

Einfluss des TGF- $\beta_3$  17369 T/C -Polymorphismus auf die Entstehung und den Verlauf  
der pulmonalen Sarkoidose

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

Janina Stefanie Schönau  
aus Aachen

2010

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

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

Tag der Mündlichen Prüfung: 21.05.2010

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

meinen Eltern gewidmet



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	7
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	10
2.1	Definition der Sarkoidose	10
2.2	Ätiologie der Sarkoidose	10
2.3	Epidemiologie der Sarkoidose	11
2.4	Symptomatik und Verlauf der Sarkoidose	12
2.5	Diagnostik der Sarkoidose	13
2.5.1	Histologie	13
2.5.2	Schweregradeinteilung und Lungenfunktionsanalyse	14
2.5.3	Ergänzende diagnostische Untersuchungen	15
2.6	Pathologie der Sarkoidose	16
2.7	Pathogenese der Sarkoidose	17
2.8	Molekularbiologischer Hintergrund der Sarkoidose	17
2.9	Pathophysiologie der pulmonalen Sarkoidose	19
2.10	Komplikationen der Sarkoidose	20
2.10.1	Kardiale Sarkoidose	20
2.10.2	Neurosarkoidose	21
2.10.3	Lungenfibrose	21
2.11	Gen-Polymorphismen bei IPF/UIP und Sarkoidose-assoziiierter Lungenfibrose	22
2.12	Transforming Growth Factor- $\beta$ und seine Isoformen	25
2.13	Transforming Growth Factor- $\beta_3$	26
2.14	Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	27
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	28
3.1	Probanden	28
3.2	Single-Nucleotide-Polymorphisms	28
3.3	Materialien	29
3.3.1	Chemikalien	29
3.3.2	Geräte	29

3.3.3	DNA-Polymerase _____	29
3.3.4	Primer _____	30
3.3.5	LightCycler <sup>®</sup> -Sonden _____	30
3.4	Durchführung der Untersuchungen _____	31
3.4.1	Blutentnahme _____	31
3.4.2	Isolierung genomischer DNA aus Vollblut _____	31
3.4.3	DNA-Amplifikation durch PCR _____	31
3.5	Real-Time PCR – LightCycler <sup>®</sup> 1.5 _____	33
3.5.1	Verfahren und Aufbau des LightCycler <sup>®</sup> 1.5 _____	33
3.5.2	Messverfahren _____	34
3.5.3	Schmelzkurvenanalyse _____	35
3.6	Statistik _____	37
3.6.1	Statistische Variablen _____	37
3.6.2	Statistische Verfahren _____	38
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> _____	<b>39</b>
4.1	Beschreibung des TGF- $\beta_3$ 17369 T/C rs3917200- Polymorphismus _____	39
4.2	Statistische Datenanalyse _____	39
4.2.1	Demographische Basisdaten _____	39
4.2.2	Verteilung von Genotypen und Allelfrequenzen des rs 3917200- Polymorphismus des TGF- $\beta_3$ -Gens _____	43
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> _____	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> _____	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> _____	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Publikationen</b> _____	<b>83</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACCESS	A Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis
ACE	Angiotensin-I-Converting-Enzym, Angiotensin-I-Konversionsenzym
ANXA-11	Annexin-11
ATS	American Thoracic Society
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaar
BTNL-2	Butyrophilin-like 2
C	Cytosin
CARD15	Caspase Recruitment Domain
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand
chron.	chronisch
CMA1	Chymase 1, mast cell
CO	Kohlenstoffmonoxid
D	Deletion
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DLco	Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERS	European Respiratory Society
EtOH	Ethanol
FAS	Fatigue Assessment Scale, Müdigkeitsfragebogen
FEV <sub>1</sub>	Forciertes Expiratorisches Volumen in einer Sekunde, Einsekundenkapazität
FL	Fluoreszein

FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FVC	Forcierte Vitalkapazität
G	Guanin
HLA	Human lymphocyte antigene, humanes Lymphozyten-Antigen
HR-CT	High Resolution Computer Tomography, Hochauflösende Computertomographie
I	Insertion
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
IPF	Interstitial Pulmonary Fibrosis, Interstitielle Lungenfibrose
iVC	inspiratory Vital Capacity, inspiratorische Vitalkapazität
k.	keine
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LED	Light Emitting Diode, Leuchtdiode
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl der Merkmalsausprägungen
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
OH <sup>·</sup>	Hydroxylradikal
OR	Odds ratio, Quotenverhältnis
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
Pat.	Patient/en
p <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie



PDGF	Platelet-derived Growth Factor
p <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
rs	Reference SNP
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
SACE	Serum Angiotensin-Converting-Enzyme
sIL-R2	soluble Interleukin-2-Receptor; löslicher Interleukin-2-Rezeptor
sec	Sekunden
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TH <sub>1</sub>	T-Helfer-1-Zellen
TH <sub>2</sub>	T-Helfer-2-Zellen
TLC	Total Lung Capacity, Totale Lungenkapazität
TLCOc SB	Carbon monoxide lung transfer factor in single breath, Hb-korrigierter CO-Transferfaktor (in Single-Breath-Technik)
TLCOc/VA	Carbon monoxide lung transfer factor per alveolar volume, Hb-korrigierter CO-Transferfaktor geteilt durch das Alveolarvolumen
TLR	Toll-like Receptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris-HCl	Trishydroxymethylaminomethan-Salzsäure
UIP	Usual Interstitial Pneumonia, Gewöhnliche interstitielle Pneumonie
VC	Vital Capacity, Vitalkapazität
vs.	versus
WASOG	World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
WHOQOL	World Health Organization Quality of Life, Fragebogen der Weltgesundheitsorganisation zur Erfassung der Lebensqualität

## **2 Einleitung**

### **2.1 Definition der Sarkoidose**

Die Sarkoidose, auch als Morbus Boeck bekannt, ist eine systemisch granulomatöse Erkrankung. Sie präsentiert sich erstmals üblicherweise bei Erwachsenen jungen und mittleren Alters, oftmals als bilaterale Lymphadenopathie, pulmonale Infiltration, sowie in Form von Defekten an Augen und Haut (Hunninghake et al., 1999). Der Befall anderer Organe wie Herz, Leber, Milz, Knochen, Muskeln und nichtpulmonaler Lymphknoten ist ebenso möglich. Laut der American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS)/World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) (2000) ist die Diagnosestellung erst nach klinisch-radiographischen Belegen, unterstützt durch den histologischen Nachweis nichtverkäsender Epitheloidzellgranulome, begründet. Granulome anderer Ursachen sind auszuschließen.

### **2.2 Ätiologie der Sarkoidose**

Die genaue Ätiologie der Sarkoidose ist bisher unbekannt. Die Sarkoidose kann als polyätiologische Erkrankung betrachtet werden. Vermutlich führt eine übersteigerte immunologische Reaktion gegen ein noch unbekanntes infektiöses Agens oder Stoffe aus der Umwelt bei genetisch prädisponierten Individuen zur Granulomformierung.

Die anfänglichen Vermutungen, Sarkoidose sei eine Erkrankung rein infektiösen Ursprungs, haben sich bisher nicht bestätigt (Newman, 2005). So konnte zwar in einer Studie von Saboor et al. (1992) bei der Hälfte der Sarkoidose-Patienten DNA des *Mycobacterium tuberculosis* sowie bei weiteren 20% nichttuberkulöse mykobakterielle DNA identifiziert werden. Die Isolierung sowie der Nachweis einer Kultur dieser Mykobakterien konnte bisher nicht gezeigt werden (Thomeer et al., 2005).

Vielmehr erscheint das Modell einer multifaktoriellen Vererbung am wahrscheinlichsten. Aufgrund von gehäuftem Auftreten der Sarkoidose in Familien und unterschiedlichem Auftreten abhängig vom ethnischen Hintergrund scheint ein genetischer Einfluss die Anfälligkeit für die Entwicklung einer Sarkoidose zu prägen. So zeigten Rybicki et al. (2001) in einer Studie mit 706 Fall-Kontroll-Paaren und Informationen über mehr als 10,000 erstgradig und 17,000 zweitgradig Verwandten bei der weißen Population ein wesentlich höheres familiäres relatives Risiko als bei afroamerikanischen Populationen (OR=18.0 versus 2.8). Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Sarkoidose-Patient von einem weiteren betroffenen Geschwister- oder Elternteil berichtete, war fünf

Mal höher als bei den Kontrollpersonen. Des Weiteren war unter Geschwistern das familiäre relative Risiko am höchsten (OR=5.8). Weltweit liegen bei 3-14% der Fälle eine familiäre Sarkoidose vor (Iannuzzi und Rybicki, 2007).

Auch eine aktuelle Zwillingsstudie von Sverrild et al. (2008) belegt den genetischen Einfluss für die Empfänglichkeit einer Sarkoidose. Dabei wurde bei Zwillingen betroffener monozygoter Brüder oder Schwestern im Vergleich zur allgemeinen Population ein 80-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Sarkoidose festgestellt. Bei dizygoten Zwillingen zeigte sich demgegenüber nur ein 7-fach erhöhtes Risiko.

Trotz dieser Erkenntnisse scheint zusätzlich zu genetischen Prädispositionen die Aussetzung gegenüber bestimmten bisher unbekanntem Umweltfaktoren ausschlaggebend für die Entwicklung einer Sarkoidose zu sein.

### **2.3 Epidemiologie der Sarkoidose**

Aufgrund einer fehlenden präzisen und einheitlichen Definition der Sarkoidose ist bisher eine exakte Quantifizierung der Inzidenz, Prävalenz, Morbidität und Mortalität erschwert. Hinzu kommt die hohe Variabilität der klinischen Präsentation der Sarkoidose. Bei 90% der symptomatischen Patienten konnten der Befall der Lungen oder intrathorakaler Lymphknoten im Laufe der Erkrankung klinisch bewiesen werden, bis zu 30% zeigten eine spontane Remission (Rybicki et al., 1998). Ein chronischer Verlauf zeigte sich in 10-30% der Fälle (Arcasoy et al., 2001), in manchen Fällen mit dem Endstadium einer Lungenfibrose und dauerhaften respiratorischen Symptomen. Dennoch bleibt ein hoher Prozentsatz an Sarkoidose-Patienten ohne jegliche klinische Manifestation.

Die Inzidenz der Sarkoidose wird weltweit auf 16,5/100.000 bei Männern und 19/100.000 bei Frauen geschätzt (Hillerdal et al., 1984). Die Inzidenz in Deutschland wird mit 10 auf 100.000 angegeben (Scharhoff, 1993). In den Vereinigten Staaten reichen die Inzidenzraten von 10,9 in der weißen Bevölkerung bis zu 35,5 in der afroamerikanischen Bevölkerung (Rybicki et al., 1997). Die Lebenszeitinzidenz liegt mit 1,3% bei Frauen höher als bei Männern (1%) und mit 2,4% bei Schwarzen höher als bei Kaukasiern (0,8%) (Hillerdal et al., 1984; Rybicki et al., 1997).

Die Prävalenz der Sarkoidose variiert stark aufgrund unterschiedlicher diagnostischer Methoden für die Diagnosestellung. Anhand von Röntgen-Thorax-Aufnahmen berechneten Siltzbach et al. (1974) demnach eine Prävalenz von 0,2 in Portugal bis zu 64 pro 100.000 in Schweden. Hä-

gerstrand und Linell (1964) untersuchten die Häufigkeit der Sarkoidose anhand von Autopsieberichten in einer bestimmten Population und errechneten eine Prävalenz von 640 pro 100.000. Nach eigenen Schätzungen liegt die Prävalenz im Großraum Köln-Bonn bei ca. 50/100.000 Einwohner (unveröffentlichte Daten).

Auch in Bezug auf das Erkrankungsalter zeigen sich große Variabilitäten. In Japan und skandinavischen Ländern wurde ein Haupterkrankungsalter zwischen 25 und 40 Jahren bei beiden Geschlechtern beobachtet (ATS/ERS/WASOG Committee, 1999; Hillerdal et al., 1984). In der ACCESS-Studie (2001) hingegen stellte sich ein großer Prozentsatz der Frauen bei Diagnosestellung mit durchschnittlich 40 Jahren oder älter vor, währenddessen Männer tendenziell jünger als 40 Jahre waren (Baughman et al., 2001).

Die Mortalitätsrate schwankt zwischen einem und sechs Prozent (Chappell et al., 2000; Hillerdal et al., 1984; Neville et al., 1983).

#### **2.4 Symptomatik und Verlauf der Sarkoidose**

Das Spektrum der Sarkoidose ist sehr vielfältig und kann jedes Organ betreffen. Meist überwiegt jedoch der pulmonale Befall (>90%) sowie in einem Drittel der Fälle der Befall des Lymphsystems (ATS/ERS/WASOG Committee, 1999). Zusätzlich hängt die klinische Präsentation der Sarkoidose von vielen epidemiologischen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Rasse, Dauer der Erkrankung und Grad der Beeinflussung ab. Asymptomatische Präsentationen, Erythema nodosum und Hyperkalzämie sind weitaus häufiger bei Europäern vertreten, während symptomatische und multiviszerales Präsentationen vorwiegend bei Afroamerikanern anzutreffen sind (ATS/ERS/WASOG Committee, 1999; Baughman et al., 2001; Baughman et al., 2003; Nunes et al., 2005; Siltzbach et al., 1974). In der ACCESS-Studie (2001) überwog bei Afroamerikanern der Befall der Augen, der Leber, des Knochenmarks, der extrathorakalen Lymphknoten und der Haut, abgesehen von Erythema nodosum. Hingegen zeigte sich bei Frauen eher ein Befall der Augen, des Gehirns oder ein Erythema nodosum (Baughman et al., 2001).

Die Kombination von Erythema nodosum, (Sprunggelenks-)Arthritis und bilateraler Lymphadenopathie, bekannt als Löfgren-Syndrom, stellt eine akute Form der Sarkoidose mit günstigem Verlauf, häufig mit kompletter spontaner Remission, dar. Grunewald und Eklund (2007) zeigten einen überrepräsentativen Anteil an Frauen mit akutem Verlauf der Sarkoidose und Erythema nodosum.

Hautmanifestationen der Sarkoidose können in unspezifische, wie das Erythema nodosum, und spezifische, wie den Lupus pernio, gegliedert werden.

Die Neurosarkoidose ist eine seltene Form der Sarkoidose. Die Inzidenz unter Sarkoidose-Patienten wird mit 5-15% angegeben (Stern et al., 1985; James und Sharma, 1967). Der Befall des Nervensystems kann sich verschiedenartig manifestieren, so dass sich eine Diagnosestellung anhand der Klinik des Patienten häufig als schwierig darstellt.

Extrathorakale Manifestationen treten nur bei der Hälfte der Patienten auf und sind in 80-90% mit intrathorakalem Befall assoziiert (Nunes et al., 2007).

Typische Merkmale der pulmonalen Sarkoidose wie unproduktiver Husten, Dyspnoe und Brustschmerz treten bei 30-50% der Patienten auf (ATS/ERS/WASOG, 1999). Hier zeigen Röntgen-Thorax-Aufnahmen bei 85-95% der Patienten mit Sarkoidose Abnormalitäten, was den Wert dieser diagnostischen Methode betont (Henke et al., 1986; Hillerdal et al., 1984; Lynch et al., 1997; Neville et al., 1983; Romer, 1982; Scadding, 1961;). Eine bilaterale Lymphadenopathie, das klassische Merkmal einer pulmonalen Sarkoidose, ist bei fast dreiviertel der Patienten nachweisbar (Lynch et al., 2007) und bei 20-50% der Sarkoidose-Patienten zeigen sich Parenchyminfiltrate, meist unter Einbezug der oberen und mittleren Lungenlappen (Baughman et al., 2001; Hillerdal et al., 1984; Lynch et al., 1997, Lynch, 2003).

Dennoch bleiben 30-60% der Patienten asymptomatisch, mit zufälligen Befunden auf Röntgen-Thorax-Aufnahmen (Hillerdal et al., 1984; Lynch et al., 1997; Reich und Johnson, 1985; Reich, 2002).

## **2.5 Diagnostik der Sarkoidose**

Die Diagnostik der Sarkoidose beruht auf der klinisch-radiographischen Präsentation und dem histologischen Nachweis nichtverkäsender Granulome, nach Ausschluss anderer granulomatöser Erkrankungen.

### **2.5.1 Histologie**

Trotz teilweise typischer klinischer und radiologischer Merkmale ist die histologische Bestätigung ausschlaggebend für die Diagnosestellung und für die weitere Behandlung der Sarkoidose. Die flexible fiberoptische Bronchoskopie mit transbronchialer Lungenbiopsie ist bei Patienten mit Verdacht auf eine pulmonale Sarkoidose diagnostisches Mittel der Wahl (Lynch et al., 1997). Die typischen Merkmale der zytologischen Untersuchung beinhalten Lymphozyten, Epitheloid-

zellgranulome, mehrkernige Riesenzellen ohne oder mit geringer Nekrose, Gruppen palisadenartig angeordneter Histozyten sowie eine Negativfärbung für Pilze und säurefeste Bakterien (Cetinkaya et al., 2004; Trisolini et al., 2003). Auch Biopsien von Hautdefekten, peripheren Lymphknoten oder jedem anderen befallenen Organ sollten zur Diagnosesicherung gewonnen werden.

### 2.5.2 Schweregradeinteilung und Lungenfunktionsanalyse

Zur Klassifizierung der pulmonalen Sarkoidose führte Scadding (1961) vor vier Jahrzehnten eine röntgenologische Stadieneinteilung ein, die noch heute von prognostischem Wert ist. Demnach werden anhand des Thorax-Röntgenbefundes folgende Stadien berücksichtigt:

Stadium 0 = Normalbefund

Stadium 1 = Bilaterale Lymphadenopathie

Stadium 2 = Bilaterale Lymphadenopathie mit Lungenbefall

Stadium 3 = Lungenbefall ohne Lymphadenopathie

Stadium 4 = irreversible Lungenfibrose.

Das Stadium 4 ist jedoch nicht universell anerkannt (Lynch et al., 2007).

Abhängig von geographischen Regionen und ethnischen Hintergrund variiert die Inzidenz der einzelnen Stadien. In den meisten skandinavischen Studien wurde eine auffällige Häufigkeit der Stadien 1 und 2 ermittelt, wohingegen in Studien der USA und der britischen Inseln die Stadien 3 und 4 dominierten (Romer, 1982; Hillerdal et al., 1984; Johns et al., 1986; Gottlieb et al., 1997).

Trotz einzelner Ausnahmen verschlechtert sich die Prognose ausgehend von Stadium 1, mit der besten Erwartung bis Stadium 3 oder 4 mit der schlechtesten Erwartung. In 60-90% der Fälle in Stadium 1 tritt eine spontane Remission ein, in 40-70% in Stadium 2, in 10-20% in Stadium 3 und in 0% in Stadium 4 (Hillerdal et al., 1984; Mañá et al., 1999; Neville et al., 1983, Romer, 1982; Scadding, 1961; Siltzbach, 1967; Siltzbach et al., 1974). Bezüglich der Mortalitätsraten zeigte Siltzbach (1974) in einer Studie mit 244 Sarkoidose-Patienten, dass keiner der 110 Patienten in Stadium 1 verstarb, aber in Stadium 2 eine Rate von 11% und in Stadium 3 eine Rate von 18% aufwies.

Die Langzeitprognose kann häufig anhand der Evolution der Krankheit innerhalb der ersten zwei bis drei Jahre ermittelt werden. Der Großteil (85%) der spontanen Remissionen tritt innerhalb der ersten zwei Jahre auf und ist meist mit einer sehr geringen Rate (<10%) eines späteren Rezidivs behaftet (Mañá et al., 1999; Gibson et al., 1996; Hunninghake et al., 1994; Romer, 1982). Sind

jedoch auch nach zwei Jahren noch Lungeninfiltrate nachzuweisen, ist mit einem chronischen oder dauerhaften Verlauf zu rechnen (Mañá et al., 1994).

Älteren Daten zufolge sind High-resolution Computer Tomographen (HRCT)-Aufnahmen den konventionellen Röntgen-Thorax-Aufnahmen zwar in einigen Aspekten überlegen, dennoch ist eine Routine-CT-Untersuchung in Bezug auf die Sarkoidose weder zwingend notwendig noch kosteneffektiv (Mañá et al., 1995). Neuere Untersuchungen liegen bislang nicht vor.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil in der Diagnostik der pulmonalen Sarkoidose ist die Lungenfunktionsanalyse. Charakteristisch für die Sarkoidose sind reduzierte Lungenvolumina (Vitalkapazität (VC) und Totale Lungkapazität (TLC)). Der sensitivste aller Parameter ist die Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (DLco) (Subramanian et al., 2006). Trotz eines unauffälligen Thorax-Röntgenbefundes zeigen sich in 25-50% der Fälle eine reduzierte DLco und bei 15-25% der Patienten eine reduzierte forcierte Vitalkapazität (FVC) (Alhamad et al., 2001; Harrison et al., 1991). Das innerhalb einer Sekunde forcierte expiratorische Volumen (FEV<sub>1</sub>) dient zur Messung der Atemwegsobstruktion.

Das Ausmaß der Lungenfunktionsschädigung korreliert zwar häufig mit dem Schweregrad der Erkrankung, bemessen anhand der Thorax-Röntgen- oder CT-Aufnahmen, aber die Zusammenhänge sind bisher nicht eindeutig (Bergin et al., 1989; Mc Loud et al., 1982). Daher scheint es zu unpräzise, anhand der direkten Messungen der Lungenfunktionstests das Ausmaß und den Grad der Schädigung zu bestimmen.

Der prognostische Wert der Lungenfunktionsanalyse bleibt umstritten. So wird zwar von einer höheren Mortalität bei Patienten mit größeren physiologischen Schäden ausgegangen, aber Aussagen zu Langzeitergebnissen anhand von physiologischen Parametern sind bis heute nicht möglich (Baughman et al., 1997; Finkel et al., 1986).

### 2.5.3 Ergänzende diagnostische Untersuchungen

Epitheloidzellen in den für die Sarkoidose charakteristischen Granulomen produzieren das Angiotensin-Converting-Enzym. Erhöhte Serumwerte des Angiotensin-Converting-Enzyms (SACE) zeigen sich in 30-80% der Fälle und könnten ein aussagekräftiger Marker für die totale Granulombelastung sein (Lynch et al., 1997; Müller-Quernheim et al., 1991). Dennoch können SACE-Werte bei Patienten mit aktiver Sarkoidose auch im Normalbereich liegen.

