

Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Büttner

Immunglobulin G Subklassen-Bestimmung mittels Immunhistochemie bei
pulmonaler Sarkoidose und Tuberkulose und ihre Bedeutung als Biomarker zur
diagnostischen Unterscheidung der Erkrankungen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Annie Linnea Hagmanns, geb. Müller
aus Gräfelfing

promoviert am 22. November 2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2021

Dekanin/Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. S. C. Schäfer
2. Gutachterin: Professorin Dr. med. C. Lehmann

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Paraffinblöcke wurden mir vom pathologischen Institut zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Fälle bzw. Böcke wurden dabei von mir persönlich mit Hilfe des Programms PathoPro ausgewählt und anschließend - nach kurzer Einweisung - von mir selbstständig im Archiv herausgesucht.

Die Idee zu dieser Arbeit stammt von mir selbst.

Die in dieser Arbeit angegebenen immunhistochemischen Untersuchungen wurden ohne meine Mithilfe im Labor unter Leitung von Frau Zenz durchgeführt.

Die der Arbeit zugrunde liegenden Ergebnisse im Sinne der lichtmikroskopischen Auswertung wurden von mir persönlich nach initialer Einarbeitung von PD Dr. Schäfer im Institut der Pathologie ermittelt.

Die in der Vorabveröffentlichung genannten Versuche wurden nicht von mir durchgeführt. Die histopathologische Auswertung der Schnitte sowie die Verfassung des entsprechenden Textes in der Publikation erfolgte – unter Kontrolle von PD Dr. Schäfer – durch mich.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 14.12.2021

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. Schäfer für die enorme Unterstützung bei der Planung und Umsetzung der Arbeit sowie für die schnelle Hilfestellung bei aufkommenden Fragen und Problemen.

Weiterer Dank gilt Frau Zenz für die Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Rybniker für die Gelegenheit zur Mitarbeit und zur Berücksichtigung bei der Publikation.

Von Herzen möchte ich meinem Mann für seine Geduld und seine uneingeschränkte Unterstützung danken.

Für Ratschläge bei der statistischen Auswertung möchte ich meinem Bruder danken.

Ein besonderer Dank gilt außerdem meiner Mutter für die mehrfache Durchsicht dieser Arbeit, ihre kritischen Anmerkungen und ihren unermüdlichen Zuspruch.

Für Frederik

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. ZUSAMMENFASSUNG	10
2. EINLEITUNG	11
2.1 Aktuelle Problematik in der Diagnosestellung	11
2.2 Sarkoidose	11
2.2.1. Epidemiologie	11
2.2.2. Pathogenese	12
2.2.3. Klinik	12
2.2.4. Histopathologie der Lungensarkoidose	13
2.2.5. Diagnostik	14
2.3 Tuberkulose	15
2.3.1. Epidemiologie	15
2.3.2. Pathogenese	15
2.3.3. Klinik	16
2.3.4. Histopathologie Lungentuberkulose	17
2.3.5. Diagnostik	18
2.4 Schwächen in der diagnostischen Unterscheidung von Sarkoidose und Tuberkulose	18
2.5 IgG-Subklassen als Biomarker	21
2.5.1. Aufbau und Funktion der Subklassen	21
2.5.2. Anwendung als Biomarker in der Diagnostik	21
2.6 Anwendung eines P38-MAPK-Inhibitors bei Tuberkulose	22
2.7 Ziele der Arbeit	22
3. MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 Studiendesign	24
3.1.1. Auswahl der Studienteilnehmer	24

3.1.2.	Studienobjekte	25
3.2	Grundlagen der Immunhistochemie	26
3.3	Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen	27
3.4	Lichtmikroskopische Auswertung	30
3.5	Statistik	31
3.6	Histopathologische Auswertung der Mäuselungen	32
4.	ERGEBNISSE	33
4.1	Charakteristika	33
4.2	Ergebnisse getrennt nach Erkrankung	34
4.2.1.	Subklassen-Verteilung bei Sarkoidose	34
4.2.2.	Subklassen-Verteilung bei Tuberkulose	35
4.3	Vergleich beider Erkrankungen	36
4.4	Korrelationen der Subklassen untereinander	38
4.5	Analyse der Mäuselungen	39
5.	DISKUSSION	41
5.1	Immunglobulin G-Subklassenbestimmung bei Sarkoidose	41
5.2	Immunglobulin G- Subklassenbestimmung bei Tuberkulose	44
5.3	Einfluss der P38-MAPK auf die Immunglobulinbildung	47
5.4	Vergleich beider Erkrankungen und Bedeutung für Diagnostik	47
5.5	Kritik an Methode	49
6.	LITERATURVERZEICHNIS	51
7.	ANHANG	61
7.1	Abbildungsverzeichnis	61
7.2	Tabellenverzeichnis	61

