

**Einfluss des TGF- $\beta$ 2 59941 A/G Polymorphismus auf  
die Lungenfibrose bei Sarkoidose**

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

Teresa Jasmina Fränken  
aus Siegburg

2010

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

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

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.09.2010

Aus der Medizinischen Klinik II der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor: Prof. Dr. Georg Nickenig

Meinen Eltern gewidmet,  
die mir in jeder Lebenslage zur Seite stehen.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1 Definition der Sarkoidose	10
1.2 Epidemiologie der Sarkoidose	11
1.3 Ätiologie der Sarkoidose	13
1.4 Klinik	13
1.5 Diagnostik	15
1.6 Pathologie	18
1.6.1 Morphologie	18
1.6.2 Pathogenese der Sarkoidose	19
1.6.3 Pathophysiologie der Sarkoidose	23
1.7 Komplikationen bei der Sarkoidoseerkrankung	23
1.7.1 Neurosarkoidose	23
1.7.2 Kardiale Sarkoidose	24
1.7.3 Lungenfibrose	24
1.8 Molekulargenetik der IPF und Sarkoidose	25
1.8.1 Idiopathische Lungenfibrose	25
1.8.2 Lungenfibrose bei Sarkoidose	28
1.9 Studienaufbau und Ziel	29
1.9.1 Molekularbiologischer Hintergrund der Arbeit	29
1.9.2 Beschreibung des Polymorphismus	30
1.9.3 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	30
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>32</b>
2.1 Probanden	32
2.2 Materialien	33
2.2.1 Chemikalien	33
2.2.2 Geräte	33
2.2.3 Primer	33

2.2.4 LightCycler®Sonden	34
2.2.5 DNA-Polymerase	34
2.3 Durchführung der Untersuchungen	35
2.3.1 Blutentnahme	35
2.3.2 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut	35
2.3.3 DNA-Amplifikation durch PCR	35
2.4 LightCycler®	37
2.4.1 Aufbau des LightCyclers®	37
2.4.2 Messprinzip des LightCyclers®	39
2.5 Statistik	42
2.5.1 Variableneinteilung	42
2.5.2 Häufigkeitsverteilung	42
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.3 Statistische Datenanalyse	44
3.3.1 Demographische Basisdatenanalysen	44
3.3.2 Verlaufsparemetrische Datenanalyse	46
3.3.3 Verteilung von Genotypen und Allelfrequenzen	48
3.4 Fazit	61
<b>4. Diskussion</b>	<b>62</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>84</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>85</b>

## 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
C	Cytosin
CD	Cluster of Differentiation
CO	Kohlenmonoxid
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CMA1	Chymase 1, mast cell
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
FEV1	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
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
I	Insertion
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-2	Interleukin-2
ITGV	Intrathorakales Gasvolumen
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
Mrd	Milliarden
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
paCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion

PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
paO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism, Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
rpm	Rotation Per Minute
rs	Reference SNP
SACE	Serum Angiotensin-Converting-Enzyme
SCAC	sarcoid clinical activity classification
sIL-2R	soluble Interleukin-2-Receptor; löslicher Interleukin-2-Rezeptor
sec	Sekunden
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor-beta
TH1	T-Helfer-1-Zellen
TH2	T-Helfer-2-Zellen
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- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris-HCl	Trishydroxymethylaminomethan-Salzsäure
UIP	Usual Interstitial Pneumonia, Gewöhnliche interstitielle Pneumonie
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
VC	Vital Capacity, Vitalkapazität
vs.	versus
WASOG	World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders
WHOQOL	World Health Organization Quality of Life, Fragebogen der Weltgesundheitsorganisation zur Erfassung der Lebensqualität

# **1. Einleitung**

## **1.1 Definition**

Die Sarkoidose ist eine entzündlich granulomatöse Multisystemerkrankung unbekannter Ätiologie, die sich durch nichtverkäsende Granulomherde auszeichnet. Sie tritt weltweit ohne Rücksicht auf Alter, Geschlecht oder Rasse auf, lässt jedoch Besonderheiten in Bezug auf die Geschlechterverteilung, familiäre Häufung oder Erkrankungsalter erkennen (Sharma, 2005). Sie ist durch eine übersteigerte T-lymphozytäre Immunantwort charakterisiert, welche zur Granulombildung führt (Drake und Newman, 2006).

Zum ersten Mal beschrieben wurde die Sarkoidose 1886 von J. Hutchinson, einem englischen Dermatologen und Chirurgen. Die Sarkoidose präsentiert sich in ihrer Symptomatik sehr heterogen und kann als akute Form mit guter Remissionsprognose oder als chronisch progrediente Form auftreten. Als spezielle Erscheinung des akuten Krankheitsbildes ist das Löfgren-Syndrom definiert, welches sich mit der typischen Trias aus Sprunggelenksarthritis, bilateraler Lymphadenopathie und Erythema nodosum präsentiert (Löfgren und Lundback, 1952). Da in über 90% der Fälle die Lunge das am stärksten befallene Organ ist, stehen symptomatisch meist Husten, Dyspnoe oder bronchiale Hyperreaktivität im Vordergrund (Lynch et al., 1997; Bechtel et al., 1981). Hauterscheinungen, Gelenkschmerzen und organspezifische Funktionsstörungen können sehr unterschiedlich stark ausgeprägt sein und werden oft fehlinterpretiert. Assoziierte klinische Manifestationen und Laborparameter sind häufig unspezifisch und beinhalten Immunsuppression, Hyperkalzämie, Hyperkalzurie, Hypergammaglobulinämie und erhöhte ACE Serumwerte (Smith et al., 2008). Bei symptomatischen Patienten ist therapeutisch die systemische Kortisontherapie das Mittel der Wahl und in besonders schwerwiegenden Fällen eine Behandlung mit Immunsuppressiva indiziert (Baughman und Lower, 2005). Therapieziel ist die Suppression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, um die immunologische Reaktion zu kontrollieren. So ist beispielsweise eine TNF- $\alpha$ -Blockade als Behandlungsoption bei refraktären Patienten, die trotz höchster Kortisondosen keine Besserung zeigten, beschrieben worden (Ziegenhagen et al., 2002).

In 1-5% kann die Sarkoidoseerkrankung letal verlaufen, meist durch respiratorische Insuffizienz bzw. Versagen anderer betroffener Organe (Costabel und Hunninghake, 1999).

## **1.2 Epidemiologie**

Die Sarkoidose als entzündlich granulomatöse Erkrankung tritt weltweit mit großen Differenzen in Vorkommen und Neuerkrankung auf. Die Prävalenz variiert zwischen 0,03/100.000 in Korea (Kim, 2001) und 640/100.000 in Schweden (Hägerstrand und Linell, 1964). In Europa fällt ein ausgeprägtes Nord-Süd-Gefälle mit den höchsten Erkrankungszahlen in Skandinavien und den niedrigsten im Mittelmeerraum auf. Dies spiegelt sich ebenfalls in den weltweiten Inzidenzraten wieder, die sich zwischen 64 in Schweden und 1,4/100.000/Jahr in Japan bewegen (Giuffrida und Francisco, 2002). Weltweit ist auch eine Manifestationsdiskrepanz zwischen Männern und Frauen erkennbar. Hier belaufen sich die Raten auf 16,5 pro 100.000/Jahr bei Männern und 21,5 pro 100.000/Jahr bei Frauen, was durch eine Lebenszeit-Inzidenz von 1% zu 1.3% gestützt werden kann (Hillerdal et al., 1984).

In den USA reichen die Inzidenzraten von 10,9 bei Weißen bis zu 35,5 bei Afro- Amerikanern (Rybicki et al., 1997). In Deutschland dagegen rechnet man mit einem Auftreten von ungefähr 10 Erkrankten auf 100.000 Einwohner pro Jahr (Scharhoff, 1993).

Diese Diskrepanzen können sowohl auf Umweltfaktoren als auch auf eine genetische Prädisposition zurückzuführen sein und unterstützen somit die Hypothese einer multifaktoriellen Genese.

Das Erkrankungsalter zeigt einen Gipfel bei Männern im Alter zwischen 30-34 Jahren; bei Frauen fallen zwei Spitzen bei 25-29 und 65-69 Jahren (Byg et al., 2003) auf. Die Inzidenz bei Kindern ist mit 1,2/100.000/Jahr bei 14 und 15 Jährigen und mit 0,06/100.000/Jahr vor dem 4. Lebensjahr sehr gering (Hoffmann et al., 2004).

Familienbasierte Studien zeigten, dass das Erkrankungsrisiko erhöht ist, sobald eine positive Familienanamnese vorliegt. Geschwister haben mit 5,8 das höchste relative Risiko an einer Sarkoidose zu erkranken, gefolgt von Verwandtschaftsbeziehungen 1. Grades mit 5,7; Großeltern mit 5,2 und Eltern mit 3,8. Das gesamtfamiliäre relative Risiko wurde somit auf 4,7 beziffert, und ist bei weißen Bevölkerungsgruppen wesentlich höher als bei Afro- Amerikanern (18,0 versus 2,8) (Rybicki et al., 2001).

Diese Ergebnisse bleiben kontrovers zu diskutieren, da andere Studien belegt haben, dass bei Afro-Amerikanern mit 17% ein höheres familiäres Risiko besteht als bei Kaukasiern mit 6% (Rybicki et al., 1998).

Zusammenfassend konnte in allen Untersuchungen der Beweis eines signifikant erhöhten Risikos für eine Erkrankung bei Verwandten 1. und 2. Grades von Sarkoidosepatienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv erbracht werden (Rybicki et al., 2001). Hunninghake et al. (1999) zeigten, dass Afro-Amerikaner auch häufiger an der prognostisch ungünstigeren chronisch progredienten Form erkranken, während in den skandinavischen Ländern die akute Form, das Löfgren-Syndrom, häufiger auftritt.

Neuste Studien beschäftigen sich mit dem genetischen Risiko speziell in Zwillingskohorten. So führten Sverrild et al. (2008) eine Untersuchung in einem dänisch-finnischen Kollektiv durch, bestehend aus monozygoten und dizygoten Zwillingen, von denen mindestens einer an einer Sarkoidose erkrankt war. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass das hereditäre Risiko bei monozygoten Zwillingen um das 80-fache und bei dizygoten Zwillingen um das 7-fache im Vergleich zum Normalkollektiv erhöht war, an einer Sarkoidose zu erkranken. Sie schlussfolgerten, dass eine genetische Disposition einen starken Einfluss auf diese Erkrankung haben muss (Sverrild et al., 2008).

Die ACCESS-Studie aus dem Jahr 2001 untersuchte 736 Sarkoidosepatienten aus 10 verschiedenen Medizinischen Zentren in den USA über einen Zeitraum von 3 Jahren mit dem Ziel, Zusammenhänge zwischen Organbefall und Geschlecht, Rasse und Alter zu ergründen. Dabei stellte sich heraus, dass Frauen insgesamt öfter von einer Uveitis und Neurosarkoidose betroffen waren und meist zum Zeitpunkt der Erkrankung 40 Jahre oder älter waren. Männer hingegen lagen mit dem Altersdurchschnitt unter 40 Jahren und waren häufiger von einer Hyperkalzämie betroffen. Bei Afro-Amerikanern konnte grundsätzlich für beide Geschlechter ein höheres Auftreten einer Uveitis sowie einer Leber-, Knochenmark- und extrathorakaler Lymphknotensarkoidose festgestellt werden. Auch granulomatöse Hauterscheinungen mit Ausnahme des Erythema nodosum traten häufiger auf. Unabhängig von Geschlecht, Alter und Ethnizität war nur der Befall der Lunge (Baughman et al., 2001).

### **1.3 Ätiologie**

Die Sarkoidose als polyäthiologische Erkrankung präsentiert sich in erster Linie mit sarkoidosespezifischen Granulomen, entstehend durch eine übersteigerte zellvermittelte Immunantwort auf noch unbekannte Antigene. Zytokine und andere Entzündungsmediatoren werden während dieses Prozesses von Makrophagen und T-Lymphozyten ausgeschüttet und beginnen mit dem Aufbau der Granulome. Durch die ähnliche röntgenologische Darstellung wurde lange Zeit eine Korrelation zur Tuberkulose vermutet, jedoch konnte bis heute noch kein eindeutiger Zusammenhang mit dem Mykobakterium, ebenso wenig wie eine Verbindung mit den ätiologisch unter Verdacht stehenden Propionibakterien, hergestellt werden (Drake und Newman, 2006). Die "World Association Of Sarcoidosis And Other Granulomatous Disorders" (WASOG) benannte außerdem in den neunziger Jahren noch Borellien, Mykoplasmen, Herpesviren, Aluminium, Zirkonium, Talk, Kieferpollen und Feinstaub als mögliche und zu untersuchende Auslöser (Costabel und Hunninghake, 1999).

Des Weiteren geht man heute von mehreren genetisch disponierenden Komponenten aus. So sind unter anderem Genpolymorphismen von Kandidatengen, die immunmodulatorisch aktiv sind, von Interesse (Smith et al., 2008). Zukünftige Untersuchungen haben die Aufgabe die Wirkmechanismen dieser Einzelfaktoren zu untersuchen und Zusammenhänge herzustellen.

### **1.4 Klinik**

Die klinische Präsentation der Sarkoidose ist sehr heterogen. So ist laut WASOG (1999) bei über 90% der Patienten die Lunge betroffen, was sich röntgenologisch durch eine Verdichtung des Lungenparenchyms, häufig in Verbindung mit hilärer Lymphadenopathie, äußert. Bei klinischer Manifestation tritt dann ein trockener Husten, Dyspnoe oder bronchiale Hyperreaktivität auf. Ungefähr 30-60% aller Sarkoidosepatienten bleiben jedoch gänzlich symptomfrei und werden nur durch eine zufällige Röntgenuntersuchung diagnostiziert (Lynch et al., 1997; Bechtel et al., 1981; Hillerdal et al., 1984). Weitere Prädilektionsorgane sind Leber, Augen, Haut, Speicheldrüsen, Gelenke, Herz und Nervensystem, jedoch kann auch jedes andere Organ ebenso involviert sein. Klinisch besonders relevant ist der Befall von Herz, Leber und neurologischem System, da hierbei eine Funktionseinschränkung schwerwiegende Folgen mit sich bringen kann.

Eine Herzbeteiligung, die in ca. 5% der Fälle auftritt (Judson et al., 2003), kann sich zu jedem Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs manifestieren. Im Besonderen ist das Myokard des linken Ventrikels in die Granulombildung involviert, was zu Komplikationen wie AV-Block, Rechtsschenkelblock, ventrikulärer Tachykardie und plötzlichem Herztod führen kann (Chapelon-Abric, 2004).

Der Befall des Nervensystems tritt bei etwa 5-10% der Patienten auf (Stern et al., 1985; James und Sharma, 1967) und kann sich sowohl auf das zentrale wie auch das periphere Nervensystem erstrecken. Die Symptome sind lokalisationsabhängig und gehen von Kopfschmerzen, Sehstörungen und neuro-endokrinen Symptomen über Hydrozephalie und psychiatrische Symptome bis zu kognitiven Einschränkungen. Das Magnetresonanztomogramm (MRT) ist hier das diagnostische Mittel der Wahl und leitet nach sicherem Ausschluss anderer neurologischer Erkrankungen zur Diagnose (Hoitsma und Sharma, 2005).

Eine Beteiligung der Gelenke kann sich sowohl akut, im Rahmen des Löfgren-Syndroms, als auch chronisch progredient darstellen. Obwohl Gelenkschmerzen in bis zu 39% der Fälle auftreten, bildet sich sehr selten eine deformierende Arthritis aus (Jansen und Geusens, 2005).

Hautbefall bei Sarkoidose tritt in etwa 25% auf und präsentiert sich sehr heterogen in seiner Erscheinung. Er kann sich in Läsionen wie Papeln, Knötchen und Rötungen manifestieren. Das Erythema nodosum tritt meist in Verbindung mit dem Löfgren-Syndrom auf und hat eine gute Prognose, nach Wochen bis Monaten wieder komplett zu verschwinden. Die meisten anderen Hauterscheinungen sind jedoch eher mit einem chronisch-progredienten Verlauf assoziiert. Besonders gefürchtet ist der Lupus Pernio, welcher sich zunächst mit Rötungen auf Nase und Wangen ankündigt und im Folgenden die unterliegenden Knorpel- und Knochenstrukturen zerstören kann (Newman et al., 1997; Hunninghake et al., 1999).

Prozentual folgen als befallene Organe die Milz (5-10%) (Moller, 2005), die Speicheldrüsen (5-10%) (Aubart et al., 2006), der Gastrointestinaltrakt (<1%) (Moller, 2005) und dann die Nieren (0.7%) (Sharma, 2005).

Eine Hyperkalzämie, die in rund 11% auftritt und eine Hyperkalzurie in 36% der Fälle sind häufige Symptome der Sarkoidoseerkrankung. Dies sind nicht zu vernachlässigende Komplikationen, die durch eine Überexpression von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (Calzitriol) durch aktivierte Makrophagen des granulomatösen Gewebes entstehen (Sharma, 2005). Calzitriol erhöht die Absorption von Kalzium aus dem enteralen System und beeinflusst die Immunregulation.

Ein weiterer Parameter für die Aktivität der Krankheit ist das Serum-Angiotensin-Converting-Enzym (SACE), welches in etwa 60% der Fälle erhöht ist (Costable et al., 2005). ACE wird von den Epitheloidzellen der Granulome produziert und reflektiert somit die Granulomlast. Variationen der Normwerte können durch einen Insertions-/Deletions-Polymorphismus auftreten, bei dem je nach Genotyp die Serumwerte grundsätzlich hoch bzw. niedrig sind. Daher ist es von Vorteil, zur Einordnung der Absolutwerte den Genotyp zu kennen (Sharma et al., 1997).

## **1.5 Diagnostik**

Die Diagnosestellung ist oft sehr schwierig und variabel, da es keinen spezifischen Test gibt, der klar zwischen Erkrankung und Nichterkrankung unterscheidet.

Das alleinige Vorhandensein von Granulomen ist nicht beweisend für eine Sarkoidose, vielmehr muss der Untersucher auf bestimmte additive Kriterien achten, wie z.B. eine passende Klinik, ein auffälliges Röntgenbild, histologisch gesicherte nicht verkäsende Granulome und den Ausschluss einer anderen Erkrankung mit identischer Histologie. Bei einem Verdacht auf Sarkoidose sollten folgende Untersuchungsziele angestrebt werden:

1. Sichere Bestätigung der Histologie
2. Beurteilung von Ausdehnung und Schweregrad der Organbeteiligung
3. Evaluation eines möglichen medikamentösen Behandlungserfolgs für den Patienten

(Costable et al., 2005).

So werden zur weiteren Diagnosesicherung und Aktivitätsbeurteilung in der Regel nach Durchführung eines Röntgen-Thorax und ggf. einer Computertomographie eine Bronchoskopie mit transbronchialer Biopsie und bronchoalveolärer Lavage durchgeführt. Weiterhin werden Serumparameter wie ACE und der lösliche Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2-R) bestimmt. Ein Lungenfunktionstest mit Bestimmung der Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid ( $DL_{CO}$ ) ist ebenfalls erforderlich. Die Involvierung wichtiger Organsysteme wie Leber, Milz, Herz und Auge sollte ebenfalls diagnostisch abgeklärt werden (Costable et al., 2005).

Flexible fiberoptische Bronchoskope werden zur Entnahme von transbronchialen Lungenbiopsien (TBLB) benutzt und erreichen mit 60-90% eine hohe Trefferquote von Materialgewinn auch bei Patienten mit Stadium 1 (Gilman und Wang, 1980; Poe et al., 1979).

Um eine Beteiligung von mediastinalen oder subcarinalen Lymphknoten zu bestimmen, kann die CT-gesteuerte Fein-Nadel-Aspiration (FNA) angewandt werden. Als Komplikationen bei dieser

Methode können ein Pneumothorax (10-60%) oder Hämoptysis (5-10%) auftreten (Zwischenberger et al., 2002).

**Histologie:** Die histologische Befundung der Biopsiepräparate ist besonders wichtig, um andere granulomatöse Erkrankungen ausschließen zu können. Das histologische Erscheinungsbild der Sarkoidose ist charakterisiert durch kompakte, homogene nicht verkäsende Epitheloidzellgranulome. Diese sind umgeben von einem Lymphozytenwall und beinhalten oft mehrkernige Riesenzellen vom Langerhans-Typ, die Einschlusskörperchen wie Schaumann- oder Astereoidkörperchen aufweisen (Kirsten und Costabel, 2005).

**Röntgen-Thorax:** Absolut obligat ist die röntgenologische Untersuchung. Der charakteristische radiologische Befund ist in bis zu 85% der Fälle die bihiläre Lymphadenopathie, oft begleitet von Verbreiterungen der paratrachealen Lymphknoten. Parenchymale Infiltrationen sind häufig (25-50%) und betreffen meist die zentralen Bereiche oder die Oberfelder (Lynch et al., 1997).

Die Stadieneinteilung erfolgt radiologisch nach Scadding (1961):

*Stadium 0: normales Röntgen mit extrathorakalem Befall*

*Stadium 1: bihiläre Lymphadenopathie*

*Stadium 2: bihiläre Lymphadenopathie mit parenchymaler Infiltration*

*Stadium 3: Lungenbefall ohne bihiläre Lymphadenopathie*

*Stadium 4: irreversible Lungenfibrose*

Die Prognose für das Stadium 1 ist am besten, da hier noch eine Spontanremission in 60-90% der Fälle möglich ist. Im Stadium 2 kommt eine Remission nur noch in 40-70% der Fälle vor. In den Stadien 3 und 4 ist die Prognose mit Remissionsraten von 10-20% bzw. 0% eher schlecht (Scadding, 1961; Hillerdal et al., 1984; Rømer, 1982; Neville et al., 1983).

