächenrezeptor Fas zu exprimieren, der für die so notwendige Apoptose verantwortlich ist. So entstehen Lymphozyten mit Fas-Defekt, die dem programmierten Zelltod entgehen, akkumulieren und folglich eine Lymphadenopathie und Splenomegalie verursachen.

Methodische Hindernisse beim Nachweis somatischer Mutationen aus fixiertem Gewebe

Vor diesem Hintergrund – zum einen der hohen pathogenetischen Bedeutung von *BTNL2* für Sarkoidose und zum anderen der Erkenntnis, dass sich auch bei nichtmalignen Erkrankungen zunehmend somatische Mutationen als ursächlicher molekularer Mechanismus identifizieren lassen – wurden in der vorliegenden Arbeit 20 an Sarkoidose erkrankte Patienten primär auf somatische Mutationen in *BTNL2* untersucht. Dies stellt bislang die erste Studie zur Sarkoidose dar, in der Untersuchungen auf somatische Mutationen beschrieben werden.

Für unsere Studie wurde das genetische Material der 20 Patienten sowohl aus Vollblut als auch aus archivierten Lymphknotenbiopsien extrahiert, um es auf Veränderungen in *BTNL2* zu überprüfen. Formalin fixierte, in Paraffin gebettete Gewebeproben präsentieren bislang die größte Quelle von archiviertem biologischem Material, das basierend auf molekulargenetischer Analyse für epidemiologische Studien verwendet wird. Eine effiziente DNA-Extraktion stellt noch immer eine labortechnische Herausforderung dar, da das genetische Material nach dem Behandlungsprozess oftmals degradiert vorliegt. Sogar eine kurzzeitige Behandlung des Gewebes mit Formalin kann die DNA-Lösbarkeit reduzieren und ihre Degeneration bewirken. Sjöholm et al. (2005) konnten zeigen, dass die Degeneration initiiert wird in der AT-reichen Region der doppelsträngigen DNA durch Brechen der Wasserstoffbrückenbindungen und einer verminderten Anlagerung der Basen. Im Vergleich zu frisch gefrorenem Gewebe weist mit Formalin fixiertes genetisches Material eine hohe Frequenz an nicht reproduzierbaren Sequenzabfolgen auf. Dies könnte auf der durch Formalin verursachten Quervernetzung der Cytosin-Nukleotide beruhen, die, auf diese Weise verändert, von der Taq Polymerase in der PCR nicht mehr erkannt werden kann. Eine weitere Ursache vermag in der überlangen Archivierung der Proben liegen. Ältere Proben zeigen zum einen unterschiedliche Techniken der Gewebedehydratation auf, zum anderen durch Formalin verursachte DNA-Umstrukturierungen, die mit der Zeit zunehmen. So sinkt die Erfolgsrate der Genotypisierung mit zunehmender Aufbewahrung und erhöhter Länge des Amplikons (Bernstein, 2002). Talaulikar et al. (2008) führten eine komparative Untersuchung mit 14 frisch gefrorenen und 13 Formalin fixierten, in Paraffin gebetteten Knochenmarksbiopsien durch. Dabei konstatierten sie, dass amplifizierbare DNA zwar aus beiden Materialien extrahiert werden kann, frisch gefrorenes Gewebe jedoch als Quelle von DNA-Matrizen überlegen ist, insbesondere für größere PCR-Produkte. Im Gegensatz zu 100% des frisch gefrorenen Materials, erzielten die mit Formalin und Paraffin behandelten Gewebeproben nur in 8% der Fälle Produkte bis zu 600bp und in ihrer Gesamtheit lediglich Fragmente von 96bp Länge. Auch in der

vorliegenden Arbeit machten wir die Erfahrung, dass ein Teil unseres DNA-Materials zwar in hoher Quantität, aber verminderter Qualität vorlag und sich längere Basenabschnitte trotz mehrmaliger Wiederholung nicht amplifizieren ließen. Die 7 untersuchten Exons von *BTNL2* betragen eine Länge zwischen 357 und 646bp. Generell sollten in nachfolgenden Studien Biopsien in gewebeschonenderer Form von frisch gefrorenem Material als Alternative in Betracht gezogen werden, sofern die Rekrutierung der Kohorte gewährleistet werden kann.

Somatische Mutationen sind selten, kommen aber vor

Trotz dieser erschwerten Bedingungen konnten 9 unserer 20 DNA-Proben in guter Qualität extrahiert werden. Aus diesen 9 weist ein Patient eine somatische Mutation in *BTNL2* auf. Die Substitution von Guanin zu Adenin an der genomischen Position 849 (c.849G>A, NM_019602) im Exon 6 bewirkt durch ein abweichend kodierendes Basentriplett einen Aminosäureaustausch und damit ein strukturell verändertes Protein. Bezüglich des Polymorphismus rs2076530 ist der Patient heterozygot und trägt den Genotyp AG. Nach Li et al. (2006) ist mit dem G-Allel eine protektive Funktion verbunden, seine Träger korrelieren weitaus weniger häufig mit dem Befund einer Sarkoidose als hetero- oder homozygote A-Allel Träger. Demnach wäre anzunehmen, dass dieses erste G-Allel bei dem Patienten funktionsfähig sei. Das zweite A-Allel hingegen könnte durch die von Valentonyte et al. (2005) beschriebene Mutation geschädigt worden sein. Entscheidend wäre nun, auf welchem Allel die obige somatische Mutation liegt. Um dies zu bestimmen, versuchten wir ein längeres Amplikon unter Einschluss beider Mutationsorte herzustellen, um mittels Haplotypanalyse zu orten, auf welchem Transkript sich die somatische Mutation befindet. Aufgrund oben beschriebener Bedingungen gelang es aber trotz mehrmaliger Wiederholung nicht, die Basenabfolge über die Länge der beiden Exons 5 und 6 zu amplifizieren. So bleiben folgende zwei Möglichkeiten bestehen: Wenn nun die somatische Mutation auf dem ursprünglich protektivem G-Allel liegt, wären beide Transkripte von *BTNL2* durch jeweils eine Mutation belastet, nämlich das A-Allel eben durch den Polymorphismus rs2076530 und das G-Allel durch die Mutation c.849G>A (NM_019602). Liegt die somatische Mutation hingegen auf dem A-Allel, so verbleiben ein durch zwei Mutationen geschädigtes und ein intaktes Allel. Bekanntlich stellt die Sarkoidose eine komplexgenetische Erkrankung dar, deren genetische Basis von multiplen Genen getragen wird. Neben vermutlich mehreren noch unerforschten Genen ist *BTNL2* mit einer hohen Beteiligung an der Krankheitsentstehung der Sarkoidose identifiziert worden. Da der obige Patient an Sarkoidose erkrankt ist, liegt die Möglichkeit nahe, dass *BTNL2*

im genetischen Entstehungsprozess der Krankheit eine ausschlaggebende Rolle spielt. So besteht die Vermutung, dass die somatische Mutation des Patienten einen Verlust des Gens herbeigeführt haben könnte, der die Entstehungswahrscheinlichkeit der Sarkoidose erhöht und mit anderen Faktoren ursächlich verantwortlich ist. In einer nachfolgenden Studie soll mit Hilfe anderer Methoden nochmals versucht werden, ein längeres Amplikon über beide genannten Mutationsorte herzustellen und den Haplotyp des Patienten zu bestimmen.