7.3	Rohdaten	61
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNG	63

Abkürzungsverzeichnis

ACE.....	Angiotensin Converting Enzyme
Aqua dem.	Demineralisiertes Wasser (Aqua)
BAL.....	Bronchoalveoläre Lavage
BCG.....	Bacillus-Calmette-Guérin
CD4.....	cluster of differentiation 4
CFP-10.....	10-kDa culture filtrate protein
CXCL9.....	C-X-C motif chemokine 9
DAB.....	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
EBUS-TBNA	endobronchiale Ultraschall gesteuerte transbronchiale Nadelaspiration
ESAT-6.....	6kDa early secretory antigenic target
HE.....	Hämatoxylin/Eosin
HPF.....	High Power Field
IFN γ	Interferon gamma
IgG.....	Immunglobulin G
IGRA	Interferon-Gamma-Release-Assay
kDa.....	Kilodalton
IL.....	Interleukin
LAM.....	Lipoarabinomannan
LTBI.....	Latente Tuberkuloseinfektion
LUN.....	Abkürzung „Lunge“ bei Patho Pro
MAP-Kinase.....	Mitogen activated protein-Kinase
NAT.....	Nukleinsäureamplifikationstechnik
NGS.....	nekrotisierendes Sarkoid-Granulom
Tbc.....	Tuberkulose
Th1-Zelle.....	T-Helfer-1-Zelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
PAB.....	Propionibacterium acnes
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion
PPD.....	purified protein derivative

1. Zusammenfassung

Tuberkulose und Sarkoidose haben als granulomatöse Erkrankungen nicht nur in ihrer Histopathologie, sondern auch in der klinischen und radiologischen Präsentation Überschneidungen, die – besonders bei atypischen Manifestationen – eine korrekte Diagnosestellung erschweren können. Schwächen der bisher verwendeten diagnostischen Verfahren in Hinblick auf Sensitivität und Spezifität tragen zu dieser Problematik bei.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob mittels immunhistochemischer Färbung an Lungenbiopsien die Erstellung eines Immunglobulin G-Subklassenprofils bei Patienten mit pulmonaler Sarkoidose und Tuberkulose möglich ist, und inwiefern diese Bestimmung eine Differenzierung zwischen den Erkrankungen erlaubt. Eine Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch lichtmikroskopische Auszählung der angefärbten Plasmazellen. Es zeigte sich, dass bei getrennter Betrachtung der Subklassenverteilung, sowohl bei Tuberkulose als auch bei Sarkoidose, zwischen den einzelnen Klassen signifikante Differenzen mit hoher Effektstärke bestehen.

Unter Berücksichtigung anderer Forschungsergebnisse fielen zudem bei Sarkoidose erniedrigte IgG4-Werte auf, welche durch ein lokal erhöhtes IFN γ /IL4 Verhältnis erklärt werden könnten. Bei Tuberkulose ist hingegen von einer erhöhten IgG1- und IgG3-Subklassen-Produktion auszugehen, welche durch die subklassenspezifischen Effektorfunktionen ihrer Fc-Regionen bei der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene von besonderer Bedeutung sind. Werden die Subklassenprofile der beiden Entitäten direkt verglichen, so bestehen aussagekräftige Differenzen: Bei Tuberkulose ließen sich für jede Subklasse signifikant mehr Immunglobulin-produzierende Plasmazellen nachweisen als bei Sarkoidose. Möglicherweise wird dies durch den höheren und andauernden Stimulus durch mykobakterielle Antigene innerhalb des Granuloms verursacht, während bei Sarkoidose eine unspezifische Stimulation besteht.