Die Langzeitprognose kann meist erst nach 1-2 Jahren gestellt werden, nachdem der Verlauf und das Ansprechen der medikamentösen Therapie observiert werden konnten.

**Computertomographie:** Obwohl die Computertomographie (CT) dem Röntgen in ihrer Auflösung weit überlegen ist, wird sie nur in bestimmten Situationen eingesetzt (Maña et al., 1995; Müller und Miller, 1993). Die CT und die hochauflösende HRCT werden in klinisch und radiologisch unklaren Situationen benutzt, beispielsweise um eine Differenzierung zwischen Inflammation und Fibrose zu diagnostizieren. In den Übergangsbereichen verschiedener Stadien

ist dies wichtig, um die Therapie exakt abstimmen zu können (Müller und Miller, 1993). Diese computertomographischen Leitlinien sind jedoch als Standards in den neunziger Jahren festgelegt worden. Da keine aktualisierten Leitlinien vorliegen, variiert der Einsatz der CT-Diagnostik in der klinischen Routine stark.

**Lungenfunktionstest:** Veränderungen in der Lungenfunktion sind bei 20% der Stadium 1-Patienten erkennbar, jedoch schon bei 40-80% der Erkrankten im Stadium 2 bis 4 (Lynch et al., 1997; Rømer, 1982; Neville et al., 1983; Alhamad et al., 2001; Sharma und Johnson, 1988). Sensitive Parameter für die Reduktion des Lungenvolumens sind die totale Lungkapazität (TLC) und die Vitalkapazität (VC) (Lynch et al, 1997). Auch die Diffusionskapazität ( $DL_{CO}$ ) ist häufig erniedrigt, jedoch weniger signifikant als z.B. bei der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose (Dunn et al., 1988). Oft wird erst im Endstadium der Sarkoidose eine Sauerstoffsubstitution benötigt (Lynch et al, 1997).

Atemwegsobstruktionen spiegeln sich in dem Parameter FEV1 wieder, welcher das forcierte expiratorische Volumen über eine Sekunde beschreibt und bei 30-50% der Patienten mit parenchymalem Befall erniedrigt ist (Sharma und Johnson, 1988; Harrison et al., 1991). In einer Studie von Bechtel et al. (1981) wurde festgestellt, dass 50% der Patienten mit Stadium 1 und 2 eine bronchiale Hyperreaktivität auf Methacholinstimulation präsentieren. Klinisch äußert sich dies durch einen chronischen trockenen Husten, welcher auf die granulomatöse Inflammation der Bronchialschleimhaut zurückzuführen ist (Benatar und Clark, 1974).

Eine seltene Komplikation können Bronchiektasen darstellen, die aber meist erst im Stadium 4 auftreten (Delobbe et al., 2002).

**Labor:** Ein wichtiger Laborparameter zur Aktivitätsbeschreibung der Sarkoidose ist das ACE, welches in 30-80% der Sarkoidosefälle erhöht ist (Lynch et al., 1997; Müller-Quernheim et al., 1991). Trotz allem sollte es niemals als alleiniger Indikator für die Entscheidung zur Einleitung einer Therapie benutzt werden.

Neuere Studien ergaben eine hohe Sensitivität des löslichen Interleukin-Rezeptors (sIL-2R) als Verlaufparameter (Rothkrantz-Kos et al., 2003; Grutters et al., 2003). Assoziierte Laborparameter sind häufig unspezifisch und beinhalten Hyperkalzämie, Hyperkalzurie und Hypergammaglobulinämie (Smith et al., 2008).

**Bronchoalveoläre Lavage:** Mit der bronchoalveolären Lavage (BAL) werden speziell alle Entzündungszellen analysiert, die sich im bronchoalveolären System befinden. Die Überexpression von Zytokinen durch T-Lymphozyten und Makrophagen leitet den granulomatösen Prozess ein (Newman et al., 1997), welcher, je nach Intensität, das klinische Bild bestimmt.

Typischerweise finden sich in der BAL eine deutliche Lymphozytose, niedrige oder normale Granulozytenzahlen und ein erhöhter CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>-Quotient (Welker et al., 2004). Diese Parameter sind jedoch nicht spezifisch für eine Sarkoidose, sondern auch bei anderen interstitiellen Lungenerkrankungen präsent.

**Nuklearmedizinische Diagnostik:** Eine Bildgebung mit nuklearmedizinischen Methoden ist seit den siebziger Jahren des vorigen Jahrhunderts ein weiteres Diagnosemittel, insbesondere zur stadienbezogenen Einteilung der Sarkoidose. Eine häufig verwendete Substanz ist Gallium-67-Citrat, welches sich sehr gut in malignen Tumoren, Lymphomen und entzündlichem Gewebe, wahrscheinlich in aktivierten Makrophagen anreichert (Mañá, 1997). Thallium-201 wird bevorzugt bei kardialer Sarkoidose (Sharma et al., 1993) und Technetium-99m bei der Knochenszintigraphie verwendet. Die Relevanz der Ganzkörper-Positronen-Emissions-Tomographie (PET) tritt auch immer mehr in den Vordergrund. Wurde sie bisher hauptsächlich zur Krebsdiagnostik genutzt, wendet man sie nun auch vermehrt zur Diagnostik entzündlicher und infektiöser Abläufe an (Zhuang und Alavi, 2002; Alavi et al., 2002). Insgesamt eignen sich alle diese nuklearmedizinischen Methoden zur Verlaufskontrolle. Der genaue Benefit ist jedoch bislang nicht in kontrollierten Studien untersucht worden.

## **1.6 Pathologie**

### **1.6.1 Morphologie**

Die Histologie der Sarkoidose ist charakterisiert durch kleine, granulomatöse Entzündungsherde. Die Epitheloidzellegranulome bestehen aus hoch differenzierten mononukleären Phagozyten und Lymphozyten. Das Zentrum des Granuloms formiert sich überwiegend aus CD<sub>4+</sub>-Lymphozyten, während die periphere Zone eher von CD<sub>8+</sub>-Lymphozyten gebildet wird (Rosen, 1994; Colby, 1995; Semenzato et al., 1994). Die Granulome werden zunächst peripher, dann auch zentral fibrotisch umgebaut und weisen gelegentlich fokale Nekroseherde auf (Rosen, 1994). Im

Elektronenmikroskop zeigen sich zytoplasmatische Einschlusskörperchen, sogenannte Schaumannkörperchen, die basophile Kalzifikationen darstellen, und auch Kalziumoxalatkristalle. Die morphologische Diagnostik der pulmonalen Sarkoidose basiert auf drei Hauptkriterien: 1. Präsenz von kompakten Granulomen mit Lymphozyten- und Fibroblastenrandwall; 2. perilymphatisch interstitielle Verteilung von Granulomen zur Biopsieentnahme; 3. Ausschluss anderer Pathologien (Tuder, 1996).

### 1.6.2 Pathogenese

Aktiviert CD<sub>4+</sub>-Lymphozyten und Makrophagen proliferieren auf einen unbekanntem endo- oder exogenen Stimulus hin und infiltrieren das Gewebe. Auch im gesunden Lungenparenchym sind, wenn auch sehr vereinzelt, lymphoide Ansammlungen vorhanden, jedoch können bei einer aktiven pulmonalen Sarkoidose bis zu  $25 \times 10^6$  T-Lymphozyten/ $\mu\text{l}$  aus der BAL Flüssigkeit extrahiert werden. Die CD<sub>4+</sub>/CD<sub>8+</sub>-Ratio ist in diesen Geweben sehr hoch (>10, Norm 1,7 bis 3).

Die T-Helferzellen CD<sub>4+</sub> und CD<sub>45RO</sub> exprimieren hauptsächlich Interferon- $\gamma$  und IL-2 (Semenzato et al., 1996; Semenzato et al., 1981), beides Zytokine, die zur Entwicklung einer Hypersensitivitätsreaktion im Zielorgan beitragen. IFN- $\gamma$  steigert die Expression kostimulierender Moleküle auf Entzündungszellen wie CD<sub>80</sub> und CD<sub>86</sub> (Agostini et al., 1999) und hat durch die Proliferationshemmung endothelialer Zellen und Synthesehemmung von Kollagen durch Fibroblasten eine wichtige antifibrotische Funktion. Auch IL-2 wird im entzündungsaktiven Gewebe freigesetzt und sorgt mit seiner Funktion als lokaler Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten für deren vermehrte Infiltration und verstärkt somit die Proliferation der Granulome (Hunninghake et al., 1983; Pinkston et al., 1983; Müller-Quernheim et al., 1996). Eine weitere wichtige Rolle spielen Makrophagen im granulomatösen Gewebe. Sie exprimieren Zytokine wie IL-1, IL-12, IL-18 und den Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ . IL-1 agiert als proinflammatorischer Stimulator und Unterstützer der Granulombildung und Fibrosierung durch Fibroblastenproliferation und gesteigerte Kollagensynthese. Erhöhte IL-1-Spiegel konnten von Hunninghake et al. (1984) bei Patienten mit aktiver Sarkoidose nachgewiesen werden.

TNF- $\alpha$  ist ein wichtiges inflammatorisches Zytokin, welches IL-1 hochreguliert, neutrophile Granulozyten anzieht, die Phagozytose der Makrophagen stimuliert und T-Lymphozyten aktiviert (Dai et al., 2005; Zheng et al., 1995). Außerdem induziert es, *via* IL-6, die Freisetzung weiterer Lymphokine sowie eine Fibroblastenproliferation und eine gesteigerte Prostaglandin-Produktion. Durch Verstärkungsmechanismen wird über IL-12 und IL-18 die Proliferation und Freisetzung

von IFN- $\gamma$  und IL-2 stimuliert. Ergänzend stellen Chemokine eine wichtige Komponente des Entzündungsablaufes dar, da sie für die Akkumulation von Immunzellen sorgen (Semenzato et al., 2005). Als profibrotische Modulatoren stehen, neben den oben schon erwähnten, noch Wachstumsfaktoren aus der Familie der TGF-verwandten Zytokine (TGF- $\beta$ ), PDGF (platelet-derived growth factor) und der „Insulin like growth factor-I“ (ILGF-I) im Verdacht (Semenzato et al., 2005).

Die stetigen Umbauprozesse des Gewebes bei Fibrosierung erklären Drent et al. (1999) durch die von Makrophagen exprimierte Zytokine und Immunglobulin-G-Komplexe, welche für eine Hochregulation von Nitrit-Oxid-Synthase in Granulomzellen verantwortlich sein könnten (Drent et al., 1999). Der hierbei zur Fibrosierung führende Hauptfaktor ist die Migration von Fibroblasten und Epitheloidzellen, die vom Interstitium in die alveolären Zwischenräume wandern und mit der umgebenden interstitiellen Matrix verkleben. Verantwortlich dafür ist die lokale Freisetzung von Chemokinen, Gerinnungsfaktoren und Matrixproteinen wie Kollagen, Laminin, Fibronectin und Elastinderivaten (Shigehara et al., 1998; Probst-Cousin et al., 1997; Marshall et al., 1996; Roman et al., 1995). Bei Patienten mit pulmonaler Sarkoidose ist nicht nur eine höhere Fibroblastendichte nachzuweisen, sondern Suganuma et al. (1995) konnten außerdem belegen, dass sowohl ein erhöhtes Teilungsvermögen als auch eine gesteigerte Migrationsfähigkeit der Zellen zu beobachten waren (Suganuma et al., 1995).

#### **1.6.2.1 Kandidatengene bei der Sarkoidose**

Die Auswahl von Kandidatengenem bezieht sich hier auf solche Gene, die für immunmodulierende Zellen kodieren und nach heutigen Erkenntnissen in das entzündlich-granulomatöse Geschehen der Sarkoidose involviert sind oder sein könnten.

**HLA:** Die Humanen Leukozyten Antigene, kodiert vom MHC-Komplex (major histocompatibility complex) auf Chromosom 6, stehen im Verdacht, den klinischen Verlauf einer Sarkoidoseerkrankung zu beeinflussen (Grunewald et al., 2004). Diese Zelloberflächen-Moleküle spielen eine entscheidende Rolle in der Antigenpräsentation körperfremder Substanzen, und manche Subtypen wurden vermehrt bei Sarkoidoseerkrankten gefunden (Brewerton, 1978).

**Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ :** Diverse Studien wiesen eine erhöhte TNF- $\alpha$  Sekretion durch aktivierte Makrophagen bei Patientenkollektiven mit aktiver Sarkoidose nach (Dai et al., 2005;

Zheng et al., 1995). Ausserdem wurde ein Basenpolymorphismus in Position -308 der Promotorregion von TNF- $\alpha$  (Wilson et al., 1992) mit einer erhöhten TNF- $\alpha$  Transkription in Verbindung gebracht (Kroeger et al., 1997).

**Interferon- $\alpha$ :** Granulomatöse Erkrankungen wie die Sarkoidose treten laut neuerer Studien vermehrt in Verbindung mit erhöhten IFN- $\alpha$  Spiegeln auf. Im Zusammenhang mit induzierten Interferon-Therapien wurde ebenfalls ein vermehrtes Auftreten granulomatöser Erkrankungen beobachtet (Papaioannides et al., 2004; Yavorkovsky et al., 1998). Akahoshi et al. (2004) entdeckten eine Assoziation zwischen einem INF-T551G (Ile184Arg) Polymorphismus und dem gehäuften Auftreten der Sarkoidoseerkrankung.

**Angiotensin-Converting-Enzym:** Analysen des ACE-Genotyps ergaben keinen Zusammenhang zwischen dem 287-bp Insertions-/Deletions-Polymorphismus im Intron 16 des ACE-Gens und einem gehäuften Auftreten der Sarkoidose. Jedoch konnten mehrere Studien zeigen, dass die Frequenz der DD-Homozygoten im Sarkoidosekollektiv wesentlich höher lag als in den Kontrollgruppen. Da der Normwert für den DD-Typ am höchsten und der für den II-Typ am niedrigsten einzuordnen ist (Arbustini et al., 1996), ist zu berücksichtigen, dass grundsätzlich bei vielen Erkrankten höhere Serumwerte vorliegen (Salobir et al., 2007; Alía et al., 2005; McGrath et al., 2001; Schürmann et al., 2001). Die Genotypisierung ist sehr hilfreich, um die ACE-Serumwerte und die damit verbundene Verlaufskontrolle eines jeden Genotyps richtig einzuordnen (Tomita et al., 1997; Alía et al., 2005). Erhöhte Serumwerte werden als Aktivitätsmarker und zur Bestimmung der Granulomlast angesehen, daher sollte der Enzymwert immer im Kontext des jeweiligen Genotyps interpretiert werden. [Die Normwerte des DD-Genotyps liegen bei 59,8 U/l; die des ID-Typs bei 47,7 U/l und der II-Genotyp weist durchschnittlich einen Wert von 32,2 U/l auf. Ohne Genotypkorrektur liegt der Mittelwert bei 48,0 U/l (Ruprecht et al., 2001)].

**Toll-Like-Rezeptoren:** TLR-4 ist der erste und am besten untersuchte „toll like receptor“, da er eine tragende Rolle in der Initialisierung einer Immunantwort spielt (Akira et al., 2001). Pabst et al. (2006) untersuchten ein deutsches Kollektiv mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analysen auf die Polymorphismen Asp299Gly und Thre399Ile und

fanden keinen Zusammenhang mit dem Auftreten der Erkrankung, jedoch eine signifikante Korrelation zur chronischen Verlaufsform für beide Allelpolymorphismen (Pabst et al., 2006).

**BTNL-2:** BTNL-2 (butyrophilin-like 2) gehört zur Superfamilie der Immunglobulin-Gene und hat möglicherweise auch eine T-Zell-stimulierende Funktion (Valentonyte et al., 2005). Valentonyte et al. (2005) stellten in ihrer Studie mit über 900 deutschen Sarkoidosepatienten einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem 15kb-Segment und dem Auftreten der Erkrankung her (Valentonyte et al., 2005). 10 SNPs des BTNL-2 Gens wurden in einer amerikanischen Studie genauer auf ihre Alleelfrequenzen hin untersucht, und es stellte sich heraus, dass die Hochrisiko-Allele nur bei der weißen Bevölkerung auftraten (Rybicki et al., 2005). Li et al. (2006) bestätigten den Zusammenhang dieses Risiko-Allels mit der chronischen Verlaufsform der Sarkoidose in einem deutschen Kollektiv.

**ANXA:** Eine aktuelle Studie beschäftigt sich mit dem Annexin A11-Gen auf Chromosom 10q23.2, welchem komplexe und essentielle Funktionen in diversen biologischen Abläufen, wie Apoptose und Proliferation, zukommen (Hofmann et al., 2008). Die Forschungsgruppe um Hofmann, die 499 deutsche Sarkoidosepatienten einem äquivalenten gesunden Vergleichskollektiv gegenüberstellte, konnte signifikante Zusammenhänge zwischen vorhandenen Gen-polymorphismen und Sarkoidoseerkrankung nachweisen (Hofmann et al., 2008).

**TGF:** Der „transforming growth factor- $\beta$ “ ist ein Zytokin, welches von Alveolarmakrophagen im entzündlichen Geschehen ausgeschüttet wird. Die drei bekannten Isoformen des Wachstumsfaktors (TGF- $\beta$ 1 bis 3) beeinflussen pluripotent sowohl die Immunantwort als auch die Angiogenese und Fibroseprozesse bei Sarkoidoseerkrankten (Awad et al., 1998). TGF- $\beta$ 1 Level sind bei Patienten mit schlechter Lungenfunktion erhöht (Salez et al., 1998), und Kruit et al. (2007) fanden heraus, dass die TGF- $\beta$ 2 59941G- und TGF- $\beta$ 3 4875A-Mutationsallele Abhängigkeiten zur Entwicklung einer Lungenfibrose aufwiesen, das TGF- $\beta$ 3 15101G-Wildtypallel jedoch bei Fibrosepatienten erniedrigt war (Kruit et al., 2006).

### **1.6.3 Pathophysiologie**

Da bei > 90% der Sarkoidoseerkrankten eine Beteiligung der Lunge vorliegt (Hunninghake, 1999), sind hier auch die größten pathophysiologischen Veränderungen festzustellen. Atemwegsobstruktionen entstehen beispielsweise aufgrund von reversiblen Entzündungen der Bronchialschleimhaut, endobronchialen Raumforderungen, extrinsischer Kompression durch z.B. hiläre oder mediastinale Lymphadenopathie und im Endstadium durch irreversible Vernarbungsprozesse im Sinne einer Fibrose (Laohaburanakit und Chan, 2003). Obstruktive Ventilationsstörungen treten in ca. 30% der Fälle auf und sprechen gewöhnlich nicht auf Bronchodilatoren an (Baughman et al., 1997). Indexparameter für die Lungenfunktion sind der Tiffenau-Index  $FEV_1/FVC$  (Norm >70%) und die Diffusionskapazität (Norm >75%). Veränderungen der Diffusionskapazität von Kohlenmonoxid über die Alveolarwände sind bei der pulmonalen Sarkoidose auf eine Verdickung der Alveolarmembran und ein Missverhältnis von Ventilation, Perfusion und Diffusion zurückzuführen. Da das pulmonale Kapillarendothelium ebenfalls am Gasaustausch beteiligt ist, ist eine herabgesetzte  $DL_{CO}$  auch als Indikator für eine Affektion des pulmonalen Kapillarnetzes anzusehen (Carrington, 1976; Rosen et al., 1977). Röntgenologisch äußert sich eine Fibrosierung des Lungenparenchyms zunächst durch eine Volumenreduktion, hiläre Retraktionen und grobkörnige Banden. Bei Fortschreiten der fibrozystischen Umwandlung können große Bullae (Packe et al., 1986), Zysten mit erhöhter Strahlendurchlässigkeit (Ichikawa et al., 1994), Distorsionen (Lynch, 2003) oder Bronchiektasen (Lewis et al., 2002) beobachtet werden.

## **1.7 Komplikationen**

Jede Manifestation von Sarkoidosegranulomen kann im Zielorgan zu Komplikationen führen, jedoch ist das Hauptaugenmerk auf die Kardiale- und Neurosarkoidose zu legen, da hierbei relativ schnell lebensbedrohliche Funktionseinschränkungen auftreten können. Des Weiteren gilt die Fibrose bei Lungenbefall als schwerwiegendste Komplikation und soll anschließend näher behandelt werden.

### **1.7.1 Neurosarkoidose**

Die Inzidenz der klinischen Beteiligung des Nervensystems wird auf 5-10% geschätzt (Stern et al., 1985; James und Sharma, 1967). Der Befall des neurologischen Systems kann sich sehr

heterogen präsentieren und tritt als akutes Krankheitsbild oder als schleichender Prozess auf. Jeder Teil des Nervensystems kann befallen sein, am häufigsten manifestiert sich die Erkrankung jedoch an den Hirnnerven, dem Hypothalamus und der Hypophyse (Stern et al., 1985). Ein Drittel der Patienten weist multiple neurologische Läsionen auf, welche teilweise schwer zu diagnostizieren sind, wenn kein Biopsiebefund vorliegt (Kidd und Beynon, 2003). Aseptische Meningitiden mit kranialer Neuropathie, Hydrozephalie, Enzephalopathien und hypothalamische Dysfunktionen sind die prädominanten Symptome bei zentralem Befall und können schwerwiegende und lebensbedrohliche Folgen nach sich ziehen (Kidd und Beynon, 2003).