Auch wenn aus 9 Patienten immerhin eine Person mit somatischer Mutation gesichert werden konnte, so muss dieses Ergebnis unbedingt zukünftig an einer größeren Kohorte bestätigt werden. Dennoch eröffnet dieser Fund schon jetzt die Möglichkeit eines für die Sarkoidose neuen Modells der somatischen Mutation in der Krankheitsentstehung und bestätigt die bedeutende Rolle von *BTNL2* für Sarkoidose.

4.3.2 Die Besonderheit von vier Mutationen auf einem G-Allel

Bei einer weiteren Patientin konnten wir vier Keimbahnmutationen in *BTNL2* lokalisieren, die sich alle auf dem Exon 5 befinden: c.560G>A, c.601A>G, c.566A>T und c.724G>A (NM_019602). Dabei ist es höchst ungewöhnlich, dass gleich vier Mutationen in unmittelbarer Nähe zueinander liegen, von denen mindestens zwei (c.560G>A und c.601A>G) mit hoher Wahrscheinlichkeit schädigend auf das Gen wirken. In diesem Fall ist bedeutend, dass die Patientin hinsichtlich des Polymorphismus rs2076530 homozygote Trägerin des G-Allels ist. Ihr Gen kann folglich nicht durch den von Valentonyte et al. (2005) beschriebenen SNP geschädigt worden sein. So besteht die Möglichkeit, dass die Fülle von vier Mutationen bei dieser Patientin zum Funktionsverlust von *BTNL2* geführt hat.

Um zu bestimmen, ob die Polymorphismen alle auf einem oder verteilt auf beiden Transkripten liegen, wurde eine Haplotypanalyse durchgeführt. Unter Einbezug des genetischen Materials beider gesunder Geschwister konnte auf die allelische Verteilung der Mutationen geschlossen und die jeweiligen Haplotypen untereinander verglichen werden. Die Analyse ergab, dass alle vier beschriebenen Mutationen auf demselben Allel liegen. An diesem Punkt stellt sich die Frage, auf welche Weise die vielen Mutationen auf einem Allel entstanden sein könnten. Eine mögliche Erklärung liegt in den Pseudogenen. Diese sind DNA-Abschnitte, die zwar wie ein Gen aufgebaut sind, aber in ihrer Struktur durch Mutationen so geschädigt wurden, dass sie nicht weiter in funktionsfähige Genprodukte transkribiert werden können. Eine geringe Anzahl von Pseudogenen sind ehemals funktionierende Gene, die durch eine Reihe von Mutationen

inaktiviert wurden. Die meisten aber sind funktionslose Duplikate von funktionierenden Genen, die schon früh im Duplikationsprozess oder aber im Laufe der Zeit durch angesammelte Mutationen ihre Funktion verloren haben. Es ist aber auch denkbar, dass das durch die vier Mutationen geschädigte Transkript von *BTNL2* auf einen reduzierten evolutionären Druck zurückzuführen ist. Möglicherweise entstand vor vielen Generationen eine Mutation, die zum Funktionsverlust des Allels führte. Da das Allel nun keinem evolutionären Druck mehr unterlag, konnten sich leicht weitere Mutationen angesammelt haben und an die nächste Generation weiter vererbt werden.

Neben der Patientin ist lediglich der Bruder ebenfalls Träger dieses Allels, ihre Schwester trägt zwei diesbezüglich mutationsfreie Allele. Beide Geschwister sind jedoch hinsichtlich des Polymorphismus rs2076530 heterozygot und nicht von der Erkrankung betroffen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass sie mit 78 und 82 Jahren keine Sarkoidose mehr entwickeln werden. Somit ist strittig, welches Maß an Bedeutung *BTNL2* für die Entstehung der Sarkoidose in dieser Familie hat. Der Bruder der Patientin beispielsweise ist auf einem Allel mit den vier obigen Mutationen, auf dem anderen Allel mit dem als nachteilig bekanntem SNP rs2076530 belastet (s. Abb.9), so dass sein *BTNL2*-Genprodukt mutmaßlich in seiner Funktion beeinträchtigt ist. Trotz dieses für die Sarkoidose ungünstigen Faktors ist er gesund, was wiederum unterstreicht, dass die Sarkoidose einen komplexgenetischen Prozess darstellt, in dem multiple Gene einen Effekt von unterschiedlich hoher Relevanz zum Erkrankungsgeschehen beitragen. Womöglich sind andere ausschlaggebende Faktoren bei ihm intakt und wirken protektiv. Unsere Patientin ist mit einem intakten und einem durch die Mutationen beeinträchtigten Transkript an Sarkoidose erkrankt, was auf andere noch unerkannte Faktoren hinweist, die primär für die Entstehung der Krankheit verantwortlich sind.