Im Rahmen weiterer Studien sind Untersuchungen unter Berücksichtigung der Erkrankungsdauer und Vortherapie der Patienten notwendig sowie höhere Fallzahlen wünschenswert. Dennoch bietet diese Arbeit einen wichtigen Anhaltspunkt dafür, dass die Bestimmung des IgG-Subklassenprofils als Biomarker die bisherigen Methoden in der Differenzierung der Erkrankungen unterstützen kann. Ebenfalls festzuhalten ist, dass das Verfahren der immunhistochemischen IgG-Subklassenfärbung an Lungenbiopsien für diagnostische- und prognostische Zwecke geeignet ist und ihr Nutzen zukünftig auch bei anderen Lungenerkrankungen erforscht werden könnte.

2. Einleitung

2.1 Aktuelle Problematik der Diagnosestellung

Sarkoidose und Tuberkulose haben aufgrund der Lunge als ihrem Hauptmanifestationsort nicht nur Ähnlichkeiten in Klinik und radiologischem Bild, sondern als granulomatöse Erkrankungen auch Überschneidungen in der Histopathologie. Vor allem in Ländern mit einer hohen Tuberkuloseprävalenz und einer bedeutenden Zahl an atypischen Tuberkulosemanifestationen kann es durch Schwachstellen der bisher verwendeten diagnostischen Verfahren Schwierigkeiten geben, eine Differenzierung zwischen beiden Erkrankungen zu ermöglichen und damit eine eindeutige Diagnose zu stellen. Angesichts der unterschiedlichen Therapieregime ist dies jedoch von enormer Bedeutung: Ein mit Tuberkulose fehldiagnostizierter Sarkoidose-Patient riskiert die medikamentösen Nebenwirkungen einer - gemäß Leitlinie - mindestens 6-monatigen Antibiotikatherapie mit Tuberkulostatika. Zugleich wird eine adäquate immunsuppressive Behandlung verzögert sowie das Fortschreiten potenziell irreversibler Lungenschäden ermöglicht ^{1,2}.

Ebenso kann sich eine Behandlung eines Tuberkulose-Infizierten mit Immunsuppressiva als fatal erweisen: Die in der Sarkoidosetherapie eingesetzten Glucocorticoide und Anti-TNF- α -Inhibitoren gehen mit einem deutlich erhöhten Risiko einher, bei Personen mit latenter Infektion eine aktive Tuberkuloseerkrankung zu verursachen ³⁻⁵. Zudem gibt es Fallberichte von disseminierten Erkrankungen nach oben genannten Therapien, sodass vor Einnahmebeginn dieser Medikamente ein Tuberkulose-Screening durchgeführt werden soll ^{6,7}.

In der Forschung wird daher nach Biomarkern gesucht, welche die aktuelle Diagnostik ergänzen und ihre Lücken schließen können.

2.2 Sarkoidose

2.2.1. Epidemiologie

Sarkoidose ist eine Multiorganerkrankung, die vorwiegend Erwachsene im Alter von 20-50 Jahren betrifft und bezüglich der Prävalenz starke geographische, ethnische und Umwelt-abhängige Unterschiede aufweist. Frauen sind über alle Ethnien hinweg häufiger betroffen als Männer.

Prävalenz und Inzidenz zeigen ein deutliches Nord- Südgefälle: So wurden in der nördlichen Hemisphäre 96% aller Sarkoidose-Erkrankungen gemeldet. Die höchsten Raten

verzeichnen Amerika, Indien und Nordeuropa, wobei die Dunkelziffer nicht gemeldeter Fälle besonders auf der Südhalbkugel schwer einschätzbar ist. Auch innerhalb Europas weist der Norden bis zu 15-fach höhere Inzidenzraten im Vergleich zum Mittelmeerraum auf⁸. In Deutschland beträgt die Prävalenz 46/100 000 Einwohner⁹.

Bei einer Betrachtung der ethnischen Herkunft gibt es starke Unterschiede bezüglich Häufigkeit, Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter, Klinik und Outcome der Erkrankten¹⁰. Vorwiegend betroffen sind Kaukasier, gefolgt von Afro-Amerikanern und Asiaten⁸.

2.2.2. Pathogenese

Die Ursachen für eine Erkrankung an Sarkoidose sind noch unklar. Studien weisen darauf hin, dass Umweltfaktoren wie infektiöse Erreger und anorganische und organische Partikel bei genetisch, epigenetisch oder immunologisch Prädisponierten eine Th1 (Typ1-T-Helfer)-Zellen gewichtete immunologische Überreaktivität gegen Gewebsantigene mit Granulombildung initiieren¹¹. Die vielfältigen Auslöser sowie die genetische Komponente könnten die große epidemiologische Heterogenität in Häufigkeit und Klinik erklären.