### **1.7.2 Kardiale Sarkoidose**

Die Diagnose der kardialen Sarkoidose ist schwer zu stellen, da die klinische Manifestation stark von Lokalisation und Ausdehnung der Granulome abhängt. Es können Arrhythmien, AV- oder Schenkelblöcke, plötzliches Herzversagen und Kammerflimmern durch den Befall des Reizleitungssystems auftreten (Sharma, 2003). Der Befall des Myokards stellt sich meist mit einer lokalen Hypertrophie oder Dyskinesie dar. Die Vernarbungsprozesse und das „remodelling“ des myokardialen Gewebes führen langfristig zu einer Dilatation des linken Ventrikels, zu lokaler Hypokinesie oder Aneurysmata der Herzwand (Sharma et al., 1993; Fleming, 1994). Bei Fortschreiten der Erkrankung trotz medikamentöser Behandlung ist eine Herztransplantation eine Therapieoption (Shammas und Movahed, 1993). Ein Rezidiv der Entzündung wird dadurch jedoch nicht ausgeschlossen (Oni et al., 1992).

### **1.7.3 Lungenfibrose**

Während sich die Granulome bei den ~60% der Erkrankten mit einer spontanen Remission zurückbilden, entwickelt sich daraus bei den chronischen Verläufe häufig eine Lungenfibrose. Die fibrotische Umwandlung resultiert aus der  $T_{H1}$ -Immunantwort, welche von Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen und Mastzellen moduliert wird (Bjermer et al., 1987; Inoue et al., 1996). Die resultierende Überproduktion von Superoxidanionen, Sauerstoffradikalen und Proteasen kann lokale Mikroverletzungen, Basalmenbranschäden mit Permeabilitätssteigerung und Zerstörung der normalen parenchymalen Lungenstruktur mit sich bringen (Agostini und Semenzato, 1998). Bei Versagen aller anderen Therapieoptionen kann es indiziert sein, eine Lungentransplantation vorzunehmen, welche jedoch das Wiederauftreten der pulmonalen Sarkoidose (in ca. 50% vorkommend) nicht ausschließt (Walker et al., 1998).

## **1.8 Molekulargenetische und -biologische Ansätze zur Entwicklung einer pulmonalen Fibrose am Beispiel der Idiopathischen Lungenfibrose und der Sarkoidose**

Im Folgenden sollen die Zusammenhänge dieser beiden Krankheitsbilder, die beide einen fibrotischen Verlauf aufweisen, herausgearbeitet werden. Zur Unterscheidung ist in den meisten Fällen eine transbronchiale Biopsie notwendig, anhand derer die eindeutige Zuweisung zur Sarkoidose oder IPF möglich gemacht wird (Flaherty et al., 2001).

Röntgenologisch kann häufig die Lokalisation der Läsionen wegweisend sein, da sie sich bei der Sarkoidose meist im oberen Lungenlappen und bei der IPF häufiger im unteren Lappen befinden (Hiraga, 1969; Staples et al., 1987). Histopathologisch hebt sich die Sarkoidose durch nicht-verkäsende Granulomherde hervor, welche bei der IPF in der Regel nicht zu finden sind (Katzenstein und Myers, 1998). Abgesehen davon präsentiert sich die Morphologie des fibrotischen Lungengewebes ebenso wie das klinische Erscheinungsbild jedoch in beiden Fällen äußerst ähnlich. Es ist also naheliegend, dass sowohl auf molekularbiologischer als auch auf molekulargenetischer Ebene Korrelationen zu finden sind.

### **1.8.1 Idiopathische Lungenfibrose**

Die idiopathische Lungenfibrose ist definiert als eine Unterform einer chronisch interstitiellen Lungenerkrankung mit dem histologischen Bild einer „gewöhnlichen interstitiellen Pneumonie“ (UIP = usual interstitial pneumonia). Diese Erkrankung ist oftmals mit einem perakuten Verlauf verbunden, der in den meisten Fällen zum Tode führt (ATS, 2000). Sie charakterisiert sich durch eine gestörte Wundheilung des Lungengewebes, resultierend aus zahlreichen Mikroverletzungen des Alveolarepithels und der Basalmembran. Die Epithelzellen werden dadurch zur Sekretion profibrotischer Moleküle stimuliert (Selman et al., 2001). Die verstärkte Proliferation von Fibroblasten und extrazellulärer Matrix führen schnell zur Fibrose und daraus folgendem Defekt der alveolären Einheiten (Krein und Winston, 2002).

Die Ätiologie der IPF ist weitestgehend unbekannt, jedoch vermutet man ein Zusammenspiel von Umweltfaktoren und genetischen Dispositionen. So werden verschiedene Wachstumsfaktoren in Zusammenhang mit der Pathogenese der IPF gebracht, da diese Faktoren profibrotische und matrixstimulierende Eigenschaften aufweisen und auch vermehrt in fibrotischen Lungen identifiziert werden konnten (Krein und Winston, 2002).

**TGF- $\beta$ :** Der “transforming growth factor- $\beta$ ” ist ein Wachstumsfaktor, der von vielen verschiedenen Zelltypen aktiviert und exprimiert wird und der als einer der entscheidenden Mediatoren bei der Fibrose mitwirkt. Man unterscheidet drei Isoformen des Wachstumsfaktors: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3, von denen der erste bis jetzt am eingehendsten untersucht wurde. Dem Wachstumsfaktor kommt beispielsweise die Rolle zu, Wundheilungsprozesse des Lungenparenchyms zu steuern. Dies geschieht durch Reduktion proinflammatorischer Zytokine (welche von Makrophagen ausgeschüttet werden), Rekrutierung von Fibroblasten, Differenzierung von Myofibroblasten und Stimulation von Extrazellulären-Matrix-Proteinen (Lasky und Brody, 2000). Die verstärkte Präsenz von TGF- $\beta$  und die erhöhte TGF- $\beta$ -Rezeptordichte auf pulmonalen Fibroblasten bei Patienten mit Lungenfibrose wurden in neueren Studien nachgewiesen (Krein und Winston, 2002). TGF- $\beta$  bindet an seinen Heterodimer-Rezeptor an der Oberfläche von „target cells“ und induziert so über seine Serin/Threonin Kinase-Aktivität und Transduktionskaskaden den Signalweg (Letterio und Roberts, 1998). Die Isoform TGF- $\beta$ 1 ist chemotaktisch auf Fibroblasten wirksam, stimuliert die Synthese von Matrix- und Glykoproteinen und inhibiert den Kollagenabbau durch Induktion von Proteaseinhibitoren und Reduktion von Metalloproteasen (Ward und Hunninghake, 1998). TGF- $\beta$ 3 initiiert genau wie TGF- $\beta$ 1 profibrotische Effekte im Lungenparenchym jedoch mit schwächeren Auswirkungen und ohne inhibitorische Wirkung auf die Extrazelluläre Matrix-Degradation (Ask et al., 2008). Des Weiteren wird TGF- $\beta$ 3 eine regulatorische Funktion zugeschrieben, indem es die von TGF- $\beta$ 1 induzierte Genexpression herunterreguliert. Ask et al. (2008) postulieren auf dieser Basis, dass TGF- $\beta$ 3 eine wichtige Rolle in der normalen Wundheilung, nicht jedoch in der fibrotischen Wundheilung spielt (Ask et al., 2008). Eine ältere Studie von Coker et al. (1997) untersuchte ebenfalls alle 3 Isoformen auf ihre genauere Funktion hin und kam zu dem Ergebnis, dass alle drei Typen über Fibroblastenstimulation die Kollagensynthese steigern, TGF- $\beta$ 3 hierbei jedoch 10 mal potenter wirkt als TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 und außerdem einen inhibitorischen Einfluss auf die intrazelluläre Prokollagen- Degradation hat (Coker et al., 1997). Die kontroversen Ergebnisse der beiden Studien bleiben also noch zu diskutieren.

**IGF-1:** Der „Insulin-like-growth-factor-1“ ist ein Polypeptid mit Strukturähnlichkeiten zu Insulin und physiologischen Funktionen wie Teilung, Differenzierung, Migration, Wachstum und Apoptoseinhibition von Zellen sowie Genregulation der Transkription. IGF-1 hat eine lange Halbwertszeit und seine Verfügbarkeit wird über Bindungsproteine moduliert (Kim et al., 1997).

Studien aus den neunziger Jahren wiesen schon eine erhöhte IGF-1 Konzentration im Lungengewebe von IPF-Patienten nach und identifizierten außerdem Alveolarmakrophagen als Quellen der Proteinproduktion (Bitterman et al., 1983; Rom et al., 1988). Krein und Winston (2002) fanden heraus, dass es bei Epithelschäden, Entzündung und Zytokinausschüttung vermehrt zu IGF-1 Expression durch Makrophagen und Epithelzellen kommt. IGF selbst stimuliert dann sekundär die Fibroblastenproliferation (Krein und Winston, 2002). In einer Studie von Homma et al. (1995) wurde der Zusammenhang zwischen TGF- $\beta$  und IGF-1 mit dem Ergebnis untersucht, dass in der frühen Phase der IPF sehr viele IGF immunoreaktive Zellen vorhanden waren, wohingegen zu einem späteren Zeitpunkt der Krankheit die Zellzahl extrem erniedrigt war. Es hatte eine negative Regulation durch TGF- $\beta$  stattgefunden, und da somit der Zellschutz *via* IGF-1 nicht mehr vorhanden war, resultierte eine gestörte Gewebereparatur, welche in letzter Instanz dann zur fibrotischen Vernarbung führte (Homma et al., 1995).

Bergeron et al. (2003) untersuchten 17 verschiedene Zytokine in Bezug auf Fibrosierungsprozesse bei der IPF. Alle 17 Zytokine waren mittels mRNA Nachweis im fibrotischen Gewebe präsent, jedoch waren lediglich die Mengen von TGF- $\beta$  und IL-10 im Vergleich zum Kontrollkollektiv auffallend hoch.

Die hohen IL-10 Levels bei den IPF Patienten lassen sich durch die gesteigerte Expression des Zytokins durch hyperplastischen Alveolarepithelzellen erklären. IL-10 wird als antiinflammatorischer Faktor gesehen, und so könnte ihm im Fibrosegeschehen eine protektive Funktion, z.B. „Downregulierung“ der inflammatorischen Reaktion, zukommen (Moore et al., 2001). Diese Erkenntnisse sind konkordant mit weiteren Forschungsergebnissen im Zusammenhang mit der Ätiologie der IPF. Es wurde von Lukacs und Kollegen (2001) eine unterstützende Funktion durch IL-10 bei der Immunantwort über T-Helfer Zellen beobachtet (Lukacs et al., 2001). Für TGF- $\beta$  konnte gezeigt werden, dass es von vielen in die IPF involvierten Zellen, wie Alveolar- und Bronchialepithelzellen, Alveolarmakrophagen, Endothelzellen, Bindegewebszellen und Lymphozyten, exprimiert wird. Des Weiteren gelang der färbetechnische Nachweis des Zytokins in Lungenbiopsiegewebeproben bei Fibrose, jedoch nicht im normalen Lungengewebe. Auch PDGF und TNF- $\alpha$  wurden von Bergeron et al. (2003) eingehend im Zusammenhang mit der Erkrankung und Fibrosierung untersucht, jedoch konnten keine Signifikanzen festgestellt werden. Der dominierende Effekt von PDGF ist die Fibroblastenproliferation und -migration. Frühere Studien wiesen eine verstärkte Präsenz des Wachstumsfaktors bei IPF- Patienten nach (Antoniades et al., 1990).

Die Untersuchung des „keratinocyte growth factor“ (KGF) ergab im Zusammenhang mit der IPF keine signifikanten Ergebnisse, da der Wachstumsfaktor ebenso häufig in normalem Lungengewebe wie in fibrotischem Gewebe auftrat. Er trägt zur Proliferation des Alveolarepithels bei und hat eine wichtige Rolle bei Reparaturmechanismen des Lungengewebes (Bergeron et al., 2003).

### **1.8.2 Fibrose bei Sarkoidose**

Ungefähr 25% aller Sarkoidosepatienten entwickeln einen chronischen Krankheitsverlauf und damit auch häufig eine pulmonale Fibrose (Hunninghake und Crystal, 1981). Die pulmonale Fibrose bei Sarkoidose charakterisiert sich wie auch bei der IPF durch eine unproportionale Vermehrung von extrazellulärer Matrix, entstehend durch proliferative Fibroblastenansammlungen (Krein und Winston, 2002). TGF- $\beta$  hat dabei bedeutende Funktionen. Die Isoform TGF- $\beta$ 1 wurde in diversen Studien im Zusammenhang mit fibrotischen Erkrankungen schon eingehend untersucht (Ask et al., 2008; Coker et al., 1997; Bergeron et al., 2003; Salez et al., 1998), über die Isoformen TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 hingegen sind erst wenige Erkenntnisse gewonnen worden (Ask et al., 2008; Coker et al., 1997). TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 wurden von Susol et al. (2000) mit Hautfibrosierung bei systemischer Sklerose assoziiert. Coker et al. (1997) vermuteten, dass bei der IPF ein mögliches Ungleichgewicht zwischen TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3 in Bezug auf eine Fibrosierung verantwortlich sein könnte (Coker et al., 1997). Diese Beobachtung wäre für die Entwicklung einer Fibrose bei Sarkoidose äquivalent. Auf molekulargenetischer Ebene wurden für alle drei Isoformen des Wachstumsfaktors bereits Genpolymorphismen identifiziert und in Verbindung mit diversen Funktionalitäten und Unterschieden in der Proteinexpression gebracht. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) im Codon 10(Leu10Pro) und Codon 25(Arg25Pro) des TGF- $\beta$ 1 Gens wurden beide mit erhöhter TGF- $\beta$ 1 Expression assoziiert (Awad et al., 1998). Diese und andere Polymorphismen im TGF- $\beta$ 1 Gen (Xaubet et al., 2003) sind verantwortlich für ein erhöhtes Risiko einer pulmonalen Fibroseentstehung. Speziell für die Fibrose bei Sarkoidose konnten diese Forschungsergebnisse jedoch nicht bestätigt werden. Weder in einem japanischen noch in einem deutschen Kollektiv konnten bisher eindeutige Assoziationen zwischen den Polymorphismen im TGF- $\beta$ 1 Gen und Auftreten oder Verlauf der Sarkoidose gefunden werden (Niimi et al., 2002; Muraközy et al., 2001). Für noch detailliertere Forschungsergebnisse untersuchten Kruit et al. (2006) TFG- $\beta$ 1, TFG- $\beta$ 2 und TFG- $\beta$ 3 nicht nur auf einzelne SNPs, sondern konstruierten Haplotypen jeder

Isoform, mit dem Ziel herauszufinden, wie die Verteilung zwischen Sarkoidosepatienten mit und ohne Lungenfibrose und im Vergleich zum Normalkollektiv sei (Kruit et al., 2006 a). Untersucht wurden dabei 7 TGF- $\beta$ 1, 13 TGF- $\beta$ 2 und 6 TGF- $\beta$ 3 Haplotypen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Verteilung dieser Haplotypen keine Differenzen zwischen Gesunden und Sarkoidosepatienten aufwies. Einzig der Haplotyp 4 im TGF- $\beta$ 3 Gen korrelierte mit Fibrosierung bei Sarkoidosepatienten. Die beiden Gruppen der Fibrose- und Nicht-Fibrosepatienten zeigten im Ergebnis eine unterschiedliche Allelverteilung im TGF- $\beta$ 3-Gen. Kruit et al. (2006 a) schlussfolgerten, dass es keinen Zusammenhang der drei Isoformen und einem Auftreten der Erkrankung im Rahmen eines Genpolymorphismus gibt, wohl aber eine Assoziation zur Fibroseentwicklung bei vorhandener TGF- $\beta$ 3 Genvariation (Kruit et al., 2006 a).

Neuere Forschungen beziehen sich auf Korrelationen zwischen einem Enzym, der Chymase, und der Pathogenese der Sarkoidose (Kruit et al., 2006 b). Chymase ist eine Serin-Proteinase, die von aktivierten Mastzellen freigesetzt wird. Ihr wird eine tragende Rolle im Gewebswiederaufbau in Lunge, Herz und Haut zugeschrieben. Sie kann Angiotensin I zu Angiotensin II konvertieren und besitzt dabei eine viel höhere Affinität zu ihrem Substrat als ACE (Urata et al., 1990). Außerdem aktiviert das Enzym noch den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 (Lindstedt et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um Kruit et al. (2006 b) konstruierte CMA1-Gen-Haplotypen für Sarkoidosepatienten und ein Normalkollektiv holländischer und japanischer Ethnizität, um den Einfluss der Polymorphismen auf eine Fibroseentstehung zu untersuchen. Es konnte resultierend kein Zusammenhang zwischen CMA1 Genotypen und Fibroseentstehung in einem der beiden Kollektive festgestellt werden (Kruit et al., 2006 b).

## **1.9. Studienaufbau und Ziel**

### **1.9.1 Molekularbiologischer Hintergrund der Arbeit**

Das menschliche Genom setzt sich aus etwa 3,2 Milliarden DNA Bausteinen zusammen und bis heute sind ungefähr 30.000 bis 40.000 Gene identifiziert. Das entspricht etwa 90 Prozent der euchromatischen Bereiche. Die exakte Kenntnis von Basenabfolgen macht es möglich bestimmte Zielsequenzen genauer zu untersuchen, was mit Hilfe von DNA-Markern durchgeführt werden kann. Wurden in den 90er Jahren hauptsächlich Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen und Mini- oder Mikro-Satelliten zur Sequenzmarkierung benutzt, so kam in den letzten Jahren den „single-nucleotide-polymorphisms“ (SNPs) eine wachsende Bedeutung zu, da sie es

ermöglichen in sowohl kodierenden und auch in nicht kodierenden Regionen Mutationen eines einzelnen Basenpaares darzustellen. SNPs sind mit etwa 90 Prozent mit Abstand der häufigste Typ interindividueller genetischer Variabilität beim Menschen und man schätzt ihr Vorkommen auf etwa 11 Millionen mit einem durchschnittlichen Auftreten alle 290 Basenpaare (Cichon et al., 2002).

### 1.9.2 Beschreibung des Polymorphismus

Der in dieser Arbeit untersuchte Einzel-Nukleotid-Polymorphismus für TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467) befindet sich auf dem Chromosom 1 im Intron 2. (*1q41*)

Die Größe der zu amplifizierenden Basensequenz beläuft sich auf 281 Basenpaare. Als Vorlage des hier untersuchten SNPs diente die Arbeit von Kruit et al. (2006), in der dieser neben anderen Polymorphismen untersucht wurde.

Der Basenaustausch von Adenin zu Guanin bei vorhandener Mutation ist hier fettgedruckt, die Ansatzstellen der Primer sind unterstrichen und die Sensor- und Anchorsequenzen kursiv dargestellt.

5'TTGTAACAGGCAACTTAAATACATCCTGATGCCATATGAATAGTGGTACTTGCAT  
 ATAGGGTATAGGCGGGGAAATTCACCAGGGAGCTGACATTTG**AT**GAGGCCTTGAGA  
 CGTATCTATTAACCTGATGGGGGATCATCATTCTTGGCAGGAAGGGCAGGCACTGC  
 AAAGACAGTCTTGAATGGGCTTGCTGAGGGTACCTGATGCATAGCGCTCAGTGCCTG  
 GAGGTGAGGAGAGACTGGGGAGAAGGTGGCCCT**C**CAAAGATAGTGTGTAGAGTGAC  
 ACTACAGAGGATT'3

### 1.9.3 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Diese Studie verfolgt den Ansatz einer Analyse des Genpolymorphismus TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467) und dessen möglichen Bezug zur Sarkoidose. Es handelt sich hierbei um einen SNP des Wachstumsfaktor- $\beta$ 2-Gens, der bereits in einer vorausgegangenen Studie von Kruit et al. (2006) untersucht wurde. Hierbei konnte er in Verbindung mit einem fibrotischen Verlauf bei Sarkoidosepatienten gebracht werden, da das mutierte Allel in dieser Untergruppe des

Studienkollektivs deutlich häufiger präsent war. Diese Signifikanz soll in der von uns durchgeführten Studie mit weitaus größeren Kollektiven geprüft werden. Im Rahmen der hier durchgeführten Fall-Kontrollstudie werden zunächst die beiden Hauptkollektive, d.h. das Sarkoidosegesamtkollektiv und das Vergleichskollektiv, unter dem Aspekt der Geno-/Phänotypanalyse gegenübergestellt. Zur besseren Differenzierung werden im Folgenden auch die Subkollektive analysiert und sowohl einander als auch der Kontrollkohorte gegenübergestellt. Hierbei spielen besonders die Krankheitsverläufe eine wichtige Rolle. Differenziert wird dabei zwischen Patienten mit einem akuten Verlauf mit Remission und Patienten mit einem chronischen Fortschreiten der Erkrankung. Außerdem unterscheiden wir zwischen Patienten mit und ohne Lungenfibrose. Ein akuter Verlauf der Sarkoidose zeigt sich durch ein einmaliges Auftreten der Krankheitssymptome mit schnellem Beginn und einer vollständigen Remission in einem Zeitfenster, das kleiner als zwei Jahre ist. Das Löfgren-Syndrom als Unterform des akuten Krankheitsbildes zeichnet sich durch die typische Symptom-Trias von Sprunggelenksarthritis, bilateraler Lymphadenopathie und Erythema nodosum aus und ist mit einer guten Prognose vergesellschaftet (Löfgren und Lundback, 1952). Der chronische Verlauf hingegen ist gegeben, wenn der Patient entweder über den Zeitraum von mehr als zwei Jahren Symptome aufweist oder zu einem späteren Zeitpunkt erneut einen Krankheitsschub erleidet.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Probanden**

Wir untersuchten ein Sarkoidosekollektiv kaukasischer Herkunft, bestehend aus 296 Patienten mit einer klinisch gesicherten Diagnose. Als Leitlinien hierfür dienten die WASOG Kriterien, welche 1999 von der *American Thoracic Society in Zusammenarbeit mit der European Thoracic Society und der World Association of Sarcoidosis and other granulomatous Disorders* zur Diagnosesicherung aufgestellt wurden (ATS et al., 1999). 168 Patienten unserer teilnehmenden Sarkoidosepatienten waren weiblich und 128 männlich.