4.3.3 Relevanz des Exon 3 für *BTNL2*

In einem dritten Schritt wurde das Auftreten der Deletion c.450delC in Exon 3 von *BTNL2* an einem erweiterten Kollektiv von insgesamt 210 Probanden beobachtet und mit einer Kontrollgruppe von 201 Personen verglichen. Die Genotypverteilung ergab, dass der Genotyp CC unter den Sarkoidose-Patienten mit 84,3%, im Kontrollkollektiv mit 85,5% vertreten ist. Der Genotyp C0 fand sich bei 15,2% der Sarkoidose-Patienten und bei 14,4% der Normalpersonen, nur ein Sarkoidose-Patient (0,5%) zeigte eine homozygote C-Deletion. Mit einem p-Wert von 0,49 im Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergeben diese Werte somit keinen signifikanten

Zusammenhang zwischen der Sarkoidose und der untersuchten Deletion. In ihren ersten Untersuchungen zu *BTNL2* erreichten Stammers et al. (2000) keine zusammenhängenden cDNA-Produkte für die Exons 1-4 und 5-6, in der Annahme, dass zwei verschiedene Gene existieren. Valentonyte et al. (2005) schlossen das Exon 3 im weiteren Verlauf von ihren Untersuchungen aus. Die fehlende Assoziation mit der Sarkoidose liefert den indirekten Hinweis dafür, dass das Exon 3 wahrscheinlich kein kodierender Abschnitt von *BTNL2* ist und bekräftigt das Vorgehen der Kieler Forschungsgruppe. Denn wäre die Deletion c.450delC mit der Sarkoidose assoziiert, so würde ihre genetische Auswirkung das *BTNL2*-Genprodukt in seiner Funktion derart schädigen, dass unter der Gesamtheit der Deletion c.450delC-Träger in unserer Studie vermutlich ein weit häufigeres Auftreten der Sarkoidose zu beobachten wäre. So ist anzunehmen, dass das Exon 3 mit seinen potenziellen genetischen Veränderungen keine Relevanz für das gesamte Gen hat, und dieses in seiner Funktion nicht beeinflusst. Diese Vermutung wurde jedoch lediglich anhand von Untersuchungen der DNA indirekt erschlossen. Um die funktionelle Bedeutung des Exon 3 für *BTNL2* exakter definieren zu können, ist es entscheidend, zukünftig auch auf RNA-Ebene nachzuweisen, ob das Exon für alternative Isoformen von *BTNL2* benutzt wird oder nicht.

4.4 Ausblick

In unseren Untersuchungen wurden zwei genetische Mechanismen beobachtet, die zum Funktionsverlust von *BTNL2* führen können und somit möglicherweise für die Sarkoidose prädisponieren. In dieser Arbeit wurde gezielt auf *BTNL2* als Suszeptibilitäts-gen fokussiert. Dabei bleibt *BTNL2* ein wichtiger Faktor, ist jedoch nicht einzig ausschlaggebend für die Auslösung der Krankheit und muss im Rahmen verschiedener prädisponierender Faktoren betrachtet werden. Die individuell unterschiedliche Bedeutung für den jeweiligen genetischen Prozess der Krankheitsentstehung unterstreicht den polyätiologischen Charakter dieser komplexgenetischen Erkrankung. Zukünftig ist zu klären, wie relevant *BTNL2* im speziellen und mit welchem Maß an Bedeutung generell die endogenen und exogenen Komponenten am Entstehungsprozess der Sarkoidose beteiligt sind. Diese Zusammenhänge werden Gegenstand nachfolgender Untersuchungen sein.

In Zukunft sollen weitere genomweite Assoziationsstudien bei Sarkoidose-Patienten durchgeführt werden, um über die Identifizierung neuer Veränderungen, Mutationstypen und neuer Gene weitere Einblicke in die genetische Ursache der Sarkoidose zu erhalten. Größere Kohorten als bisher sind hierfür notwendig, um eine für die Bevölkerung allgemeingültigere Aussage über die

untersuchten Zusammenhänge zu treffen. Ähnlich wie SNPs sollen auch Copy number variations (CNV) in neueren Assoziationsstudien als genetische Marker dienen. CNVs bezeichnen die Varianten bzw. Anzahl von Kopien eines bestimmten Gens im Genom und können für das Individuum spezifisch in nur einer, drei oder auch höherer Kopienzahl vorliegen. Mit Hilfe neuer Genchips ist es künftig möglich bis zu 1,8 Millionen genetische Marker im initialen Durchlauf einer Genuntersuchung auf Assoziation zu prüfen, was eine höchste Abdeckung des Genoms erlaubt. Kandidatenregionen und Kandidatengene können so effizienter mittels Feinkartierung auf für die Sarkoidose prädisponierende Veränderungen untersucht werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Sarkoidose repräsentiert eine entzündliche Multisystemerkrankung ungeklärter Ätiologie, die in akuter oder chronischer Form verlaufen kann. Vor allem Erwachsene jungen und mittleren Alters sind betroffen und zeigen meist eine bilaterale Lymphadenopathie und eine Manifestation der Lunge, doch auch nahezu jedes andere Organ kann betroffen sein. Die Sarkoidose wird zu den komplexgenetischen Erkrankungen gezählt, die durch ein interagierendes Geschehen multipler endogener und exogener Faktoren bedingt werden. Ungleiche Prävalenzen in ethnisch verschiedenen Bevölkerungsgruppen und das familiär gehäufte Auftreten unterstreichen dabei die Vermutung einer genetischen Grundlage. Mit *BTNL2* wurde kürzlich ein für die Sarkoidose prädisponierendes Gen erkannt, auf dem der assoziierte SNP rs2076530G>A einen Funktionsverlust des Transkripts verursacht.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein Fragebogen erstellt, der am Beispiel der Sarkoidose die Erhebung von Kollektiven für die Analyse komplexgenetischer Erkrankungen erlaubt. Die detaillierte Befragung der Organbeteiligung zum Zeitpunkt der Diagnose und nach 24 Monaten ermöglicht eine Verlaufsbeurteilung des einzelnen Patienten und eine diesbezüglich statistische Bewertung der Kohorte. Der Fragebogen soll zukünftig an größerer Patientenzahl praktisch eingesetzt werden.

Im zweiten, experimentellen Teil wurde *BTNL2* auf weitere molekulare Mechanismen untersucht, die für die Sarkoidose prädisponieren. Hierfür wurde die DNA 20 selektierter Sarkoidose-Patienten aus Blut-Leukozyten und befallenen Lymphknotenbiopsien extrahiert. Einige Proben lagen wie erwartet aufgrund der Art ihrer Fixierung und Aufbewahrung in zu niedriger Qualität vor, doch konnten 9 von 20 Proben mittels PCR amplifiziert und dann sequenziert werden. Die Genotypisierung ergab eine somatische Mutation bei einem für obigen Polymorphismus heterozygoten Patienten. Es ist nicht gesichert, ob die Mutation auf dem intakten oder bereits geschädigten Allel liegt, und ob diese folglich zum Funktionsverlust des Gens und damit zur Prädisposition für Sarkoidose führt. Dennoch eröffnet dieser Fund den Weg eines neuen Modells der somatischen Mutation in der Sarkoidose-Entstehung und bestätigt die bedeutende Rolle von *BTNL2* für die Erkrankung. Bei einer weiteren für das G-Allel homozygoten Patientin konnten vier benachbarte Keimbahnmutationen gefunden werden, die mittels Haplotypanalyse alle auf einem Allel nachgewiesen wurden. Möglicherweise hat die Fülle von vier Mutationen bei dieser Patientin zum Funktionsverlust eines Transkripts geführt und damit die