Einige Studien konnten mit hoher Sensitivität und Spezifität *Propionibacterium acnes* im betroffenen Gewebe Sarkoidose-Erkrankter kultivieren sowie immunhistochemisch mit *P. acnes*-spezifischen Antikörpern (PAB Antikörper) kleine runde Körperchen innerhalb der Granulome anfärben¹². Die Ergebnisse indizieren, dass dieses Bakterium zumindest ein Auslöser bei Patienten sein könnte. Andere Untersuchungen, bei denen mykobakterielle Bestandteile in Sarkoidose-Granulomen nachgewiesen wurden, legen Fälle von Mykobakterien-assoziiertes Sarkoidose nahe¹³.

2.2.3. Klinik

Bei 95% der Patienten ist die Lunge involviert - als systemische Erkrankung kann jedoch grundsätzlich jedes Organ betroffen sein. Häufige Manifestationsorte sind neben der Lunge vor allem Haut, Lymphknoten, Auge und Leber, sodass meist eine multidisziplinäre Betreuung der Erkrankten erforderlich ist¹⁴. Bei einer Lungenbeteiligung sind ein persistierender Husten sowie Luftnot typische Symptome. Auch Müdigkeit, Fieber, geringere Leistungsfähigkeit und Arthralgien können den Alltag der Betroffenen einschränken¹⁵. Es gibt jedoch viele asymptomatische Patienten, bei denen die Diagnose zufällig im Rahmen der radiologischen Abklärung einer anderen Erkrankung gestellt wird. Bei 25-65% aller Erkrankten lässt sich im Röntgenthorax die für Sarkoidose

typische bilaterale Lymphadenopathie nachweisen. Pathologische Befunde im Röntgenbild sind bei 90% der Patienten zu finden ¹⁶.

In 60% der Fälle kommt es innerhalb der ersten 2-5 Jahre zu einer klinischen Remission, bei den restlichen persistiert die Erkrankung ¹⁷. Insgesamt entwickeln 20% aller Patienten eine fortschreitende Lungenfibrose ¹⁸. Ausnahmen bilden das Löfgren-Syndrom mit der klinischen Symptomkonstellation Erythema nodosum, Polyarthrit und bilaterale Lymphadenopathie sowie das Heerfordt Syndrom mit der Trias aus Parotitis, Uveitis und Fazialisparese. Als Akutformen sind diese meist selbstlimitierend und heilen folgenlos aus ^{19,20}.

2.2.4. Histopathologie der Lungensarkoidose

Sarkoidosegranulome werden als dicht gepackte, gut ausgebildete, nicht nekrotisierende Granulome beschrieben. Sie bestehen im Zentrum aus Epitheloidzellen und CD4+ (cluster of differentiation 4) T-Lymphozyten, sowie aus reifen Makrophagen und multinukleären Langhans-Riesenzellen. Ringförmig entlang des Granuloms ordnen sich in der Peripherie B-Lymphozyten/Plasmazellen und CD8+ T-Zellen sowie ein Saum mit lamellärer Fibrose an ²¹. Weitere assoziierte Befunde sind zytoplasmatische Einschlüsse in den Riesenzellen wie Asteroid-, Schaumann- und Calciumoxalatkörper (siehe Abb. 1) ²².