Das Kontrollkollektiv formierte sich aus 377 Personen, die dem Patientenkollektiv in Alter, Geschlecht und ethnischer Herkunft angepasst wurden und bei denen eine Sarkoidose ausgeschlossen werden konnte. Alle teilnehmenden Personen wurden von uns selber rekrutiert. Dies geschah hauptsächlich in der Pneumologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik II der Universitätsklinik Bonn. Weiterhin wurden im Rahmen von Treffen der Selbsthilfegruppen aus Bonn, Köln, Mainz, Altenkirchen und Wuppertal sowie bei Informationsveranstaltungen der Unikliniken Patienten rekrutiert. Zusätzlich konnten durch die Zusammenarbeit vieler niedergelassener Ärzte aller Fachrichtungen in Bonn und Umgebung weitere Kontakte hergestellt werden. Abgesehen von der Blutabnahme zur genetischen Untersuchung führten wir bei den Patienten eine sehr genaue und ausführliche Anamnese durch und evaluierten den Gesamtstatus über mehrere von uns überarbeitete Fragebögen. Hierbei kam der *Quality of Life*-Fragebogen der WHO, ein von Dr. M. Drent aus Maastricht, Niederlande entwickelter Fragebogen zur Erfassung der Müdigkeit (*Fatigue Assessment Scale*) sowie ein von der Uniklinik standardisierter Anamnesebogen speziell für Sarkoidosepatienten zum Einsatz. Die Studiendurchführung fand mit schriftlichem Einverständnis aller teilnehmenden Probanden statt und wurde auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt. Das Projekt wurde durch die Ethikkommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn bewilligt.

## **2.2 Materialien**

### **2.2.1 Chemikalien**

➤ Chemikalien für die DNA-Extraktion:

Lysis-Puffer (Natriumchloridlösung, EDTA, Aqua dest.)

0,1% Triton X 100-Lösung

10% Sodium-Dodecyl-Sulfat-Lösung

20mg/ml Proteinase-K-Lösung, 6M Natriumchlorid-Lösung

TE8-Puffer (Tris-HCl, Aqua dest.)

➤ Chemikalien für die Real-Time- PCR (LightCycler):

MasterMix : dNTPs, Puffer, Taq DNA Polymerase

20pmol/ µl Primer

2mmol/µl Magnesiumchlorid

H<sub>2</sub>O( Aqua dest.)

3pmol/ µl Anchor/Sensor Sonden

200 µg/ml DNA

### **2.2.2 Geräte**

Zentrifuge: Mikrofuge E<sup>TM</sup> (Firma Beckmann, München, Deutschland)

Überkopfschüttler

Wasserbad/Inkubator

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

LightCycler<sup>®</sup> Roche1.5. Instrument (Firma Roche, Mannheim, Deutschland)

LightCycler<sup>®</sup> Software 3.5. (Firma Roche, Mannheim, Deutschland)

### **2.2.3 Primer**

Primer sind Oligonukleotide, die als Initiatoren für die Replikation bestimmter DNA Abschnitte dienen. Die amplifizierenden Enzyme, hier die DNA-Polymerase, sind biochemisch auf die Hydroxylgruppe der Primer angewiesen, um die Reaktion zu starten. Bei der PCR lässt sich das zu amplifizierende DNA-Fragment durch die Wahl der Forward und Reverse-Primer festlegen, die am komplementären Doppelstrang exakt die zu amplifizierende Nukleotidsequenz flankieren.

Das Primerdesign muss bestimmten Anforderungen entsprechen, um optimal arbeiten zu können. So sollte die Länge in Basenpaaren, das Verhältnis von CG- zu AT-Basenpaaren aufgrund ihrer Wasserstoffbrückenbindungskräfte und die damit verbundene Schmelztemperatur spezifisch zum verwendeten Enzym passen, um einen reibungslosen Reaktionsablauf zu gewährleisten.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer für TGF- $\beta$ 2 stammen von der Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH Berlin (Deutschland).

Primer für TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467):

1. 5'gTAAACA<sub>g</sub>CAACTTAAATACA 3' F
2. 5'CACTCTACACACTATCTTT<sub>g</sub>gA 3' R

#### **2.2.4 LightCycler® Sonden**

Zur sequenzspezifischen Detektion von Polymorphismen werden mit Farbstoff markierte Oligonukleotide als Sonden benötigt. In dieser Arbeit wurden Sonden, mit Markierung des Sensors durch Fluoreszein und Markierung des Anchors durch LightCycler Red 640 verwendet.

Sonden für TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467):

1. Sensor A : 5'- GCTGACATTTT $\underline{\text{G}}$ ATGAGGCC--FL'3
2. Anchor TGF- $\beta$ 2 : 5'- LC640-TGAGACGTATCTATTAAAACCTGATGGGGG--PH - '3

#### **2.2.5 DNA-Polymerase**

Der DNA-Polymerase kommt die Funktion zu, Desoxy-Nukleosidtriphosphat Monomere (dNTPs) chemisch zum DNA Polymer zu verknüpfen und sie wird daher bei der DNA Replikation benötigt. Biotechnologisch wird sie bei der PCR eingesetzt, um ein durch bestimmte Primer (siehe 2.2.3) flankiertes DNA-Fragment zu amplifizieren. Die hier verwendete Taq-Polymerase ist ein thermostabiles Enzym, welches aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, normalerweise in heißen Quellen vorkommend, stammt und in *Escherichia coli* gentechnisch angezüchtet werden kann.

## **2.3 Durchführung der Untersuchungen**

### **2.3.1 Blutentnahme**

Jedem Patienten aus dem Patienten- und Kontrollpersonen-Kollektiv wurde mittels des Vacutainer Systems je ein Röhrchen venöses Blut abgenommen. Die 9ml EDTA Vollblutproben wurden folgend zur DNA Extraktion verwendet. Vor der Abnahme war jeder Patient verpflichtet, eine Einverständniserklärung zu unterschreiben, welche die genetische Untersuchung der DNA durch unser Labor, mit Bewilligung der Ethikkommission, erlaubte.

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

Zur Gewinnung der DNA wurden 9 ml EDTA-Blut mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt. Nach einer 30 minütigen Ruhephase bei 4°C wurde der Ansatz 20 Minuten bei 3000 rpm ( $r = 20$  cm, 3500xg) zentrifugiert und der Überstand anschließend abdekantiert und verworfen. Das Sediment wurde in einem zweiten, analogen Durchgang entsprechend mit Aqua dest. lysiert, zentrifugiert und vom Überstand getrennt. Das erhaltene Pellet aus Leukozyten wurde mit 30 ml einer 0,1%igen Triton-Lösung versetzt und durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation und anschließender Separation des Rückstands wurde dieser mit 5 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl 10% Natrium-Dodecyl-Sulfat wurden die Zellkerne zur Fragmentation gebracht; diese Zellfragmente wurden im Anschluss durch 100 µl Proteinase-K-Lösung bei 37°C im Wasserbad über Nacht inkubiert und enzymatisch gespalten. Um die in der Probe enthaltenen Proteine „auszusalzen“ (= auszufällen), wurde der Ansatz am Folgetag in eine 15 ml Falcon-Tube überführt, mit 1,5 ml 6M NaCl-Lösung versetzt und 90 Minuten lang auf einem Überkopfschüttler durchmischt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in eine 50 ml Falcon-Tube überführt. Durch Zugabe von 25 ml 100% EtOH wurde die DNA gefällt. Die nun fadenförmige DNA wurde aus dem Ansatz entnommen, in 70% EtOH gewaschen und abschließend in 250 µl TE8-Puffer gelöst.

### **2.3.3 DNA-Amplifikation durch PCR**

Das so gewonnene genetische Material muss nun mittels der PCR Methode amplifiziert werden, um weitere Untersuchungen der Genpolymorphismen anschließen zu können. Das Ziel der PCR ist es enzymatisch, mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase (siehe 2.2.5), einen

bestimmten Abschnitt der DNA in vitro semikonservativ zu vervielfältigen. Um dies umzusetzen, muss ein aus drei Phasen bestehender Mechanismus zyklisch repetiert werden.

### ***1. Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstrangs***

Durch Erhitzen der DNA auf ca. 94-96°C werden alle Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen beider Stränge aufgebrochen, woraus zwei DNA Einzelstränge resultieren. Diese initiale Denaturierung ist Grundlage für die nachfolgenden Amplifikationszyklen.

### ***2. Anlagerung (Annealing) der Oligonukleotidprimer***

Durch ein Abkühlen des Reaktionsansatzes auf eine Temperatur zwischen 50°C und 70°C findet die Anlagerung der beiden spezifischen Oligonukleotidprimer an das zu amplifizierende DNA-Fragment statt. Diese Anlagerungstemperatur ist stark abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und muss je nach Ansatz individuell bestimmt werden.

### ***3. Elongation der Oligonukleotidprimer durch die hitzestabile DNA-Polymerase***

Die einzelsträngige Matrizen-DNA wird nun durch Anlagerung der jeweils komplementären dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate: dATP, dGTP, dCTP und dTTP) mit Hilfe der DNA-Polymerase verlängert. Die Primer dienen hierbei, durch Bereitstellung ihrer Hydroxylgruppe, als Initiatoren. Abhängig vom Arbeitsoptimum der verwendeten Polymerase muss die Temperatur in diesem Schritt angepasst werden. Des Weiteren ist die, dem Konzentrationsverhältnis angepasste, Zugabe von Magnesiumchlorid und Pufferlösung notwendig, um die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Nun beginnt der Zyklus mit Schritt 1 von Neuem.

Reagenzien	[ $\mu$ l]
LC-MasterMix <sup>1</sup>	1,0
Magnesiumchlorid	0,4
Foward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
H <sub>2</sub> O	5,6
Anchor LC 640 <sup>2</sup>	0,5
Sensor FL <sup>3</sup>	0,5
DNA	1,0

<sup>1</sup> dNTPs, Puffer, Taq DNA Polymerase; <sup>2</sup> LightCycler<sup>®</sup>Red markierte Sonde; <sup>3</sup> Fluoreszenzmarkierte Sonde

**Tabelle 1:** LightCycler<sup>®</sup>-Reaktionsansatz (10  $\mu$ l) für TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467)

Um eine Kontamination der Proben und somit falsche Ergebnisse auszuschließen, wurde eine Referenzprobe, die statt DNA nur H<sub>2</sub>O enthielt, zugefügt.

## **2.4 LightCycler<sup>®</sup> 1.5.**

Der LightCycler<sup>®</sup> vereint die klassische Methodik der PCR und Gelelektrophorese in einem Gerät. Er ist geeignet für wiederholbare kinetische Quantifikationen von DNA, cDNA und RNA. Der PCR Vorgang wird wie oben beschrieben (siehe 2.3.3) durchgeführt. Im 2. Schritt wird die Fluoreszenzminderung durch abspringende Sonden während eines Schmelzvorganges erfasst, womit die Existenz möglicher DNA- Polymorphismen bestimmt werden kann.

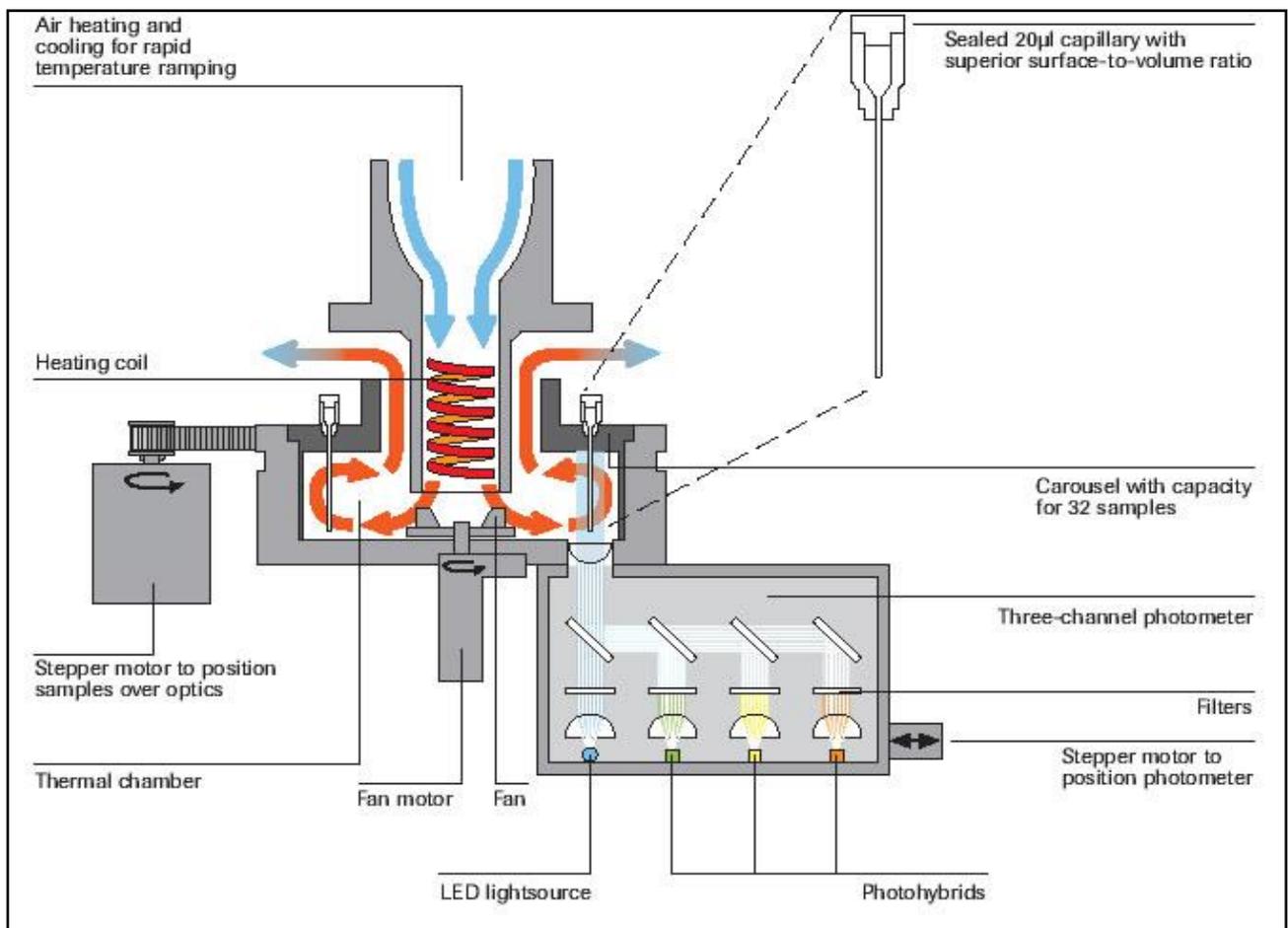
### **2.4.1 Aufbau des LightCyclers<sup>®</sup>:**

Das Gerät besteht aus vier Elementen:

- a) einer thermostatisierten Reaktionskammer
- b) einem Probenrotor
- c) einer Heiz- bzw. Kühlvorrichtung
- d) einem Fluorimeter

Durch diesen Aufbau ergibt sich eine Kombination aus PCR-Cycler und Fluoreszenzphotometer (Wittwer et al., 1997 a).

Der funktionale Aufbau des LightCyclers<sup>®</sup>, bestehend aus einem Temperatursensor im Inneren der Reaktionskammer, einer Heizspirale und einem Ventilator, ermöglicht extrem schnelle Aufheiz- und Abkühlraten von bis zu 20°C pro Sekunde. Des Weiteren trägt die Konstruktionsweise der Reaktionsgefäße zu einer Zeitersparnis während des PCR-Ablaufes bei. Die speziell angefertigten Glaskapillaren haben ein günstiges Volumen-Oberflächen-Verhältnis und bewirken somit einen extrem schnellen Wärmetransport in das nur 10 bis 20 µl betragende Reaktionsgemisch. Das Fluorimeter (Fluoreszenzphotometer) ist aus halbdurchlässigen Spiegeln und wellenlängenspezifischen Filtern konstruiert. Diese leiten die von den Proben emittierte Fluoreszenzstrahlung aus den Reaktionskapillaren zu den drei Photohybriden (530 nm, 640 nm, 705 nm), welche dort von optischen in elektrische Signale umgewandelt und zum PC übermittelt werden. Da die Fluoreszenz zeitsynchron über alle Arbeitsphasen des LightCyclers<sup>®</sup> hinweg gemessen wird, ist der Arbeitsprozess während der gesamten Laufzeit ohne Zeitverzögerung am PC verfolgbar und daher in Echtzeit („Realtime“) beurteilbar (Wittwer et al., 1997 a).



**Abbildung 1:** Schematische Abbildung eines 3-Kanal-Photometers (Roche Diagnostics, 2010 a)

### 2.4.2 Messprinzip des LightCyclers®

Für die Messung der DNA Proben mit dem LightCycler® ist es notwendig mit speziellen Markern und Sonden zu arbeiten.

**LightCycler® Sonden (Hybridization Probes):** Bei dieser Methode werden zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Hybridization Probes) zum normalen PCR-Ansatz zugegeben. Die Sonden sind mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffen markiert (Fluoreszein und LightCycler-Red 640 oder 705). In dieser Arbeit wurden Fluoreszein und LightCycler Red 640 verwendet. Die Detektion der spezifischen Nukleotidsequenz beruht auf dem FRET-Prinzip (Fluoreszenz Resonance Energy Transfer). Dieses Prinzip beschreibt den Energietransfer, den die beiden Sonden untereinander vornehmen. Durch Anregung des Fluoreszeins der Donor-Sonde, mit Licht der Wellenlänge 470 nm, überträgt diese statt zu fluoreszieren, mindestens 50% ihrer Energie durch Dipol-Dipol-Kräfte auf die benachbarte Akzeptor-Sonde. Durch diesen Energietransfer wird der Fluoreszenzfarbstoff der Akzeptor-Probe angeregt. Diese emittiert nun eine Fluoreszenz der Wellenlänge 640 nm, die durch das Fluorimeter registriert werden kann. Dadurch ist eine direkte proportionale Messung der Menge an Ziel-DNA möglich. Die Fluoreszenz jeder Probe wird einmal pro PCR-Zyklus direkt nach Abschluss der Primeranlagerung gemessen, da dann beide Hybridisations Sonden an die DNA gebunden sind und der Energietransfer zwischen ihnen stattfinden kann. Ungebundene Sonden erzeugen kein Fluoreszenzsignal, da das FRET Prinzip keine Wirkung hat.

**Schmelzkurvenermittlung:** Die Schmelzkurvenermittlung hat zum Ziel zu erkennen, welche PCR Amplifikate Allelpolymorphismen aufweisen. Durch eine schrittweise und kontinuierliche Temperaturerhöhung werden die DNA Abschnitte bei produktspezifischen Temperaturen zum Schmelzen gebracht. An diesem spezifischen Temperaturpunkt sinkt die Fluoreszenz abrupt ab, da sich bei der Trennung der beiden DNA Stränge die auflagernden Sonden voneinander entfernen und somit kein „FRET“ mehr stattfindet.

Bei Übereinstimmung der Zielsequenz mit der Sondensequenz bleiben die Hybridisations Sonden maximal lange an den DNA-Strang gebunden. Liegt jedoch eine Mutation in Form eines Basenaustausches in dem Bereich vor, schwächt dies die Bindung in diesen Sequenzabschnitt. Somit löst sich die Sonde in Abhängigkeit von der Basenübereinstimmung zwischen DNA und Sondensequenz zu unterschiedlichen Zeit- und bei verschiedenen Schmelzpunkten. Da in dieser

Arbeit der Sensor A den Wildtyp repräsentierte, konnte sich die Sonde bei vorhandener Mutation in Form eines Basenaustausches A/G nicht optimal der Ziel-DNA anlagern. Somit sprang sie schon früher, d.h. bei niedrigeren Temperaturen, ab als bei mutationsfreien DNA-Sequenzen.

Durch dieses Funktionsprinzip kann eine sehr zuverlässige Genotypisierung vorgenommen werden.

### 1. PCR

	TGF- $\beta$ 2
Initiale Denaturierung	95°C – 5 min
Denaturierung	95°C – 3 sec
Anlagerung	54°C – 20 sec
Elongation	72°C – 25 sec
Zyklusanzahl	45

Mit jedem Amplifikationszyklus findet eine Verdopplung der DNA-Moleküle statt, wodurch es zu einer exponentiellen Vermehrung der Sequenz kommt.

### 2. Schmelzkurve

1. Schmelzpunkt	95°C – 5 sec
2. Schmelzpunkt	45°C – 60 sec
3. Schmelzpunkt	80°C – 0 sec
Zyklusanzahl	1

### 3. Abkühlphase

Kühlen	40°C – 30 sec
Zyklen	1

**Tabelle 2** : LightCycler<sup>®</sup>-Programm für den untersuchten Polymorphismus TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467)

Mit Hilfe der LightCycler® Software 3.5. ist es möglich, die Genotypisierung der Polymorphismen direkt nach dem Realtime-PCR-Lauf elektronisch auszuwerten. So kann anhand der Schmelzpunkttemperatur, bei der das Fluoreszenzsignal aufgrund von abspringenden Sonden schwächer wird, zwischen homozygotem Wildtyp, Heterozygotie und homozygotem Mutanten unterschieden werden. Bei dem hier untersuchten Polymorphismus für TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467) stellte sich der homozygote Wildtyp mit einer Schmelztemperatur von ca. 64,2°C und der homozygote Mutant mit einem Schmelzpunkt bei ca. 56,1°C dar. Die Schmelzkurve des heterozygoten Typs wies zwei Peaks, jeweils bei den oben genannten Temperaturen, auf.