Als weiterer Serummarker ist der lösliche Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R) zu nennen. Aktivierte T-Helfer-Zellen exprimieren den IL-2-Rezeptor auf der Zelloberfläche und setzen die lösliche

Form dieses Rezeptors frei (Kumar et al., 1987). Erhöhte sIL-2R-Serumwerte korrelieren mit der Aktivität T-Zell-vermittelter Erkrankungen und können daher als Marker für die Aktivität der T-Zellen genutzt werden (Arranz et al., 2000). Grutters et al. (2003) bestätigten in ihrer Studie, dass die Konzentration des sIL-2R als Index für die Aktivität der T-Helfer-Zellen dient und somit auch Aussagen über Aktivität der Sarkoidose gibt. Rothkrantz-Kos et al. (2003) zeigten in ihrer Studie, dass sIL-2R der beste Marker zur Vorhersage des Schweregrads der Sarkoidose ist.

Die bronchoalveoläre Lavage ist in Bezug auf die pulmonale Sarkoidose ebenso von diagnostischer Bedeutung. Sie zeigt eine erhöhte Anzahl aktivierter Lymphozyten (typischerweise CD4+T-Zellen), Alveolarmakrophagen und verschiedene proinflammatorische Zytokine und Mediatoren (Costabel et al., 2006). Daraus ergaben sich signifikante Einblicke in die Pathogenese der Sarkoidose. Eine Lymphozytose zeigt sich bei über 85% der Patienten mit pulmonaler Sarkoidose, Granulozyten befinden sich im Normbereich oder sind verringert (Costabel et al., 2006; Drent et al, 1993; Welker et al, 2004). Der CD4:CD8-Quotient ist bei 50-60% der Patienten erhöht. Auch wenn die BAL-Zellprofile nicht spezifisch für die Sarkoidose sind, können sie dennoch differentialdiagnostisch hilfreich sein (Costabel et al., 2006; Drent et al, 1993; Welker et al, 2004).

Der Stellenwert kostenintensiver radionuklearmedizinischer Techniken, wie Szintigraphien mit Somatostatin-Analoga oder PET-Scans, ist noch weitestgehend unbekannt (Lynch et al., 2007).

## **2.6 Pathologie der Sarkoidose**

Charakteristikum der Sarkoidose ist das nichtverkäsende Epitheloidzellgranulom, bestehend aus hochdifferenzierten Epitheloid- und Riesenzellen und Lymphozyten. Im Zentrum des Granuloms befinden sich überwiegend CD4+-Lymphozyten, wohingegen CD8+-Lymphozyten in der peripheren Zone dominieren (Colby, 1995; Rosen, 1994; Semenzato et al., 1994). Fibrotische Veränderungen innerhalb der Granulome sind möglich. Sie breiten sich meist von der Peripherie zum Zentrum hin aus mit dem Endergebnis einer kompletten Fibrose und/oder Hyalinisierung (Poletti et al., 2005). Die morphologische Diagnose der pulmonalen Sarkoidose beruht auf drei Hauptkriterien:

1. enge Granulome umgeben von einem Lymphozyten- und Fibroblasten-Wall in der Randzone des Granuloms;
2. perilymphatische Verteilung der Granulome;
3. Ausschluss anderer Ursachen (Freiman und Hardy, 1970; Tuder, 1996).



Im Gegensatz zu Granulomen tuberkulösen Ursprungs sind Granulome der Sarkoidose niemals verkäsend, obgleich einzelne Stellen fibrinoider Nekrosen in den Granulomen beobachtet werden können (Poletti et al., 2005). Bei pulmonalem Befall verteilen sich die Granulome hauptsächlich entlang der pulmonalen Lymphbahnen, der Pleura und der pulmonalen Arterien, Venen und Bronchien (Poletti et al., 2005).

## **2.7 Pathogenese der Sarkoidose**

Man vermutet, dass die Granulome aus einer verzögerten Immunantwort auf ein unbekanntes Antigen resultieren. Die Persistenz dieses Antigens und/oder das Ungleichgewicht verschiedener Mechanismen zur Beseitigung der inflammatorischen Zellen und ihrer Nebenprodukte scheinen zu einer weiter andauernden inflammatorischen Antwort zu führen.

Ansammlungen von aktivierten T-Zellen und Makrophagen charakterisieren das Bild der Sarkoidose. Meist handelt es sich bei den T-Zellen um CD4+-T-Helferzellen. Interaktionen zwischen Alveolarmakrophagen, CD4+-T-Zellen sowie einem Netzwerk an Th<sub>1</sub>-Zytokinen treiben den granulomatösen Prozess voran (Newman et al., 1997). T-Zellen lassen spontan Th<sub>1</sub>-Zytokine frei, während sie simultan Th<sub>2</sub>-Zytokine, wie IL-4 und IL-5, unterdrücken (Agostini et al., 2002; Moller, 1999; Pinkston et al., 1983; Robinson et al., 1985).

## **2.8 Molekularbiologischer Hintergrund der Sarkoidose**

Die Vermutung, dass Umweltfaktoren zusammen mit genetischen Faktoren das Ausmaß der Sarkoidose bestimmen, gab Anlass dazu, sich zunehmend auf den genetischen Hintergrund der Sarkoidose zu konzentrieren. Aufgrund der unterschiedlichen Inzidenzraten und der charakteristischen Variabilitäten in der klinischen Präsentation der Sarkoidose, abhängig von Geschlecht, Verwandtschaftsgrad und ethnischem Hintergrund, liegt der Verdacht eines prädisponierenden genetischen Ursprungs nahe. Der Fokus lag dabei bisher auf der Identifikation der Gene, welche die Dysregulation der T-Zellantwort verursachen könnten.

Human lymphocyte antigens (HLAs) spielen bei der Antigenpräsentation und Immunmodulation eine entscheidende Rolle und wurden in Bezug auf den genetischen Hintergrund der Sarkoidose bereits eingehend untersucht. HLAs werden von Genen des major-histocompatibility-Komplexes (MHC) auf Chromosom 6 kodiert. Unterschiede in der Prädisposition, klinischen Präsentation, Progression und Prognose wurden mit verschiedenen HLA-Phenotypen assoziiert (Smith et al.,

2008). Weiterhin zeigten sich unterschiedliche HLA-Assoziationen, abhängig von der geographischen Verteilung und ethnischen Populationen (Brewerton et al., 1977; Kunikane et al., 1987).

Zytokine sind in diesem Zusammenhang ebenfalls eingehend untersucht worden. Der Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ; s. Kap. 2.12) war dabei in vielen Studien von großem Interesse. TGF- $\beta$  ist ein pluripotentes, immunmodulierendes Zytokin, das Entzündungen herunterreguliert und in der Fibrogenese eine entscheidende Rolle spielt (El-Gamel et al., 1999). Polymorphismen aller drei Isoformen von TGF- $\beta$  (TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ , TGF- $\beta_3$ ) sind mit unterschiedlichen Proteinexpressionen assoziiert worden (Awad et al., 1998). Erhöhte TGF- $\beta$ -Werte sprechen für eine spontane Rückbildung der Sarkoidose (Zissel et al., 1996).

Einen weiteren Bestandteil in der Unterdrückung der Th<sub>1</sub>-Zellantwort stellen IL-4 und sein Rezeptor (IL-4R) dar. In einer Studie von Bohnert et al. (2002) wurden Polymorphismen des Rezeptors untersucht, jedoch ohne signifikante Ergebnisse.

IL-12 sowie IL-18 induzieren die Produktion von IFN- $\gamma$  (Yoshimoto et al., 1998). Zusätzlich wurde IFN- $\alpha$  in Zusammenhang mit granulomatösen Erkrankungen erkannt und trägt vermutlich auch zu der Entstehung einer Sarkoidose bei (Papaioannides et al., 2004; Yavorkovsky et al., 1998).

Alveolarmakrophagen sezernieren den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Dieser findet sich im Vergleich zur inaktiven Sarkoidose bei Patienten mit aktiver Sarkoidose stärker erhöht (Zheng et al., 1995). Er stimuliert die Phagozytose in Makrophagen, lockt neutrophile Granulozyten an, beeinflusst die Granulombildung und führt zu einer Erhöhung von IL-1. Des Weiteren wurden TNF- $\alpha$ -Inhibitoren in Einzelfällen erfolgreich zur Behandlung der Sarkoidose eingesetzt (Baughman und Iannuzzi, 2003). Interleukin-1 steigert als Antwort auf ein Antigen die Aktivität der T-Zellen. Bei Patienten mit aktiver Sarkoidose wurden erhöhte Werte von IL-1 gefunden (Hunninghake, 1984).

Die Untersuchung anderer Kandidatengene für die Sarkoidose brachte weitere neue Erkenntnisse. Dabei wurde das butyrophilin-like 2 Gen (BTNL2) in verschiedenen Studien als mögliches Gen für die Prädisposition einer Sarkoidose entdeckt (Li et al., 2006; Valentonyte et al., 2005). Es gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie und ist vermutlich ein stimulierendes Molekül in der Kaskade zur T-Zell-Aktivierung. Polymorphismen im BTNL-2-Gen könnten demnach zu einer dysregulierenden Th-Zell-Aktivierung als Autoimmunantwort führen.

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) spielen eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort. In einer Studie von Pabst et al. (2006) zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen TLR4-Mutationen und Patienten mit chronischer Sarkoidose.

In einer kürzlich durchgeführten genomweiten Studie von Hofman et al. (2008) mit 499 Sarkoidose-Patienten und 490 Kontrollpersonen machte sich ein auffälliger Zusammenhang zwischen dem Annexin A11 (ANXA11)-Gen und Sarkoidose-Patienten bemerkbar. Annexin A11 hat komplexe und essentielle Funktionen in unterschiedlichen biologischen Kaskaden, unter anderem in der Apoptose und Zellproliferation.

Die Prädisposition für andere granulomatöse Erkrankungen, wie Morbus Crohn oder das Blau-Syndrom, wird unter anderem von dem Gen CARD15, auch NOD2 genannt, verursacht (Hampe et al., 2001; Miceli-Richard et al., 2001). In Bezug auf die Sarkoidose konnte jedoch bislang keine Assoziation mit CARD15 festgestellt werden (Schürmann et al., 2003).

Das Angiotensin-Converting-Enzym wird in der Diagnostik der Sarkoidose als Serummarker verwendet. ACE wird von den Epitheloidzellen der Granulome sezerniert und scheint die Granulombelastung des Körpers zu reflektieren. Der Serum-ACE-Spiegel wird von einem Insertion(I)/Deletion(D)-Polymorphismus im ACE-Gen beeinflusst. So finden sich erniedrigte Werte bei Individuen mit dem Genotyp II und erhöhte Werte mit dem Genotyp DD. Das gleiche Schema spiegelte sich bei Patienten mit Sarkoidose wider, allerdings ergaben verschiedene Studien bisher unterschiedliche Resultate. In einigen Studien wurde das ACE-D-Allel mit einem erhöhten Risiko für Sarkoidose assoziiert (Maliarik et al., 1998; Rigat et al., 1990; Schürmann et al., 2001). Andere Studien wiederum zeigten keine Assoziation zwischen dem ACE I/D Polymorphismus und dem Auftreten oder Fortschreiten von Sarkoidose (Arbustini et al., 1996; McGrath et al., 2001).

## **2.9 Pathophysiologie der pulmonalen Sarkoidose**

Aus den beschriebenen pathologischen Prozessen in den Atemwegen von Sarkoidose-Patienten lassen sich die beobachteten pathophysiologischen Veränderungen und Symptome erklären.

Bei einer Vielzahl der Patienten treten neben restriktiven auch obstruktive Atemwegsstörungen auf. So konnten bei 30-50% der Patienten mit pulmonaler Sarkoidose Atemwegsobstruktionen und bronchiale Hyperreaktivitäten festgestellt werden (Harrison et al., 1991; McCann und Harrison, 1991; Sharma und Johnson, 1988; Stjernberg und Thunell, 1984). Ein wichtiger Parameter zur Messung der Atemwegsobstruktion ist das innerhalb einer Sekunde forcierte expiratorische Volumen (FEV<sub>1</sub>). Den Ursachen für die Atemwegsobstruktion liegen verschiedene Mechanismen

zugrunde. So kann es zur Einengung der Bronchialwände durch granulomatöse Defekte, durch fibrotische Veränderungen, durch vergrößerte Lymphknoten sowie zur bronchialen Hyperreaktivität kommen. Harrison et al. (1991) zeigten in einer Studie mit 107 neu diagnostizierten Sarkoidose-Patienten bei 61 Patienten einen reduzierten Tiffenau-Index ( $FEV_1:FVC = 57\%$ ). Die Häufigkeit der Atemwegsobstruktion stieg mit Verschlechterung des Röntgenstadiums an.

Diffusionsstörungen sind ein weiteres Merkmal für das Fortschreiten einer pulmonalen Sarkoidose. Eine pulmonale Diffusionsstörung ist definiert als die Abnahme des Verhältnisses von pulmonaler Diffusionskapazität zur Lungenperfusion. Die Diffusionskapazität gilt als Maß für die Diffusion von Gasen durch die alveolokapilläre Membran. Zur Bestimmung der Diffusionskapazität (DLco) dient Kohlenmonoxid als Indikatorgas, welches eine mehr als 200fach höhere Affinität zu Hämoglobin hat als Sauerstoff. Als Ursachen für eine verminderte Diffusionskapazität kommen ein Alveolo-kapillärer Block (z.B. durch fibrotische Veränderungen), eine verminderte Kapillardiffusionsoberfläche, ein verminderter Alveolarraum sowie eine Verminderung der Diffusionskonstanten (durch Anämie) in Betracht. So konnte in verschiedenen Studien bewiesen werden, dass unter Belastung unter anderem die Diffusionskapazität für CO (DLco) der stärkste funktionelle Parameter ist, welcher mit dem Ausmaß und der Schwere der Sarkoidose, bemessen anhand von pathologischen Aspekten und HR-CT-Aufnahmen, korrelierte (Carrington, 1976; Medinger et al., 2001; Young et al., 1968). Lamberto et al. (2004) konnten des Weiteren nachweisen, dass eine verminderte alveoläre Membrandiffusionskapazität die Hauptursache für eine geschädigte DLco bei Sarkoidose-Erkrankten ist.

## **2.10 Komplikationen der Sarkoidose**

Abhängig vom betroffenen Organ, ist die Sarkoidose mit mehr oder minder schwerwiegenden Komplikationen verbunden. Das Hauptaugenmerk wird an dieser Stelle auf den kardialen Befall, den nervalen Befall sowie die Lungenfibrose bei pulmonalem Befall gerichtet.

### **2.10.1 Kardiale Sarkoidose**

Die Inzidenz der kardialen Beteiligung nach Diagnosestellung einer Sarkoidose wird mit 2,3% angegeben (Baughman et al., 2001). Eine kardiale Sarkoidose ist nach dem Lungenversagen die zweithäufigste mit der Sarkoidose assoziierte Todesursache (Gideon und Mannino, 1996; Baughman et al., 1997). Die klinische Manifestation der kardialen Sarkoidose reicht von asymptomatischen Verläufen bis zu fatalen Arrhythmien. Die meist betroffenen Strukturen sind das My-

okard, insbesondere des linken Ventrikels, und das Reizleitungssystem (Roberts et al, 1977). Herzklappenfunktionsstörungen äußern sich hauptsächlich in einer Mitralklappeninsuffizienz aufgrund einer granulomatösen Infiltration des korrespondierenden Papillarmuskels oder Veränderungen in der Ventrikelstruktur (Zoneraich et al., 1974). Im weiteren Verlauf werden die aktiven Granulome durch myokardiales Narbengebilde und Remodelling ersetzt, mit dem Ergebnis einer Dilatation des linken Ventrikels, einer lokalen Hypokinesie oder eines Aneurysmas (bei 8-10%) (Flemming, 1994; Sharma et al., 1993). Bradykarde Arrhythmien oder Reizleitungsstörungen, wie ein AV-Block unterschiedlichen Grades oder ein Schenkelblock, wurden bei Befall des Reizleitungssystems oder Septums beobachtet (Flemming, 1994; Roberts et al, 1977).

Die Diagnosestellung der asymptomatischen kardialen Sarkoidose gestaltet sich oftmals schwierig. Sie basiert auf einer Reihe von Untersuchungen wie Elektrokardiographie, Echokardiographie, nuklearmedizinischen Untersuchungen, Magnetresonanztomographie, Koronarangiographie, endomyokardialer Biopsie und elektrophysiologischen Untersuchungen. Häufig sind die Befunde jedoch nicht zielführend und erst das Ansprechen auf eine gezielte Therapie ist die einzige Bestätigung der Verdachtsdiagnose.

### 2.10.2 Neurosarkoidose

Die Mortalität der Neurosarkoidose wird mit 10% angegeben und ist damit doppelt so hoch wie die aller anderen Manifestationen der Sarkoidose zusammen (James, 1998). Hypothalamus, Hirnnerven und Hypophyse sind die meist betroffenen Strukturen, der Befall jeder anderen nervalen Struktur ist ebenso möglich (Stern et al., 1985). Ein Drittel der Patienten weisen multiple neurologische Schäden auf (Hoitsma und Sharma, 2005). Komplikationen der Neurosarkoidose können sich in einer aseptischen Meningitis, einem Hydrozephalus sowie in hypothalamischen Dysfunktionen und Myopathien äußern (Jarnier und Seriès, 1999). Die Diagnosestellung beruht häufig auf den Informationen bildgebender Verfahren sowie der Liquoruntersuchung. Aufgrund der mannigfaltigen klinischen Präsentation bereitet sie dennoch ohne den histologischen Nachweis nichtverkäsender Granulome Schwierigkeiten (Lower und Weiss, 2008).

### 2.10.3 Lungenfibrose

Bei fast 80% der Sarkoidose-Patienten stellt sich im Verlauf eine spontane Remission ein, wovon 10% ein Rezidiv erleiden. Bei diesen Patienten kann es zu einem fortschreitendem Verlauf mit einer massiven Weiterentwicklung der Granulome kommen, welche letztendlich in eine Fibrose

mündet (Semenzato et al., 2005). Die fibrotischen Veränderungen verursachen lokale Verletzungen, Zerstörungen der Basalmembran, unterschiedliche Permeabilitäten der Epithelien sowie den Zerfall der normalen Lungenparenchymarchitektur (Agostini und Semenzato, 1998). Sie geschehen aufgrund der Th<sub>1</sub>-vermittelten Immunantwort und werden von Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen und Mastzellen moduliert (Bjermer et al., 1987; Inoue et al., 1996). Die Lungenfibrose ist meist mit chronischer Dyspnoe und einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion assoziiert. In den westlichen Ländern stellt die Lungenfibrose die Haupttodesursache bei Sarkoidose-Patienten dar (Nunes et al., 2007). Aufgrund oben genannter fibrotischer Veränderungen entstehen weitere spezifische Komplikationen der Lungenfibrose. So ist unter anderem die Infiltration oder Obliteration der Lungengefäße durch die granulomatöse, fibrotische Reaktion für eine pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) ursächlich (Damuth et al., 1980; Nunes et al., 2006; Preston et al., 2001). Eine bestehende PAH verschlechtert deutlich die Überlebenschancen bei Sarkoidose-Erkrankten. So wurden in einer kürzlich durchgeführten Studie mit Sarkoidose-Patienten mit vorhandener PAH Zwei- und Fünf-Jahres-Überlebensraten von 74% und 59% ermittelt (Nunes et al., 2006). Im Gegensatz dazu wurde beim Sarkoidose-Kontrollkollektiv ohne PAH eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 96,4% angegeben.

Die Bronchusstenose ist eine weitere mögliche Folge einer Lungenfibrose. Die Inzidenz bei Sarkoidose-Patienten reicht in zwei Studien von 2% bis 26% (Armstrong et al., 1981; Udwadia et al. 1990). Bronchoskopisch lassen sich einzelne fokale Stenosen, multiple fokale Stenosen sowie diffuse Verengungen des Bronchialbaums darstellen (Chambellan et al., 2005).

### **2.11 Gen-Polymorphismen bei IPF/UIP und Sarkoidose-assoziiertes Lungenfibrose**

Vor dem Hintergrund histomorphologischer und ätiologischer Parallelen der Sarkoidose-assoziierten Lungenfibrose und der klassischen Lungenfibrose (usual interstitial pneumonia; UIP) sollen im Folgenden die Gen-Polymorphismen der UIP und der Sarkoidose genauer betrachtet werden. Die UIP ist das histologische Korrelat der idiopathischen Lungenfibrose (IPF), einer progressiven inflammatorischen und fibrotischen Lungenerkrankung.

Einige Studien konnten bei Patienten mit IPF verschiedene Zytokine nachweisen, die an der Pathogenese der Fibrosierung teilhaben könnten (Strieter, 2001; Coker und Laurent, 1998). Aufgrund dessen wurden Polymorphismen in den Kandidatengenen der Mediatoren, die den inflammatorischen Verlauf und die Wundheilung beeinflussen könnten, untersucht.

Dabei zeigt sich in vielen Studien, dass der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  einen bedeutenden Einfluss auf die Entwicklung der Fibrose nimmt. So konnte beispielsweise in einer Studie von Bergeron et al. (2003) bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose, verglichen mit dem Normalkollektiv, wesentlich häufiger für TGF- $\beta$  kodierende mRNA identifiziert werden. Es wurde jedoch kein Zusammenhang zwischen der Menge der für dieses Zytokin kodierenden mRNA und dem Ausmaß der Fibrose deutlich.

Die Isoform des Wachstumsfaktors TGF- $\beta_1$  wirkt chemotaktisch auf Fibroblasten, induziert die Synthese von Matrix- und Glykoproteinen und inhibiert durch vermehrte Produktion von Protease-Inhibitoren und Minimierung der Metalloproteasen die Kollagenzersetzung (Ward und Hunninghake, 1998). Bisher wurden sieben Polymorphismen im TGF- $\beta_1$ -Gen identifiziert, wobei vor allem Polymorphismen in Codon 10 und 25 für die Regulation der TGF- $\beta_1$ -Produktion verantwortlich gemacht wurden (Cambien et al., 1996). Bei dem Versuch, Assoziationen dieser Polymorphismen in Bezug auf die Entstehung und den Verlauf der idiopathischen Lungenfibrose darzustellen, konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden (Xaubet et al., 2003).