Entstehungswahrscheinlichkeit der Sarkoidose erhöht. Bei drei anderen Patienten wurde die Deletion c.450delC im Exon 3 identifiziert, woraufhin das Auftreten dieser Deletion im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie am erweiterten Kollektiv von 210 Patienten und 201 gesunden Personen beobachtet wurde. Die Genotypverteilung ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Sarkoidose und der untersuchten Veränderung, so dass geschlussfolgert wurde, dass das Exon 3 vermutlich kein kodierender Abschnitt von *BTNL2* ist. Um die funktionelle Bedeutung des Exon 3 für *BTNL2* exakter definieren zu können, ist es jedoch entscheidend dies zukünftig auch auf RNA-Ebene nachzuweisen.

BTNL2 bleibt als Suszeptibilitätsgen ein wichtiger Faktor, ist jedoch nicht einzig ausschlaggebend für die Auslösung der Sarkoidose und muss im Rahmen verschiedener prädisponierender Faktoren betrachtet werden. Die individuell unterschiedliche Bedeutung für den jeweiligen genetischen Prozess der Krankheitsentstehung unterstreicht den polyätiologischen Charakter dieser komplexgenetischen Erkrankung. Zukünftig ist zu klären, wie relevant *BTNL2* im speziellen und mit welchem Maß an Bedeutung generell die endogenen und exogenen Komponenten am Entstehungsprozess der Sarkoidose beteiligt sind. In nachfolgenden Untersuchungen sollte an größeren Kollektiven die somatische Mutation bestätigt und *BTNL2* auf weitere prädisponierende Mechanismen untersucht werden. Genomweite Assoziationsstudien mit neusten Genchip-Technologien eröffnen zudem die Möglichkeit, über die Identifizierung neuer Veränderungen, Mutationstypen und neuer Gene weitere Einblicke in die genetische Ursache der Sarkoidose zu erhalten.

6. ANHANG

Sarkoidose-Fragebogen:

Choose Patient

Save data

Clear data

Version 1.2

ID	<input type="text"/>	ID will be automatically assigned - do not change!
D- number	<input type="text"/>	
center	<input type="text"/>	e.g. UKB= Uniklinikum Bonn
date of issue (last supplementation)	<input type="text"/>	[year/mm/dd]
Date of birth	<input type="text"/>	[year/mm/dd]
Sex	<input type="text"/>	1=male, 2=female
Height (present-day)	<input type="text"/>	[cm]
Weight (present-day)	<input type="text"/>	[kg]
Smoking history	<input type="text"/>	0=never, 1=in the past, 2=currenty
Cumulated packyears	<input type="text"/>	
Date of first manifestation (initial diagnosis)	<input type="text"/>	[year/mm/dd]
Date of first visit at the center	<input type="text"/>	[year/mm/dd]
Observation period at the center	<input type="text"/>	[months]
Is the patient a twin?	<input type="text"/>	0=no, 1=yes, monozygotic twin, 2=yes, fraternal twin
Origin: Are all grandparents white coloured ?	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
If no please give information about all 4 grandparents	<input type="text"/>	
Is there any history of familial sarcoidosis ?	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
If yes please give information which relative	<input type="text"/>	
History of oncologic or rheumatic or Crohns disease ?	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
History of Type1 allergy ?	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Sarcoidosis was proven histologically	<input type="text"/>	0=no, 1=yes. Only patients with clear Loeffgren syndrome should be included without any proof by biopsy
Presence of (minimal) caseating granuloma	<input type="text"/>	0=no, 1=yes histologically proven sarcoidosis with minimal caseating granuloma
Histologic evidence of fibrosis	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Is there any extrapulmonary organ involvement ?	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Course of disease		
Acute onset	<input type="text"/>	0=no, 1=yes patient presented initially with malaise (e.g. fever/ subfebril, night sweat, weight loss, abnormal
Subacute onset	<input type="text"/>	0=no, 1=yes patient presented initially not with malaise
Loeffgren syndrome	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (definition: evidence of bilhiliary lymph node swelling in chest x-ray, erythema nodosum, (arthritis not
Incidental diagnosis	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Spontaneous resolution	<input type="text"/>	0=no, 1=yes received no immunosuppressive treatment, clinical remission (malaise, dyspnea...)
Number of relapses	<input type="text"/>	
Heerfordt syndrome	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (definition: evidence of swollen parotid gland, uveitis, facial nerve paresis)
clinical course	<input type="text"/>	0=acute, 1=chronic (definition: more than 2 years or 2 episodes in a lifetime)

- - - -

Prednisolone treatment

Was Prednisolone treatment required at all?	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Prednisolone treatment required at initial diagnosis	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Requirement for prednisolone treatment at any point in time	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Requirement for additional immunosuppressive treatment	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Requirement for another course of prednisolone treatment within 24 months	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (if the patient requires prednisolone therapy for more than 1 year, please enter yes)
Could you recognize an improvement/ positive response to prednisolone treatment	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (e.g. improvement in pulmonary function test: TLC% > 10%, FVC% > 10%, DLCO% > 15%)

Rationale for immunosuppressive therapy ?

Pulmonary function loss	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Clinical symptoms: cough/ dyspnea	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Clinical symptoms: fatigue, fever, weight loss,...	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Extrapulmonary organ involvement (e.g. cerebral, renal, myocardial,...)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes

Radiologic type and pulmonary function (at initial diagnosis)

Radiologic type (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	[0=0, 1=I, 2=II, 3=III, 4=IV]
Spontaneous resolution of radiologic signs	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Radiologic type (at the end of observation time)	<input type="text"/>	[0=0, 1=I, 2=II, 3=III, 4=IV]
Radiologic course (within the radiologic type, at the end of observation time)	<input type="text"/>	0=deteriorated, 1=improved, 2=stable
Pulmonary function at initial diagnosis	<input type="text"/>	0=normal, 1=pulmonary function is limited
Pulmonary function within 2 years	<input type="text"/>	0=improved (TLC/VC improved > 10% percent predicted), 1= stable, 2= declined (TLC/VC declined > 10% percent predicted)
CO-Diffusion capacity	<input type="text"/>	0=improved (DLCO improved > 15% percent predicted), 1= stable, 2= declined (DLCO declined > 15% percent predicted)