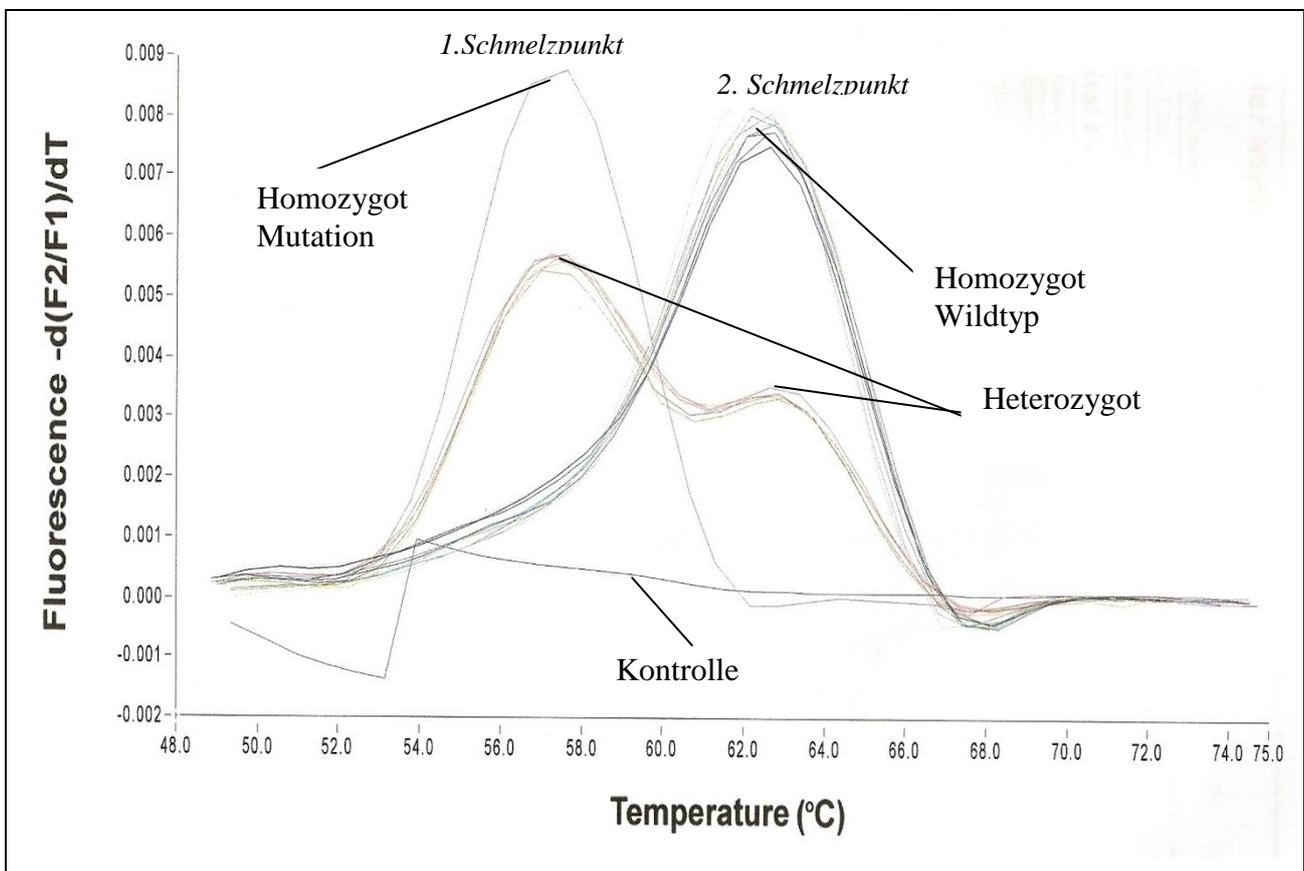


Abbildung 2: Schmelzkurvendarstellung mit Genotypenverteilung (Roche Diagnostics, 2010 b)

## **2.5 Statistik**

Die statistische Datenanalyse wurde mit Hilfe des Programmsystems SPSS 14 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) durchgeführt.

### **2.5.1 Variableneinteilung**

Die diskreten Variablen mit nominalem Messniveau, die die Bedingungen der Reflexivität, Symmetrie und Transitivität erfüllten, umfassten folgende Merkmale:

- Geschlecht
- Rasse
- Genotypen des untersuchten Polymorphismus TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467)
- Allelfrequenzen des Polymorphismus
- Krankheitsverlauf der Sarkoidose (akut/chronisch)
- Stadieneinteilung (I-IV)
- Fibrose (ja/nein)

Zu den stetigen, intervallskalierten Variablen mit metrischem Messniveau wurden folgende Datengruppen bearbeitet:

- Alter bei Erstdiagnose
- Alter bei Blutentnahme
- Lungenfunktionsparameter (FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>/FVC und Diffusionskapazität)

### **2.5.2 Häufigkeitsverteilung**

*Deskriptive Statistik:* Anhand von Kreuztabellen lassen sich Zusammenhänge zwischen nominalen und ordinalen Variablen darstellen. Hier können verschiedene Kollektive einander gegenübergestellt und dann unter dem Aspekt der unterschiedlichen Häufigkeitsverteilung verglichen werden.

*Analytische Statistik:* Anhand des T-Tests können Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und diese dann für alle Kollektive analysiert werden.

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson gibt Auskunft über die Signifikanz der Untersuchungsergebnisse durch Überprüfung der Unabhängigkeit relevanter Variablen.

Der Chi-Quadrat-Wert  $\chi^2$  berechnet sich aus der Differenz zwischen beobachteten und erwarteten Ereignissen:

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

Statistische Signifikanz wird bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\leq 0,05$  d.h.  $p \leq 0,05$  erreicht.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Statistische Datenanalysen

Die beiden untersuchten Kollektive wurden sowohl in ihrer Gesamtheit als auch differenziert im Hinblick auf eine Lungenfibrose im Sarkoidosekollektiv einander gegenübergestellt.

In der folgenden Tabelle sind die Variablen - Geschlecht, Herkunft, Alter - zusammenfassend dargestellt.

#### 3.1.1 Demographische Basisdaten

Variable		Sarkoidose- Gesamtkollektiv	Sarkoidose mit Fibrose	Kontrollkollektiv
Gesamtzahl		296	32	377
Geschlecht	Weiblich	168 (56,8%)	14 (43,8%)	202 (53,4%)
	Männlich	128 (43,2%)	18 (56,2%)	175 (46,6%)
Herkunft	Deutsch	268 (91,2%)	31 (96,9%)	346 (91,5%)
	Europäisch	28 (8,8%)	1 (3,1%)	31 (8,5%)
Alter bei Studieneintritt		53,01 ± 12,94	56,66 ± 8,83	53,17 ± 17,59
Alter bei Erstdiagnose		41 ± 12,30	40,80 ± 9,13	/

**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)

Das Verhältnis von Männern und Frauen zeigte in beiden Gesamtkohorten, mit 56,8% Sarkoidosepatientinnen und 53,4% gesunden Teilnehmerinnen, eine leichtes Überwiegen des weiblichen Geschlechts. Im Fibrosekollektiv waren jedoch mit 56,2% die Männer zahlenmäßig überlegen. Beide Kollektive formierten sich ausschließlich aus Teilnehmern kaukasischer Herkunft, davon war der überwiegende Anteil deutschstämmig und die übrigen Teilnehmer sonstiger europäischer Abstammung. Bei Studieneintritt wiesen beide Gruppen einen ähnlichen Altersdurchschnitt auf und die Altersspanne reichte zum Zeitpunkt der Datenerfassung von 19 bis 83 im Sarkoidosekollektiv und von 19 bis 94 bei den Vergleichspersonen. Das Alter der Sarkoidosepatienten bei Erstdiagnose betrug durchschnittlich  $41 \pm 12,3$  Jahre. Es sind somit keine großen Differenzen der demographischen Daten erkennbar. Dies ist eine Voraussetzung für eine gute Äquivalenz der beiden Gruppen. Die Auswahl der in die Kontrollgruppe eingeschlossenen Personen wurde in dieser Hinsicht bestmöglich auf die Sarkoidoseteilnehmer abgestimmt.

### 3.1.2 Verlaufsparametrische Basisdaten

Variable		Sarkoidose- Gesamtkollektiv	Sarkoidose+Fibrose	Kontrollkollektiv
Ruhe FEV <sub>1</sub> (l)		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
Diffusionskapazität TL <sub>co</sub> c_SB <sup>1</sup> (%des Sollwertes)		87,89 ± 16,53	82,99 ± 19,16	
Diffusionskapazität TL <sub>co</sub> _VA <sup>2</sup> (%des Sollwertes)		97,76 ± 15,54	93,22 ± 18,58	/
Verlauf	Akut <sup>3</sup>	70 (23,8%)	/	/
	Chronisch <sup>4</sup>	168 (57,1%)	32 (100%)	/
	Unklar <sup>5</sup>	58 (19,1%)	/	/
Stadien (Erstdiagnose)	0	10 (3,4%)	/	/
	Ia- Löfgren	42 (14,2%)	2 (6,3%)	/
	Ic	38 (12,8%)	2 (6,3%)	/
	II	88 (29,7%)	6 (18,7%)	/
	III	21 (7,1%)	20 (62,4%)	/
	Keine Angaben	97 (32,8%)	2 (6,3%)	/
Stadien (Verlauf)	0	21 (7,1%)	/	/
	I	11 (3,7%)	/	/
	II	41 (13,8%)	/	/
	III	20 (6,8%)	19 (59,4%)	/
	ohne Angaben	203 (68,6%)	13 (40,6%)	/

<sup>1</sup> Diffusionskapazität mit Hb-korrigiertem CO-Transferfaktor

<sup>2</sup> Diffusionskapazität mit Hb-korrigiertem CO-Transferfaktor geteilt durch das Alveolarvolumen

<sup>3</sup> eine Krankheitsepisode, mit Remission innerhalb von 2 Jahren

<sup>4</sup> mehr als 1 Krankheitsschub oder eine Erkrankungsdauer von mehr als 2 Jahren

<sup>5</sup> da keine Angaben vorhanden oder Beobachtungszeitraum zu kurz (weniger als 2 Jahre)

**Tabelle 4:** Verlaufparameter der Patienten- und Kontrollkohorte (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen und die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der stetigen Variablen)

Anhand der Lungenfunktionswerte konnten keine signifikanten Differenzen zwischen beiden Gruppen festgestellt werden, einzig die FEV<sub>1</sub> in Prozent vom Soll war bei der Fibrosegruppe niedriger als im Vergleichskollektiv und Sarkoidosegesamtkollektiv. Außerdem lagen die Werte für die Diffusionskapazität im Fibrosekollektiv unterhalb der Norm. Bei der Verteilung der Krankheitsverläufe überwogen mit 168 Patienten (57,1%) die chronischen Fälle im Sarkoidosegesamtkollektiv gegenüber den akuten Verläufen mit 70 Fällen (23,8%). Das Fibrosekollektiv formierte sich definitionsgemäß zu 100% aus chronischen Fällen. Die meisten Patienten des Sarkoidosegesamtkollektivs wurden sowohl bei Erstdiagnose als auch im Verlauf mit dem Stadium II klassifiziert, wohingegen sich in der Fibrosegruppe bereits bei Erstdiagnose ein starkes Überwiegen der Stadium III Patienten zeigte. Dieser Trend bestätigte sich im Verlauf mit einer Stadium-III-Zugehörigkeit der Fibrosepatienten von 59,4 %.

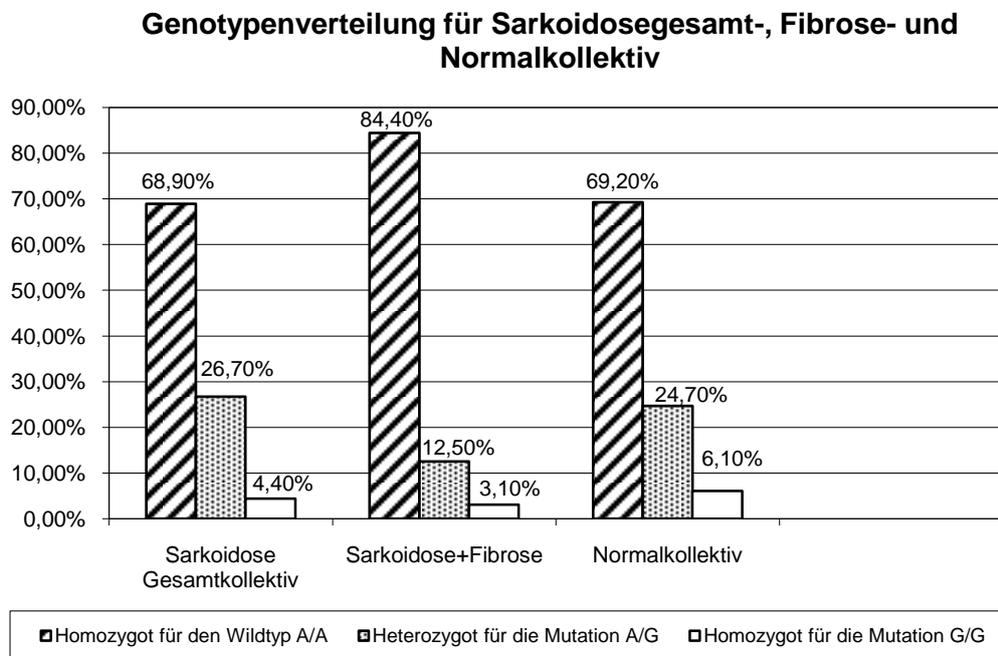
### 3.1.3 Verteilung von Genotypen und Allelfrequenzen

Variable		Sarkoidose Gesamtkollektiv	Sarkoidose mit Fibrose	Kontrollkollektiv
TGF- $\beta$ 2	Homozygot Wildtyp	204 (68,9%)	27 (84,4%)	261 (69,2%)
	Heterozygot	79 (26,7%)	4 (12,5%)	93 (24,7%)
	Homozygot Mutant	13 (4,4%)	1 (3,1%)	23 (6,1%)
Gesamt		296	32	377
	Allelfrequenz des Mutationsallels	0,177 (105/592)	0,094 (6/64)	0,184 (139/754)
	Prävalenz des Mutationsallels	0,311 (92/296)	0,156 (5/32)	0,308 (116/377)
	P-Wert (verglichen mit Kontrollkohorte)	0,556	0,197	/

**Tabelle 5:** Sarkoidosegesamtkollektiv, Fibrosekollektiv und Normalpersonenkollektiv Genotypenverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467) Polymorphismus (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)

Die Verteilung des Genpolymorphismus TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467) wurde für alle Sarkoidosepatienten, das gesamte Vergleichskollektiv, sowie für jede Untergruppe der beiden Hauptkollektive untersucht. Die Gegenüberstellung zeigte folgende Ergebnisse: Der homozygote Wildtyp (A/A) trat in allen Gruppen ausnahmslos am häufigsten auf, gefolgt vom heterozygoten (A/G) und dann vom homozygoten Genotyp mit Mutation (G/G). Die Allelfrequenzen des mutierten Allels präsentierten sich für die Sarkoidose- und Normal-Gesamtkollektive nahezu identisch, was sich auch in den Prävalenzwerten widerspiegelte. Im Vergleich zeigten das Sarkoidosegesamtkollektiv und die gesunde Vergleichsgruppe fast identische prozentuale Häufigkeitsverteilungen, wohingegen das Fibrosekollektiv zwar ebenfalls diesem Trend folgte,

jedoch prozentual leicht von den Ergebnissen der beiden Gesamtkollektive abwich. Mit 84,4% trat hier der Wildtyp noch wesentlich häufiger auf, als es mit rund 69% bei den beiden Gesamtkollektiven der Fall war. Der heterozygote Genotyp war mit 12,5% seltener zu beobachten als in den beiden großen Hauptgruppen. Auch die Allelfrequenz des Mutationsallels trat mit 0,094 seltener im Fibrosekollektiv auf als mit 0,177 bzw. 0,184 im Sarkoidosegesamt- bzw. Kontrollkollektiv. Der Chi- Quadrat-Test nach Pearson wies weder für die Fibrosepatienten noch für das Sarkoidosegesamtkollektiv versus Normalkollektiv eine Signifikanz auf, da alle p-Werte  $>0,05$  waren.

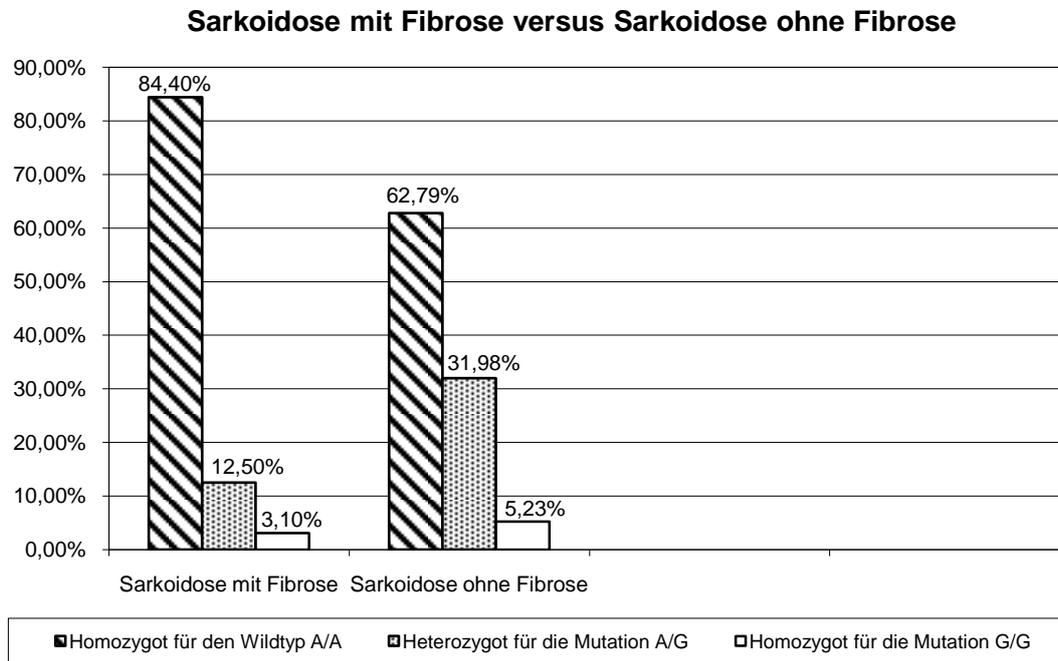


**Abbildung 3**

	Sarkoidose-Patienten mit Fibrose	Sarkoidose-Patienten ohne Fibrose
Gesamt (n)	32	172
Homozygot für den Wildtyp (AA)	27 (84,4%)	108 (62,79%)
Heterozygot für die Mutation (AG)	4 (12,5%)	55 (31,98%)
Homozygot für die Mutation (GG)	1 (3,1%)	9 (5,23%)
Allelfrequenz des Mutationsallels	0,094 (6/66)	0,212 (73/344)
Prävalenz des Mutationsallels	0,156 (5/32)	0,372 (64/172)
P-Wert (verglichen mit Sark.-Pat. ohne Fibrose)	0,058	/

**Tabelle 6:** Sarkoidosepatienten mit Fibrose vs. Sarkoidose-Patienten ohne Fibrose (exklusive Unklare). Genotypenverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467) Polymorphismus (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)

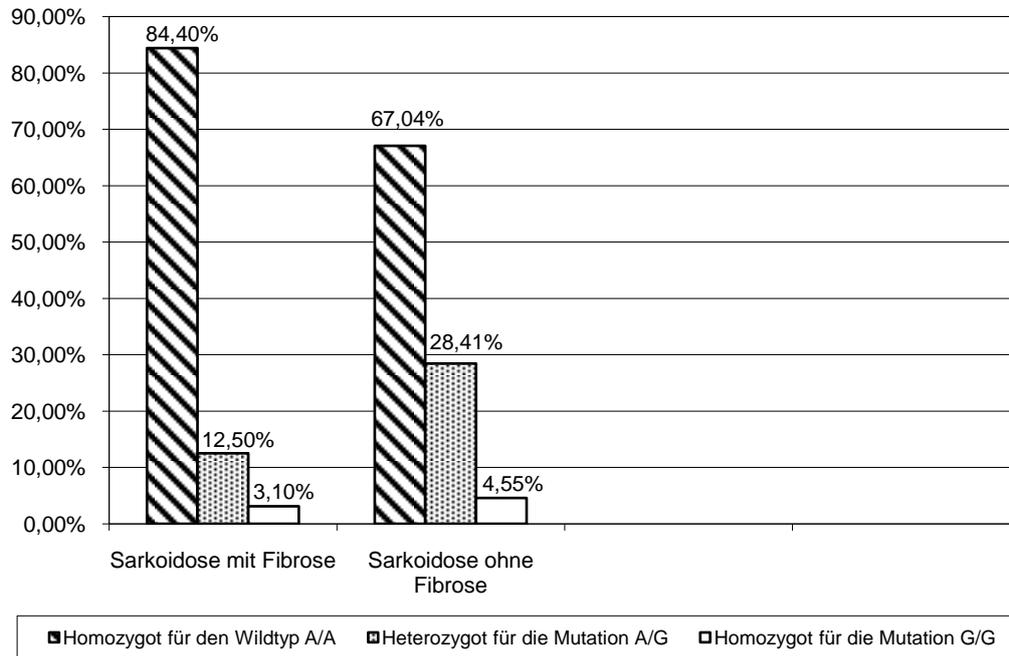
In beiden Gruppen konnte ein deutliches Überwiegen des homozygoten Wildtyps beobachtet werden wobei sich der heterozygote Genotyp im Patientenkollektiv ohne Fibrose mit 31,98% doppelt so häufig darstellte wie in der Fibrosegruppe mit 12,5%. Dies spiegelte sich auch in der Frequenz sowie in der Prävalenz des Mutationsallels wieder. Im Fibrosekollektiv war die Allelfrequenz mit 0,094 nur halb so groß wie die des Vergleichkollektivs mit 0,212 ebenso wie die Prävalenz mit 0,156 für Fibrosepatienten gegenüber 0,372 für die Patienten ohne Fibrose. Der p-Wert betrug hier 0,058 und wies somit auf einen Trend in der Genotypenverteilung hin. Dieser Berechnung wurden alle Patienten mit einer unklaren Stadieneinteilung entzogen.