Die Isoform TGF- $\beta_3$  hat ebenso profibrotische Effekte wie TGF- $\beta_1$ , obgleich die Veränderungen hierbei weniger massiv und progredient zu sein scheinen. Ask et al. (2008) vermuteten zudem, dass TGF- $\beta_3$  eine regulierende Rolle hat, indem es TGF- $\beta_1$ -induzierte Genexpressionen supprimieren kann.

Krein und Winston (2002) behaupteten, dass der durch TGF- $\beta$  vermehrte Zelltod unter anderem über eine verminderte Expression des Insulin-like growth factors-I (IGF-I) geregelt wird. IGF-I ist bekannt für seine mitogenen und antiapoptotischen Funktionen. Während Homma et al. (1995) in frühen Stadien der IPF erhöhte IGF-I-Werte, welche für die Fibroblastenproliferation teilweise verantwortlich zu sein scheinen, nachweisen konnte, zeigte sich in späteren Stadien ein signifikanter Rückgang der IGF-I-positiven Zellen. Dies unterstützt die Behauptung Kreins und Winstons (2002), dass IGF-I von TGF- $\beta$  negativ reguliert wird. Aus diesem Mechanismus resultieren ein vermehrter epithelialer Zelltod und chronisch freigelegte alveoläre Basalmembranen.

Ein weiteres Zusammenspiel verschiedener Mediatoren wurde in einer Studie von Murray et al. (2008) beobachtet. Dabei reagierten erkrankte (UIP-) Fibroblasten auf TGF- $\beta$ , CCL2 und Interleukin-13 (IL-13) mit einer vermehrten Expression der TGF- $\beta$ - und IL-13-Rezeptoren. Diesen Mediatoren ist es somit möglich, ihre Funktionen gegenseitig zu modulieren.

Erhöhte Werte des IL-10, PDGF (platelet-derived growth factor) und KGF (keratinocyte growth factor) sind ebenfalls mit dem Auftreten einer UIP assoziiert worden (Bergeron et al., 2003).

Die Vermutung, dass Gen-Polymorphismen des Interleukin (IL)-1-Rezeptorantagonisten und des Tumornekrosefaktors (TNF)- $\alpha$  mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer IPF einhergehen, konnte bisher nur in einer von drei Studien bestätigt werden (Hutyrová et al., 2002; Pantelidis et al., 2001; Whyte et al., 2000).

Aufgrund der oben erwähnten Parallelen zwischen Sarkoidose-assoziiierter Lungenfibrose und der UIP untersuchten Kruit et al. (2006 a), ob single-nucleotide polymorphismen (SNPs) in TGF- $\beta_1$ -, TGF- $\beta_2$ - und TGF- $\beta_3$ -Genen zur Entstehung einer Lungenfibrose bei Sarkoidose-Patienten beitragen. Je TGF- $\beta$ -Gen wurden fünf single-nucleotid-polymorphismen (SNPs) untersucht. Das A-Allel des TGF- $\beta_3$  4875 G/A Polymorphismus und das C-Allel des TGF- $\beta_3$  17369 T/C Polymorphismus traten bei Sarkoidose-Patienten mit Fibrose wesentlich häufiger auf, als bei Patienten mit akutem bzw. selbstlimitierendem und chronischem Verlauf zusammen ( $p=0,01$  und  $p=0,05$ ). Die Träger-Frequenz des TGF- $\beta_3$  15101 G-Allels hingegen war bei Patienten mit Fibrose geringer als bei Patienten mit akutem bzw. selbstlimitierendem und chronischem Verlauf zusammen. Genetische Variationen von TGF- $\beta_3$  könnten somit ein wichtiger Bestandteil in der Entwicklung einer Fibrose bei Sarkoidose-Patienten sein.

Wenn auch nicht signifikant, wurde das G Allel des TGF- $\beta_2$  59941 A/G Polymorphismus häufiger bei Patienten mit Fibrose im Vergleich zu Patienten mit akutem bzw. selbstlimitierendem und chronischem Verlauf zusammen beobachtet ( $p=0,2$ ). In Bezug auf TGF- $\beta_1$  konnten keine Gen-Polymorphismen mit Fibrose assoziiert werden.

In einer kürzlich durchgeführten Studie untersuchten Kruit et al. (2006 b) unter anderem Chymase-Gen-Polymorphismen (CMA1) bei Sarkoidose-Patienten mit Lungenfibrose. Chymase wird von Mastzellen freigesetzt und spielt eine entscheidende Rolle bei Gewebsverletzungen sowie beim Remodelling des Lungengewebes. Es konnte zu keinem der fünf untersuchten Gen-Polymorphismen ein Zusammenhang in Bezug auf die Krankheitsempfänglichkeit oder die fibrotischen Veränderungen dargestellt werden. Allerdings war das T-Allel des CMA1 526 C/T Polymorphismus mit einer verminderten inspiratorischen Vitalkapazität (iVC) assoziiert und könnte somit das funktionelle Outcome der pulmonalen Sarkoidose beeinflussen.

Die Analyse der Gen-Polymorphismen der Zytokine IL-6 und IL-1A ließen ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge erkennen (Grutters et al., 2003). Die Polymorphismen IL6-174(G/C), IL6 Intron 4(A/G) und IL1A-889(C/T) scheinen somit keinen Einfluss auf die Krankheitsempfänglichkeit oder den Schweregrad der Sarkoidose zu haben. Dennoch wurde bei Patienten mit



Lungenfibrose eine leicht erhöhte Träger-Frequenz des IL6-174C-Allels festgestellt ( $p=0,03$ ). Das IL6-174C-Allel könnte demnach das Ausmaß der Sarkoidose oder das Fortschreiten in Richtung Lungenfibrose beeinflussen.

## **2.12 Transforming Growth Factor- $\beta$ und seine Isoformen**

Aufgrund der Tatsache, dass TGF- $\beta$  sowohl bei der Entstehung einer UIP, als auch bei der Entstehung einer Sarkoidose-assoziierten Lungenfibrose eine entscheidende Rolle zu spielen scheint, sollen im Folgenden TGF- $\beta$  und seine Isoformen genauer erläutert werden.

TGF- $\beta$  gehört zur Gruppe der Wachstumsfaktoren. Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die mit spezifischen zellulären Rezeptoren interagieren, was zu vielen unterschiedlichen biologischen Antworten führt. Wachstumsfaktoren regulieren verschiedene Mechanismen endokrinen Gewebes, einschließlich autokriner, parakriner und endokriner Funktionen. Außerdem üben sie einen direkten oder indirekten Effekt auf die Zellproliferation aus.

TGF- $\beta$  ist ein 25kDa Disulfid-gekoppeltes homodimeres oder heterodimeres Protein, was an einen heterodimeren Rezeptor auf der Oberfläche von Zielzellen bindet und über die Serin/Threonin-Kinase des Rezeptors und die Signaltransduktionskaskade Zellen stimuliert.

TGF- $\beta$  ist ein immunmodulierendes Zytokin, welches entzündliche Prozesse herunterreguliert. Es verringert die Produktion proinflammatorischer Zytokine von Makrophagen, es fördert die Ansammlung von Fibroblasten und stimuliert die Produktion von Extrazellulärmatrix-Proteinen (Lasky und Brody, 2000). TGF- $\beta$  reguliert Komponenten der adaptiven Immunabwehr, wie T-Zellen, und der angeborenen Immunabwehr, wie natürliche Killerzellen (Laouar et al., 2005; Li et al., 2006).

Bezüglich der Zellherkunft von TGF- $\beta$  existieren kontroverse Angaben. So werden bronchiale Epithelzellen, Endothelzellen, alveoläre Epithelzellen, alveoläre Makrophagen sowie T-Zellen als möglicher Ursprung diskutiert (AyanlarBatuman et al., 1991; Khalil et al. 1994, Santana et al., 1995). Bei der Sarkoidose wird vermutet, dass zum einen epitheliale Histiozyten der Granulome, zum anderen inflammatorische Zellen in den Alveolarräumen erhöhte TGF- $\beta_1$ -Werte durch vermehrte Produktion verursachen (Limper et al., 1994). Die Wirkungen von TGF- $\beta$  hängen vom Mikromilieu und vom Status der Zielzellen ab (Ludviksson und Gunnlaugsdottir, 2003).

Des Weiteren sind die drei Isoformen TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  und TGF- $\beta_3$  teilweise mit unterschiedlichen Funktionen assoziiert worden (Awad et al., 1998, Kruit et al., 2006 a). Laut Sime et al. (1997) geht eine gesteigerte pulmonale TGF- $\beta_1$ -Expression mit einer chronisch fibrotischen Ant-

wort einher. Den Ergebnissen einer Studie von Zissel et al. (1996) zufolge wurden erhöhte TGF- $\beta_1$ -Werte mit einer spontanen Remission assoziiert. Durch die Identifikation eines funktionellen Polymorphismus in Codon 25 des TGF- $\beta_1$ -Gens, welcher die Freisetzung von TGF- $\beta_1$  durch Immunzellen beeinflusst, bestand die Möglichkeit anhand von genetisch definierten hohen TGF- $\beta_1$ -Werten auf eine spontane Remission schlussfolgern zu können (Cambien et al., 1996). Dennoch konnte weder in einer deutschen noch in einer amerikanischen Studie eine Assoziation zu Sarkoidose festgestellt werden (Jonth et al., 2007; Muraközy et al., 2001).

Susol et al. (2000) zeigten TGF- $\beta_2$ - und TGF- $\beta_3$ -Gen-Polymorphismen, die mit Hautfibrose bei systemischer Sklerodermie assoziiert waren. Alle drei Isoformen können die Produktion von Extrazellulärmatrix induzieren (Takehara, 1998).

### **2.13 Transforming Growth Factor- $\beta_3$**

Die genaue Rolle der Isoform TGF- $\beta_3$  ist bisher unklar. Die Isoformen 1 und 2 der TGF- $\beta$ -Familie wurden mit generell profibrotischen Eigenschaften beschrieben, während TGF- $\beta_3$  einen diverseren Charakter zu haben scheint (Nath et al., 1994; Shah et al., 1995).

Während bei Bleomycin-induzierter Lungenfibrose in drei Studien vorwiegend TGF- $\beta_1$  als dominierende Isoform nachgewiesen werden konnte, behaupteten Santana et al. (1995), dass alle drei Isoformen beteiligt seien (Baecher-Allan und Barth, 1993; Khalil et al., 1993; Khalil et al., 1994). Coker et al. (1997) bestätigten diese Aussage, indem sie in vitro potentielle profibrotische Effekte aller drei Isoformen nachweisen konnten. Anschließend untersuchten sie durch In-Situ-Hybridisierung anhand einer Lungenfibrose eines mausspezifischen Modells die Genexpressionen der verschiedenen Isoformen. Resultierend zeigte sich eine erhöhte Genexpression von TGF- $\beta_1$ , jedoch nicht von TGF- $\beta_3$ . In einer weiteren Studie von Coker et al. (2001) wurden erstmals TGF- $\beta_3$ -Genexpressionen bei menschlicher Lungenfibrose nachgewiesen, obgleich auch hier TGF- $\beta_1$ -Genexpressionen überwogen. Demnach schien TGF- $\beta_3$  bei der Pathogenese der Lungenfibrose nicht wesentlich beteiligt zu sein.

Erstmals untersuchten Kruit et al. (2006 a) Gen-Polymorphismen aller drei Isoformen. Dabei konnten sie signifikante Erkenntnisse bezüglich TGF- $\beta_3$  in Zusammenhang mit Sarkoidose-assoziiierter Lungenfibrose erlangen (s. Kap. 2.8). Variationen im TGF- $\beta_3$ -Gen könnten somit entgegen aller bisherigen Aussagen bei Sarkoidose-Patienten zur Entstehung einer Lungenfibrose beitragen.

Ask et al. (2008) konnten in ihrer Studie ebenfalls profibrotische Effekte von TGF- $\beta_3$  nachweisen, wenn auch weniger schwerwiegend als die von TGF- $\beta_1$ . Sie vermuten, dass TGF- $\beta_3$  bei der „normalen Wundheilung“ eine entscheidende Rolle spielt, jedoch bei „fibrotischer Wundheilung“ durch TGF- $\beta_1$  überlagert wird.

#### **2.14 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit**

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss eines Einzelbasentausches (SNP) im TGF- $\beta_3$ -Gen auf den Krankheitsverlauf der pulmonalen Sarkoidose darzustellen. Bei dem untersuchten genotypisierten SNP handelt es sich um den 17369 T/C (rs3917200)-Polymorphismus im TGF- $\beta_3$ -Gen. Die Wahl dieses Polymorphismus basiert auf signifikanten Ergebnissen einer vorausgegangenen niederländischen Studie (Kruit et al, 2006).

Der Einfluss des oben genannten SNPs im TGF- $\beta_3$ -Gen auf den Krankheitsverlauf der pulmonalen Sarkoidose soll dabei anhand folgender Fragestellungen konkretisiert werden:

- Inwieweit unterscheidet sich die Genotypverteilung des untersuchten Polymorphismus bei Sarkoidose-Erkrankten, bei Sarkoidose-Erkrankten mit akutem Verlauf oder bei Sarkoidose-Erkrankten mit chronischem Verlauf im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv?
- Wie unterscheiden sich in diesem Zusammenhang Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf im Vergleich zu Sarkoidose-Patienten ohne chronischen Verlauf bezüglich der Genotypverteilung?

Des Weiteren soll besonders auch der Einfluss des oben genannten SNPs im TGF- $\beta_3$ -Gen auf Sarkoidose-assoziierte Lungenfibrose dargestellt werden. Hierzu stellen sich folgende Fragen:

- Inwieweit unterscheidet sich die Genotypverteilung des untersuchten Polymorphismus bei Sarkoidose-Patienten mit Lungenfibrose im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv?
- Wie unterscheiden sich in diesem Zusammenhang Sarkoidose-Patienten mit Lungenfibrose im Vergleich zu Sarkoidose-Patienten ohne Lungenfibrose bezüglich der Genotypverteilung?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Probanden**

Das Patientenkollektiv der vorliegenden Studie umfasst 296 Personen mit klinisch gesicherter Diagnose der Sarkoidose. Die Diagnosestellung der Sarkoidose entspricht den Richtlinien des ATS/ERS/WASOG-Komitees. Die klinische Symptomatik wurde durch histologischen Beweis bestätigt, andere bekannte Ursachen für granulomatöse Erkrankungen konnten ausgeschlossen werden. Die Kontrollkohorte setzt sich aus 377 gesunden Personen europäischen Ursprungs zusammen.

Die Rekrutierung der insgesamt 673 Teilnehmer fand an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn sowie über das Sarkoidose Netzwerk Bonn und die Sarkoidose-Selbsthilfegruppen Altenkirchen, Köln, Leipzig und Wuppertal statt. Somit konnte im Rahmen der Rekrutierung das zuvor vorhandene Sarkoidose-Kollektiv von 150 auf 377 Personen erweitert werden. Mittels standardisierter krankheitsspezifischer Fragebögen sowie dem Quality of Life (WHOQOL-Bref)-Fragebogen und dem Fatigue Assessment Scale (FAS)-Fragebogen wurden die Angaben der Teilnehmer erfasst. Die Stadieneinteilung erfolgte nach der Klassifizierung von Scadding (1961) (s. Kap. 2.5.2). Patienten mit stabilem Stadium IV oder einem Fortschreiten in Richtung dieses Stadiums wurden unter dem Begriff der Fibrose kategorisiert (Kruit et al., 2006 a).

Alle Teilnehmer gaben vor Einschluss in die Studie ihr schriftliches Einverständnis. Nach Vorgaben der revidierten Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki (1983) erfolgte die Studierendurchführung mit Zustimmung der Ethikkommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn nach Approbation des Versuchsprotokolls.

#### **3.2 Single-Nucleotide-Polymorphisms**

Den Probanden wurde für die Untersuchung venöses Blut entnommen, welches hinsichtlich des TGF- $\beta_3$ -17369 T/C (rs3917200)-Polymorphismus untersucht wurde. Dieser Polymorphismus ist ein sogenannter single nucleotide Polymorphismus, kurz SNP. SNPs stellen eine etablierte Methode zur Identifikation möglicher Kandidatengene dar. SNPs liegen sowohl in kodierenden als auch nichtkodierenden Bereichen und stellen Mutationen eines einzelnen Basenpaars, so genannte Einzelbasentausche, dar. SNPs sind der weitaus häufigste Typ genetischer Variabilität im Menschen und machen etwa 90% der interindividuellen genetischen Variabilität aus. Erst ab einer

minoren Allelfrequenz von etwa einem Prozent in der Bevölkerung werden SNPs für viele genetische Fragestellungen interessant. Anhand der durch die International SNP Map Working Group veröffentlichten SNP-Daten schätzt man, dass es etwa elf Millionen SNPs gibt, deren minores Allel eine Frequenz von wenigstens einem Prozent in der Weltbevölkerung hat (The International SNP Map Working Group, 2001). Diese SNPs kommen durchschnittlich wahrscheinlich alle 290bp vor. Mittlerweile sind bereits mehr als zwei Millionen SNPs bekannt.

### 3.3 Materialien

#### 3.3.1 Chemikalien

##### Chemikalien für die DNA-Extraktion:

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

##### Chemikalien für die Real-Time-PCR:

H<sub>2</sub>O, 3mM MgCl<sub>2</sub>, LC-Master Mix, 5' Primer (20pmol/μl), 3' Primer (20 pmol/μl), Anchor TGF-β<sub>3</sub> (3 pmol/μl), Sensor A (3 pmol/μl), DNA (200 μg/ml).

Der LightCycler(LC)-Master Mix enthielt dNTPs, Puffer sowie Taq-DNA-Polymerase.

#### 3.3.2 Geräte

Real-Time-PCR: LightCycler<sup>®</sup> 1.5 Instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany); LightCycler<sup>®</sup> Software 3.5.3 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany); Zentrifuge: Mikrofuge E<sup>™</sup> (Firma Beckmann, München, Deutschland); Vortexgerät: Vortex Genie (Firma Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz); Überkopfschüttler; Wasserbad/Inkubator.

#### 3.3.3 DNA-Polymerase

Desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTPs) werden mithilfe der DNA-Polymerase chemisch zum Polymer der Desoxyribonukleinsäure (DNA) verknüpft. Polymerasen sind Enzyme, die physiologisch im Zellkern vorkommen und bei der Replikation der DNA von zentraler Bedeutung sind. Biotechnologisch werden sie zur Amplifikation eines bestimmten DNA-Fragments eingesetzt. Das vorgesehene Fragment wird zuvor durch Primer festgelegt (s. Kap. 3.3.4). Bei der Taq-

Polymerase handelt es sich um eine thermostabile DNA-Polymerase, welche aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde und in *E.coli* gentechnisch angezüchtet werden kann.

### 3.3.4 Primer

Primer sind Oligonukleotide und dienen den Polymerasen als Startstück für die Replikation der DNA. Bei der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) lässt sich das zu amplifizierende DNA-Fragment mit Hilfe der Primer festlegen. Der Forward-Primer beschreibt die Nukleotidsequenz am Beginn des Amplikons, während der Reverse-Primer komplementär und invers zur Nukleotidsequenz am Ende des Fragments liegt.

Um Primerschmelztemperaturen zwischen 60°C und 75°C zu erreichen, müssen die Primer bestimmte Anforderungen erfüllen. Dabei sollte die Länge der Primersequenzen zwischen 18 und 30 Nukleotiden liegen und das Verhältnis von GC- zu AT- Paaren beider Primer sich ähneln.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind zur Untersuchung des TGF- $\beta_3$ -SNPs eigens dafür von TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH Berlin entworfen worden.

#### Primerpaar für den TGF- $\beta_3$ 17369 T/C rs3917200-Polymorphismus

forward Primer: 5' - CAC CTC CCT CGC AGA CT - 3'

reverse Primer: 5'- CAT GGT CAT CCT CAT TGT CC - 3'

### 3.3.5 LightCycler<sup>®</sup>-Sonden

Zur sequenzspezifischen Detektion von Polymorphismen werden mit Farbstoff markierte Oligonukleotide in Form von Sonden verwendet. Dabei wurde in diesem Fall die eine Sonde, Sensor C, mit Fluoreszein markiert, während die andere Sonde, Anchor TGF- $\beta_3$ , mit LightCycler<sup>®</sup> Red 640 (LC640) versehen wurde.

#### Sondenpaar für den TGF- $\beta_3$ 17369 T/C rs3917200-Polymorphismus

Sensor C: 5' - GCT CTG CTC TCC TCA GAC AG--FL

Anchor TGF- $\beta_3$ : 5' - LC640- GAT TGT CAC TTT CCT TCC CTT CTT CAG GC--PH

### 3.4 Durchführung der Untersuchungen

#### 3.4.1 Blutentnahme

Unter Routinelaborbedingungen wurde sowohl dem Patienten- als auch dem Kontrollkollektiv venöses Blut mittels Vacutainersystem entnommen. Die so gewonnenen 1x9 ml-Röhrchen mit EDTA-Vollblut wurden zur DNA-Extraktion verwendet.