Module 1, general symptoms**Symptoms at initial diagnosis**

Cough (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Dyspnoe at exertion (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Fatigue or fever or night sweat or weight loss (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes
Arthralgia (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes

Module 2, organ involvement**Organ involvement at initial diagnosis**

Pulmonary involvement (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes, 3=not known
Bronchial (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (endobronchial aspect), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Parenchymal (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically (CT-scan), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Pleural (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically (CT-scan), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Swollen lymph nodes (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes 3=not known
Hilar / mediastinal (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes(CT-scan, ultrasound, MRI), 2=yes biopsy proven, 9=not known
Cervical (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (CT-scan, ultrasound, MRI), 2=yes biopsy proven, 9=not known
Axillary (initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (CT-scan, ultrasound, MRI), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Inguinal (initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (CT-scan, ultrasound, MRI) 2=yes biopsy proven, 3=not known
Abdominal (initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (CT-scan, ultrasound, MRI), 2=yes biopsy proven, 3=not known

Skin involvement (initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Scars (initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
E. nodosum (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Eyes (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Retinitis (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Scleritis/ Uveitis (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Conjunctivitis (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Central nervous system (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes, 3=not known
Facial palsy (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
N. Opticus involvement (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Cerebral granuloma (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (MRI-diagnosis), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Involvement of pituitary gland (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (MRI-diagnosis), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Meningitis (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (MRI-diagnosis and liquor puncture), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Polyneuropathy (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (ENG), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Small fibre neuropathy (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (ENG), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Swollen Glands	<input type="text"/>	0=no, 1=yes 3=not known
Salivary gland G. parotis/ submandibularis (initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (Sicca-Syndrome + swollen glands), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Lachrymal gland (initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (Sicca-Syndrome + swollen glands), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Signs of cardiac involvement (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes 3=not known
ECG-alteration (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (bundle block), 3=not known
Myocarditis / cardiomyopathy (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically (echocardiography, coronarangiography without pathologic findings), 2=yes 3=no, 1=yes, 3=not known
Pericardium effusion (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes, 3=not known
Signs of hepatic involvement (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes, 3=not known
Biliary duct (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (ultrasound, laboratory findings), 2=biopsy proven, 3=not known
Hepatic granuloma (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (ultrasound, CT-scan, laboratory findings), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Spleen (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (enlargement seen at CT-scan, ultrasound, (thrombocytopenia)), 2=histologically proven, 3=not
Signs of renal involvement (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes, 3=not known; hypercalcaemia or parenchymal involvement
Renal granuloma (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Nephrocalcinosis / Nephrolithiasis (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes hypercalcaemia or calcium-crystal-stone, 3=not known
Hypercalcurie (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes 3=not known
Muscle (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Arthritis (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven (puncture), 3=not known
Bone (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (radiologic signs: cystic changes), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Bone marrow (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (leukopenia, thrombopenia, anemia), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Tonsil (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Gut (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Appendix (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Testes (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Ovary / Uterus (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Mamma (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known

Organ involvement in the course of disease

Pulmonary involvement (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes, 3=not known
Bronchial (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (endobronchial aspect), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Pulmonary parenchymal (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically (CT-scan), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Pleural (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically (CT-scan), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Swollen lymph nodes (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes 3=not known
Hilar / mediastinal (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes(CT-scan, ultrasound, MRI), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Cervical (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (CT-scan, ultrasound, MRI), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Axillary (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (CT-scan, ultrasound, MRI), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Inguinal (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (CT-scan, ultrasound, MRI) 2=yes biopsy proven, 3=not known
Abdominal (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (CT-scan, ultrasound, MRI), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Skin involvement (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Scar involvement (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
E. nodosum (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Eyes (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Retinitis (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Scleritis (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Conjunctivitis (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Central nervous sytem (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes, 3=not known
Facial palsy (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
N. Opticus involvement (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Cerebral granuloma (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (MRI-diagnosis), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Involvement of pituitary gland (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (MRI-diagnosis), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Meningitis (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (MRI-diagnosis and liquor puncton), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Polyneuropathy (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (ENG), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Small fibre neuropathy (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (ENG), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Swollen Glands (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes 3=not known
Salivary gland G. parotis/ submandibularis (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (Sicca-Syndrome + swollen glands), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Lachrymal gland (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (Sicca-Syndrome + swollen glands), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Signs of cardiac involvement (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes 3=not known
ECG-alteration (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (bundle blocks), 3=not known
Myocarditis / cardiomyopathy (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically (echocardiography, coronarangiography without pathologic findings), 2=yes
Pericardium effusion (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes, 3=not known
Signs of hepatic involvement (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes, 3=not known
Biliary duct (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (ultrasound, laboratory findings), 2=biopsy proven, 3=not known
Hepatic granuloma (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (ultrasound, CT-scan, laboratory findings), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Spleen (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (enlargement seen at CT-scan, ultrasound, (thrombocytopenia)), 2=histologically proven, 3=not

Objective: please state organ involvement at the end of observation period (2 years following first data set entry; no further biopsy is necessary, if the diagnosis of organ involvement was already established. Ultrasound or CT-scan proven diagnosis is sufficient.

Signs of renal involvement (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes, 3=not known; hypercalcaemia or parenchymal involvement
Renal granuloma (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Nephrocalcinosis / Nephrolithiasis (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes hypercalcaemia or calcium-crystal-stone, 3=not known
Hypercalcurie (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes 3=not known
Muscle (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Arthritis (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven (puncture), 3=not known
Bone (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes radiologic signs (cystic changes), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Bone marrow (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes (leukopenia, thrombopenia, anemia), 2=yes biopsy proven, 3=not known
Tonsil (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Gut (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Appendix (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Testes (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Ovary / uterus (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known
Mamma (in the course of disease)	<input type="text"/>	0=no, 1=yes clinically, 2=yes biopsy proven, 3=not known

Module 3, pulmonary function test

Pulmonary function test at initial diagnosis

time between initial diagnosis and PFT	<input type="text"/>	Objective: pulmonary function test at initial diagnosis (within 1 month) [months]. If the patient presented earlier in the course of disease, please give a minus.
PO ₂ (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	[mmHg]
PCO ₂ (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	[mmHg]
PO ₂ at maximal exertion (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	[mmHg]
maximal exertion at ? Watt effort	<input type="text"/>	[Watt]
DLCOc (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	[%], hemoglobin corrected, single breath
R tot (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	[kPa*s/l]
RV (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	[ml]
VC (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	[ml]
Ist/Soll VC (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	[%]
TLC (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	[ml]
FEV ₁ (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	[ml]
Ist/Soll FEV ₁ (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	[%]
FEV ₁ / VC In (at initial diagnosis)	<input type="text"/>	[%]