**Abbildung 4**

	Sarkoidose-Patienten mit Fibrose	Sarkoidose-Patienten ohne Fibrose
Gesamt (n)	32	264
Homozygot für den Wildtyp (AA)	27 (84,4%)	177 (67,04%)
Heterozygot für die Mutation (AG)	4 (12,5%)	75 (28,41%)
Homozygot für die Mutation (GG)	1 (3,1%)	12 (4,55%)
Allelfrequenz des Mutationsallels	0,094 (6/64)	0,188 (99/528)
Prävalenz des Mutationsallels	0,156 (5/32)	0,33 (88/264)
P-Wert (verglichen mit Sark.-Pat. ohne Fibrose)	0,082	/

**Tabelle 7:** Sarkoidose-Patienten mit Fibrose vs. Sarkoidose-Patienten ohne Fibrose (inklusive Unklare). Genotypenverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467) Polymorphismus (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)

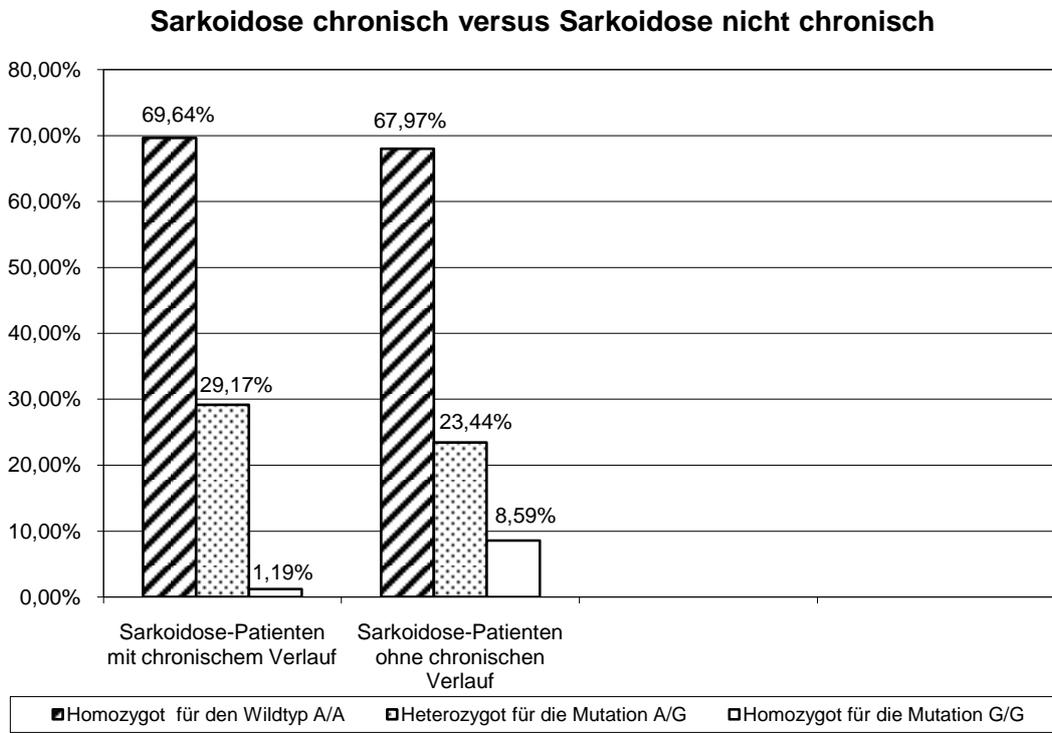
Der Vergleich aller Sarkoidosepatienten ohne Fibrose inklusive der als unklar definierten Sarkoidosepatienten mit dem Fibrosekollektiv ergab in relativen Häufigkeiten ein fast identisches Ergebnis zu den Resultaten der Berechnungen, bei denen alle unklar zuzuordnenden Patienten entfernt wurden. Die Frequenzen lagen bei 0,67(A/A), 0,284(G/A) und 0,045(G/G) für das Kollektiv ohne Fibrose wobei die Genotypenverteilung für das Fibrosekollektiv identisch mit denen im Diagramm 2 dargestellten blieben. Mit einem p-Wert von 0,082 zeichnete sich wiederum eine Tendenz der Genotypenverteilung in Bezug auf einen Zusammenhang zwischen TGF- $\beta$ 2 Polymorphismus und Patientenkollektiv ab.

**Sarkoidose mit Fibrose versus Sarkoidose ohne Fibrose****Abbildung 5**

	Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf	Sarkoidose-Patienten ohne chronischen Verlauf
Gesamt (n)	168	128
Homozygot für den Wildtyp (AA)	117 (69,64%)	87 (67,97%)
Heterozygot für die Mutation (AG)	49 (29,17%)	30 (23,44%)
Homozygot für die Mutation (GG)	2 (1,19%)	11 (8,59%)
Allelfrequenz des Mutationsallels	0,158 (53/336)	0,203 (52/256)
Prävalenz des Mutationsallels	0,304 (51/168)	0,32 (41/128)
P-Wert (verglichen mit Sark. ohne chron. Verlauf)	0,009	/

**Tabelle 8:** Sarkoidosepatienten mit einem chronischen Verlauf versus Sarkoidosepatienten ohne einen chronischen Verlauf (unklare inklusive) Genotypenverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467) Polymorphismus (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)

Die Gegenüberstellung dieser beiden Gruppen konnte zunächst sehr ähnliche Verteilungen für den homozygoten Wildtyp sowie für den heterozygoten Mutationstypen darstellen, jedoch zeigte sich mit einer deutlichen Signifikanz von 0,009 ein absolutes Überwiegen des homozygoten Mutationsgenotyps mit 8,59% in der Gruppe der nicht chronisch erkrankten Sarkoidosepatienten im Vergleich zum Kollektiv mit chronischem Verlauf, welches einen Wert von nur 1,19% aufwies. Da in diese Berechnung auch alle als unklar definierten Patienten miteinbezogen wurden, wird im Folgenden eine Darstellung unter Ausschluss dieser Patienten erfolgen, um die Signifikanz auch dort zu bestätigen.



**Abbildung 6**

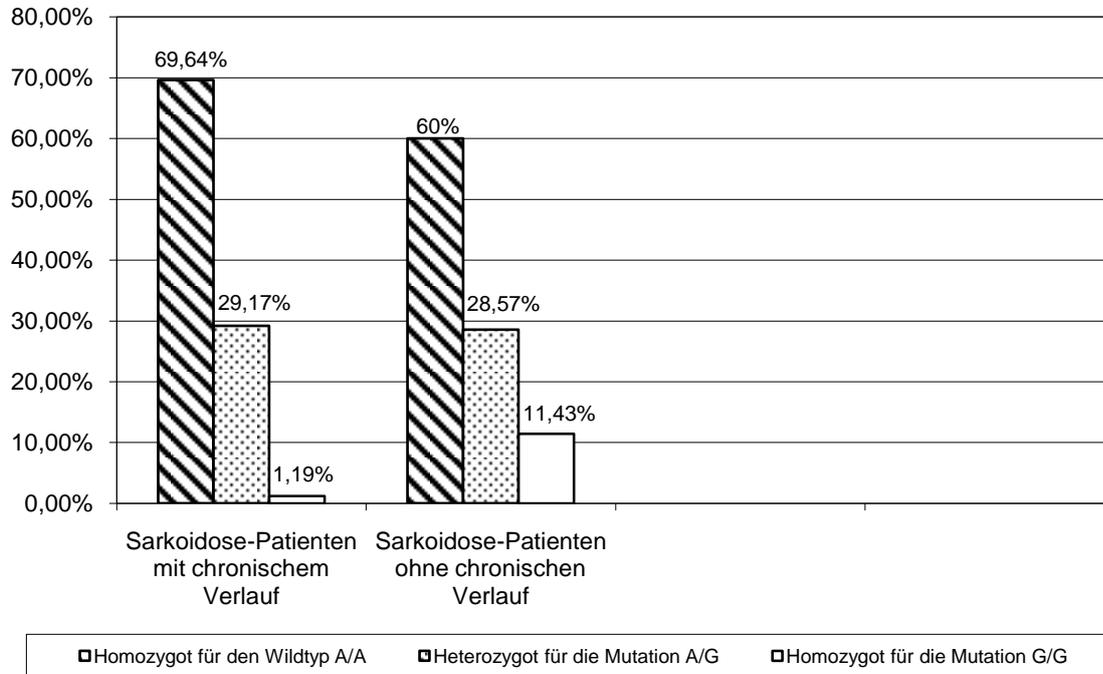
	Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf	Sarkoidose-Patienten ohne chronischen Verlauf
Gesamt (n)	168	70
Homozygot für den Wildtyp (AA)	117 (69,64%)	42 (60%)
Heterozygot für die Mutation (AG)	49 (29,17%)	20 (28,57%)
Homozygot für die Mutation (GG)	2 (1,19%)	8 (11,43%)
Allelfrequenz des Mutationsallels	0,158 (53/336)	0,257 (36/140)
Prävalenz des Mutationsallels	0,304 (51/168)	0,4 (28/70)
P-Wert (verglichen mit Sark. ohne chron. Verlauf)	0,001	/

**Tabelle 9:** Sarkoidosepatienten mit einem chronischen Verlauf versus Sarkoidosepatienten ohne einen chronischen Verlauf (unklare exklusive) Genotypenverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467) Polymorphismus (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)

In dieser Berechnung zeigte sich mit einer Signifikanz von  $p=0,001$  ein noch deutlicheres Ergebnis in der Genotypenverteilung bei der Gegenüberstellung der beiden Kollektive. Die chronischen Patienten präsentierten ein Überwiegen des Wildtyps mit 69,64%, gefolgt vom Auftreten des Heterozygoten mit 29,17%. Diese Ergebnisse fanden sich in ähnlicher Verteilung in der Gruppe der nicht chronisch Erkrankten mit 60% und 28,57%. Im Gegensatz dazu wurden jedoch nur 2 von 168 chronischen Patienten dem homozygoten Mutationsgenotyp zugeordnet, was 1,19% entspricht, während 8 von 70 Patienten ohne chronischen Verlauf mit 11,43% den überwiegenden Anteil der homozygoten Allelträger G/G darstellten. Die Patienten ohne chronischen Verlauf wiesen damit 10 Mal häufiger den homozygoten Mutationygenotypen auf als die chronisch Erkrankten. In dieser Berechnung konnte für 58 Patienten keine eindeutige

Zuordnung zu den Kategorien: chronisch oder nicht chronisch stattfinden; daher wurden sie der Statistik entzogen.

### Sarkoidose chronisch versus Sarkoidose nicht chronisch

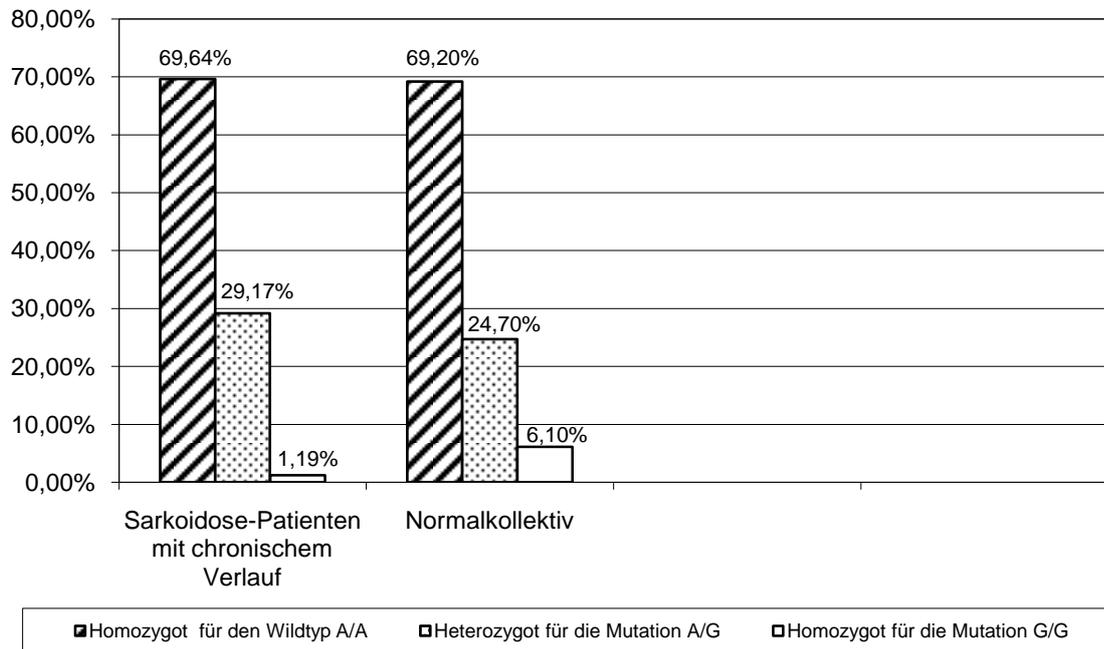


**Abbildung 7**

	Sarkoidose-Patienten mit chronischem Verlauf	Normalkollektiv
Gesamt (n)	168	377
Homozygot für den Wildtyp (AA)	117 (69,64%)	261 (69,2%)
Heterozygot für die Mutation (AG)	49 (29,17%)	93 (24,7%)
Homozygot für die Mutation (GG)	2 (1,19%)	23 (6,1%)
Allelfrequenz des Mutationsallels	0,158 (53/336)	0,184 (139/754)
Prävalenz des Mutationsallels	0,304 (51/168)	0,308 (116/377)
P-Wert (verglichen mit Normalpersonen)	0,030	/

**Tabelle 10:** Sarkoidosepatienten mit einem chronischen Verlauf versus Normalkollektiv Genotypenverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467) Polymorphismus (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)

Die Gegenüberstellung von chronischen Sarkoidosepatienten mit dem Normalkollektiv ließ mit  $p=0,03$  erneut eine deutliche Signifikanz bei der Genotypenverteilung erkennen. Wieder wiesen nur 2 von 170 Sarkoidosepatienten den G/G Polymorphismus auf. Dies entspricht erneut nur 1,19%. Im Gegensatz dazu fanden sich 23 von 377, also 6,1% der Normalpersonen, die die G/G Allelsequenz repräsentierten.

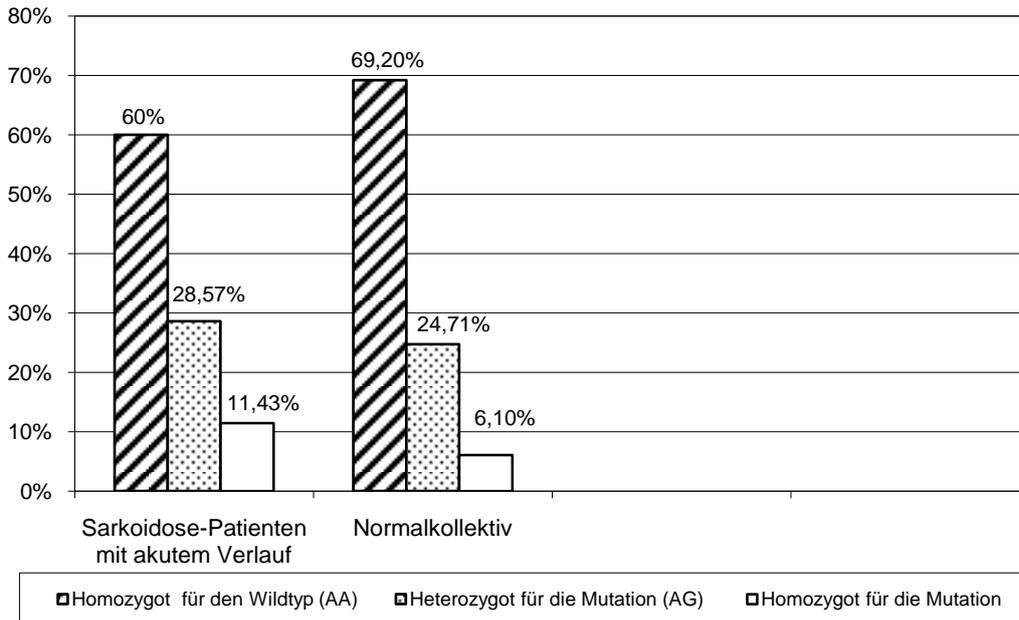
**Sarkoidose chronisch versus Normalpersonen****Abbildung 8**

	Sarkoidose-Patienten mit akutem Verlauf	Normalkollektiv
Gesamt (n)	70	377
Homozygot für den Wildtyp (AA)	42 (60%)	261 (69,2%)
Heterozygot für die Mutation (AG)	20 (28,57%)	93 (24,7%)
Homozygot für die Mutation (GG)	8 (11,43%)	23 (6,1%)
Allelfrequenz des Mutationsallels	0,257 (36/140)	0,184 (139/754)
Prävalenz des Mutationsallels	0,4 (28/70)	0,308 (116/377)
P-Wert (verglichen mit Normalpersonen)	0,173	/

**Tabelle 11:** Sarkoidosepatienten mit einem akutem Verlauf versus Normalpersonen Genotypenverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467) Polymorphismus (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)

Bei der Gegenüberstellung von akuten Sarkoidosefällen und dem Vergleichskollektiv konnte keine Signifikanz bei der Allelverteilung beider Gruppen festgestellt werden (wobei hier immer Sarkoidosefälle mit akutem Verlauf versus Normalpersonen verglichen wurden). Der p-Wert war mit 0,173 als nicht signifikant anzusehen.

### Sarkoidose akut versus Normalpersonen



**Abbildung 9**

### 3.2 Fazit:

Viele der hier bearbeiteten Gegenüberstellungen wiesen keine eindrucklichen Differenzen in ihren Verteilungsmustern der verschiedenen Genotypen für den TGF- $\beta$ 2 (59941 A/G rs1891467) Polymorphismus auf. Dies spiegeln auch die Chi-Quadrat-Testresultate wieder, welche in betreffenden Vergleichen konstant über 0,05 lagen und somit keine analytischen Zusammenhänge erkennen ließen. In der Gegenüberstellung von Fibrosepatienten mit einem Sarkoidosekollektiv ohne Fibrose konnte ein Trend anhand eines p-Wertes von 0,058 nachgewiesen werden. Außerdem wies der Vergleich von chronisch erkrankten Patienten mit nicht chronischen Sarkoidosepatienten und auch dem Normalpersonenkollektiv in mehreren Berechnungen mit p-Werten unter 0,05 deutliche Signifikanzen auf, die in der anschließenden Diskussion eingehend behandelt werden sollen.

## **4. Diskussion**

Für den im Sarkoidosekollektiv untersuchten TGF- $\beta$ 2 59941 A/G Polymorphismus konnten signifikante Assoziationen zwischen mehreren definierten Untergruppen nachgewiesen werden. Die A-Allelfrequenz des SNPs war im Sarkoidosekollektiv mit chronischem Krankheitsverlauf signifikant höher als im Sarkoidosekollektiv ohne chronischen Krankheitsverlauf. Der hier errechnete p-Wert betrug 0,001. Auch die Gegenüberstellung der chronischen Sarkoidosegruppe mit dem gesunden Normalpersonenkollektiv zeigte mit einem p-Wert von 0,03 signifikante Zusammenhänge. Des Weiteren konnte eine starke Tendenz beim Vergleich von Sarkoidosepatienten mit und Sarkoidosepatienten ohne eine Lungenfibrose und deren Genotypenverteilung nachgewiesen werden, wobei der p-Wert mit 0,058 nicht signifikant war. In den Gruppen der chronisch erkrankten bzw. fibrotischen Patienten wurde deutlich, dass der G/G homozygote Mutationstyp deutlich seltener auftrat. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass dem TGF- $\beta$ 2 G/G Genotyp des untersuchten Polymorphismus möglicherweise als Baustein eines multifaktoriellen Geschehens im Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf bei Sarkoidosepatienten eine protektive Funktion zukommen könnte. Es zeigten sich ansonsten keine weiteren Assoziationen zwischen bestimmten Phänotypen und dem TGF- $\beta$ 2 59941 A/G Polymorphismus.