#### 3.4.2 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut nach der Aussalzmethode (Miller et al., 1988)

Die 9 ml EDTA-Blut wurden zur Gewinnung der DNA mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt. Es folgte eine 30 minütige Ruhephase bei 4°C. Im Anschluss wurde der Ansatz 20 Minuten bei 3000 rpm ( $r = 20 \text{ cm}$ , 3500xg) zentrifugiert, der Überstand abdekantiert (bzw. abpipettiert) und verworfen. In einem zweiten, analogen Durchgang wurde das Sediment entsprechend mit Aqua dest. lysiert, zentrifugiert und vom Überstand getrennt. Das entstandene Pellet aus Leukozyten wurde mit 30 ml einer 0,1%igen Triton-Lösung versetzt und durchmischt. Es folgte eine erneute Zentrifugation mit anschließender Separation des Rückstands, welcher mit 5 ml Lysis-Puffer resuspendiert wurde. Durch Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  10% Natrium-Dodecyl-Sulfat wurden die Zellkerne zur Fragmentation gebracht. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 37°C im Wasserbad über Nacht inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellfragmente durch vorherige Gabe von 100  $\mu\text{l}$  Proteinase-K-Lösung enzymatisch gespalten. Um die in der Probe enthaltenen Proteine „auszusalzen“ (= auszufällen), wurde der Ansatz am Folgetag in eine 15 ml Falcon-Tube gefüllt, mit 1,5 ml 6M NaCl-Lösung versetzt und 90 Minuten lang auf einem Überkopfschüttler durchmischt. Der Überstand wurde nach anschließender Zentrifugation in eine 50 ml Falcon-Tube überführt. Durch Zugabe von 25 ml 100% EtOH wurde die DNA gefällt. Aus dem Ansatz wurde die nun fadenförmige DNA entnommen, in 70% EtOH gewaschen und abschließend in 250  $\mu\text{l}$  TE8-Puffer gelöst.

#### 3.4.3 DNA-Amplifikation durch PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine von K.B. Mullis (Mullis und Faloona, 1987) entwickelte Methode, welche die exponentielle Amplifikation kurzer DNA-Sequenzen (meist 100 bis 600 Basen) innerhalb eines längeren doppelsträngigen DNA-Moleküls ermöglicht.

Es handelt es sich dabei um ein Verfahren, durch das DNA auf enzymatischem Wege, das heißt mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, *in vitro* semikonservativ vervielfältigt werden kann. Maßgeblich für dieses Verfahren ist die zyklische Abfolge folgender drei sich wiederholender Arbeitsschritte:

*Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstrangs*

Durch Erhitzen der DNA auf ca. 94-97°C lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen beider Stränge. So spaltet sich der Doppelstrang in zwei einzelsträngige DNA-Moleküle. Um die gesamte vorgelegte DNA zu denaturieren, wird den Amplifikationszyklen der Arbeitsschritt der initialen Denaturierung vorgeschaltet.

*Anlagerung (Annealing) der Oligonukleotidprimer*

Anschließend lagern sich zwei spezifische Oligonukleotidprimer an die DNA, welche das zu amplifizierende DNA-Fragment eingrenzen. Dieser Vorgang findet bei Abkühlen des Reaktionsansatzes auf eine Temperatur zwischen 50°C und 70°C statt. Diese Annealing-Temperatur wird entscheidend von der Schmelztemperatur der Primer bestimmt.

*Extension der Oligonukleotidprimer durch die hitzestabile DNA-Polymerase*

Nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung verlängert die DNA-Polymerase den Primer entlang der einzelsträngigen Matrizen-DNA durch Anlagerung der jeweils komplementären dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate: dATP, dGTP, dCTP und dTTP). Eine im Konzentrationsverhältnis angepasste Zugabe von Magnesiumchlorid und Pufferlösung dient der Optimierung der Reaktionsbedingungen.

Reagenzien	Menge in µl
H <sub>2</sub> O	5,2
MgCl <sub>2</sub>	0,8
LC-Master Mix	1,0
5' Primer	0,5
3' Primer	0,5
Sensor C	0,5
Anchor TGF-β <sub>3</sub>	0,5
DNA	1,0

**Tabelle 1:** PCR-Reaktionsansatz TGF-β<sub>3</sub> 17369 T/C (rs3917200), Gesamtvolumen 10 µl



Um eine Kontamination der Proben und somit falsche Ergebnisse auszuschließen, wurde zusätzlich eine Referenzprobe verwendet, welche anstelle der DNA H<sub>2</sub>O enthält.

### 3.5 Real-Time PCR – LightCycler® 1.5

Die Real-Time PCR ermöglicht es, eine PCR in vergleichbar kurzer Zeit durchzuführen (40 Zyklen in ca. 60 Minuten) und dabei zeitgleich die Amplifikation auf einem Monitor zu verfolgen (daher die Namensgebung Real-Time PCR). In einem zweiten Schritt werden mittels Schmelzkurvenanalyse mögliche Polymorphismen erfasst und dargestellt.

#### 3.5.1 Verfahren und Aufbau des LightCycler® 1.5

Der Aufbau des LightCycler® 1.5 setzt sich aus folgenden vier Elementen zusammen:

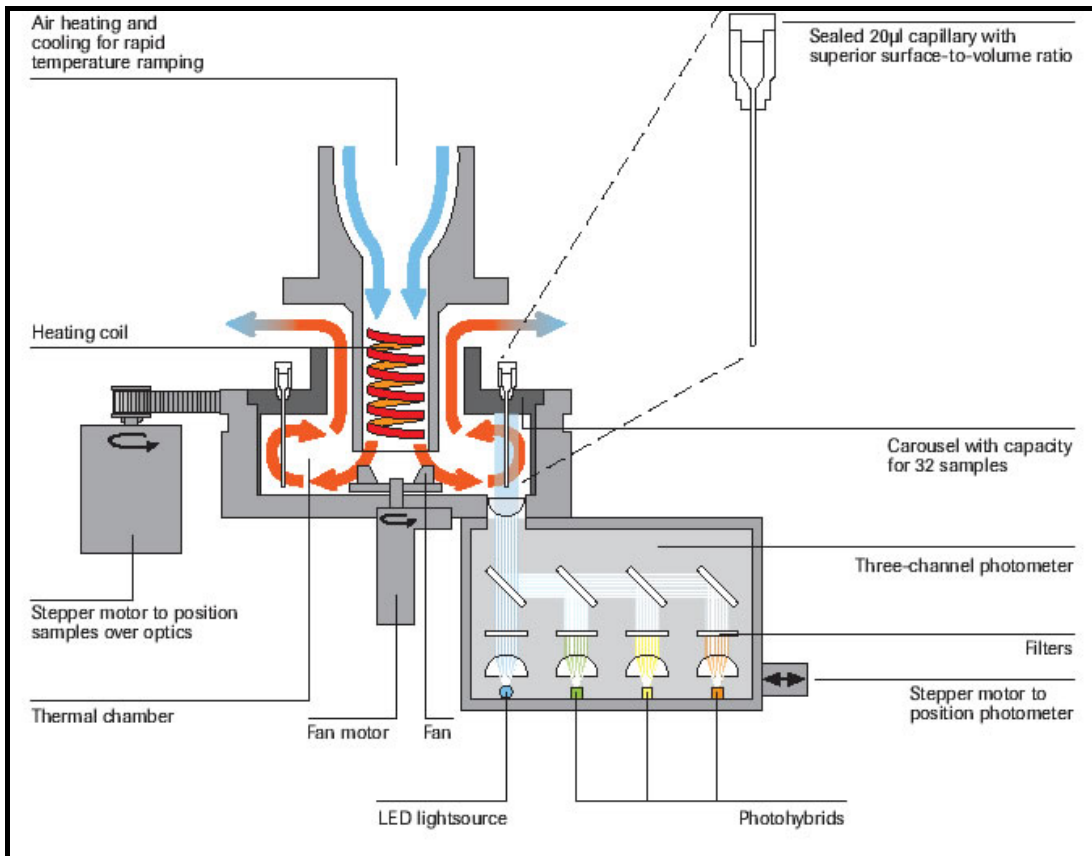
- einer thermostatisierten Reaktionskammer
- einem Probenrotor
- einer Heiz- bzw. Kühlvorrichtung
- einem Fluorimeter

Sowohl Reaktionskammer als auch Probenrotor sind aus Materialien mit geringer Wärmekapazität hergestellt und können somit Aufheiz- und Abkühlraten von bis zu 20°C pro Sekunde erreichen.

Heiz- bzw. Kühlvorrichtung setzen sich aus einem Temperatursensor im Inneren der Reaktionskammer, einer Heizspirale und einem Ventilator zusammen. Letzterer dient der homogenen Temperaturverteilung in der Kammer.

In einem Lauf können bis zu 32 Kapillaren analysiert werden. Diese Kapillaren befinden sich in einem Proben-Karussell, welches innerhalb der Reaktionskammer rotiert. Sie bestehen aus speziell angefertigten 20 µl Glaskapillaren mit einem optimalen Oberflächen-Volumen-Verhältnis, die eine rasche Anpassung an wechselnde Temperaturen ermöglichen. Aufheiz- und Abkühlphasen werden so auf ein Minimum gekürzt.

Das optische System besteht aus einer blauen High-Performance-Diode (LED) als Energiequelle, die mit einer Wellenlänge von 470 nm ± 40 die Proben zur Fluoreszenz anregt. Das emittierte Licht der Proben wird über Spiegel und einen Photomultiplier in eine der drei Photohybriden (530 nm, 640 nm, 705 nm) geleitet, in dem die emittierte Wellenlänge der Probe analysiert wird. In diesen Photohybriden findet die Umwandlung optischer in elektrische Signale statt, welche mithilfe des Computers übermittelt werden (Wittwer et al., 1997 a; Wittwer et al., 1997 b).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des LightCycler<sup>®</sup> 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, 2008a)

### 3.5.2 Messverfahren

Für die sequenzspezifische Detektion lässt sich der Fluorescence resonance energy transfer (FRET) nutzbar machen. FRET basiert auf dem Energietransfer von einem fluoreszierenden Molekül auf ein anderes benachbartes, fluoreszierendes Molekül. Dabei wird der Donor-Farbstoff von einem Photon der blauen Leuchtdiode angeregt. Dies erregt bestimmte Elektronen im Donormolekül auf ein höheres Energielevel. Diese gewonnene Energie wird durch Energietransfer auf den Akzeptor-Farbstoff übertragen.

Dieser FRET-Prozess wurde in diesem Fall mithilfe von LightCycler<sup>®</sup>-Sonden durchgeführt. Hierbei werden zwei sequenzspezifische Oligonukleotide mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert (Donor und Akzeptor) und dem PCR-Ansatz beigelegt. In diesem Fall ist der Donor am 3'-Ende mit Fluoreszin markiert, der Akzeptor am 5'-Ende mit LightCycler<sup>®</sup> Red 640. Während der Annealing-Phase hybridisieren die Sonden die Ziel-Sequenzen an dem amplifizierten DNA-Fragment. Hierbei wird ein so genanntes „head-to-tail-arrangement“ vorgenommen, mithilfe dessen die beiden Sonden einander näher gebracht werden. Erst wenn beide Sonden weniger als fünf

Nukleotide voneinander entfernt sind, ist ein Energietransfer möglich. Durch Anregung des Fluoreszeins der Donor-Sonde mit Licht der Wellenlänge 470 nm wird mithilfe des Energietransfers der Farbstoff der Akzeptor-Sonde (LightCycler<sup>®</sup> Red 640) angeregt. Diese Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge der Ziel-DNA, welche während der PCR erzeugt wurde. Während der Elongations- und Denaturationsphase werden die Sonden erneut versetzt.

### 3.5.3 Schmelzkurvenanalyse

Im Anschluss an die PCR wird mit Hilfe der LightCycler<sup>®</sup> Software 3.5 eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Sie dient der Identifizierung und Genotypisierung der DNA-Produkte.

Zur Bestimmung der Schmelzprofile wird die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht. Gleichzeitig wird die Fluoreszenz beobachtet. Mit Zunahme der Temperatur verringert sich die Fluoreszenz der Proben. Ein plötzlicher Fluoreszenzabfall deutet auf das Schmelzen des DNA-Strangs und somit auf das Ablösen der Sonden hin. Die Farbstoffmoleküle entfernen sich hierbei räumlich so weit voneinander, dass ein FRET nicht mehr möglich ist und das Fluoreszenzsignal erlischt.

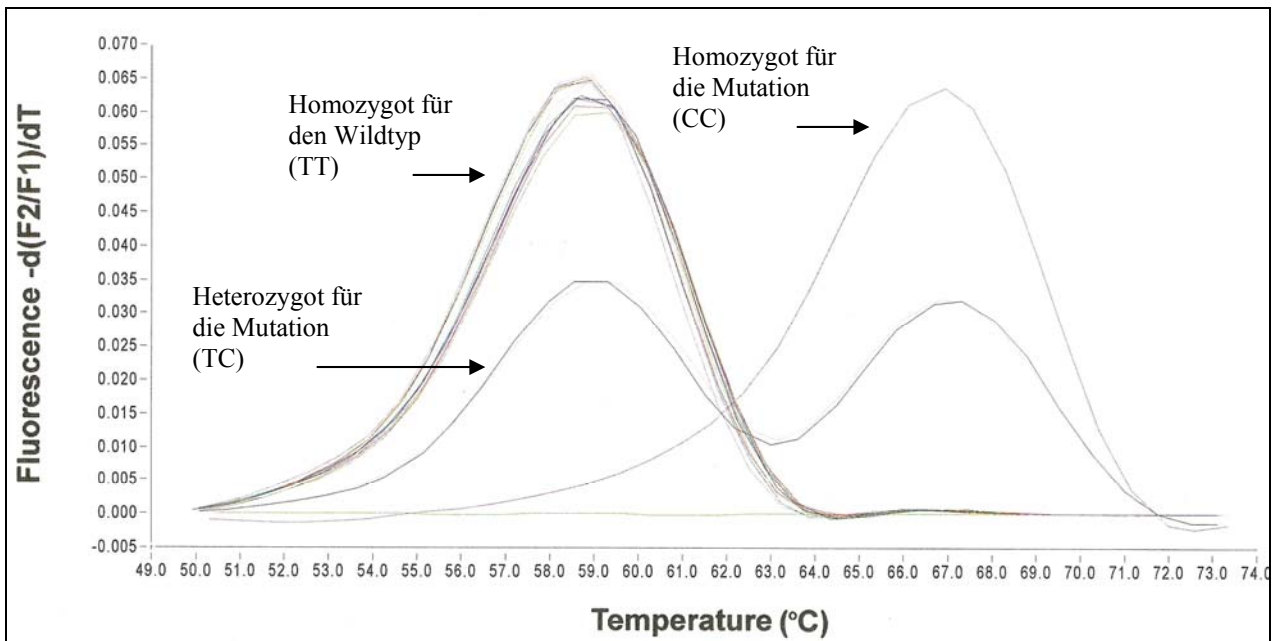
Die Beschaffenheit der Zielsequenz ist ausschlaggebend für den Zeitpunkt des Ablösens der Sonden. Stimmt die Sequenz der Sonden mit der Zielsequenz der DNA überein, verweilen die Sonden maximal lange am DNA-Strang. Stimmen die Sequenzen der Sonden und DNA, z.B. aufgrund eines Basenaustausches, jedoch nicht überein, schwächt dies die Bindung der Sonden an der DNA. Somit kommt es bereits bei niedrigeren Temperaturen zu einer Ablösung der Sonden. Da in der vorliegenden Untersuchung die Sequenz der Sonde Sensor C für die Mutation kodierte, lagen die Schmelztemperaturen bei Vorliegen eines Basenaustausches höher als die Temperaturen bei mutationsfreien Sequenzen.

<b>PCR-Programm</b>	
Initiale Denaturierung	95°C - 5 min
Denaturierung	95°C - 3 sec
Annealing	58°C - 20 sec
Extension	72°C - 25 sec
Zyklenzahl	40
<b>Schmelzprogramm</b>	
1.	95°C - 5 sec
2.	45°C - 60 sec
3.	80°C - 0 sec
Zyklenzahl	1
<b>Kühl-Programm</b>	
Abkühlphase	40°C - 30 sec
Zyklenzahl	1

**Tabelle 2:** LightCycler® 1.5-Programm für den rs3917200-Polymorphismus im TGF- $\beta_3$ -Gen

Mithilfe der LightCycler® Software 3.5 wurde die Genotypanalyse durchgeführt. Dabei wurde die Gestalt der Schmelzkurven aller Proben analysiert und anschließend zu Gruppen von Kurven ähnlicher Gestalt zusammengefasst. So erfolgte eine Einteilung der Proben in homozygoten Wildtyp, heterozygote und homozygote Mutation (Roche Diagnostics GmbH, 2008b).

Lag in der vorliegenden Untersuchung der homozygote Wildtyp vor, fand bereits bei ca. 58°C das Ablösen der Sonde statt. Im Gegensatz dazu löste sich die Sonde bei Vorliegen einer homozygoten Mutation erst bei einer Temperatur von ca. 67°C. Im Falle heterozygoter Proben lassen sich anhand der Schmelzkurven zwei Peaks erkennen. Nach der Amplifikation der DNA entstehen bei heterozygoten Proben zwei DNA-Sequenzen, welche das Ablösen der Sonde bei unterschiedlichen Temperaturen, hier bei ca. 58°C und ca. 67°C, verursachen (s. Abb. 2).



**Abbildung 2:** Darstellung des TGF- $\beta_3$  17369 T/C rs3917200-SNPs nach Schmelzkurvenanalyse.

### 3.6 Statistik

Die statistische Datenanalyse wurde mit Hilfe des EDV-Programms SPSS<sup>®</sup> 14 (SPSS<sup>®</sup> GmbH Software, München, Deutschland) durchgeführt.

#### 3.6.1 Statistische Variablen

Als diskrete Variablen mit nominalem Messniveau, die die Bedingungen der Reflexivität, Symmetrie und Transitivität erfüllten, wurden folgende verwendet:

- Genotypen des untersuchten Polymorphismus (TGF- $\beta_3$ -rs3917200)
- Geschlecht
- Rasse
- Krankheitsverlauf (akut/chronisch)
- Stadieneinteilung (I-IV)
- Fibrose (ja/nein)

Die stetigen, intervallskalierten Variablen mit metrischem Messniveau umfassen:

- Alter bei Blutentnahme,
- Alter bei Erstdiagnose und
- Lungenfunktionsparameter (Ruhe FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub> (% des Sollwertes), FEV<sub>1</sub>/FVC, Diffusionskapazität).

### 3.6.2 Statistische Verfahren

Die genannten Variablen wurden anhand folgender statistischer Verfahren untersucht:

Deskriptive Statistik – mithilfe von Kreuztabellen wurde der Zusammenhang zwischen nominalen und ordinalen Variablen untersucht.

Analytische Statistik – anhand des T-Tests wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und unter den Kollektiven verglichen.

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson ermittelt. Dabei wurde die Unabhängigkeit der Variablen und damit indirekt der Zusammenhang der Merkmale überprüft. Der so ermittelte Chi-Quadrat-Wert  $p$  berechnet sich aus der Differenz zwischen beobachteten und erwarteten Ereignissen:

$$p = \chi^2 = \sum (\text{Beobachtungswert} - \text{Erwartungswert})^2 / \text{Erwartungswert}$$

Statistische Signifikanz wurde erreicht bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\leq 0,05$ , d.h. bei einem Chi-Quadrat-Wert  $p \leq 0,05$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Beschreibung des TGF- $\beta_3$ 17369 T/C rs3917200-Polymorphismus

Der untersuchte Polymorphismus für TGF- $\beta_3$  (17369 T/C rs3917200) befindet sich auf dem Chromosom 14q24. Die Größe der zu amplifizierenden Basensequenz umfasst 146 Basenpaare. Die vorliegende Untersuchung orientiert sich an einem zuvor in einer niederländischen Studie untersuchten Polymorphismus.

5'- CA CAC CTC CCT CGC AGA CTG CAC TGC CCC TCC TCC TGG GCA GTG  
 ATG GGG CGT GTG GAG GAG GCA CCC TCC AAG *GGC TCT GCT CTC **TTC** AGA*  
*CAG GAG ATT GTC ACT TTC CTT CCC TTC TTC AGG CGT GGA CAA TGA GGA*  
TGA CCA TGG CCG TGG A

**Abbildung 3:** DNA-Sequenz im Bereich des untersuchten rs3917200-Polymorphismus. Der Basenaustausch von Thymin zu Cytosin ist fett und vergrößert dargestellt. Die Sensorsequenz ist kursiv dargestellt, die darauf folgende Sequenz des Anchor TGF- $\beta_3$  ist kursiv und unterstrichen. Die Ansatzstellen der Primer sind unterstrichen.

### 4.2 Statistische Datenanalyse

Das untersuchte Patientenkollektiv wurde sowohl in seiner Gesamtheit als auch differenziert nach dem Vorliegen einer Fibrose im Sarkoidose-Kollektiv demographisch charakterisiert und mit der gesunden Probandengruppe verglichen.

#### 4.2.1 Demographische Basisdaten

Die Verteilung der entscheidenden Variablen – Geschlecht, Herkunft, Alter, Lungenfunktion und Verlauf – ist nachfolgend tabellarisch dargestellt.

Das Sarkoidose-Gesamtkollektiv umfasst 296 Personen mit klinisch gesicherter Diagnose der Sarkoidose entsprechend den Richtlinien des ATS/ERS/WASOG Komitees. Aus diesem Kollektiv wurde eine weitere Kohorte bestehend aus 32 Sarkoidose-Patienten mit Lungenfibrose gebildet. Den genannten Patientenkohorten steht ein Kontrollkollektiv von 377 gesunden Normalpersonen gegenüber.

		Sarkoidose- Gesamtkollektiv	Sarkoidose-Pat. mit Fibrose	Kontrollkollektiv
Gesamt (n)		296	32	377
Geschlecht	Weiblich	168 (56,8%)	14 (43,8%)	202 (53,6%)
	Männlich	128 (43,2%)	18 (56,3%)	175 (46,4%)
Herkunft	Deutsch	268 (90,5%)	31 (96,9%)	346 (91,8%)
	Europäisch	28 (9,5%)	1 (3,1%)	31 (8,2%)
Alter <sup>1</sup>		53,01 ± 12,94	56,66 ± 8,83	53,17 ± 17,60

**Tabelle 3:** Demographische Basisdaten der Patienten- und Kontrollkohorte (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen und die Mittelwerte ± Standardabweichungen der stetigen Variablen)

Sowohl im Sarkoidose-Gesamtkollektiv als auch im Kontrollkollektiv zeigt sich bezüglich der Geschlechtsverteilung ein minimales Überwiegen der weiblichen Sarkoidose-Erkrankten, wobei der Vergleich zwischen den einzelnen Patientengruppen ein ähnliches Geschlechtsverhältnis widerspiegelt. Das Kollektiv Sarkoidose-Erkrankter mit Fibrose zeigt dem Kontrollkollektiv gegenüber ein minimales Überwiegen des männlichen Geschlechts.