Pulmonary function test at the end of the observation period

time between initial diagnosis and PFT	<input type="text"/>	Objective: pulmonary function test 24 months after initial diagnosis. [months]
PO ₂ (after 24 months)	<input type="text"/>	[mmHg]
PCO ₂ (after 24 months)	<input type="text"/>	[mmHg]
PO ₂ at maximal exertion (after 24 months)	<input type="text"/>	[mmHg]
maximal exertion at ? Watt effort	<input type="text"/>	[Watt]
DLCOc (after 24 months)	<input type="text"/>	[%], hemoglobin corrected
R tot (after 24 months)	<input type="text"/>	[kPa*s/l]
RV (after 24 months)	<input type="text"/>	[ml]
VC (after 24 months)	<input type="text"/>	[ml]
Ist/Soll VC (after 24 months)	<input type="text"/>	[%]
TLC (after 24 months)	<input type="text"/>	[ml]
FEV ₁ (after 24 months)	<input type="text"/>	[ml]

Module 4, laboratory chemistry**Laboratory chemistry at initial diagnosis**

time between initial diagnosis and Laboratory chemistry

Leucocytes (at initial diagnosis)

C-reactive-protein (at initial diagnosis)

ACE (at initial diagnosis)

ACE- genotype

sIL-2 (at initial diagnosis)

Objective: laboratory chemistry at initial diagnosis. If the patient was presented later in the course of disease, please state first laboratory chemistry at your center. [months]

[count/ μ l]

[mg/l]

[U/l]

1=DD (homozygote for deletion allele), 2=DI (heterozygote), 3=II (homozygote for insertion allele)

[U/l]

Laboratory chemistry at the end of observation period

time between initial diagnosis and Laboratory chemistry

ACE (after 24 months)

sIL-2 (after 24 months)

Objective: laboratory chemistry at the end of observation period. If possible 24 months after first data set entry [months]

[U/l]

[U/l]

Module 5, bronchoalveolar lavage

time between initial diagnosis and BAL

Was BAL performed while patient received immunosuppressive therapy ?

BAL-Macrophages %

BAL-Lymphocytes %

BAL-Neutrophils %

BAL-Eosinophils %

BAL- Mastcells %

CD4/ CD8 -ratio

Total cell count (per 100ml BAL)

[months]

0=no, 1=yes, 2=not known

[%]

[%]

[%]

[%]

[%]

[%]

[10⁶ cells/100ml BAL]**Module 6, high resolution computed tomography**

time between initial diagnosis and HRCT

Thickening or irregularities of bronchovascular bundle

Septal and non-septal lines

Intraparenchymal nodules

Ground glass attenuation

Parenchymal consolidation

Enlargement of hilar or mediastinal lymph nodes

Pleural involvement

[months]

0=no, 1=yes

0=no, 1=yes

0=no, 1=yes

0=no, 1=yes

0=no, 1=yes

0=no, 1=yes

0=no, 1=yes

7. LITERATURVERZEICHNIS

- American Thoracic Society (ATS)**, the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG). Statement on Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 736-755
- Ansorge W**, Sproat B, Stegemann J, Schwager C, Zenke M. Automated DNA sequencing: Ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 4593-4602
- Bernstein JL**, Thompson WD, Casey G, DiCioccio RA, Whittemore AS, Diep AT, Thakore SS, Vaziri S, Xue S, Haile RW. Comparison of techniques for the successful detection of BRCA1 mutations in fixed paraffin-embedded tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 809-814
- Brennan NJ**, Crean P, Long JP, Fitzgerald MX. High prevalence of familial sarcoidosis in an Irish population. *Thorax* 1984; 39: 14-18
- Cardon LR, Palmer LJ**. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 2003; 361: 598-604
- Costabel U**. Immunologische Befunde bei Sarkoidose. In: Kirsten D, Magnussen H, Hrsg. Sarcoidose Up-date 2000. Großhansdorf: Interpneu, 2000: 79-90
- Costabel U**. Sarcoidosis: Clinical update. *Eur Respir J Suppl* 2001; 32: 56-68
- Costabel U**, Guzman J, Drent M. Diagnostic approach to sarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, Hrsg. Sarcoidosis. Wakefield: The Charlesworth Group, 2005: 259-264
- Culver DA**, Newman LS, Kavuru MS. Gene-environment interactions in sarcoidosis: challenge and opportunity. *Clin Dermatol* 2007; 25: 267-275
- De Vries J**, Michielsen H, Van Heck GL, Drent M. Measuring fatigue in sarcoidosis: the Fatigue Assessment Scale (FAS). *Br J Health Psychol* 2004; 9: 279-291
- Drake WP**, Pei Z, Pride DT, Collins RD, Cover TL, Blaser MJ. Molecular analysis of sarcoidosis tissues for Mycobacterium species DNA. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1334-1341
- Drent M**, Jacobs JA, Cobben NA, Costabel U, Wouters EF, Mulder PG. Computer program supporting the diagnostic accuracy of cellular BALF analysis: a new release. *Respir Med* 2001; 95: 781-786

- Ebe Y**, Ikushima S, Yamaguchi T, Kohno K, Azuma A, Sato K, Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y. Proliferative response of peripheral blood cells and levels of antibody to recombinant protein from *Propionibacterium acnes* DNA expression library in Japanese patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2000; 17: 256-265
- Edmonstone WM**. Sarcoidosis in nurses: Is there an association? *Thorax* 1988; 43: 342-343
- Eishi Y**, Suga M, Ishige I, et al. Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 198-204
- Erickson RP**. Somatic gene mutation and human disease other than cancer. *Mutat Res* 2003; 543: 125-136
- Ezzie ME, Crouser ED**. Considering an infectious etiology of sarcoidosis. *Clin Dermatol* 2007; 25: 259-266
- Ferlinz R**. *Pneumologie in Klinik und Praxis*. Stuttgart: Thieme, 1994
- Fisseni HJ**. *Lehrbuch der psychologischen Diagnostik*. Göttingen: Hogrefe, 2004
- Fité E**, Fernández-Figueras MT, Prats R, Vaquero M, Morera J. High prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in biopsies from sarcoidosis patients from Catalonia, Spain. *Respiration* 2006; 73: 20-26
- Gollob MH**, Jones DL, Krahn AD, Danis L, Gong XQ, Shao Q, Liu X, Veinot JP, Tang AS, Stewart AF, Tesson F, Klein GJ, Yee R, Skanes AC, Guiraudon GM, Ebihara L, Bai D. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2006; 354: 2677-2688
- Heyll A**, Meckenstock G, Aul C, Söhngen D, Borchard F, Hadding U, Mödder U, Leschke M, Schneider W. Possible transmission of sarcoidosis via allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 161-164
- Holzelova E**, Vonarbourg C, Stolzenberg MC, Arkwright PD, Selz F, Prieur AM, Blanche S, Bartunkova J, Vilmer E, Fischer A, Le Deist F, Rieux-Laucat F. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N Engl J Med* 2004; 351: 1409-1418
- Iannuzzi MC**. Advances in the genetics of sarcoidosis. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4(5): 457-460
- Iannuzzi MC, Rybicki BA**. Genetics of sarcoidosis: candidate genes and genome scans. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 108-116