Bisherige Studien verweisen darauf, dass aus fibrotischen Lungen isolierte Fibroblasten eine deutlich erhöhte Sekretionsrate von Wachstumsfaktoren, im Speziellen von TGF- $\beta$ , im Vergleich zum gesunden Lungengewebe aufweisen. In diesen Studien wurde vor allem die Expression von TGF- $\beta$  untersucht, welches durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und durch Auslösen von Entzündungskaskaden dazu führt, dass das Lungengewebe bindegewebig umstrukturiert wird. Dem Wachstumsfaktor wird ein potenter Einfluss auf Fibrosierungsprozesse wie bei der Sarkoidose aber auch bei vielen anderen Erkrankungen wie der Idiopathischen Lungenfibrose, der Bronchopulmonalen Dysplasie, der Systemischen Sklerose oder der Rheumatoiden Arthritis zugeschrieben (Krein und Winston, 2002). In diesen Untersuchungen wurde der Fokus jedoch nur auf die Expression von TGF- $\beta$  und nicht etwa auf das Vorhandensein von Genpolymorphismen gelegt. Eine *in vitro* Studie von Coker et al. (1997) zeigte, dass alle drei Isoformen des Wachstumsfaktors grundsätzlich die Fähigkeit besitzen, über eine

Fibroblastenstimulation die Prokollagensynthese zu forcieren und somit zu einer Fibrosierung beizutragen. Hierbei ist anzumerken, dass die verschiedenen Isoformen in ihrer Potenz erheblich variieren. So gilt TGF- $\beta$ 3 nach den vorliegenden Erkenntnissen von Coker et al. (1997) als zehn Mal potenter als die beiden anderen Isoformen. O’Kane und Ferguson (1997) hingegen untersuchten das Gleichgewicht der Isoformen  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 der TGF-Superfamilie in der Wundheilung und kamen zu dem Ergebnis, dass durch eine manipulative Reduktion von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2, beispielsweise durch Antikörper, die Fibrosierung reduziert werden konnte. TGF- $\beta$ 3 hingegen schien einen inhibitorischen Effekt auf TGF- $\beta$ 1 und auf die Extrazellulärmatrixproduktion auszuüben (O’Kane und Ferguson, 1997). Dieses Gleichgewicht der drei Isoformen spielt anscheinend eine wichtige Rolle in der Wundheilung und der damit verbundenen Fibrosierung. Eine Studie von Shah et al. (1995) befasste sich eingehender mit der Verteilung der Isoformen in Hautwunden und konnten zeigen, dass TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 profibrotische Funktionen und TGF- $\beta$ 3 eine eher hemmende Wirkung auf Vernarbungsprozesse hatte. Durch Addition neutralisierender Antikörper von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 reduzierte sich der Narbenanteil bei der dermalen Wundheilung. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Reduktion von TGF- $\beta$ 1 alleine nur eine partielle Verbesserung der Vernarbung brachte und dass der alleinige Einsatz von Anti-TGF- $\beta$ 2 keine Differenzen zu den Kontrollnarben aufwies. Der Einsatz von Antikörpern beider Isoformen in Kombination ist somit sinnvoll, um die gewünschte Fibrosierungsreduktion erreichen zu können. Eine Hemmung von TGF- $\beta$ 3 wies außerdem eine Reduktion von Monozyten und Makrophagen, Fibronectin und Kollagen auf und führte somit ebenfalls zu einer besseren Wundheilung bzw. einer reduzierten Vernarbung. Als Fazit stellten Shah et al. (1995) die Möglichkeit in Aussicht, diesen TGF- $\beta$  Antikörperereinsatz als mögliche Therapieoption bei Narbenbildung einzusetzen (Shah et al. 1995). Neuere Studien nutzten diese Erkenntnisse und befassten sich bereits mit der Wirksamkeit der Antikörpertherapie speziell für TGF- $\beta$ 2 in der Ophthalmologie. Hierbei wurde der Antikörper nach durchgeführter Trabekulektomie bei Weit- und Engwinkelglaukomen als Fibrosierungsinhibitor eingesetzt (Khaw et al., 2007). Bisher konnte jedoch keine Wirksamkeit für den alleinigen Einsatz des TGF- $\beta$ 2 Antikörpers nachgewiesen werden (Khaw et al., 2007). Dies unterstützt wiederum die Ergebnisse von Shah et al. (1995). Die Resultate für einen gemeinsamen Einsatz der Antikörper gegen alle Isoformen beispielsweise in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und in der Onkologie sind dagegen erfolgversprechender. Durch die Antikörperbehandlung bei laryngotrachealen Stenosen konnte beispielsweise eine Reduktion von Fibrosierungsprozessen erzielt werden

(Simpson et al., 2008). In der Onkologie bewiesen Anscher et al. (2006) die wirksame Herabsetzung von Inflammation und Fibrosierung nach einer Bestrahlungstherapie bei Lungenkrebs. Wenn man nun diese Fähigkeiten des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  als Basis für Forschungen auf molekulargenetischer Ebene nimmt, ist die Untersuchung von Genpolymorphismen der einzelnen Isoformen ein weiterer Ansatzpunkt. Falls existierende Polymorphismen einen Einfluss auf die Funktion des Wachstumsfaktors haben, muss nicht nur die Expression der vorhandenen Isoformen, sondern auch deren Funktionalität berücksichtigt werden. Auch das Verhältnis, in welchem die Isoformen zueinander stehen, könnte von Bedeutung sein, da bereits deutlich wurde, dass dieses Gleichgewicht eine tragende Rolle spielt. Bei der Mutation eines oder beider Allele einer TGF- $\beta$ -Isoform könnte es sowohl zu einer Funktionssteigerung bzw. zu einem Funktionsverlust als auch zu veränderten Proteinlevels kommen, die das Individuum dann möglicherweise für eine Fibrose prädisponieren. Die Funktionalität von Polymorphismen aller drei Isoformen haben Susol et al. (2000), mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern für die Systemische Sklerose untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Assoziationen zwischen dem Auftreten der Erkrankung und TGF- $\beta$ 2 sowie TGF- $\beta$ 3-Polymorphismen bestehen (Susol et al., 2000). Awad et al. (1998) untersuchten Genpolymorphismen bei der Lungenfibrose und beschrieben eine Assoziation eines TGF- $\beta$ 1-Polymorphismus in Codon 10 und in Codon 25 mit erhöhten Spiegeln der Isoform beim homozygoten Wildtyp im Vergleich zum heterozygoten Genotypen. Hier kann also beispielsweise von einem Funktionsverlust bei vorhandener Mutation ausgegangen werden (Awad et al., 1998). Der T869C Polymorphismus in Codon 10 wurde von einer japanischen Forschungsgruppe um Niimi et al. (2002) speziell bei Sarkoidosepatienten untersucht. Hierbei konnten jedoch keine signifikanten Assoziationen festgestellt werden. Auch unter Berücksichtigung der Stadien waren keine Signifikanzen erkennbar. Jedoch fällt in dieser Studie auf, dass nur 4 von den 104 Sarkoidosepatienten ein Stadium III und kein Einziger ein Stadium IV aufwiesen. Im Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen Polymorphismus und Fibrosierung ist diese Studie aufgrund der Zusammensetzung des Studienkollektivs daher keinesfalls aussagekräftig. Der von uns untersuchte 59941 A/G (rs1891467) Polymorphismus des TGF- $\beta$ 2 Gens wurde außer von Kruit et al. (2006) noch nicht im Zusammenhang mit der Sarkoidose untersucht.

Unser Studienziel war es, den Fokus auf den Zusammenhang zwischen vorliegenden Genotypen und Phänotypen zu legen und darzustellen, welchen eventuellen Einfluss der 59941 A/G (rs1891467) Polymorphismus auf die Sarkoidose ausübt. Diesen Geno-Phänotyp-Ansatz verfolgte auch die niederländische Forschungsgruppe von Kruit et al. (2006), die ihr Hauptaugenmerk auf den Zusammenhang zwischen der Prävalenz der Polymorphismen und dem Auftreten einer Lungenfibrose bei Sarkoidosepatienten legte. Die Forschungsgruppe untersuchte hierfür ein niederländisches Kollektiv auf SNPs der Isoformen 1 bis 3 des TGF- $\beta$  Gens und erstellte anhand dessen Haplotypen mit Carrierfrequenzangaben, die zum Vergleich der Einzelkollektive dienten. Der Vergleich der beiden Studien ist zulässig, da die Untersuchung anhand ähnlicher Kriterien stattfand. So formierten sich die Kollektive aus Teilnehmern kaukasischer Herkunft mit geographisch eng beieinander liegendem Ursprung, wodurch eine gewisse Übereinstimmung des Genoms gegeben ist. Die Einteilung der röntgenologischen Stadien der Sarkoidose wurde in beiden Studien auf der Grundlage der Zuordnung durch Scadding (1961) vorgenommen, wobei die Zuweisung zur Fibrose in beiden Studien die Stadien III und IV einschloss. Auch der Abgleich von Patienten und gesunden Normalpersonen fand bei beiden Forschungsgruppen statt, um einen validen Vergleich zu garantieren. In der Studie von Kruit und Kollegen wurde ein Sarkoidosekollektiv von 154 und ein Kontrollkollektiv bestehend aus 315 Personen untersucht. Die Patientenkohorte formierte sich aus 50 akuten, selbstlimitierenden und 46 Fällen mit Löfgrensyndrom sowie 58 chronischen Patienten. Davon präsentierten 24 Patienten eine Lungenfibrose. Die beiden Gruppen wurden über 4 Jahre hinweg verfolgt und die Verlaufsparemeter verglichen. Die in unserer Arbeit untersuchten Kollektive wurden ebenfalls einem „follow up“ unterzogen, welches sich auf einen Zeitraum von durchschnittlich 5,6 Jahren bezieht. In unser Kontrollkollektiv wurden 378 freiwillige Teilnehmer eingeschlossen, von denen jedoch nur 377 genotypisiert werden konnten. Unser Sarkoidosekollektiv umfasste 296 Studienpatienten. Hierbei handelte es sich um 168 Patienten mit einem chronischen Verlauf, 136 davon ohne und 32 mit einer Lungenfibrose. Von den 70 Patienten mit einem akuten Verlauf hatten 42 ein Löfgren Syndrom und keiner eine Lungenfibrose. Die restlichen 58 Patienten konnten keiner klaren Stadieneinteilung zugeführt werden, da sie hauptsächlich aus den Selbsthilfegruppen rekrutiert wurden. Aufgrund dieser weitaus höheren Teilnehmeranzahl in beiden Kollektiven wird die Aussagekraft der ermittelten Ergebnisse erheblich gesteigert, was uns im Vergleich zu Kruit et al. (2006) möglicherweise ein stabileres Fundament in Bezug auf unsere Ergebnisse liefert. In der Studien der niederländischen

Forschungsgruppe wurden SNPs für alle 3 Isoformen von TGF- $\beta$  untersucht. Im Gegensatz dazu wurde der Fokus unserer Studie einzig auf den TGF- $\beta$ 2-59941-A/G(rs1891467)-SNP und seine Allelfrequenzen in den verschiedenen Kollektiven gelegt. Auch Kruit und seine Forschungsgruppe beschäftigten sich mit diesem Genlocus und postulierten, dass für Patienten mit einer Lungenfibrose ein Überwiegen des G Allels, bestätigt durch eine Gesamtcarrierfrequenz von 0,62 für den TGF- $\beta$ 2 59941 A/G Polymorphismus festgestellt werden konnte. Mit einer Allelfrequenz von 0,41 für akute und 0,28 für chronische Krankheitsverläufe trat das Mutationsallel in den Bezugsgruppen deutlich seltener auf. Außerdem zeichneten sich im Kontrollkollektiv Verteilungsfrequenzen von 0,33 für den A/G- und 0,64 für den A/A- Genotyp ab, im Vergleich zu A/G-Frequenzen von 0,58 und A/A- Frequenzen von 0,38 bei Fibrosepatienten. Bei Kruit konnte also gezeigt werden, dass der homozygote Wildtyp A/A mit 38% im Fibrosekollektiv sehr viel seltener auftrat als im gesunden Vergleichskollektiv. Die A/G-Frequenz der Normalpersonen kam mit 33% wesentlich seltener vor als bei den Fibrosepatienten, die eine Frequenz des A/G Typs von 58% aufwiesen. Diese Ergebnisse lieferten Kruit et al. die Diskussionsbasis ihrer Aussage, dass die Präsenz des Mutationsgens mit einem fibrotischen Verlauf der Sarkoidoseerkrankung assoziiert sein könnte. Die Verteilung für alle von uns untersuchten Kollektive dieser Studie stellte sich wie folgt dar: die Allelfrequenz des G-Allels für Fibrosepatienten betrug 0,094; für akute und chronische Verläufe: 0,257 und 0,158; für das Sarkoidosegesamtkollektiv 0,177 und für das gesunde Vergleichskollektiv 0,184. Bereits hier, nur bei der Betrachtung der Gesamtfrequenz des Mutationsallels, zeigen sich sehr deutliche Differenzen zu den Studienergebnissen von Kruit et al. (2006). Die von uns genotypisierten Fibrosepatienten weisen lediglich eine Carrierfrequenz von 9,4% auf, was ca. einem Sechstel der durch die niederländische Forschungsgruppe ermittelten Ergebnisse entspricht. Auch in der Gruppe der akut und chronisch Erkrankten trat das mutierte Allel im Studienvergleich mit 25,7% und 15,8% nur halb so häufig auf. Ein differenzierteres Betrachten der Frequenzen für jeden einzelnen Genotyp wies erneut deutliche Differenzen im Vergleich der beiden Studien auf. Zunächst konnte festgestellt werden, dass für den A/A- Wildtyp der Kontrollkollektive beider Studien kein großer Unterschied im Vorkommen ermittelt werden konnten, wohingegen jedoch die Allelfrequenz des heterozygoten A/G Typs bei Kruit et al. (2006) doppelt so hoch lag wie in unserem Kollektiv, d.h. der heterozygote Typ wesentlich häufiger zu identifizieren war. Des Weiteren ließ der Vergleich der Fibrosekollektive untereinander deutlich werden, dass in unserer Studie mit einer A/A Allelfrequenz des Wildtyps von 0,844 das Auftreten deutlich höher lag als

in der niederländischen Vergleichsgruppe mit 0,38. Die A/G Allelfrequenz zeigt sich jedoch mit 0,58 erheblich häufiger bei Kruit und Mitarbeitern als bei unseren Untersuchungen mit 0,063 was die Aussage zulässt, dass die Mutationsallele in unserem Fibrosekollektiv fast 10 Mal seltener auftritt als in dem niederländischen Kollektiv. Die Auswertung der in diesen beiden voneinander unabhängigen Studien ermittelten Allelfrequenzen für die unterschiedlichen Kollektive weist deutliche Differenzen, bzw. diametrale Ergebnisse auf. Die Mutmaßung von Kruit et al. (2006) über ein häufigeres Auftreten des mutierten Allels bei Fibrosepatienten konnte daher von uns definitiv nicht bestätigt werden. Unsere Ergebnisse zeigten außerdem einen Trend im Zusammenhang von Polymorphismus und chronischem Krankheitsverlauf, was bei der niederländischen Studie nicht der Fall war. Das Vorhandensein einer Lungenfibrose und einem chronischen Verlauf der Sarkoidose sollte differenziert beurteilt werden, da nicht jeder chronische Patient zwangsläufig eine Lungenfibrose entwickelt. Da in der Literatur das Auftreten des TGF- $\beta$ 2-Polymorphismus einzig im Zusammenhang mit einer Fibrosierung untersucht wurde, sind keine Daten zum Einfluss auf den Krankheitsverlauf verfügbar. Wir konnten jedoch eine signifikante Assoziation zwischen chronischem Verlauf und Vorliegen des G-Allels des 59941 A/G Polymorphismus' nachweisen. Es ist teilweise sehr schwierig, trotz röntgenologischer Stadieneinteilung zwischen chronischen Patienten mit einem fibrotischen Lungenbefall und denen ohne diesen Verlauf zu differenzieren. In unklaren Fällen wird das Röntgen oft durch eine HRCT-Untersuchung ersetzt und somit anders beurteilt, da die Detektionsrate von Fibroseherden im CT wesentlich höher liegt. Dennoch werden die Patienten der Röntgenstadieneinteilung nach Scadding (1961) zugeordnet, was streng genommen die Stadieneinteilung verfälscht. Da nicht jede Lungenfibrose durch eine Biopsie gesichert werden kann, sollte bei der Zuteilung der Stadien sehr sorgfältig und vor allem einheitlich vorgegangen werden. Eine neue Studie von Prasse et al. (2008) befasste sich mit diesem Problem und entwickelte eine alternative Klassifikation zur Einteilung der Sarkoidosestadien unter Berücksichtigung differenzierter diagnostischer Aspekte. Das „SCAC“-Protokoll zielt vor allem auf die klinische Präsentation der Patienten ab und beinhaltet desweiteren die Analyse von Serumparametern und additiver Diagnostik wie BAL und Lungenfunktionsanalysen (Prasse et al., 2008). Zur besseren Beurteilung des Krankheitsgrades mit der Konsequenz einer adäquaten Behandlung sind solche Protokolle in Zukunft der alten Klassifikation durchaus vorzuziehen.

Die höchsten Gesamtcarrierfrequenzen fanden sich in der Gruppe der akut Erkrankten bzw. nicht chronischen Patienten. Mit einer Signifikanz von 0,001 zeigt sich ein viel häufigeres Vorkommen

des homozygoten Mutationstyps mit 11,43% bei nicht chronischen Patienten, bzw. mit 6,1% beim Normalkollektiv, im Vergleich zu einem Vorkommen des Genotyps von lediglich 1,19% im chronischen Kollektiv bzw. mit 3,1% in der Sarkoidosegruppe mit Lungenfibrose.

Auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse kann entgegen der Postulierungen von Kruit et al. die Hypothese aufgestellt werden, dass zwar eine vermehrte Expression von TGF- $\beta$ 2 zur Entwicklung einer Fibrose beitragen kann, die Mutation eines oder beider Allele des Gens jedoch nicht zwangsläufig einen negativen Einfluss auf den Verlauf haben muss. Die hier gewonnene Datenlage zeigt vielmehr ein gegenteiliges Bild und lässt die Vermutung zu, dass durch die Mutation in einem oder sogar beiden Allelen des TGF- $\beta$ 2 Gens möglicherweise die profibrotische Funktion der  $\beta$ 2-Isoform des Wachstumsfaktors herabgesetzt sein könnte. Demnach hätte der mutationsfreie Genotyp, hier das Patientenkollektiv in einem chronischen Stadium bzw. mit einer diagnostizierten Lungenfibrose, eine höhere Wahrscheinlichkeit eine Fibrose zu entwickeln. Diesem Ansatz folgend wären dann die Individuen mit einer hohen Mutationsrate, evtl. durch eine Fehlfunktion von TGF- $\beta$ 2, vor einem chronischen Verlauf mit möglicher Fibrosierung geschützt. Diese These wird durch die Ergebnissen in allen relevanten Risikogruppen dieser Arbeit gestützt, da die Kollektive mit den höchsten Mutationsraten durch die akut erkrankten Sarkoidosepatienten bzw. die Patienten ohne Lungenfibrose sowie durch das Normalpersonenkollektiv repräsentiert wurden. Eine Expressionsanalyse würde zeigen, wie wichtig das quantitative Verhältnis der verschiedenen Isoformen zueinander ist. Eine weitere offene Frage ist, inwieweit auch das Verhältnis anderer Entzündungsmediatoren zueinander, welche die bei der Sarkoidose entstehende Immunreaktion hervorrufen, einen Einfluss ausübt. Ebenso verhält es sich mit der Bewertung von Polymorphismen der TGF- $\beta$  Gene in Bezug auf deren phänotypische Auswirkung. Die bis heute bekannten Forschungsdaten lassen kontroverse Hypothesen über einen Einfluss der Polymorphismen zu. Anhand der Ergebnissen dieser Arbeit könnte gemutmaßt werden, dass speziell für den TGF- $\beta$ 2 59941 A/G Polymorphismus bei Vorliegen der Mutation in beiden Allelen ein Funktionsverlust als mögliche Auswirkung in Frage kommt. Diese Spekulationen können jedoch nur durch funktionelle Studien bestätigt werden, in denen die Auswirkung der Polymorphismen in verschiedenen Kollektiven evaluiert würde. Hierzu könnten beispielsweise BAL, Serum oder Biopsiepräparate auf die Expression von TGF- $\beta$  untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit bestünde im „Knock-out“ Tiermodell verschiedener Expressionsmuster mit Phänotypenanalysen. Es muss außerdem beachtet werden, dass es

eventuell nicht nur zu einem Funktionsverlust oder einer Funktionssteigerung kommen kann, sondern dass auch Hemm- und Potenzierungsmechanismen der Isoformen untereinander außer Kraft gesetzt werden können. Die absolute Hemmung, wie z.B. in der Antikörpertherapie, einer oder mehrerer Isoformen von TGF- $\beta$ , ist nicht als beweisend anzusehen, da die Veränderung der durch die Mutation entstehenden Abläufe erforscht werden soll und nicht die Auswirkung des kompletten Verlustes. Die Funktionalität von TGF- $\beta$  sollte in weiteren Studien mit größeren Kollektiven, bestehend aus Patienten unterschiedlicher Ethnizität, untersucht werden. Die unterschiedlichen Spiegel der Isoformen im granulomatösen Gewebe könnten so mit ihrer jeweiligen Funktion in Zusammenhang gebracht werden. Neben diesem funktionellen Ansatz sind auch weitere Genotyp-Phänotyp-Untersuchungen notwendig. Die Ansätze vorangegangener Studien beziehen zwar die Verlaufsformen und Stadien der Sarkoidose in die Genotypisierung mit ein, jedoch könnten weitere Zusammenhänge wie z.B. Art und Anzahl der befallenen Organe in Korrelation mit den jeweiligen Genotypen untersucht werden.