Die Altersverteilung zeigt im Sarkoidose-Gesamtkollektiv mit einem Mittelwert von 53,01 Jahren eine fast identische Alterstruktur im Vergleich zum Kontrollkollektiv (53,17 Jahre). Im Kollektiv der Sarkoidose-Patienten mit Fibrose lag der Mittelwert leicht über dem des Kontrollkollektivs (56,66 Jahre versus 53,17 Jahre).

---

<sup>1</sup> Alter bei Studieneinschluss



		Sarkoidose- Gesamtkollektiv	Sarkoidose-Pat. mit Fibrose	Kontrollkollektiv
Gesamt (n)		296	32	377
Alter bei Erstdiagnose		41,00 ± 12,30	40,80 ± 9,13	/
Verlauf	akut <sup>1</sup>	70	0	/
	chronisch <sup>2</sup>	168	32	/
	unklar <sup>3</sup>	58	0	/
Stadium bei Erstdiagnose	0 <sup>4</sup>	10 (3,4%)	0	/
	1a <sup>5</sup>	42 (14,2%)	2 (6,25%)	/
	1	38 (12,8%)	2 (6,25%)	/
	2	88 (29,7%)	6 (18,8%)	/
	3	21 (7,1%)	20 (62,5%)	/
	k. Angabe	97 (32,8%)	2 (6,25%)	/
Stadium im Verlauf <sup>6</sup>	0	21 (7,0%)	0	/
	1	11 (3,7%)	0	/
	2	41 (13,9%)	0	/
	3	20 (6,8%)	19 (59,4%)	/
	k. Angabe	203 (68,6%)	13 (40,6%)	/

**Tabelle 4:** Krankheitsbezogene Basisdaten (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen und die Mittelwerte ± Standardabweichungen der stetigen Variablen)

<sup>1</sup> bei weniger als zwei Sarkoidose-Episoden im Leben oder einer Krankheitsdauer  $\leq 2$  Jahre

<sup>2</sup> bei mehr als zwei Sarkoidose-Episoden im Leben oder einer Krankheitsdauer  $\geq 2$  Jahre

<sup>3</sup> unklar, da Beobachtungszeitraum zu kurz ( $< 2$  Jahre)

<sup>4</sup> extrapulmonaler Befall

<sup>5</sup> entspricht Löfgren-Syndrom

<sup>6</sup> innerhalb des Beobachtungszeitraums

Anhand von Tabelle 4 lässt sich im Sarkoidose-Gesamtkollektiv ein deutliches Überwiegen eines chronischen Krankheitsverlaufs erkennen (56,8%). Bei bekanntem Stadium bei Diagnosestellung überwiegt im selbigen Kollektiv mit 29,7% das Stadium 2. Konkrete Aussagen bezüglich der Stadienverteilung im Verlauf der Erkrankung sind jedoch aufgrund fehlender Angaben (68,5%) nur bedingt möglich. Bei mehr als der Hälfte (62,5%) aller Sarkoidose-Patienten mit Lungenfibrose konnte bereits bei Diagnosestellung ein Stadium 3 festgestellt werden. In den meisten Fällen wurde keine Veränderung bezüglich der Stadienverteilung im Verlauf der Erkrankung deutlich, jedoch lässt sich auch hier aufgrund fehlender Angaben nur bedingt eine konkrete Aussage treffen.

		Sarkoidose-Gesamtkollektiv	Sarkoidose-Pat. mit Fibrose	Kontrollkollektiv
Gesamt (n)		296	32	377
Ruhe FEV <sub>1</sub> (l/s)		2,89 ± 0,91	2,55 ± 0,97	2,52 ± 0,94
FEV <sub>1</sub> (% des Sollwertes)		90,70 ± 19,89	81,27 ± 25,40	88,41 ± 25,27
DLco (% des Sollwertes)	TLCOc SB <sup>1</sup>	87,88 ± 16,53	82,99 ± 19,16	/
	TLCOc/VA <sup>2</sup>	97,76 ± 15,54	93,22 ± 18,58	/

**Tabelle 5:** Lungenfunktionsparameter (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte der diskreten Variablen und die Mittelwerte ± Standardabweichungen der stetigen Variablen)

Bei dem Vergleich des Sarkoidose-Gesamtkollektivs gegenüber dem Kontrollkollektiv zeigen sich bezüglich der Lungenfunktionsparameter keine großen Differenzen. So liegt die Einsekundenkapazität FEV<sub>1</sub> mit einem Mittelwert von 90,7% in der Nähe des Mittelwertes des Kontrollkollektivs (88,41%). Dem gegenüber ist der Mittelwert des Kollektivs der Sarkoidose-Patienten mit Fibrose im Vergleich zum Kontrollkollektiv wesentlich erniedrigt (81,27%). Der Absolutwert des Mittelwertes der Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (TLCOc SB) liegt im Sarkoidose-Gesamtkollektiv bei 87,88% und bei Sarkoidose-Erkrankten mit Fibrose bei nur 82,99%. In Abhängigkeit des Alveolarvolumens ist die Diffusionskapazität bei Sarkoidose-Erkrankten mit Fibrose ebenfalls niedriger als im Sarkoidose-Gesamtkollektiv (93,22% vs. 97,76%).

<sup>1</sup> Hb-korrigierter Kohlenmonoxid-Transferfaktor (in Single-Breath-Technik), Absolutwert

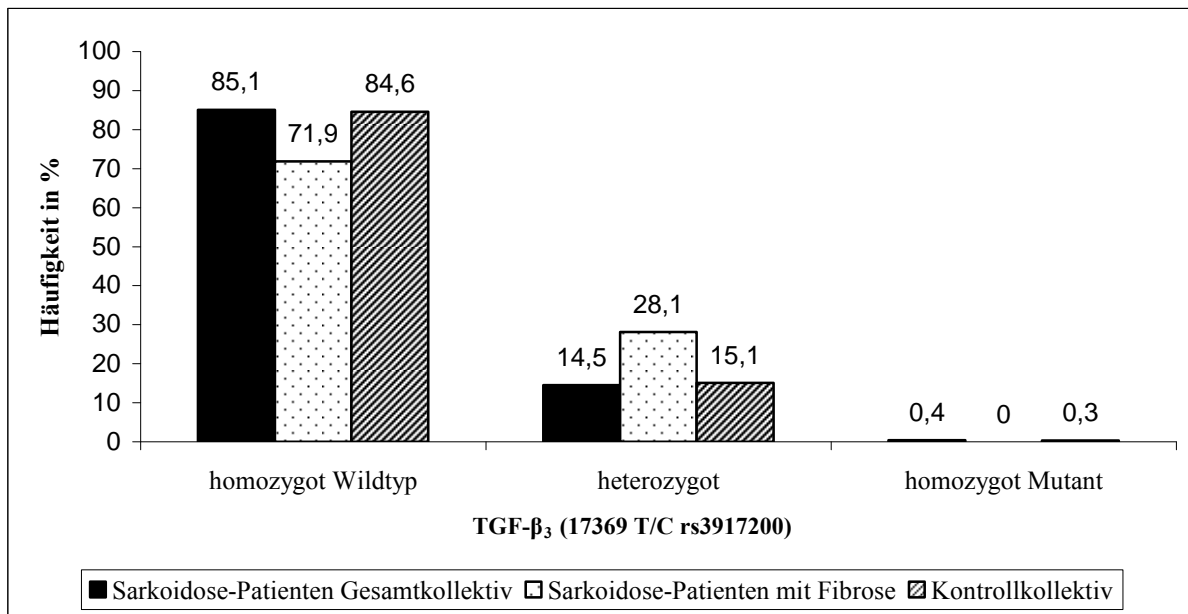
<sup>2</sup> Hb-korrigierter Kohlenmonoxid-Transferfaktor geteilt durch das Alveolarvolumen, volumenkoriert

#### 4.2.2 Verteilung von Genotypen und Allelfrequenzen des rs 3917200-Polymorphismus des TGF- $\beta_3$ -Gens

Jeder Proband wurde an dem untersuchten polymorphen Genort genotypisiert. Entsprechend der Zugehörigkeit der Probanden zu ihrem Kollektiv konnten Aussagen zur Häufigkeit der Genotypen und Allelfrequenzen in den einzelnen Gruppen getroffen werden. Anhand des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson wurde durch Bestimmung des p-Werts die Genotypenverteilung in den drei Patientengruppen mit der in der Kontrollgruppe verglichen und auf signifikante Unterschiede hin untersucht (Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$ ).

	Sarkoidose-Gesamtkollektiv	Sarkoidose-Pat. mit Fibrose	Kontrollkollektiv
Gesamt (n)	296	32	377
Homozygot Wildtyp (TT)	252 (85,1%)	23 (71,9%)	319 (84,6%)
Heterozygot Mutation (TC)	43 (14,5%)	9 (28,1%)	57 (15,1%)
Homozygot Mutation (CC)	1 (0,4%)	0	1 (0,3%)
Allelfrequenz des Mutationsallels	0,076 (45/592)	0,141 (9/64)	0,078 (59/754)
Prävalenz des Mutationsallels	0,149 (44/296)	0,281 (9/32)	0,154 (58/377)
P-Wert (verglichen mit Kontrollkollektiv)	0,964	0,153	

**Tabelle 6:** Sarkoidose-Gesamtkollektiv vs. Sarkoidose-Pat. mit Fibrose vs. Kontrollkollektiv. Genotypenverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- $\beta_3$ -rs3917200 Polymorphismus (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)



**Abbildung 4:** Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung des TGF- $\beta_3$ -rs3917200 Polymorphismus: Sarkoidose-Gesamtkollektiv vs. Sarkoidose-Pat. mit Fibrose vs. Kontrollkollektiv

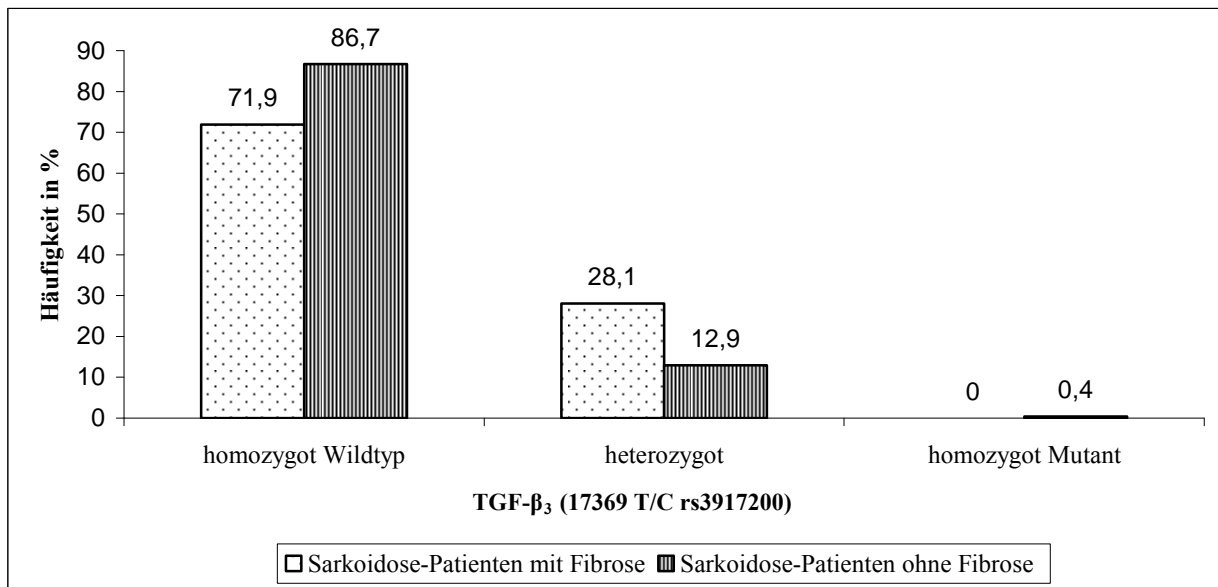
Hierbei sind keine signifikanten Unterschiede bei der Verteilung der Genotypen dieses Polymorphismus zu erkennen. Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, sind in den einzelnen Gruppen bei Anwendung des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson alle p-Werte  $> 0,05$ . Es lassen sich jedoch beim Vergleich der Werte Tendenzen beobachten, die im Folgenden dargestellt werden sollen.

Der Vergleich des Sarkoidose-Gesamtkollektivs mit dem Kontrollkollektiv ergibt bezüglich der Häufigkeitsverteilung des Polymorphismus mit einem p-Wert von 0,964 kein statistisch signifikantes Ergebnis. Auch mit Hilfe der aus den Absolutwerten ermittelten Prozentangaben lassen sich kaum Unterschiede bei der Gegenüberstellung dieser beiden Gruppen erkennen. Die Prävalenz liegt im Patientenkollektiv bei 14,9%, während im Normalkollektiv eine Prävalenz von 15,4% erreicht wird. Die Frequenz des Mutationsallels zeigt mit 7,6% bzw. 7,8% im Patienten- bzw. Vergleichskollektiv nah beieinander liegende Werte und ist Ausdruck der fehlenden Assoziation mit dem betrachteten SNP im TGF- $\beta_3$ -Gen. Homozygote Mutationsallelträger sind 0,4% der 296 Sarkoidose-Patienten und 0,3% der 377 Kontrollpersonen. Den heterozygoten TC-Genotyp am genannten Genort weisen 14,5% des Sarkoidose-Gesamtkollektivs und 15,1% der Vergleichsgruppe auf. Homozygot für den Wildtyp sind 85,1% der Sarkoidose-Patienten und 84,6% der Kontrollgruppe.

Der Vergleich der Sarkoidose-Patienten mit Fibrose mit dem Kontrollkollektiv ergibt mit einem p-Wert von 0,153 ebenfalls kein statistisch signifikantes Ergebnis. Homozygotie für das Mutationsallel findet sich bei keinem der Patienten aus diesem Kollektiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv, bei dem 0,3% der 377 Kontrollpersonen homozygote Mutationsallelträger sind. Mit 28,1% überwiegt bei Sarkoidose-Patienten mit Fibrose der Anteil des heterozygoten TC-Genotyps deutlich im Vergleich zum Kontrollkollektiv (15,1%). Homozygot für den Wildtyp sind währenddessen nur 71,9% der Erkrankten, weniger als im Kontrollkollektiv (84,6%). Es zeigt sich eine Allelfrequenz des Mutationsallels von 14,1%, während im Kontrollkollektiv eine Frequenz von nur 7,8% nachgewiesen werden kann. Die Prävalenz des Mutationsallels liegt bei den Patienten mit Fibrose mit 28,1% fast doppelt so hoch wie die des Kontrollkollektivs (15,4%).

	Sarkoidose-Patienten mit Fibrose	Sarkoidose-Patienten ohne Fibrose
Gesamt (n)	32	264
Homozygot Wildtyp (TT)	23 (71,9%)	229 (86,7%)
Heterozygot Mutation (TC)	9 (28,1%)	34 (12,9%)
Homozygot Mutation (CC)	0	1 (0,4%)
Allelfrequenz des Mutationsallels	0,141 (9/64)	0,068 (36/528)
Prävalenz des Mutationsallels	0,281 (9/32)	0,133 (35/264)
P-Wert (verglichen mit Sark.-Pat. ohne Fibrose)	0,197	

**Tabelle 7:** Sarkoidose-Patienten mit Fibrose vs. Sarkoidose-Patienten ohne Fibrose. Genotypenverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- $\beta_3$ -rs3917200 Polymorphismus (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)



**Abbildung 5:** Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung des TGF- $\beta_3$ -rs3917200 Polymorphismus: Sarkoidose-Patienten mit Fibrose vs. Sarkoidose-Patienten ohne Fibrose

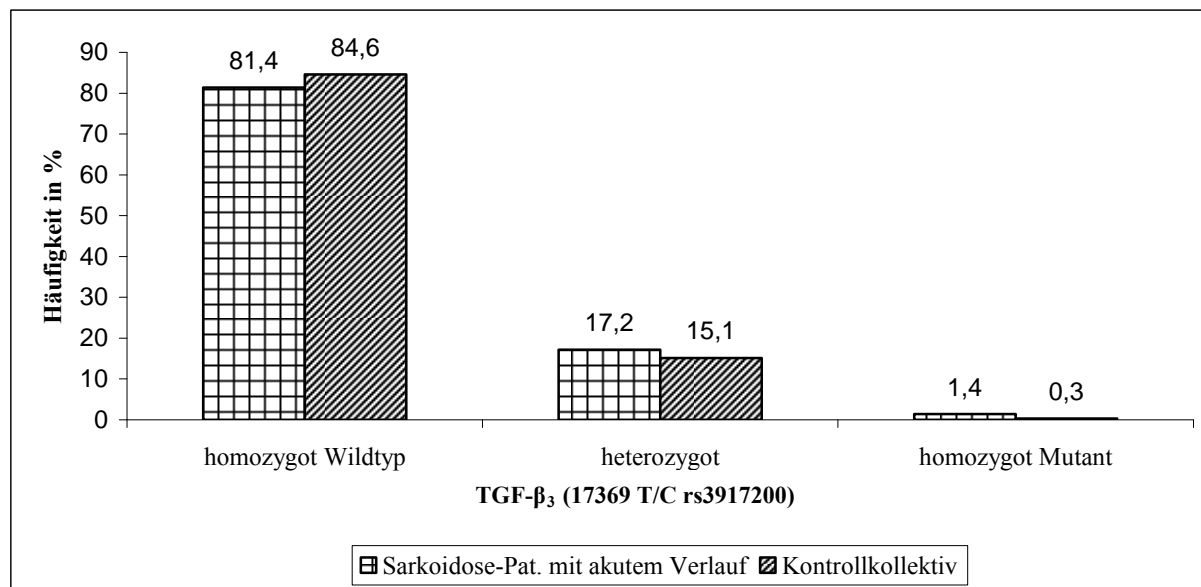
Die Betrachtung einer möglichen Beeinflussung der Entwicklung einer Fibrose bei Sarkoidose-Erkrankten durch den rs3917200 Polymorphismus ergibt zwar mit einem p-Wert von 0,197 kein statistisch signifikantes Ergebnis, lässt jedoch einen Trend erkennen (s. Tab. 7).

Während nur 12,9% der Sarkoidose-Patienten ohne Fibrose den heterozygoten TC-Genotyp am genannten Genort aufweisen, zeigen Fibrose-Erkrankte mit einer Häufigkeit von 28,1% einen weitaus höheren Anteil des TC-Genotyps. Keiner der Patienten mit Fibrose ist homozygoter Mutationsallelträger, während einer der 264 Erkrankten ohne Fibrose mit dem CC-Genotyp nachgewiesen werden kann. Homozygot für den Wildtyp sind 71,9% der Sarkoidose-Patienten mit Fibrose und 86,7% der Patienten ohne Fibrose.

Mit einer Mutationsallelfrequenz von 14,1% und einer Prävalenz von 28,1% ist der Anteil der Träger des Mutationsallels unter den Sarkoidose-Patienten mit Fibrose mehr als doppelt so hoch wie der Anteil des Mutationsallels unter den Sarkoidose-Patienten ohne Fibrose (Frequenz von 6,8% und Prävalenz von 13,3%).

	Sarkoidose-Patienten mit akutem Verlauf	Kontrollkollektiv
Gesamt (n)	70	377
Homozygot Wildtyp (TT)	57 (81,4%)	319 (84,6%)
Heterozygot Mutation (TC)	12 (17,2%)	57 (15,1%)
Homozygot Mutation (CC)	1 (1,4%)	1 (0,3%)
Allelfrequenz des Mutationsallels	0,1 (14/140)	0,078 (59/754)
Prävalenz des Mutationsallels	0,186 (13/70)	0,154 (58/377)
P-Wert (verglichen mit Kontrollkollektiv)	0,37	

**Tabelle 8:** Sarkoidose-Patienten mit akutem Verlauf vs. Kontrollkollektiv. Genotypenverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- $\beta_3$ -rs3917200 Polymorphismus (dargestellt sind die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)



**Abbildung 6:** Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung des TGF- $\beta_3$ -rs3917200 Polymorphismus: Sarkoidose-Patienten mit akutem Verlauf vs. Kontrollkollektiv

Die Gegenüberstellung von Sarkoidose-Patienten mit akutem Verlauf und dem Kontrollkollektiv im Hinblick auf Unterschiede in der Verteilung der Genotypen des rs3917200 Polymorphismus ergibt mit einem p-Wert von 0,37 keine statistische Signifikanz (s. Tab. 8).

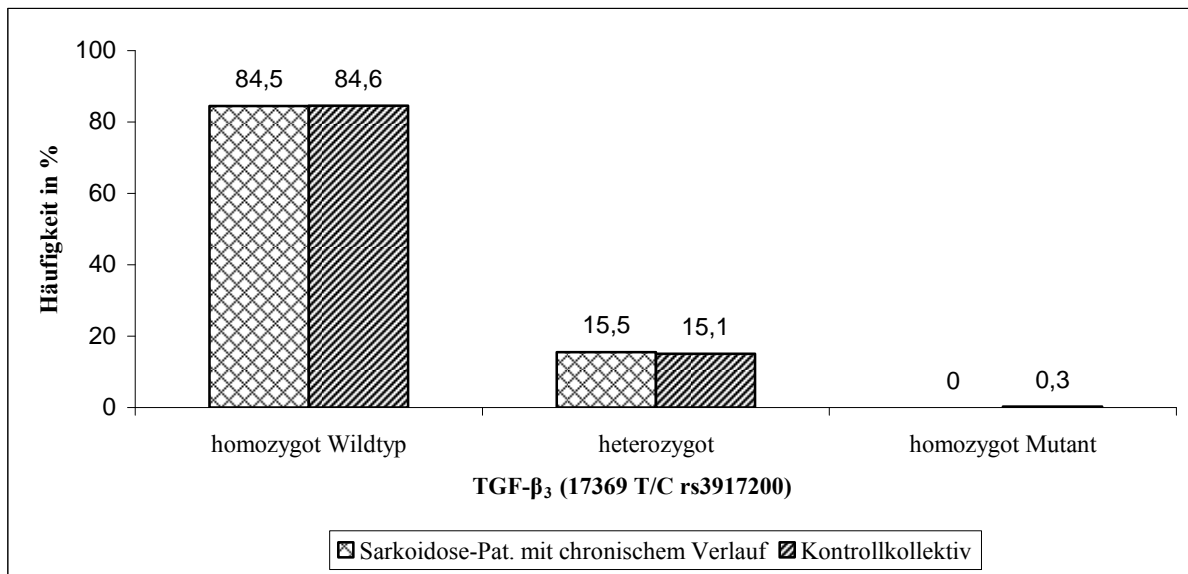
1,4% der Patienten mit akutem Verlauf weisen eine Homozygotie für die Mutation auf gegenüber 0,3% der Vergleichsgruppe. Heterozygote Allelträger sind ebenfalls häufiger Sarkoidose-Patienten mit akutem Verlauf (17,2%) als Kontrollpersonen, deren Anteil am Kontrollkollektiv 15,1% ausmacht. Homozygotie für das Wildtypallel liegt bei 81,4% bei Sarkoidose-Patienten mit akutem Verlauf bzw. 84,6% bei den Kontrollpersonen.