- Izbicki G**, Chavko R, Banauch GI, Weiden MD, Berger KI, Aldrich TK, Hall C, Kelly KJ, Prezant DJ. World Trade Center "sarcoid-like" granulomatous pulmonary disease in New York City Fire Department rescue workers. *Chest* 2007; 131: 1414-1423
- Janning W, Knust E**. Genetik. Stuttgart - New York: Thieme, 2004
- Kayser M**, Liu F, Janssens AC, Rivadeneira F, Lao O, van Duijn K, Vermeulen M, Arp P, Jhamai MM, van Ijcken WF, den Dunnen JT, Heath S, Zelenika D, Despriet DD, Klaver CC, Vingerling JR, de Jong PT, Hofman A, Aulchenko YS, Uitterlinden AG, Oostra BA, van Duijn CM. Three genome-wide association studies and a linkage analysis identify HERC2 as a human iris color gene. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 411-423
- Kern DG**, Neill MA, Wrenn DS, Varone JC. Investigation of a Unique Time-Space Cluster of Sarcoidosis in Firefighters. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 974-980
- Kirsten D**, Magnussen H. Die Diagnostik und Differentialdiagnostik der Lungensarkoidose. In: Kirsten D, Magnussen H, Hrsg. Sarcoidose Up-date 2000. Großhansdorf: Interpneu, 2000: 105-117
- Kneitz C**, Wilhelm M, Kraus MR, Tony HP, Tschammler A, Jany B. Sarcoidosis in monozygotic twins. *Dtsch Med Wochenschr* 1995; 120: 867-873
- Kummer F**. Epidemiologie der Sarkoidose. In: Kirsten D, Magnussen H, Hrsg. Sarcoidose Up-date 2000. Großhansdorf: Interpneu, 2000: 33-40
- Li H**, Wetten S, Li L, St Jean PL, Upmanyu R, Surh L, Hosford D, Barnes MR, Briley JD, Borrie M, Coletta N, Delisle R, Dhalla D, Ehm MG, Feldman HH, Fornazzari L, Gauthier S, Goodgame N, Guzman D, Hammond S, Hollingworth P, Hsiung GY, Johnson J, Kelly DD, Keren R, Kertesz A, King KS, Lovestone S, Loy-English I, Matthews PM, Owen MJ, Plumpton M, Pryse-Phillips W, Prinjha RK, Richardson JC, Saunders A, Slater AJ, St George-Hyslop PH, Stinnett SW, Swartz JE, Taylor RL, Wherrett J, Williams J, Yarnall DP, Gibson RA, Irizarry MC, Middleton LT, Roses AD. Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2008; 65: 45-53
- 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
- Lienert GA**. Testaufbau und Testanalyse. Weinheim: Psychologie Verlags Union, 1989
- Lopez-Campos JL**, Rodriguez-Rodriguez D, Rodriguez-Becerra E, Michavila IA, Guerra JF, Hernandez FJ, Casanova A, de Córdoba Gamero JF, Ortiz AR, Arellano-Orden E,

Montes-Worboys A. Association of the 3050G>C Polymorphism in the Cyclooxygenase 2 Gene with Systemic Sarcoidosis. *Arch Med Res* 2008; 39: 525-530

Lynch JP 3rd, Ma YL, Koss, MN, White ES. Pulmonary Sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28: 53-74

Michielsen HJ, Drent M, Peros-Golubicic T, De Vries J. Fatigue is associated with quality of life in sarcoidosis patients. *Chest* 2006; 130: 989-994

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215

Moller DR. Rare manifestations of sarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, Hrsg. *Sarcoidosis*. Wakefield: The Charlesworth Group, 2005: 233-250

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350

Nakamura H, Hashimoto T, Yagyuu H, Sudou A, Sarashina G, Hatao E, Tuchida F, Adachi H, Kishi K, Kashiwabara K, Matsuoka T. Sarcoidosis in a man and his identical twin sons. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2000, 38: 452-455

Newman LS, Rose CS, Bresnitz EA, Rossman MD, Barnard J, Frederick M, Terrin ML, Weinberger SE, Moller DR, McLennan G, Hunninghake G, DePalo L, Baughman RP, Iannuzzi MC, Judson MA, Knatterud GL, Thompson BW, Teirstein AS, Yeager H Jr, Johns CJ, Rabin DL, Rybicki BA, Cherniack R; ACCESS Research Group. A case control etiologic study of sarcoidosis: environmental and occupational risk factors. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1324-1330

Newman LS. Aetiologies of sarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, Hrsg. *Sarcoidosis*. Wakefield: The Charlesworth Group, 2005: 23-48

Nguyen T, Liu XK, Zhang Y, Dong C. BTNL2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation. *J Immunol* 2006; 176: 7354-7360

Noor A, Knox KS. Immunopathogenesis of sarcoidosis. *Clin Dermatol* 2007; 25:250-258

Nunes H, Bouvry D, Soler P, Valeyre D. Sarcoidosis. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2: 46

Ohara K, Judson MA, Baughman RP. Clinical aspects of ocular sarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, Hrsg. *Sarcoidosis*. Wakefield: The Charlesworth Group, 2005: 188-209