## **5. Zusammenfassung**

Die Sarkoidose als polyätiologische Multisystemerkrankung ist charakterisiert durch nicht verkäsende Granulomherde, die sich im ganzen Körper manifestieren können, am häufigsten jedoch in der Lunge zu finden sind. Die Begleitsymptome sind oft sehr unspezifisch und variabel. Die Ätiologie der Sarkoidose ist immer noch weitestgehend ungeklärt, dennoch kann nach heutigem Wissensstand von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen werden. Umwelteinflüsse und genetische Dispositionen stehen gleichermaßen im Verdacht zu der Entstehung der Erkrankung beizutragen. Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang von Einzelnukleotid-Polymorphismen mit der Sarkoidose zu spezifizieren. Der hier bearbeitete 59941 A/G (rs1891467) Polymorphismus des TGF- $\beta$ 2 Gens wurde hinsichtlich seines Einflusses auf den Krankheitsverlauf mit möglicher Fibrosierung bei Sarkoidosepatienten untersucht. In vorangegangenen Studien konnte TGF- $\beta$  mit seinen einzelnen Isoformen quantitativ mit fibrotischen Umbauvorgängen der Lunge in Verbindung gebracht werden. Der Einfluss von Polymorphismen des Gens ist bisher jedoch noch unzureichend untersucht. Die hier verwendeten Probandenkollektive formierten sich aus 296 Sarkoidosepatienten, die entsprechend ihres Erkrankungsgrades in röntgenologische Stadien eingeteilt wurden, sowie aus 377 gesunden Vergleichspersonen. Alle Teilnehmer wurden für den 59941 A/G (rs1891467) Polymorphismus genotypisiert. Assoziationsanalysen ergaben signifikante Ergebnisse für die Patientengruppe der chronischen Sarkoidosepatienten im Vergleich zu denen mit nicht chronischen Verläufen und den gesunden Normalpersonen. Mit einem p-Wert von 0,001 war das Vorkommen des homozygoten Mutationstyps in der Gruppe der chronischen Patienten zehn Mal seltener zu finden als bei den Erkrankten mit nicht chronischen bzw. akuten Verläufen. Eine Assoziation zur Entstehung einer Lungenfibrose konnte nicht direkt nachgewiesen werden, jedoch war ein eindeutiger Trend festzustellen. Die Patienten mit fibrotischem Verlauf wiesen von allen untersuchten Gruppen am seltensten das Mutationsallel auf und präsentierten ebenso wie die chronischen Patienten auffallend seltener den homozygoten Mutationstyp als die Vergleichskollektive. Vor dem Hintergrund der hier erarbeiteten Daten kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der 59941 A/G (rs1891467) Polymorphismus im TGF- $\beta$ 2 Gen, als Teil eines multifaktoriellen Geschehens, bei vorhandener Mutation eine protektive Funktion haben könnte. Da die Kollektive mit den höchsten Mutationsraten eines oder beider Allele von gesunden Teilnehmern und Patienten mit

akuten Verläufen repräsentiert wurden, scheinen sie durch einen möglichen Funktionsverlust bei vorliegender Mutation einen gewissen Schutz vor chronischen Verläufen und der Ausbildung einer Lungenfibrose zu haben. Die Rolle des 59941 A/G (rs1891467) Polymorphismus sollte in Zukunft vor allem in funktionellen und groß angelegten Studien weiter untersucht werden.

Präsentation auf der Jahrestagung der European Respiratory Society 2009 (Wien): Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ )-2 and -3 gene polymorphisms in different phenotypes of sarcoidosis, S. Pabst, J. Schönau, T. Fränken, C. Grohé (Bonn, Berlin, Germany)

Präsentation auf der Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2009 (Borstel): Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) gene polymorphisms in different phenotypes of sarcoidosis, S. Pabst, T. Fränken, J. Schönau, C. Grohé (Bonn, Berlin, Germany)

## **6. Literaturverzeichnis**

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

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

Akahoshi M, Ishihara M, Remus N, Uno K, Miyake K, Hirota T, Nakashima K, Matsuda A, Kanda M, Enomoto T, Ohno S, Nakashima H, Casanova JL, Hopkin JM, Tamari M, Mao XQ, Shirakawa T. Association between IFNA genotype and the risk of sarcoidosis. *Hum Genet.* 2004; 114: 503-509

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001; 2: 675-680

Alavi A, Gupta N, Alberini JL, Hickeson M, Adam LE, Bhargava P, Zhuang H. Positron emission tomography imaging in nonmalignant thoracic disorders. *Semin Nucl Med.* 2002; 32: 293-321

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

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

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

Anscher MS, Thrasher B, Rabbani Z, Teicher B, Vujaskovic Z. Antitransforming growth factor-beta antibody 1D11 ameliorates normal tissue damage caused by high-dose radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 65: 876-881

Antoniades HN, Bravo MA, Avila RE, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M, Selman M. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 1990; 86: 1055-1064

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 gene in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153: 851-854

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-beta3. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40: 484-495

Aubart FC, Ouayoun M, Brauner M, Attali P, Kambouchner M, Valeyre D, Nunes H. Sinonasal involvement in sarcoidosis: a case-control study of 20 patients. *Medicine (Baltimore)* 2006; 85: 365-371

Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 1014-1020

Baughman R.P, Lower E.E. Therapy for Sarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis*. Wakefield UK: Eur Respir Mon 2005: 301-315

Baughman RP, Teirstein AS, Judson MA, RossmannMD, Yeager H Jr, Bresnitz EA, DePalo L, Hunninghake G, Iannuzzi MC, Johns CJ. 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

Bechtel JJ, Starr T 3rd, Dantzker DR, Bower JS. Airway hyperreactivity in patients with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis.*1981; 124: 759-761

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

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

Bitterman PB, Adelberg S, Crystal RG. Mechanisms of pulmonary fibrosis. Spontaneous release of the alveolar macrophage-derived growth factor in the interstitial lung disorders. *J Clin Invest.* 1983; 72: 1801-1813

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

Brewerton DA. HLA system and rheumatic disease. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol).* 1978; 12: 117-119

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

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

Chapelon-Abric C, de Zuttere D, Duhaut P, Veyssier P, Wechsler B, Huong DL, de Gennes C, Papo T, Blétry O, Godeau P, Piette JC. Cardiac sarcoidosis: a retrospective study of 41 cases. *Medicine (Baltimore).* 2004; 83: 315-334

Cichon S, Freudenberg J, Propping P, Nöthen M.M. Variabilität im menschlichen Genom. *Deutsches Ärzteblatt* 2002; 46: 3091-3101

Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Lympany 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, eds. *Pathology of the lung*, 2nd Edn. New York: Thieme Medical Publishers, 1995; 589-737

Costabel U, Hunninghake GW. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Statement Committee. American Thoracic Society. European Respiratory Society. World Association for Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. *Eur Respir J.* 1999; 14: 735-737

Costabel U, Guzman J, Drent M. Diagnostic approach to sarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis*. Wakefield UK: Eur Respir Mon 2005: 259-264

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

Delobbe A, Perrault H, Maitre J, Robin S, Hossein-Foucher C, Wallaert B, Aguilaniu B. Impaired exercise response in sarcoid patients with normal pulmonary function. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2002; 19: 148-153

Drake WP, Newman LS. Mycobacterial antigens may be important in sarcoidosis pathogenesis. *Curr Opin Pulm Med.* 2006; 12: 359-363

Drent M, Jacobs JA, de Vries J, Lamers RJ, Liem IH, Wouters EF. Does the cellular bronchoalveolar lavage fluid profile reflect the severity of sarcoidosis? *Eur Respir J.* 1999; 13: 1338-1344

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

Flaherty KR, Travis WD, Colby TV, Toews GB, Kazerooni EA, Gross BH, Jain A, Strawderman RL, Flint A, Lynch JP, Martinez FJ. Histopathologic variability in usual and nonspecific interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 1722-1727

Fleming H. Cardiac Sarcoidosis. In: James D, ed. *Sarcoidosis and other granulomatous Disorders*. New York: Marcel Decker, 1994; 323-334

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

Giuffrida TJ, Kerdel FA. Sarcoidosis. *Dermatol Clin*. 2002; 20: 435-447

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

Grutters JC, Fellrath JM, 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

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

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

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

Hiraga Y. Case of sarcoidosis initiated by a pulmonary lesion (retrospective study of the clinical development of sarcoidosis) *Saishin Igaku* 1969; 24: 2589-2594

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

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

Hoitsma E, Sharma OP. Neurosarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis*. Wakefield UK: Eur Respir Mon 2005: 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, Bedell GN, Zavala DC, Monick M, Brady M. Role of interleukin-2 release by lung T-cells in active pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis*. 1983; 128: 634-638

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

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

Ichikawa Y, Fujimoto K, Shiraishi T, Oizumi K. Primary cavitory sarcoidosis: high-resolution CT findings. *AJR Am J Roentgenol.* 1994; 163: 745

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

Israel HL, Lenchner GS, Atkinson GW. Sarcoidosis and aspergilloma. The role of surgery. *Chest* 1982; 82: 430-432

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

Jansen TLThA, Geusens PPMM. Sarcoidosis: joint, muscel and bone involvement. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis.* Wakefield UK: Eur Respir Mon 2005: 210-219

Judson MA, Baughman RP, Thompson BW, Teirstein AS, Terrin ML, Rossman MD, Yeager H Jr, McLennan G, Bresnitz EA, DePalo L, Hunninghake G, Iannuzzi MC, Johns CJ, Moller DR, Newman LS, Rabin DL, Rose C, Rybicki BA, Weinberger SE, Knatterud GL, Cherniak R; ACCESS Research Group. Two year prognosis of sarcoidosis: the ACCESS experience. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2003; 20: 204-211

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

Kidd D, Beynon HL. The neurological complications of systemic sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2003; 20: 85-94

Kim DS. Sarcoidosis in Korea: report of the Second Nationwide Survey. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2001; 18: 176-180

Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT Jr, Rosenfeld RG. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA.*1997; 94: 12981-12986

Kirsten D, Costabel U. Pulmonary sarcoidosis. *Pneumologie.* 2005; 59: 378-390

Krein PM, Winston BW. Roles for insulin-like growth factor I and transforming growth factorbeta in fibrotic lung disease. *Chest* 2002; 122: 289-293

Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol.*1997; 34: 391-399

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

Laohaburanakit P, Chan A. Obstructive sarcoidosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2003; 25: 115-129

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

Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16: 137-161

Lewis MM, Mortelliti MP, Yeager H Jr, Tsou E. Clinical bronchiectasis complicating pulmonary sarcoidosis: case series of seven patients. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2002; 19: 154-159

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

Lindstedt KA, Wang Y, Shiota N, Saarinen J, Hyytiäinen M, Kokkonen JO, Keski-Oja J, Kovanen PT. Activation of paracrine TGF-beta1 signaling upon stimulation and degranulation of rat serosal mast cells: a novel function for chymase. *FASEB J.* 2001; 15: 1377-1388

Löfgren S, Lundback H. The bilateral hilar lymphoma syndrome; a study of the relation to age and sex in 212 cases. *Acta Med Scand.* 1952; 142: 259-264

Lukacs NW, Hogaboam C, Chensue SW, Blease K, Kunkel SL. Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis. *Chest* 2001; 120: 5-8

Lynch JP 3rd, Kazerooni EA, Gay SE. Pulmonary sarcoidosis. *Clin Chest Med.* 1997; 18: 755-785

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

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

Mañá J. Nuclear imaging. <sup>67</sup>Gallium, <sup>201</sup>thallium, <sup>18</sup>F-labeled fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography. *Clin Chest Med.* 1997; 18: 799-811

Marshall BG, Wangoo A, Cook HT, Shaw RJ. Increased inflammatory cytokines and new collagen formation in cutaneous tuberculosis and sarcoidosis. *Thorax.*1996; 51: 1253-1261

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

Moller DR. Rare manifestations of sarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, eds. Sarcoidosis. Wakefield UK: Eur Respir Mon 2005: 233-250

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 683-765

Müller NL, Miller RR. Ground-glass attenuation, nodules, alveolitis, and sarcoid granulomas. *Radiology* 1993; 189: 31-32

Müller-Quernheim J, Pfeifer S, Kienast K, Zissel G. Spontaneous interleukin 2 release of bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis is a codeterminator of prognosis. *Lung* 1996; 174: 243-253

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

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

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, 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 polymorphism in sarcoidosis and tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002; 6: 510-515

O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29: 63-78

Oni AA, Hershberger RE, Norman DJ, Ray J, Hovaguimian H, Cobanoglu AM, Hosenpud JD. Recurrence of sarcoidosis in a cardiac allograft: control with augmented corticosteroids. *J Heart Lung Transplant.* 1992; 11: 367-369

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

Packe GE, Ayres JG, Citron KM, Stableforth DE. Large lung bullae in sarcoidosis. *Thorax* 1986; 41: 792-797

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

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

Poe RH, Israel RH, Utell MJ, Hall WJ. Probability of a positive transbronchial lung biopsy result in sarcoidosis. *Arch Intern Med.* 1979; 139: 761-763

Prasse A, Katic C, Germann M, Buchwald A, Zissel G, Müller-Quernheim J. Phenotyping sarcoidosis from a pulmonary perspective. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177: 330-336

Probst-Cousin S, Poremba C, Rickert CH, Böcker W, Gullotta F. Factor XIIIa expression in granulomatous lesions due to sarcoidosis or mycobacterial infection. *Pathol Res Pract.* 1997; 193: 741-745

Roche Diagnostics, 2010 a: Technical Features. [https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/lightcycler/index.jsp?id=ict\\_010200](https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/lightcycler/index.jsp?id=ict_010200) (09.08.2010)

Roche Diagnostics, 2010 b: [https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/lightcycler/lightcycler\\_docs/manuals/software\\_3\\_5\\_3/software\\_3\\_5\\_3.pdf](https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/lightcycler/lightcycler_docs/manuals/software_3_5_3/software_3_5_3.pdf) (09.08.2010)

Rom WN, Basset P, Fells GA, Nukiwa T, Trapnell BC, Crystal RG. Alveolar macrophages release an insulin-like growth factor I-type molecule. *J Clin Invest.* 1988; 82: 1685-1693

Roman J, Jeon YJ, Gal A, Perez RL. Distribution of extracellular matrices, matrix receptors, and transforming growth factor-beta 1 in human and experimental lung granulomatous inflammation. *Am J Med Sci.* 1995; 309: 124-133

Rømer FK. Presentation of sarcoidosis and outcome of pulmonary changes. *Clin Chest Med.* 1997; 18: 755-785

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

Rosen Y, Moon S, Huang CT, Gourin A, Lyons HA. Granulomatous pulmonary angiitis in sarcoidosis. *Arch Pathol Lab Med.* 1977; 101: 170-174

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

Ruprecht B, Schürmann M, Ziegenhagen MW, vom Bauer E, Meier D, Schlaak M, Müller-Quernheim J. [Corrected normal values for serum ACE by genotyping the deletion-/insertion-polymorphism of the ACE gene] *Pneumologie* 2001; 55: 326-332

Rybicki BA, Iannuzzi MC, Frederick MM, Thompson BW, Rossman MD, Bresnitz EA, Terrin ML, Moller DR, Barnard J, Baughman RP, DePalo L, Hunninghake G, Johns C, Judson MA, Knatterud GL, McLennan G, Newman LS, Rabin DL, Rose C, Teirstein AS, Weinberger SE, Yeager H, Cherniack R; ACCESS Research Group. Familial aggregation of sarcoidosis. A case-

control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 2085-2091

Rybicki BA, 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, Iannuzzi MC. Epidemiology, demographics and genetics of sarcoidosis. *Semin Respir Infect.* 1998; 13: 166-173

Rybicki BA, Walewski JL, Maliarik MJ, Kian H, Iannuzzi MC; ACCESS Research Group. The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and Whites. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 491-499

Salez F, Gosset P, Copin MC, Lamblin Degros C, Tonnel AB, Wallaert B. Transforming growth factor-beta1 in sarcoidosis. *Eur Respir J.* 1998; 12: 913-919

Salobir B, Medica I, Tercelj M, Kastrin A, Sabovic M, Peterlin B. Association of angiotensin-converting enzyme/DD genotype with sarcoidosis susceptibility in Slovenian patients. *Med Sci Monit.* 2007; 13: 538-542

Scadding JG. Prognosis of intrathoracic sarcoidosis in England: a review of 136 cases after 5 years' observation. *Br Med J.* 1961; 2: 1165-1172

Scharkoff T. Epidemiology of sarcoidosis. *Pneumologie* 1993; 47: 588-592

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

Selman M, King TE, Pardo A; American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med.* 2001; 134: 136-151

Semenzato G, Bortoli M, Brunetta E, Agostini C. Immunology and Pathophysiology. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis*. Wakefield UK: Eur Respir Mon 2005: 49-63.

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

Semenzato G, Chilosi M, Agostini C. Sarcoidosis: Immunology and immunohistology. In: *Sarcoidosis and other granulomatous disorders*. James DG, ed. Lung Biology in Health and Disease. Vol. 73. New York: Marcel Dekker, 1994; 153-179.

Semenzato G, Pezzutto A, Agostini C, Gasparotto G, Cipriani A. Immunoregulation in sarcoidosis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1981; 19: 416-427

- 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
- Shammas RL, Movahed A. Sarcoidosis of the heart. *Clin Cardiol.* 1993; 16: 462-472
- Sharma O.P. Definition and History of Sarcoidosis. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis.* Wakefield UK: Eur Respir Monograph 2005 a; 1-12
- Sharma OP. Renal sarcoidosis and hypercalcaemia. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis.* Wakefield UK: Eur Respir Monograph 2005 b; 220-232
- Sharma OP, Johnson R. Airway obstruction in sarcoidosis. A study of 123 nonsmoking black American patients with sarcoidosis. *Chest* 1988; 94: 343-346
- Sharma OP, Maheshwari A, Thaker K. Myocardial sarcoidosis. *Chest* 1993; 103: 253-258
- Sharma OP. Diagnosis of cardiac sarcoidosis: an imperfect science, a hesitant art. *Chest* 2003; 123: 18-19
- Sharma P, Smith I, Maguire G, Stewart S, Shneerson J, Brown MJ. Clinical value of ACE genotyping in diagnosis of sarcoidosis. *Lancet* 1997; 349: 1602-1603
- Shigehara K, Shijubo N, Hirasawa M, Abe S, Uede T. Immunolocalization of extracellular matrix proteins and integrins in sarcoid lymph nodes. *Virchows Arch.* 1998; 433: 55-61
- Simpson CB, White S, McGuff HS. Anti-transforming growth factor beta as a treatment for laryngotracheal stenosis in a canine model. *Laryngoscope.* 2008; 118: 546-551
- Smith G, Brownell I, Sanchez M, Prystowsky S. Advances in the genetics of sarcoidosis. *Clin Genet.* 2008; 73: 401-412.
- Staples CA, Müller NL, Vedal S, Abboud R, Ostrow D, Miller RR. Usual interstitial pneumonia: correlation of CT with clinical, functional, and radiologic findings. *Radiology* 1987; 162: 377-381
- Stern BJ, Krumholz A, Johns C, Scott P, Nissim J. Sarcoidosis and its neurological manifestations. *Arch Neurol.* 1985; 42: 909-917
- Suganuma H, Sato A, Tamura R, Chida K. Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions. *Thorax* 1995; 50: 984-989
- Susol E, Rands AL, Herrick A, McHugh N, Barrett JH, Ollier WE, Worthington J. Association of markers for TGFbeta3, TGFbeta2 and TIMP1 with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 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
- Tomita H, Ina Y, Sugiura Y, Sato S, Kawaguchi H, Morishita M, Yamamoto M, Ueda R. Polymorphism in the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156: 255-259
- Tuder RM. A pathologist's approach to interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med.* 1996; 2: 357-363
- Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem.* 1990; 265: 22348-22357
- 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.
- Walker S, Mikhail G, Banner N, Partridge J, Khaghani A, Burke M, Yacoub M. Medium term results of lung transplantation for end stage pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 1998; 53: 281-284
- Ward PA, Hunninghake GW. Lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 123-129
- Welker L, Jörres RA, Costabel U, Magnussen H. Predictive value of BAL cell differentials in the diagnosis of interstitial lung diseases. *Eur Respir J.* 2004; 24: 1000-1006
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997 a; 22: 130-131, 134-138
- Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997 b; 22: 176-181
- Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet.* 1992; 1: 353
- Xaubet A, Marin-Arguedas A, Lario S, Ancochea J, Morell F, Ruiz-Manzano J, Rodriguez-Becerra E, Rodriguez-Arias JM, Inigo P, Sanz S, Campistol JM, Mullol J, Picado C. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with disease regression 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

Zheng L, Teschler H, Guzman J, Hübner 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

Zhuang H, Alavi A. 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomographic imaging in the detection and monitoring of infection and inflammation. *Semin Nucl Med.* 2002; 32: 47-59

Ziegenhagen MW, Rothe ME, Zissel G, Müller-Quernheim J. Exaggerated TNFalpha release of alveolar macrophages in corticosteroid resistant sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2002; 19: 185-190

Zwischenberger JB, Savage C, Alpard SK, Anderson CM, Marroquin S, Goodacre BW. Mediastinal transthoracic needle and core lymph node biopsy: should it replace mediastinoscopy? *Chest* 2002; 121: 1165-1170

## **7. Danksagung**

Abschließend möchte ich den Menschen meinen Dank aussprechen, die die Entstehung dieser Arbeit unterstützt und ermöglicht haben. An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Professor C. Grohé für sein Engagement, seine Anmerkungen und die Überlassung des Dissertationsthemas.

Den Professoren H. Vetter und G. Nickenig danke ich als Klinikdirektoren für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und die Genehmigung der Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Pabst, der mir während der gesamten Zeit unserer Zusammenarbeit stets als Ansprechpartner bei Fragen und Problemen zur Verfügung stand. Vielen Dank für die Motivation, die Denkanstöße und das Korrekturlesen der gesamten Arbeit.

Frau Martina Lennarz und Frau Imke Beyer möchte ich ebenfalls im Besonderen danken. Durch ihre Präsenz und engagierte Anleitung im Labor haben sie es überhaupt erst möglich gemacht den experimentellen Teil dieser Arbeit durchzuführen.

Auch den gesamten Mitarbeitern der Poliklinik und den anderen Doktoranden möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Nicht zu vergessen sind alle freiwilligen Probanden, die Sarkoidosepatienten der Klinik aber auch alle Mitglieder der Sarkoidoseselbsthilfegruppen, die sich freundlicherweise bereit erklärt haben an unserer Studie teilzunehmen. Ohne ihre Bereitwilligkeit wäre diese Arbeit niemals entstanden. Zum Schluss bedanke ich mich aus tiefstem Herzen bei meiner Familie, die mich immer wieder motiviert und gestärkt und mich ausnahmslos unterstützt hat.