Mit einer Mutationsallelfrequenz von 10% und einer Prävalenz von 18,6% ist der Anteil der Träger des Mutationsallels unter den Sarkoidose-Patienten mit akutem Verlauf höher als der Anteil der Träger des Mutationsallels unter den Normalpersonen (Frequenz von 7,8% und Prävalenz von 15,4%).

	Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf	Kontrollkollektiv
Gesamt (n)	168	377
Homozygot Wildtyp (TT)	142 (84,5%)	319 (84,6%)
Heterozygot Mutation (TC)	26 (15,5%)	57 (15,1%)
Homozygot Mutation (CC)	0	1 (0,3%)
Allelfrequenz des Mutationsallels	0,077 (26/336)	0,078 (59/754)
Prävalenz des Mutationsallels	0,155 (26/168)	0,154 (58/377)
P-Wert (verglichen mit Kontrollkollektiv)	0,80	

**Tabelle 9:** Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf vs. Kontrollkollektiv. Genotypenverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- $\beta_3$ -rs3917200 Polymorphismus (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)





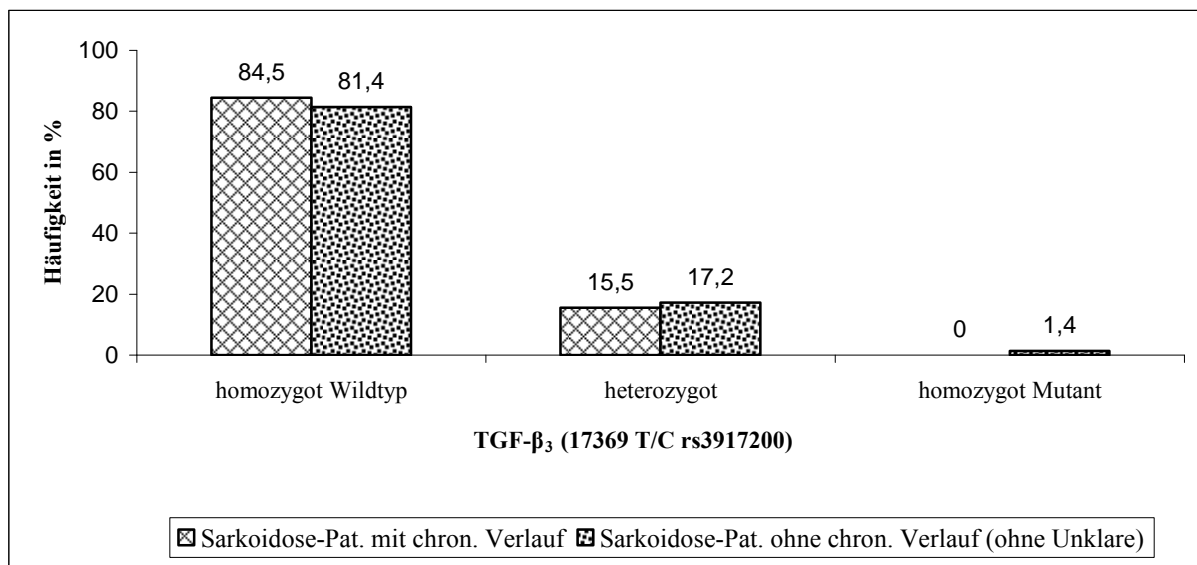
**Abbildung 7:** Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung des TGF- $\beta_3$ -rs3917200 Polymorphismus: Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf vs. Kontrollkollektiv

Die Betrachtung einer möglichen Beeinflussung eines chronischen Verlaufs bei Sarkoidose-Erkrankten durch den rs3917200 Polymorphismus ergibt keinen signifikanten Zusammenhang (s. Tab. 9). Im angewendeten Chi-Quadrat-Test liegt der p-Wert bei 0,8.

Homozygotie für das Mutationsallel liegt bei Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf nicht vor und beträgt 0,3% beim Kontrollkollektiv. Die Verteilung der heterozygoten Allelträger liegt bei 15,5% im Sarkoidose-Kollektiv und 15,1% in der Vergleichsgruppe. Ebenso ausgeglichen zeigt sich die Verteilung der homozygoten Allelträger für den Wildtyp: 84,5% im Sarkoidose-Kollektiv mit chronischem Verlauf und 84,6% im Kontrollkollektiv tragen am TGF- $\beta_3$ -Genort den TT-Genotyp. Frequenz und Prävalenz des Mutationsallels halten dies fest: Eine Mutationsallelfrequenz von 7,7% und 7,8% und eine Prävalenz von 15,5% und 15,4% in der Gruppe chronisch Sarkoidose-Erkrankter bzw. in der Kontrollgruppe sind Ausdruck der fehlenden Korrelation.

	Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf	Sarkoidose-Pat. ohne chroni- schen Verlauf
Gesamt (n)	168	70
Homozygot Wildtyp (TT)	142 (84,5%)	57 (81,4%)
Heterozygot Mutation (TC)	26 (15,5%)	12 (17,2%)
Homozygot Mutation (CC)	0	1 (1,4%)
Allelfrequenz des Mutationsallels	0,077 (26/336)	0,1 (14/140)
Prävalenz des Mutationsallels	0,155 (26/168)	0,186 (13/70)
P-Wert (vergl. mit Sark.- Pat. ohne chron. Verlauf)	0,28	

**Tabelle 10:** Sarkoidose-Pat. mit chronischem Verlauf vs. Sarkoidose-Pat. ohne chronischen Verlauf (exklusive Patienten mit fehlenden Angaben zum Krankheitsverlauf). Genotypenverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- $\beta_3$ -rs3917200 Polymorphismus (dargestellt sind Absolutwerte/Prozentsätze der diskreten Variablen)



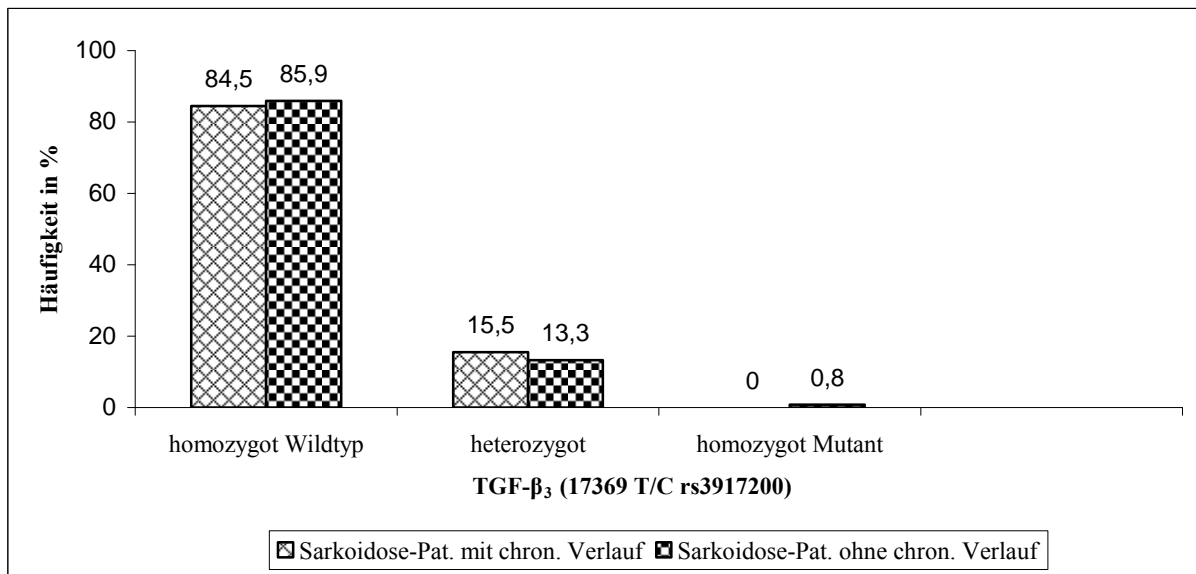
**Abbildung 8:** Graphische Darst. der Häufigkeitsverteilung des TGF- $\beta_3$ -rs3917200 Polymorphismus: Sarkoidose-Pat. mit chron. Verlauf vs. Sarkoidose-Pat. ohne chron. Verlauf (exklusive Patienten mit fehlenden Angaben zum Krankheitsverlauf)

Der Vergleich der Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf gegenüber Sarkoidose-Erkrankten ohne chronischen Verlauf bezüglich des rs3917200 Polymorphismus ergibt keinen signifikanten Zusammenhang. Im angewendeten Chi-Quadrat-Test liegt der p-Wert bei 0,28. Aufgrund fehlender Angaben in 58 Fällen bezüglich des Krankheitsverlaufes (chronisch vs. akut) wurden diese der statistischen Auswertung entzogen (s. Tab. 10).

Homozygotie für das Mutationsallel findet sich bei keinem der chronisch erkrankten Sarkoidose-Patienten im Vergleich zum Patientenkollektiv ohne chronischen Verlauf, bei dem 1,4% der 70 Personen homozygote Mutationsallelträger sind. Den heterozygoten TC-Genotyp am genannten Genort weisen 15,5% der chronisch erkrankten Patienten und 17,2% der Sarkoidose-Patienten ohne chronischen Verlauf auf. Homozygot für den Wildtyp sind 84,5% der Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf und 81,4% der Patienten ohne chronischen Verlauf. Mit einer Mutationsallelfrequenz von 10% und einer Prävalenz von 18,6% ist der Anteil der Träger des Mutationsallels unter den Sarkoidose-Patienten ohne chronischen Verlauf höher als der Anteil der Träger des Mutationsallels unter den chronisch erkrankten Sarkoidose-Patienten (Frequenz von 7,7% und Prävalenz von 15,5%).

	Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf	Sarkoidose-Pat. ohne chroni- schen Verlauf
Gesamt (n)	168	128
Homozygot Wildtyp (TT)	142 (84,5%)	110 (85,9%)
Heterozygot Mutation (TC)	26 (15,5%)	17 (13,3%)
Homozygot Mutation (CC)	0	1 (0,8%)
Allelfrequenz des Mutationsallels	0,077 (26/336)	0,074 (19/256)
Prävalenz des Mutationsallels	0,155 (26/168)	0,141 (18/128)
P-Wert (vergl. mit Sark.- Pat. ohne chron. Verlauf)	0,40	

**Tabelle 11:** Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf vs. Sarkoidose-Pat. ohne chronischen Verlauf. Genotypenverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- $\beta_3$ -rs3917200 Polymorphismus (dargestellt sind die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)



**Abbildung 9:** Graphische Darst. der Häufigkeitsverteilung des TGF-β<sub>3</sub>-rs3917200 Polymorphismus: Sarkoidose-Patienten mit chron. Verlauf vs. Sarkoidose-Pat. ohne chron. Verlauf

Unter Einbeziehung der 58 Sarkoidose-Patienten mit unklarem Krankheitsverlauf in das Kollektiv der Sarkoidose-Patienten ohne chronischen Verlauf kann bei der Gegenüberstellung gegenüber dem Kollektiv Sarkoidose-Erkrankter mit chronischem Verlauf im Hinblick auf Unterschiede in der Verteilung der Genotypen des rs3917200 Polymorphismus mit einem p-Wert von 0,40 keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden (s. Tab. 11).

Homozygotie für das Mutationsallel liegt bei keinem der 168 Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf vor und beträgt 0,8% bei Sarkoidose-Patienten ohne chronischen Krankheitsverlauf. Die Verteilung der heterozygoten Allelträger liegt bei 15,5% im Kollektiv chronischer Sarkoidose-Patienten und bei 13,3% bei Patienten ohne chronischen Verlauf. Ausgeglichen zeigt sich die Verteilung der homozygoten Allelträger für den Wildtyp: 84,5% im Sarkoidose-Kollektiv mit chronischem Verlauf und 85,9% im Kontrollkollektiv tragen am TGF-β<sub>3</sub>-Genort den TT-Genotyp. Eine Mutationsallelfrequenz von 7,7% und 7,4% und eine Prävalenz von 15,5% und 14,5% in der Gruppe chronisch Sarkoidose-Erkrankter bzw. in der Gruppe Sarkoidose-Erkrankter ohne chronischen Verlauf sind Ausdruck der fehlenden Korrelation.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der 17369 T/C (rs3917200)-SNP (single-nucleotide-polymorphismus) im TGF- $\beta_3$ -Gen hinsichtlich seines Einflusses auf Entstehung und Verlauf der Sarkoidose in einer Genotyp-Phänotyp-Assoziationsstudie untersucht. Hierbei konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem untersuchten Polymorphismus und dem Sarkoidose-Gesamtkollektiv sowie den akuten, chronischen und fibrotischen Subkollektiven nachgewiesen werden.

Der 17369 T/C (rs3917200)-Polymorphismus wies eine ähnliche Frequenzverteilung des Polymorphismus im Sarkoidose-Kollektiv und im Kontrollkollektiv auf. Ein Zusammenhang zwischen dem untersuchten Polymorphismus und Lungenfunktionswerten, Geschlecht, Alter sowie Herkunft konnte nicht festgestellt werden.

Ein möglicher Einfluss des 17369 T/C (rs3917200)-Polymorphismus im TGF- $\beta_3$ -Gen auf einen akuten Krankheitsverlauf der Sarkoidose konnte in der vorliegenden Arbeit mit einem p-Wert von 0,37 nicht nachgewiesen werden. Sarkoidose-Patienten mit akutem Krankheitsverlauf wiesen dennoch im Vergleich zum Kontrollkollektiv eine höhere Allelfrequenz des Mutationsallels auf. In der vorliegenden Untersuchung lag die Frequenz des seltenen Allels des rs3917200-Polymorphismus in der Patientengruppe mit akutem Verlauf bei 0,1.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Untersuchung kein signifikanter Einfluss des rs3917200-Polymorphismus auf einen chronischen Verlauf der Sarkoidose festgestellt werden. Geringe Abweichungen bei der Allelfrequenz des C-Allels und der Genotypverteilung in Patienten- und Kontrollkollektiv belegen diese Aussage. Bezüglich der Genotypverteilung innerhalb des Patientenkollektivs wurde bei Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf im Vergleich zu Sarkoidose-Patienten ohne chronischen Verlauf ebenfalls kein statistisch signifikanter Zusammenhang deutlich. Für den untersuchten rs3917200-Polymorphismus im TGF- $\beta_3$ -Gen wurde somit in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Einfluss auf einen chronischen Verlauf nachgewiesen.

Weiterer Bestandteil der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des rs3917200-Polymorphismus im TGF- $\beta_3$ -Gen auf die 32 Patienten mit einer Sarkoidose-assoziierten Lungenfibrose zu untersuchen. Die Entwicklung einer Lungenfibrose ist eine gefürchtete Komplikation der Sarkoidose. So kann zwar häufig ein spontaner Rückgang der Parenchymveränderungen der Lungen beobachtet werden, bei 20 bis 25% der Patienten präsentiert sich jedoch das Bild einer

Lungenfibrose (Hunninghake und Crystal, 1981). Auch wenn in der vorliegenden Untersuchung kein statistisch signifikanter Zusammenhang dargestellt werden konnte, wiesen die Patienten mit Sarkoidose-assoziiierter Lungenfibrose im Vergleich zum Kontrollkollektiv deutlich mehr heterozygote Genotypen auf. Die Allelfrequenz des Mutationsallels war im Patientenkollektiv fast doppelt so hoch wie die des Kontrollkollektivs.

Ein deutlicher Trend zeigt sich auch im Hinblick auf eine Analyse des untersuchten Polymorphismus bei Sarkoidose-Patienten mit Lungenfibrose im Vergleich zu Sarkoidose-Patienten ohne Lungenfibrose. Wenn auch ohne statistische Signifikanz, war das C-Allel des TGF- $\beta_3$  17369 T/C -Polymorphismus wesentlich häufiger bei Patienten mit Sarkoidose-assoziiierter Lungenfibrose nachzuweisen als bei den Patienten mit akutem/selbstlimitierendem und chronischem Verlauf ohne Lungenfibrose.

Bei dem Vergleich der hier gewonnenen Resultate mit einer vergleichbaren niederländischen Studie (Kruit et al. (2006 a)) zeigen sich neben vielen Übereinstimmungen auch Unterschiede. Bei der Studie Kruits an 154 Sarkoidose-Patienten und 315 niederländischen Kontrollpersonen fand sich ebenfalls eine ähnliche Frequenzverteilung des Polymorphismus im Patienten- und Kontrollkollektiv. Somit scheint laut der hier vorliegenden Untersuchung und der von Kruits Arbeitsgruppe der untersuchte Polymorphismus nicht mit einer erhöhten Empfänglichkeit für eine Sarkoidose assoziiert zu sein.

Der Einfluss des 17369 T/C (rs3917200)-Polymorphismus auf einen akuten oder chronischen Krankheitsverlauf der Sarkoidose zeigte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Zusammenhang und stimmt mit unseren Beobachtungen überein. Bei dem Vergleich der Frequenzverteilungen des Polymorphismus bei Patienten mit Sarkoidose-assoziiierter Lungenfibrose und dem Kontrollkollektiv konnte die Arbeitsgruppe Kruits ebenfalls keinen statistisch signifikanten Zusammenhang feststellen. Ebenso wie in der hier vorliegenden Untersuchung konnte jedoch eine deutlich höhere Allelfrequenz des Mutationsallels im Patientenkollektiv als im Kontrollkollektiv beobachtet werden.

Kruits Arbeitsgruppe konnte an 24 Patienten mit diagnostizierter Sarkoidose-assoziiierter Lungenfibrose einen statistisch signifikanten Einfluss des SNPs im TGF- $\beta_3$ -Gen auf die Entwicklung einer Lungenfibrose bei Sarkoidose-Patienten nachweisen. Hierbei trat das C Allel des TGF- $\beta_3$  17369 T/C Polymorphismus bei Patienten mit Fibrose signifikant häufiger auf als bei Patienten mit akutem/selbstlimitierendem und chronischem Verlauf ohne Lungenfibrose ( $p=0,05$ ). Diese Ergebnisse konnten in der hier vorliegenden Untersuchung an einem größeren Kollektiv nicht

bestätigt werden. So konnte zwar in der vorliegenden Arbeit das C-Allels des TGF- $\beta_3$  17369 T/C –Polymorphismus häufiger bei Patienten mit Sarkoidose-assoziiierter Lungenfibrose als bei Patienten mit akutem/selbslimitierendem und chronischem Verlauf ohne Lungenfibrose nachgewiesen werden, jedoch wurde eine statistische Signifikanz ( $p=0,08$ ) knapp verfehlt. Die Vermutung Kruits, dass der genetische Einfluss dieses SNPs im TGF- $\beta_3$ -Gen Auswirkungen auf die Tendenz zur Entwicklung einer Lungenfibrose bei Sarkoidose-Patienten haben könnte, konnten folglich in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden.

Diese teilweise unterschiedlichen Ergebnisse in beiden Untersuchungen lassen sich möglicherweise unter anderem auf Unterschiede in den jeweiligen Patienten- und Kontrollkollektiven zurückführen. Zum einen weicht das Alter in der hier vorliegenden Arbeit mit einem Mittelwert von ca. 53 Jahren im Patienten- und Kontrollkollektiv stark von dem der Studie Kruits mit einem Mittelwert von 36,5 Jahren im Patientenkollektiv und 39,0 Jahren im Kontrollkollektiv ab. Zum anderen weist die hier vorliegende Arbeit mit 296 Sarkoidose-Patienten und 377 Kontrollpersonen ein deutlich größeres Kollektiv auf als die Studie der Arbeitsgruppe von Kruit mit 154 Sarkoidose-Patienten und 315 Kontrollpersonen.

In vielen weiteren Studien wurden mögliche Kandidatengene der Sarkoidose intensiv untersucht. Hintergrund dieser Untersuchungen ist die Annahme, dass die Sarkoidose als polyätiologische Erkrankung betrachtet werden kann. Vermutlich führt ein noch unbekannter exogener Faktor zur Triggerung einer charakteristischen Immunantwort bei genetisch prädisponierten Individuen. Die Annahme einer genetischen Prädisposition basiert hauptsächlich auf zwei Beobachtungen:

1. Prävalenz- und Inzidenzraten der Sarkoidose unterscheiden sich in Abhängigkeit vom ethnischen Hintergrund.
2. Es konnte ein gehäuftes Auftreten der Sarkoidose in Familien festgestellt werden.

Des Weiteren weisen Unterschiede im Krankheitsverlauf bei verschiedenen ethnischen Gruppen auf eine genetische Komponente hin. Während die akute Form der Sarkoidose vorwiegend bei Kaukasiern auftritt, überwiegt bei Afroamerikanern der chronische Verlauf (Baughman et al., 2001; James et al., 1976).

Gen-Polymorphismen möglicher Kandidatengene könnten demnach Aufschluss über das Risiko an Sarkoidose zu erkranken geben. Auf diese Weise könnten des Weiteren Informationen über den Organbefall, das Ansprechen auf spezifische Therapien sowie den Krankheitsverlauf gewonnen werden. Viele kürzlich durchgeführte genetische Untersuchungen unterstützen die Vermutung, einer genetischen Anfälligkeit für die Sarkoidose. So wurde das butyrophilin-like 2 Gen

(BTNL2) in verschiedenen Studien als mögliches Gen für die Prädisposition einer Sarkoidose entdeckt (Li et al., 2006; Schürmann et al., 2000; Valentonyte et al., 2005). Li et al. (2006) konnten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen einem SNP im BTNL2-Gen und dem chronischen Krankheitsverlauf der Sarkoidose nachweisen. BTNL2 gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie und ist vermutlich ein stimulierendes Molekül in der Kaskade zur T-Zell-Aktivierung. Polymorphismen im BTNL2-Gen könnten demnach zu einer dysregulierenden Th-Zell-Aktivierung als Autoimmunantwort führen.