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

- Parkes SA**, Baker SB, Bourdillon RE, Murray CR, Rakshit M. Epidemiology of sarcoidosis in the Isle of Man--1: A case controlled study. *Thorax* 1987; 42: 420-426
- Pietinalho A**, Ohmichi M, Hirasawa M, Hiraga Y, Löfroos AB, Selroos O. Familial sarcoidosis in Finland and Hokkaido, Japan--a comparative study. *Respir Med* 1999; 93: 408-412
- Plenge RM**, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J, Pe'er I, Burtt NP, Blumenstiel B, DeFelice M, Parkin M, Barry R, Winslow W, Healy C, Graham RR, Neale BM, Izmailova E, Roubenoff R, Parker AN, Glass R, Karlson EW, Maher N, Hafler DA, Lee DM, Seldin MF, Remmers EF, Lee AT, Padyukov L, Alfredsson L, Coby J, Weinblatt ME, Gabriel SB, Purcell S, Klareskog L, Gregersen PK, Shadick NA, Daly MJ, Altshuler D. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2007; 39: 1477-1482
- Prasse A**, Katic C, Germann M, Buchwald A, Zissel G, Muller-Quernheim J. Phenotyping Sarcoidosis from a Pulmonary Perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 330-336
- Puck JM, Straus SE**. Somatic mutations - not just for cancer anymore. *N Engl J Med* 2004; 351: 1388-1390
- Renz-Polster H**, Krautzig S, Braun J. *Basislehrbuch Innere Medizin*. München - Jena: Elsevier, 2004
- Risch N**. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000; 405: 847-856
- Rossmann MD, Kreider ME**. Lesson learned from ACCESS (A Case Controlled Etiologic Study of Sarcoidosis). *Proc Am Thorac Soc*. 2007; 4: 453-456
- 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**, Walewski JL, Maliarik MJ, et al. The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and Whites. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 491-499
- Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5463-5467
- Schurmann M**, Reichel P, Muller-Myhsok B, Schlaak M, Muller-Quernheim J, Schwinger E. Results from a genome-wide search for predisposing genes in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 840-846
- Sharma OP**. Robert Willian remembered. *J Am Acad Dermatol* 1983; 9: 971-976

- Sharma OP.** Definition and history of sarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, Hrsg. Sarcoidosis. Wakefield: The Charlesworth Group, 2005: 1-12
- Sharma OP.** Sarcoidosis: A historical perspective. *Clin Dermatol* 2007; 25: 232-241
- Sjöholm MI,** Hoffmann G, Lindgren S, Dillner J, Carlson J. Comparison of archival plasma and formalin-fixed paraffin-embedded tissue for genotyping in hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 251-255
- Sladek R,** Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007; 445: 881-885
- 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
- Stammers M,** Rowen L, Rhodes D, Trowsdale J, Beck S. BTL-II: a polymorphic locus with homology to the butyrophilin gene family, located at the border of the major histocompatibility complex class II and class III regions in human and mouse. *Immunogenetics* 2000; 51: 373-382
- Talaulikar D,** Gray JX, Shadbolt B, McNiven M, Dahlstrom JE. A comparative study of the quality of DNA obtained from fresh frozen and formalin-fixed decalcified paraffin-embedded bone marrow trephine biopsy specimens using two different methods. *J Clin Pathol* 2008; 61: 119-123
- Tinschert S,** Naumann I, Stegmann E, Buske A, Kaufmann D, Thiel G, Jenne DE. Segmental neurofibromatosis is caused by somatic mutation of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 455-459
- Tromp G,** Kuivaniemi H, Raphael S, Ala-Kokko L, Christiano A, Considine E, Dhulipala R, Hyland J, Jokinen A, Kivirikko S, Korn R, Madhatheri S, McCarron S, Pulkkinen L, Punnett H, Shimoya K, Spotila L, Tate A, Williams CJ. Genetic linkage of familial granulomatous inflammatory arthritis, skin rash, and uveitis to chromosome 16. *Am J Hum Genet.* 1996; 59: 1097-1107
- Vagal AS,** Shipley R, Meyer CA. Radiological manifestations of sarcoidosis. *Clin Dermatol* 2007; 25: 312-325

- 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
- Victor A**. Bewertung genetischer Forschungsergebnisse - Methoden und vermeintbare Fehler. *Gesundheit + Gesellschaft Wissenschaft* 04/07; 14-22
- Ziemssen F**, Schnepf R, Pfeiffer A. Die SSCP (Single strand conformation polymorphism)-Analyse zum Nachweis von Punktmutationen. *Med Klin (Munich)* 2001; 96: 515-520
- Zugi V**, Videnovi -Ivanov J, Gvozdenovi B. St. George's respiratory questionnaire (SGRQ) in sarcoidosis patients. *Med Pregl.* 2005; 58: 71-74

8. DANKSAGUNG

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Christian Grohé für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas danken. Er hat mich als Doktorvater mit seiner wissenschaftlichen Erfahrung und Hilfsbereitschaft stets begleitet und so wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Stefan Pabst danke ich sehr herzlich für die Betreuung meiner Arbeit, seine durchgehende Unterstützung und unkomplizierte, freundliche Art bei allen Besprechungen. Besonders die Endphase der Arbeit hat er mit viel Mühe und Geduld begleitet.

Sehr herzlich danke ich Herrn Dr. Bernd Wollnik für seine Betreuung und Unterstützung insbesondere in allen humangenetischen Fragen. Er hat meine Arbeit mit seiner Geduld, Diskussionsbereitschaft und vielen Anregungen sehr bereichert. Der Arbeitsgruppe Dr. Wollnik im Institut für Humangenetik der Uniklinik Köln danke ich für ihre Unterstützung und die so entspannte und angenehme Atmosphäre im Labor. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. Yun Li, der mich in die Laborarbeit eingeführt und alle Experimente durchgehend mit großer Hilfsbereitschaft und seinem kompetenten Wissen begleitet hat.

Frau Dr. Edyta Rohmann danke ich herzlich für die Durchsicht meiner Arbeit und ihre wertvollen Tipps.

Den Herren Dr. Wolfgang Schulte und Dr. Ulrich Gerigk vom Malteser Krankenhaus Bonn und Herrn Dr. Martin Buchenroth vom Johanniter Krankenhaus Bonn danke ich sehr für ihre Hilfsbereitschaft bei der Rekrutierung des Patientenkollektivs. Frau PD Dr. Eva Wardelmann vom Institut für Pathologie der Uniklinik Bonn sage ich Dank für ihre fachkundige Unterstützung bei der Auswahl der Lymphknoten-Biopsien.

Nicht zuletzt bin ich meiner Familie sehr, sehr dankbar für ihr Vertrauen und all ihre liebevolle Unterstützung während der Doktorarbeit und meines ganzen Studiums!