In einer Studie von Pabst et al. (2006) zeigte sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen TLR4-Mutationen und Patienten mit einem chronischen Verlauf der Sarkoidose.

In einer kürzlich durchgeführten genomweiten Studie von Hofman et al. (2008) mit 499 Sarkoidose-Patienten und 490 Kontrollpersonen machte sich ein auffälliger Zusammenhang zwischen dem Annexin A11 (ANXA11)-Gen und Sarkoidose-Patienten bemerkbar. Annexin A11 hat komplexe und essentielle Funktionen in unterschiedlichen biologischen Kaskaden, unter anderem in der Apoptose und Zellproliferation.

Auch eine aktuelle Zwillingsstudie von Sverrild et al. (2008) deutet auf einen genetischen Einfluss für die Empfänglichkeit einer Sarkoidose hin. Dabei wurde bei Zwillingen betroffener monozygoter Brüder oder Schwestern im Vergleich zur allgemeinen Population ein 80-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Sarkoidose festgestellt. Bei dizygoten Zwillingen zeigte sich demgegenüber nur ein 7-fach erhöhtes Risiko.

Durch die Identifizierung von Gen-Polymorphismen der drei Isoformen des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  konnten ebenfalls Einblicke in den genetischen Hintergrund der Sarkoidose gewonnen werden. Dabei konnten bei japanischen und weißen Patienten Leu10Pro- und Arg25Pro-Polymorphismen im TGF- $\beta_1$ -Gen für die Auswirkungen bei fortschreitender Sarkoidose verantwortlich gemacht werden (Niimi et al., 2002; Muraközy et al., 2001). Aussagen über mögliche Assoziationen des Polymorphismus zu Krankheitsverlauf, Anfälligkeit oder Ausmaß der Erkrankung konnten jedoch nicht gemacht werden.

Polymorphismen im TGF- $\beta_2$ - und TGF- $\beta_3$ -Gen konnten mit Hautfibrose bei systemischer Sklerodermie assoziiert werden (Susol et al., 2000). Diese Ergebnisse gaben Grund zu der Annahme, dass auch für die Sarkoidose-assoziierte Lungenfibrose Polymorphismen in diesen Genen verantwortlich sein könnten. Kruit et al. (2006 a) identifizierten in diesem Zusammenhang zwei verschiedene Polymorphismen im TGF- $\beta_2$ -Gen und den in dieser Arbeit untersuchten Polymorphis-



mus im TGF- $\beta_3$ -Gen, welche gehäuft bei Sarkoidose-Erkrankten mit einer Lungenfibrose auftreten.

Bezüglich der genauen Funktion des TGF- $\beta_3$ -Gens liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Während die Isoformen 1 und 2 der TGF- $\beta$ -Familie generell mit profibrotischen Eigenschaften beschrieben wurden, bleiben profibrotische Eigenschaften von TGF- $\beta_3$  vorerst umstritten (Nath et al., 1994; Shah et al., 1995). In Bezug auf Lungenfibrose anderer Ätiologien konnten dem Charakter von TGF- $\beta_3$  teilweise profibrotische Eigenschaften zugewiesen werden. Satomi et al. (2007) konnten bei der Untersuchung einer Paraquin-induzierten Lungenfibrose bei Ratten Widererwartens wesentlich höhere Werte von TGF- $\beta_3$  als von TGF- $\beta_1$  feststellen. Ebenso war bei der Entwicklung der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose bei Ratten TGF- $\beta_3$  häufiger nachzuweisen als die Isoformen 1 und 2 (Santana et al., 1995). Demgegenüber konnten Kaminski et al. (2000) bei Bleomycin-induzierter Lungenfibrose bei Mäusen keine Induzierung der TGF- $\beta$ -Isoformen feststellen. In-vitro konnten Coker et al. (1997) TGF- $\beta_3$  als potenteste Isoform für die Stimulierung der Prokollagen Produktion identifizieren. In einer weiteren Studie von Coker et al. (2001) wurden erstmals TGF- $\beta_3$ -Genexpression bei menschlicher Lungenfibrose nachgewiesen. Hier überwog jedoch der Anteil der TGF- $\beta_1$ -Genexpression. In einer aktuellen Studie konnten durch die exogene Zufuhr von TGF- $\beta_3$  profibrotische Effekte in den Lungen von Ratten nachgewiesen werden, obgleich auch in diesem Fall die von TGF- $\beta_1$  induzierten profibrotischen Effekte überwogen (Ask et al., 2008).

Diese teilweise kontroversen Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die Isoformen von TGF- $\beta$  gegenseitig in ihren Funktionen beeinflussen. Ask et al. (2008) vermuten, dass TGF- $\beta_3$  eine regulierende Rolle hat, indem es die TGF- $\beta_1$ -induzierte Genexpression reduzieren kann. Ältere Studien konnten wiederum nachweisen, dass die von TGF- $\beta_3$  stimulierte Kollagensynthese vorab von TGF- $\beta_1$ -abhängigen und -unabhängigen Mechanismen gesteuert wird (Murata et al., 1997). Die Autoren eben dieser Studie vermuteten, dass TGF- $\beta_3$  lediglich an der Feinabstimmung des bereits von allen Isoformen der TGF- $\beta$ -Familie induzierten Programms der Kollagenablagerung beteiligt sei.

Auch unterschiedliche Wirkungen von TGF- $\beta$  in Abhängigkeit vom Mikromilieu und vom Status der Zielzellen sind diskutiert worden (Ludviksson und Gunnlaugsdottir, 2003). Diese Vermutung könnte die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien bezüglich TGF- $\beta_3$  in Abhängigkeit von den untersuchten Objekten (Nager, Menschen, in-vitro) erklären. Vor diesem Hintergrund scheint es

jedoch auch sinnvoll, den Einfluss von TGF- $\beta_3$  auf fibrotische Veränderungen in anderen Organen zu betrachten.

Die Tatsache, dass Polymorphismen im TGF- $\beta_3$ -Gen auch mit Hautfibrose bei systemischer Sklerodermie assoziiert sind, bestätigt die Annahme, dass TGF- $\beta_3$  profibrotische Eigenschaften aufweist (Susol et al., 2000). Währenddessen konnte beim Einfluss von TGF- $\beta_3$  auf die Wundheilung und Narbenbildung Gegenteiliges bewiesen werden. Shah et al. (1995) zeigten signifikant reduzierte Narbenbildungen nach der exogenen Zufuhr von TGF- $\beta_3$ . Im Gegensatz dazu hatten TGF- $\beta_1$  und TGF- $\beta_2$  keinerlei Einfluss auf die Narbenbildung. Die Menge der Monozyten und Makrophagen wurde durch die Zufuhr von TGF- $\beta_3$  reduziert. Daraus resultierten vermutlich auch geringere TGF- $\beta_1$ - und TGF- $\beta_2$ -Werte, die somit die Ablagerung von Extrazellulärmatrix verringerten. Neuere Studien bestätigen die Ergebnisse Shas. Demnach konnten in Wunden von Embryonen, welche grundsätzlich narbenfrei verheilen, geringe TGF- $\beta_1$ - und TGF- $\beta_2$ -Werte und hohe TGF- $\beta_3$ -Werte festgestellt werden (Ferguson und O’Kane, 2004). Nach der exogenen Zufuhr von TGF- $\beta_3$  fand auch hier eine narbenfreie Wundheilung bei Erwachsenen statt. Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen brachten erhebliche Fortschritte in einer therapeutischen Intervention der Wundheilung mittels rekombinantem TGF- $\beta_3$ . Vor diesem Aspekt untersuchten Carrington et al. (2006) anhand von Korneazellen den Einfluss der Isoformen des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  auf die frühe Wundheilung an der Kornea. Außerdem wurden die Veränderungen nach Blockade der Isoformen durch humane Isoform-spezifische neutralisierende Antikörper beobachtet. TGF- $\beta_1$  stellte sich als vorherrschende Isoform bei der Wundheilung mit profibrotischen Veränderungen dar. Währenddessen hatte TGF- $\beta_3$  nur einen geringen Effekt auf die Re-Epithelialisation, aber reduzierte die Repopulation des Stromas. Die Blockade von TGF- $\beta_3$  hatte keinen direkten Effekt auf die untersuchten Zellen. Die Blockade resultierte vermutlich eher in einer Unterdrückung der Effekte von TGF- $\beta_1$ , was die Beobachtungen von Shah et al. (1995) bestätigt (Carrington et al., 2006). Es scheint, als spiele generell das Verhältnis von TGF- $\beta_1$  zu TGF- $\beta_3$  eine entscheidende Rolle bei dem Ausmaß der Fibrosierung. TGF- $\beta_3$  könnte somit auch in der Augenheilkunde zu therapeutischen Zwecken bei der Regulation des Heilungsprozess an der Kornea und zur Prävention von Fibrosierungen eingesetzt werden.

Die kürzlich durchgeführte Analyse des Einflusses von rekombinantem TGF- $\beta_3$  auf die Kollagensynthese und –ablagerung am Beispiel der Leberfibrose brachte neue Erkenntnisse (Li et al., 2008). Mithilfe eines Rattenmodells konnte durch die rekombinante TGF- $\beta_3$ -Expression eine Anpassung der Expression von Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren beobachtet wer-

den. Daraus resultierten eine verminderte Kollagensynthese und unterdrückte Kollagenablagerung. Neben anderen weisen auch die Ergebnisse der Studie von Li et al. (2008) darauf hin, dass der Einsatz von TGF- $\beta_3$  für eine therapeutische Intervention bei Fibrosierungen an Organen durchaus begründet sein könnte. Bezüglich fibrotischer Veränderungen bei pulmonalen Erkrankungen liegen in diesem Zusammenhang jedoch noch keine Untersuchungen und Erkenntnisse vor.

Eine Vielzahl kürzlich durchgeführter genetischer Untersuchungen unterstützt die Vermutungen einer genetischen Anfälligkeit für die Sarkoidose. In der vorliegenden Untersuchung konnte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem 17369 T/C (rs3917200)-Polymorphismus im TGF- $\beta_3$ -Gen und der Empfänglichkeit für eine Sarkoidose nachgewiesen werden. Auch die statistisch signifikanten Ergebnisse der Studie von Kruit et al. (2006 a) bezüglich des 17369 T/C (rs3917200)-Polymorphismus im TGF- $\beta_3$ -Gen und der Entwicklung einer Lungenfibrose bei Sarkoidose-Erkrankten können in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Das tendenzielle Überwiegen des C-Allels des TGF- $\beta_3$  17369 T/C - Polymorphismus bei Patienten mit Sarkoidose-assoziiierter Lungenfibrose im Vergleich zu Patienten mit akutem/selbstlimitierendem und chronischem Verlauf könnte jedoch auf einen genetischen Einfluss von TGF- $\beta_3$  auf einen fibrotischen Verlauf hinweisen. Dennoch kann nicht prinzipiell von profibrotischen Effekten von TGF- $\beta_3$  und demnach auch der Beteiligung an fibrotischen Strukturveränderungen ausgegangen werden, wie oben diskutierte Studien zeigen.

Der hier untersuchte 17369 T/C (rs3917200)-Polymorphismus im TGF- $\beta_3$ -Gen sollte weiterhin in Assoziationsstudien mit Sarkoidose-Patienten untersucht werden. Um eine größere Aussagekraft bezüglich der Interpretationen dieses Polymorphismus zu erhalten, empfiehlt es sich, zukünftige Untersuchungen an einem größeren Patienten-Kollektiv als dem hier vorliegenden durchzuführen. Eine genaue Interpretation der Ergebnisse gestaltet sich jedoch vorerst als schwierig, da weder eine genaue Funktion des TGF- $\beta_3$ -Gens an sich, noch des untersuchten Polymorphismus bekannt sind. Sollten sich die bei der Leberfibrose und Wundheilung kürzlich gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der antifibrotischen Eigenschaften von TGF- $\beta_3$  bestätigen, könnte dies ein möglicher Ansatzpunkt für die Prävention und Therapie der Sarkoidose-assoziierten Lungenfibrose sein. Spekulationen oder Schlussfolgerungen sollten jedoch erst aufgestellt werden, wenn funktionelle Daten zu diesem Polymorphismus und Gen vorliegen.

Des Weiteren könnte die Erforschung der Phänotypen der TGF- $\beta$ -Isoformen Aufschluss über den Krankheitsverlauf geben. Durch die Bestimmung der Werte der jeweiligen TGF- $\beta$ -Isoformen in

der bronchoalveolären Lavage, im Serum oder in Biopsien könnten so neue Erkenntnisse in Bezug auf die Pathogenese der Sarkoidose gewonnen werden.

Um einheitliche Aussagen in den verschiedenen Studien bezüglich der Stadieneinteilung und des Krankheitsverlaufs zu erhalten, sollte unter anderem eine Erweiterung der röntgenologischen Stadieneinteilung nach Scadding vorgenommen werden. Mit der fortschreitenden medizintechnischen Entwicklung gehören HR-CT-Aufnahmen zunehmend zur primären Diagnostik der Sarkoidose. So können auch Frühstadien der Sarkoidose und Fibrose, welche in Röntgen-Thorax-Aufnahmen vermutlich unentdeckt bleiben, besser erfasst werden. Um den Krankheitsverlauf der Sarkoidose noch genauer beurteilen zu können, wäre außerdem in einer Fall-Kontrollstudie eine Überprüfung durch einen langen Nachverfolgungszeitraum sinnvoll. Ein möglicher Einfluss eines Polymorphismus auf einen akuten oder chronischen Krankheitsverlauf könnte so wesentlich besser erfasst werden.

Im Zusammenhang mit Sarkoidose bedarf es somit der Untersuchung weiterer Polymorphismen im TGF- $\beta_3$ -Gen sowie in den Genen der anderen Isoformen TGF- $\beta_1$  und TGF- $\beta_2$ . Besonders von Interesse ist dabei auch der Einfluss der jeweiligen Isoformen aufeinander. Aufgrund der gravierenden Unterschiede der Krankheitsverläufe in Abhängigkeit vom ethnischen Hintergrund sollte der Einfluss der Polymorphismen in verschiedenen geographischen Regionen und Ethnizitäten betrachtet werden. In Anbetracht der mutmaßlichen Interaktion von Genen und Umweltfaktoren sind jedoch auch infektiöse Agenzien oder Stoffe aus der Umwelt zu berücksichtigen, um eine endgültige Aussage über die Bedeutung dieses Gens und der Polymorphismen in Bezug auf Präsentation und Ausmaß der Sarkoidose machen zu können.

## 6 Zusammenfassung

Die Sarkoidose ist eine Multisystemerkrankung mit dem charakteristischen Vorkommen nicht-verkäsender Granulome. In ca. 90% der Fälle liegt ein pulmonaler Befall vor. Obgleich die genaue Ätiologie unbekannt ist, wird die Sarkoidose als polyätiologische Erkrankung betrachtet. Vermutlich entsteht sie durch eine übersteigerte immunologische Reaktion gegen ein noch unbekanntes infektiöses Agens oder Stoffe aus der Umwelt bei genetisch prädisponierten Individuen. Unterschiedliche Prävalenzen in ethnisch verschiedenen Bevölkerungsgruppen und das familiär gehäufte Auftreten der Sarkoidose weisen auf eine genetische Prädisposition dieser Erkrankung hin.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der 17369 T/C (rs3917200)- SNP (single-nucleotide-polymorphismus) im TGF- $\beta_3$ -Gen hinsichtlich seines Einflusses auf Entstehung und Verlauf der Sarkoidose im Rahmen eines Fall-Kontroll-Studienmodells untersucht. In diesem Zusammenhang wurde besonders ein möglicher Einfluss des genannten SNPs im TGF- $\beta_3$ -Gen auf die Sarkoidose-assoziierte Lungenfibrose betrachtet. In einer vergleichbaren Studie an 154 Sarkoidose-Patienten und 315 Kontrollpersonen in den Niederlanden konnte eine signifikante Assoziation dieses Polymorphismus auf die Entwicklung einer Lungenfibrose bei Sarkoidose-Patienten nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Polymorphismus auf dessen mögliche Implikation bei der Ausbildung und dem Verlauf der Sarkoidose an einem Kollektiv von 296 Patienten untersucht und mit den Ergebnissen an 377 Kontrollpersonen verglichen. Alle Studienteilnehmer waren ausschließlich kaukasischer Herkunft.

Die Genotypisierung der Studienteilnehmer erfolgte durch DNA-Extraktion aus kernhaltigen Blutzellen und anschließender Amplifikation der DNA-Extrakte mittels Real-Time-PCR unter Einsatz des LightCyclers<sup>®</sup> 1.5.

Im Gegensatz zu der zuvor genannten niederländischen Untersuchung konnte dabei für den untersuchten Polymorphismus weder im Sarkoidose-Gesamtkollektiv noch in den akuten, chronischen und fibrotischen Subkollektiven ein statistisch signifikantes Ergebnis nachgewiesen werden. Damit ist die zuvor beschriebene signifikante Assoziation zwischen dem rs3917200-Polymorphismus im TGF- $\beta_3$ -Gen und der Sarkoidose-assoziierten Lungenfibrose nicht reproduzierbar. Dennoch war das C-Allel des TGF- $\beta_3$  17369 T/C -Polymorphismus wesentlich häufiger bei Patienten mit Sarkoidose-assoziiierter Lungenfibrose nachzuweisen als bei den Patienten mit

akutem/selbstlimitierendem und chronischem Verlauf ohne Lungenfibrose. Demnach ist in der hier vorliegenden Untersuchung lediglich ein Trend zu verzeichnen, jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang.

Um eine endgültige Aussage über die Bedeutung dieses Gens und des Polymorphismus treffen zu können, sind Folgestudien mit größeren Kollektiven und unter Berücksichtigung des Krankheitsverlaufs und des ethnischen Hintergrunds erforderlich. Des Weiteren sollten weitere TGF- $\beta_3$ -Genvarianten im Hinblick auf die Entwicklung und das Ausmaß der Sarkoidose bestimmt werden. In Anbetracht der Erkenntnisse, dass andere Isoformen der TGF- $\beta$ -Familie ebenfalls Einfluss auf die Krankheitsentstehung und den Verlauf der Sarkoidose aufweisen, sollten auch die Funktionen dieser Isoformen genauer betrachtet werden. Die Relevanz weiterer Polymorphismen in anderen Genen, für die ebenso signifikante Korrelationen zur Sarkoidose beschrieben wurden, sollte dabei ebenfalls berücksichtigt werden.

Mit der vorliegenden Untersuchung konnten weitere Erkenntnisse über den genetischen Hintergrund der Sarkoidose erlangt werden. Durch die zunehmende Identifikation möglicher Kandidatengene könnten somit zukünftig Fortschritte im Hinblick auf die Entwicklung neuer diagnostischer und prognostischer Verfahren sowie therapeutischer Interventionen gemacht werden.

## 7 Literaturverzeichnis

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

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

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

American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society and the European Respiratory Society. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 646-664

Arbustini E, Grasso M, Leo G, Tinelli C, Fasani R, Diegoli M, Banchieri N, Cipriani A, Gorrini M, Semenzato G, Luisetti M. Polymorphism of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 851-854

Arcasoy SM, Christie JD, Pochettino A, Rosengard BR, Blumenthal NP, Bavaria JE, Kotloff RM. Characteristics and outcomes of patients with sarcoidosis listed for lung transplantation. *Chest* 2001; 120: 873-880

Armstrong JR, Radke JR, Kvale PA, Eichenhorn MS, Popovich J Jr. Endoscopic findings in sarcoidosis: characteristics and correlations with radiographic staging and bronchial mucosal biopsy yield. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1981; 90: 339-343

Arranz O, Ara J, Rodriguez R, Saurina A, Mirapeix E, Darnell A. Serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with ANCA-associated vasculitis. *J Nephrol* 2000; 13: 59-64

Ask K, Bonniaud P, Maass K, Eickelberg O, Margetts PJ, Warburton D, Groffen J, Gauldie J, Kolb M. Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF- $\beta$  isoform 1 but not TGF- $\beta$ 3. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40: 484-495

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

Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor- $\beta$ 1 gene: association with transforming growth factor  $\beta$ 1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 1014-1020

AyanlarBatuman O, Ferrero AP, Diaz Am Jimenez SA. Regulation of transforming growth factor  $\beta$ 1 gene expression by glucocorticoids in normal human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1991; 88: 1574-1580

Baecher-Allan CM, Barth RK. PCR analysis of cytokine induction profiles associated with mouse strain variation in susceptibility to pulmonary fibrosis. *Reg Immunol* 1993; 5: 207-217

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

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

Baughman RP, Iannuzzi M. Tumor necrosis factor in sarcoidosis and its potential for targeted therapy. *BioDrugs* 2003; 17: 425-431

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

Bayat A, Walter JM, Bock O, Mrowietz U, Ollier WE, Ferguson MW. Genetic susceptibility to keloid disease: mutation screening of the TGF- $\beta$ 3 gene. *Br J Plast Surg* 2005; 58: 914-921



Bergeron A, Soler P, Kambouchner M, Loiseau P, Milleron B, Valeyre D, Hance AJ, Tazi A. Cytokine profiles in idiopathic pulmonary fibrosis suggest an important role for TGF- $\beta$  and IL-10. *Eur Respir J* 2003; 22: 69-76

Bergin CJ, Bell DY, Coblentz CL, Chiles C, Gamsu G, MacIntyre NR, Coleman RE, Putman CE. Sarcoidosis: correlation of pulmonary parenchymal pattern at CT with results of pulmonary function tests. *Radiology* 1989; 171: 619-624

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

Bohnert A, Schürmann M, Hartung A, Hackstein H, Müller-Quernheim J, Bein G. No linkage of the interleukin-4 receptor locus on chromosome 16p11.2-12.1 with sarcoidosis in German multiplex families. *Eur J Immunogenet* 2002; 29: 269-272

Brewerton DA, Cockburn C, James DC, James DG, Neville E. HLA antigens in sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 1977; 27: 227-229

Cambien F, Richard S, Troesch A, Mallet C, Generenaz L, Evans A, Arvelier D, Luc G, Ruidavets JB, Poirer O. Polymorphisms of transforming growth factor  $\beta_1$  gene in relation to myocardial infarction and blood pressure: the Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension* 1996; 28: 881-887

Carrington C. Structure and function in sarcoidosis. *Ann N Y Acad Sci* 1976; 278: 265-283

Carrington LM, Albon J, Anderson I, Kamma C, Boulton M. Differential regulation of key stages in early corneal wound healing by TGF- $\beta$  isoforms and their inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1886-1894

Cetinkaya E, Yildiz P, Altin S, Yilmaz V. Diagnostic value of transbronchial needle aspiration by Wang 22-gauge cytology needle in intrathoracic lymphadenopathy. *Chest* 2004; 125: 527-531

Chambellan A, Turbie P, Nunes H, Brauner M, Battesti JP, Valeyre D. Endoluminal stenosis of proximal bronchi in sarcoidosis: bronchoscopy, function, and evolution. *Chest* 2005; 127: 427-481

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

Coker RK, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *Eur Respir J* 1998; 11: 1218-1221

Coker RK, Laurent GJ, Jeffery PK, du Bois RM, Black CM, McAnulty RJ. Localisation of transforming growth factor- $\beta$ 1 and  $\beta$ 3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. *Thorax* 2001; 56: 549-556

Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Lympny PA, du Bois RM, Jeffery PK, McAnulty RJ. Transforming growth factors- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Pathol* 1997; 150: 981-991

Colby TV. Interstitial lung diseases. In: Thurlbeck W, Churg A, HRSG. *Pathology of the Lung*, 2<sup>nd</sup> Edn. New York: Thieme Medical Publishers, 1995: 589-737

Costabel U, Guzman J, Albera A, Baughman RP. Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. In: Baughman RP, HRSG. *Sarcoidosis*. New York: Taylor and Francis Group, 2006; 210: 399-414

Dai H, Guzman J, Chen B, Costabel U. Production of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor-alpha by alveolar macrophages in sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Chest* 2005; 127: 251-256

Damuth TE, Bower JS, Cho K, Dantzker DR. Major pulmonary artery stenosis causing pulmonary hypertension in sarcoidosis. *Chest* 1980; 78: 888-891

Drent M, Mulder PG, Wagenaar SS, Hoogsteden HC, van Velzen-Blad H, van den Bosch JM. Differences in BAL fluid variables in interstitial lung diseases evaluated by discriminant analysis. *Eur Respir J* 1993; 6: 803-810

El-Gamel A, Awad MR, Hasleton PS, et al. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) genotype and lung allograft fibrosis. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18: 517-523

Ferguson MW, O'Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004; 359: 839-850

Finkel R, Teirstein AS, Levine R, Brown LK, Miller A. Pulmonary function tests, serum angiotensin-converting enzyme levels, and clinical findings as prognostic indicators in sarcoidosis. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 465: 665-671

Flemming H. Cardiac Sarcoidosis. In: James D, HRSG. *Sarcoidosis and other granulomatous disorders*. New York: Marcel Dekker, 1994: 323-334

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

Gibson GJ, Prescott RJ, Muers MF, Middleton WG, Mitchell DN, Connolly CK, Harrison BD. British Thoracic Society Sarcoidosis study: effects of long term corticosteroid treatment. *Thorax* 1996; 51: 2380-247

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

Gottlieb JE, Isreal HL, Steiner RM, Triolo J, Patrick H. Outcome in sarcoidosis: the relationship of relapse to corticosteroid therapy. *Chest* 1997; 51: 483-502

Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2001; 345: 517-525

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

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

Grutters JC, Sato H, Pantelidis P, Ruven HJ, McGrath DS, Wells AU, van den Bosch JM, Welsh KI, du Bois RM. Analysis of IL6 and IL1A gene polymorphisms in UK and Dutch patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2003; 20: 20-27

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

Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Haselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001; 357: 1925-1928

Harrison BD, Shaylor JM, Stokes TC, Wilkes AR. Airflow limitation in sarcoidosis: a study of pulmonary function in 107 patients with newly diagnosed disease. *Respir Med* 1991; 85: 59-64

Henke CE, Henke G, Elveback LR, Beard CM, Ballard DJ, Kurland LT. The epidemiology of sarcoidosis in Rochester, Minnesota: a population-based study of incidence and survival. *Am J Epidemiol* 1986; 123: 840-845

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

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

Hoitsma E, Sharma OP. Neurosarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis*. Wakefield, UK: *Eur Respir Mon*, 2005; 32: 164-187

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

Hunninghake GW. Release of interleukin-1 by alveolar macrophages of patients with active pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 569-572

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

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

Hunninghake GW, Gilbert S, Pueringer R, Dayton C, Floerchinger C, Helmers R, Merchant R, Wilson J, Galvin J, Schwartz D. Outcome of the treatment for sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 893-898

Hutyrová B, Pantelidis P, Drábek J, Zurková M, Kolek V, Lenhart K, Welsh K, du Bois RM, Petrek M. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 148-151

Iannuzzi MC, Rybicki BA. Genetics of Sarcoidosis. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 108-116

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

James DG. Life-threatening situations in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1998; 15: 134-139

James DG, Neville E, Siltzbach LE. A worldwide review of sarcoidosis. *Ann N Y Acad Sci* 1976; 278: 321-334

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

Jarnier D, Seriès C. Neurosarcoidosis. Review of the literature. *Neurochirurgie* 1999; 45: 214-218

Johns CJ, Schonfeld SA, Scott PP, Zachary JB, Mac Gregor MI. Longitudinal study of chronic sarcoidosis with low dose maintenance corticosteroid therapy: outcome and complications. *Ann NY Acad Sci* 1986; 465: 702-712

Jonth AC, Silveira L, Fingerlin TE, Sato H, Luby JC, Welsh KI, Rose CS, Newman LS, du Bois RM, Maier LA; ACCESS Group. TGF- $\beta$  1 variants in chronic beryllium disease and sarcoidosis. *J Immunol*. 2007; 179: 4255-4262

Kaminski N, Allard JD, Pillet JF, Zuo F, Griffiths MJ, Morris D, Huang X, Sheppard D, Heller RA. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1778-1783

Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1301-1315

Khalil N, O'Connor RN, Flander KC, Shing W, Whitman CI. Regulation of type II alveolar epithelial cell proliferation by TGF  $\beta$  during bleomycine-induced lung injury in rats. *Am J Physiol* 1994; 267: 498-507

Khalil N, Whitman CI, Zuo L, Danielpour D, Greenberg A. Regulation of alveolar macrophage transforming factor- $\beta$  secretion by corticosteroids in bleomycin-induced pulmonary inflammation in the rat. *J Clin Invest* 1993; 92: 1812-1818

Krein PM, Winston BW. Roles for Insulin-like Growth Factor I and Transforming Growth Factor- $\beta$  in Fibrotic Lung Disease. *Chest* 2002; 122: 289-293

Kruit A, Grutters JC, Ruven HJ, van Moorsel CH, Weiskirchen R, Mengsteab S, van den Bosch JM. Transforming growth factor- $\beta$  gene polymorphisms in sarcoidosis patients with and without fibrosis. *Chest* 2006 a; 129: 1584-1591

Kruit A, Grutters JC, Ruven HJ, Sato H, Izumi T, Nagai S, Welsh KI, du Bois RM, van den Bosch JM. Chymase gene (CMA1) polymorphisms in Dutch and Japanese sarcoidosis patients. *Respiration*. 2006 b; 73: 623-633

Kumar A, Moreau JL, Gibert M, Theze J. Internalization of interleukin 2 (IL-2) by high affinity IL-2 receptors is required for the growth of IL-2-dependent T cell lines. *J Immunol* 1987; 139: 3680-3684

Kunikane H, Abe S, Tsuneta Y, Nakayama T, Tajima Y, Misonou J, Wakisaka A, Aizawa M, Kawakami Y. Role of HLA-DR antigens in Japanese patients with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 688-691

Lamberto C, Nunes H, Le Toumelin P, Duperron F, Valeyre D, Clerici C. Membrane and capillary blood components of diffusion capacity of the lung for carbon monoxide in pulmonary sarcoidosis: relation to exercise gas exchange. *Chest* 2004; 125: 2061-2068

Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor- $\beta$  controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon- $\gamma$ . *Nat Immunol* 2005; 6: 600-607

Lasky JA, Brody AR. Interstitial fibrosis and growth factors. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 751-762

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor- $\beta$  regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 99-146

Li Q, Zhou X, Yu J, Qian W, Xu KS. Influence of recombinant transforming growth factor- $\beta$ 3 on collagen synthesis and deposition: experiment with rat cell model of liver fibrosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008; 88: 1273-1278

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

Limper AH, Colby TV, Sanders MS, Asakura S, Roche P, DeRemee RA. Immunohistochemical localization of TGF- $\beta$ <sub>1</sub> in the nonnecrotizing granulomas of pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 197-204

Lower EE, Weiss KL. Neurosarcoidosis. *Clin Chest Med* 2008; 29: 475-492

Ludviksson BR, Gunnlaugsdottir B. Transforming growth factor- $\beta$  as a regulator of site-specific T-cell inflammatory response. *Scand J Immunol* 2003; 58: 129-138

Lynch 3<sup>rd</sup> JP. Computed tomographic scanning in sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2003; 24: 393-418

Lynch 3<sup>rd</sup> JP, Kaszeroni EA, Gay SE. Pulmonary sarcoidosis. *Clin Chest Med* 1997; 18: 755-785

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



Maliarik MJ, Rybicki BA, Malvitz E, Sheffer RG, Major M, Popovich J Jr, Iannuzzi MC. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and risk of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1566-1570

Mañá J, Gomez-Vaquero C, Montero A, Salazar A, Marcoval J, Valverde J, Manresa F, Pujol R. Löfgren-Syndrome revisited: a study of 186 patients. *Am J Med* 1999; 107: 240-245

Mañá J, Salazar A, Manresa F. Clinical factors predicting persistence of activity in sarcoidosis: a multivariate analysis of 193 cases. *Respiration* 1994; 61: 219-225

Mañá J, Teirstein AS, Mendelson DS, Padilla ML, DePalo LR. Excessive thoracic computed tomographic scanning in sarcoidosis. *Thorax* 1995; 50: 1264-1266

Marshall RP, Puddicombe A, Cookson WOC. Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the UK. *Thorax* 2000; 55: 143-146

McCann BG, Harrison BD. Bronchiolar narrowing and occlusion in sarcoidosis-correlation of pathology with physiology. *Respir Med* 1991; 85: 65-67

McGrath DS, Foley PJ, Petrek M, Izakovicova-Holla L, Kolek V, Veeraraghavan S, Lympny PA, Pantelidis P, Vasku A, Wells AU, Welsh KI, Du Bois RM. ACE gene I/D polymorphism and sarcoidosis pulmonary disease severity. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 197-201

McLoud TC, Epler GR, Gaensler EA, Burke GW, Carrington CB. A radiographic classification for sarcoidosis: physiologic correlation. *Invest Radiol* 1982; 17: 129-138

Medinger AE, Khouri S, Rohatgi PK. Sarcoidosis: the value of exercise testing. *Chest* 2001; 120: 93-101

Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, Prieur AM, Manouvrier-Hanu S, Häfner R, Chamaillard M, Zouali H, Thomas G, Hugot JP. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet* 2001; 29: 19-20

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

Moller DR. Cells and cytokines involved in the pathogenesis of sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999; 16: 24-31

Mozes MM, Böttinger EP, Jacot TA, Kopp JB. Renal expression of fibrotic matrix proteins and of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Isoforms in TGF- $\beta$  transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 271-280

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

Muraközy G, Gaede KI, Zissel G, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Analysis of gene polymorphisms in interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$  1 in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2001; 18: 165-169

Murata H, Zhou L, Ochoa S, Hasan A, Badiavas E, Falanga V. TGF- $\beta$ 3 stimulates and regulates collagen synthesis through TGF- $\beta$ 1-dependent and independent mechanisms. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 258-262

Murray LA, Argentieri RL, Farrell FX, Bracht M, Sheng H, Whitaker B, Beck H, Tsui P, Cochlin K, Evanoff HL, Hogaboam CM, Das AM. Hyper-responsiveness of IPF/UIP fibroblasts: Interplay between TGF $\beta$ 1, IL-13 and CCL2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40: 2174-2182

Müller-Quernheim J, Pfeifer S, Strausz J, Ferlinz R. Correlation of clinical and immunologic parameters of the inflammatory activity of pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1322-1329

Nath RK, LaRegina M, Markham H, Ksander GA, Weeks PM. The expression of transforming growth factor type  $\beta$  in fetal and adult rabbit skin wounds. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 416-421

Neville E, Walker AN, James DG. Prognostic factors predicting the outcome of sarcoidosis: an analysis of 818 patients. *Q J Med* 1983; 52: 525-533

Newman LS. Aetiologies of Sarcoidosis. In: Drent M, Coxtabel U, eds. *Sarcoidosis*. Wakefield, UK: European Respiratory Monograph, 2005: 23-48

Newman LS, Rose CS, Maier LA. Sarcoidosis. *N Engl J Med* 1997; 336: 1224-1234

Niimi T, Sato S, Sugiura Y, Yoshinouchi T, Akita K, Maeda H, Achiwa H, Ninomiya S, Akita Y, Suzuki M, Nishio M, Yoshikawa K, Morishita M, Shimizu S, Ueda R. Transforming growth factor- $\beta$  gene polymorphisms in sarcoidosis and tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6: 510-515

Nunes H, Bouvry D, Soler P, Valeyre D. Sarcoidosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2007; 2: 46

Nunes H, Humbert M, Capron F, Brauner M, Sitbon O, Battesti JP, Simonneau G, Valeyre D. Pulmonary hypertension associated with sarcoiodosis: mechanisms, haemodynamics and prognosis. *Thorax* 2006; 61: 68-74

Nunes H, Soler P, Valeyre D. Pulmonary sarcoidosis. *Allergy* 2005; 60: 565-582

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 chornic course of sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 420-426

Pantelidis P, Fanning GC, Wells AU, Wellsh KI, du Bois RM. Analsysis of tumor necrosis factor- $\alpha$ , lymphotoxin-  $\alpha$ , tumor necrosis factor receptor II, and interleukin-6 polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1432-1436

Papaoannides D, Fotinou M, Korantzopoulos P, Latsi P, Sinapidis D, Akritidis N, Orphanidou D. Sarcoidosis associated with interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *Med Sci Monit* 2004; 10: CS5-CS7

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

Poletti V, Casoni G, Chilosi M. Pathology. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis*. Wakefield, UK: *Eur Respir Mon*, 2005; 32: 82-91

Preston IR, Klinger JR, Landzberg MJ, Houtchens J, Nelson D, Hill NS. Vasoresponsiveness of sarcoidosis-associated pulmonary hypertension. *Chest* 2001; 120: 866-872

Reich JM. Mortality of intrathoracic sarcoidosis in referral vs population-based settings: influence of stage, ethnicity, and corticosteroid therapy. *Chest* 2002; 121: 32-39

Reich JM, Johnson RE. Course and prognosis of sarcoidosis in a nonreferral setting. Analysis of 86 patients observed for 10 years. *Am J Med* 1985; 78: 61-67

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-1346

Roberts WC, McAllister HA Jr, Ferrans VJ. Sarcoidosis of the heart: a clinicopathologic study of 35 necropsy patients (group 1) and review of 78 previously described necropsy patients (group 2). *Am J Med* 1977; 63: 86-108

Robinson BW, McLemore TL, Crystal RG.  $\gamma$ -interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. *J Clin Invest* 1985; 75: 1488-1495

Roche Diagnostics GmbH, 2008a. LightCycler® 1.5 Instrument. <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/index.jsp?id=LC01050201> (29.09.2008)

Roche Diagnostics GmbH, 2008b. LightCycler® Software. <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/index.jsp?id=LC0106010401> (29.09.2008)

Romer FK. Presentation of sarcoidosis and outcome of pulmonary changes. *Dan Med Bull* 1982; 29: 27-32

Rosen Y. Sarcoidosis. In: Dail DH, Hammer SP, HRSG. *Pulmonary Pathology*, 2<sup>nd</sup> Edn. New York: Springer-Verlag, 1994: 13-645

Rothkrantz-Kos S, van Dieijen-Visser MP, Mulder PG, Drent M. Potential usefulness of inflammatory markers to monitor respiratory functional impairment in sarcoidosis. *Clin Chem* 2003; 49: 1510-1517

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

Rybicki BA, Major M, Popovich J Jr, Maliarik MJ, Iannuzzi MC. Racial differences in sarcoidosis incidence: a 5-year study in a health maintenance organization. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 234-241

Rybicki BA, Maliarik MJ, Major M, Popovich J Jr, Iannuzzi MC. Epidemiology, demographics, and genetics of sarcoidosis. *Semin Respir Infect* 1998; 13: 166-173

Saboor SA, Johnson NM, McFadden J. Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. *Lancet* 1992; 339: 1012-1015

Santana A, Saxena B, Noble NA, Gold LI, Marshall BC. Increased expression of transforming growth factor  $\beta$  isoforms in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol Med* 1995; 13: 34-44

Satomi Y, Sakaguchi K, Kasahara Y, Akahori F. Novel and extensive aspects of Paraquin-induced pulmonary fibrogenesis: comparative and time-course microarray analyses in fibrogenic and non-fibrogenic rats. *J Toxicol Sci* 2007; 32: 529-553

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

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

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

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

Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF- $\beta_1$  and TGF- $\beta_2$  or exogenous addition of TGF- $\beta_3$  to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 1995; 108: 985-1002

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

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

Schürmann M, Lympany PA, Reichel P et al. Familial sarcoidosis is linked to the major histocompatibility complex region. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 861-864

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

Schürmann M, Valentonyte R, Hampe J, Müller-Quernheim J, Schwinger E, Schreiber S. CARD15 gene mutations in sarcoidosis. *Eur Respir J* 2003; 22: 748-754

Siltzbach LE. Sarcoidosis: clinical features and management. *Med Clin North Am* 1967; 51: 483-502

Siltzbach LE, James DG Neville E, et al. Course and prognosis of sarcoidosis around the world. *Am J Med* 1974; 57: 847-852

Sime PJ, Xing Z, Graham FL, et al. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor  $\beta$ 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* 1997; 100: 768-776

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

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

Stjernberg N, Thunell M. Pulmonary function in patients with endobronchial sarcoidosis. *Acta Med Scand* 1984; 215: 121-126

Strieter RM. Mechanisms of pulmonary fibrosis: conference summary. *Chest* 2001; 120: 77-85

Susol E, Rands AL, Herrick A, McHugh N, Barrett JH, Ollier WER, Worthington J. Association of markers for TGF- $\beta$ <sub>3</sub>, TGF- $\beta$ <sub>2</sub> and TIMP1 with systemic sclerosis. *Rheumatology* 2000; 39: 1332-1336

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

Subramanian I, Flaherty K, Martinez F. Pulmonary function testing in sarcoidosis. In: Baughman RP. HRSG. Sarcoidosis. New York: Taylor and Francis Group, 2006; 210: 415-433

Takehara K. Induction of subcutaneous tissue fibrosis in newborn mice by TGF- $\beta$ . Simultaneous application with basic fibroblast growth factor causes persistent fibrosis. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 68

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

Thomeer M, Demedts M, Wuyts W. Epidemiology of sarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, eds. Sarcoidosis. Wakefield, UK: Eur Respir Mon, 2005; 32: 13-22

Travis WD, Matsui K, Moss J, Verrans VJ. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: prognostic significance of cellular and fibrosing patterns: survival comparison with usual interstitial pneumonia and desquamative interstitial pneumonia. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 19-33

Trisolini R, Agli LL, Cancellieri A, Poletti V, Tinelli C, Baruzzi G, Patelli M. The value of flexible transbronchial needle aspiration in the diagnosis of stage I sarcoidosis. *Chest* 2003; 124: 2126-2130

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

Udwadia ZF, Pilling JR, Jenkins PF, Harrison BD. Bronchoscopic and bronchographic findings in 12 patients with sarcoidosis and severe or progressive airways obstruction. *Thorax* 1990; 45: 272-275



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

Ward PA, Hunninghake GW. Lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care med* 1998; 157: 123-129

Welker L, Jorres RA, Costabel U, Magnussen H. Predictive value of BAL cell differentials in the diagnosis of interstitial lung disease. *Eur Respir J* 2004; 24: 1000-1006

Whyte M, Hubbard R, Meliconi R, Whidborne M, Eaton V, Bingle C, Timms J, Duff G, Facchini A, Pacilli A, Fabbri M, Hall I, Britton J, Johnston I, Di Giovine F. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 755-758

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid DNA amplification. *Bio Techniques* 1997 a; 22: 130-138

Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Bio Techniques* 1997 b; 22: 176-181

Xaubet A, Marin-Arguedas A, Lario S, Ancochea J, Morell F, Ruiz-Manzano J, Rodriguez-Becerra E, Rodriguez-Arias JM, Iñigo P, Sanz S, Campistol JM, Mullol J, Picado C. Transforming growth factor- $\beta_1$  Gene Polymorphisms are associated with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 431-435

Yavorkovsky LL, Carrum G, Bruce S, McCarthy PL Jr. Cutaneous sarcoidosis in a patient with Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia treated with interferon-alpha. *Am J Hematol* 1998; 58: 80-81

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

Young RL, Lordon RE, Krumholz RA, Harkleroad LE, Branam GE, Weg JG. Pulmonary sarcoidosis: 1. Pathophysiologic correlations. *Am Rev Respir Dis* 1968; 97: 997-1008

Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA. TGF- $\beta$  isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int* 2003; 64: 844-856

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

Zissel G, Homolka J, Schlaak J, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Anti-inflammatory cytokine release by alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 713-719

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

## **8 Publikationen**

European Respiratory Society, Annual Congress 2009, Vienna, Austria, September 12-16:  
Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ )-2 and -3 gene polymorphisms in different phenotypes  
of sarcoidosis.