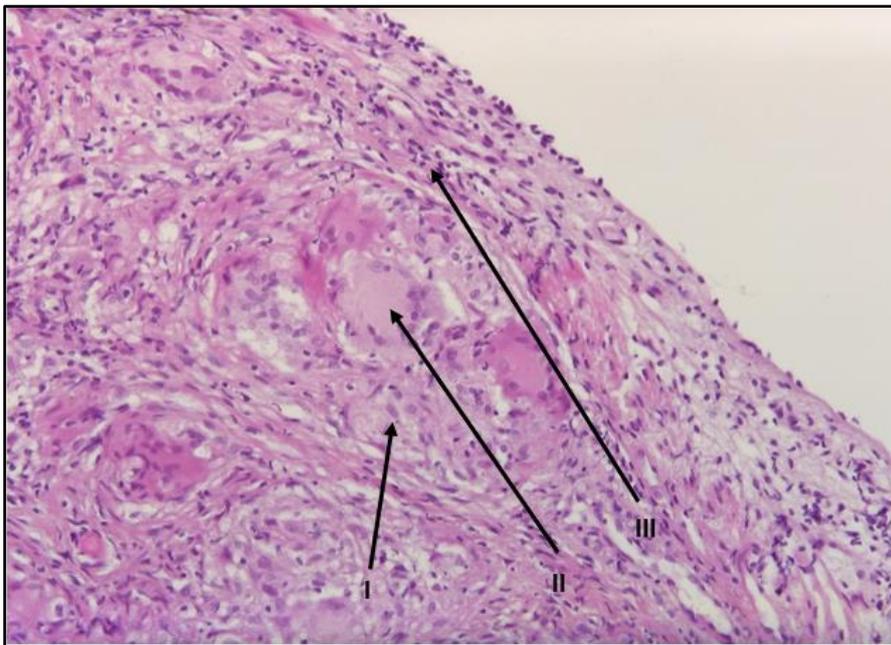


Abbildung 1: Aufbau eines Sarkoidosegranuloms, bestehend aus Epitheloidzellen (I), multinukleären Riesenzellen (II) sowie einem Begleitinfiltrat aus Makrophagen und Lymphozyten (III). HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung.

Die granulomatöse Ausbreitung in der Lunge folgt dem perivaskulären Lymphsystem entlang Pleura, interlobulären Septen und bronchovaskulärer Strukturen²². Häufig werden sie auch in der Außenwand der großen Atemwege gefunden, weshalb sich zur Probengewinnung transbronchiale Biopsien eignen²¹.

2.2.5. Diagnostik

Nachdem es keinen spezifischen diagnostischen Test zum Nachweis von Sarkoidose gibt, basiert die Diagnosestellung auf der Trias Symptomatik, Radiologie und Histopathologie. Bei einer für Sarkoidose typischen Symptomkonstellation verbunden mit der Beteiligung von mehr als zwei Organsystemen, einer Biopsie aus einem betroffenen Organ, welche nicht-nekrotisierende Granulome zeigt, und dem Fehlen eines Anhaltspunktes für eine andere Ursache, kann die Erkrankung als sehr wahrscheinlich eingeschätzt werden⁸. Dennoch bleibt Sarkoidose eine Ausschlussdiagnose: Mit Hilfe der Diagnostik wird lediglich eine Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit welcher die Diagnose zutrifft und Differenzialdiagnosen unwahrscheinlich werden. Deshalb sollte die Einschätzung als potenziell fehlbar eingeschätzt und besonders dann hinterfragt werden, wenn die Klinik des Erkrankten unspezifisch ist, eine pathologische Probengewinnung nicht möglich ist oder Hinweise für andere Ursachen der Beschwerden existieren.

Besonders atypische Formen der Granulome im histologischen Befund, beispielsweise solche mit fokaler Nekrose, stellen ein diagnostisches Problem dar²³. Ausnahmen in der Diagnostik bilden das Löfgren- und das Heerfordt-Syndrom, welche aufgrund ihrer charakteristischen Symptomatik keinen histopathologischen Nachweis benötigen²⁴.

Um die Verdachtsdiagnose zu stützen, können zusätzlich Biomarker bestimmt werden: Ein im klinischen Alltag verwendeter Marker ist der Spiegel des Serum-ACE (Angiotensin Converting Enzyme), welches von Epitheloidzellen gebildet wird und die Gesamt-Granulomlast des Körpers anzeigt²⁴. Dieser ist bei 3/4 aller unbehandelten Sarkoidose-Patienten erhöht²⁵. Er ist jedoch mit einer Sensitivität von 57%, Spezifität von 90% sowie positiv und negativem prädiktivem Wert von 90% bzw. 60% zur Bestätigung der Diagnose oder zum Screening nicht geeignet²⁶. Unter anderem liegt dieser geringen Aussagekraft des Wertes das Vorkommen von Polymorphismen im Enzym mit entsprechend unterschiedlicher Enzymaktivität zugrunde²⁷. Auch können andere Erkrankungen wie Tuberkulose oder Hyperthyreose Ursache für erhöhte ACE-Spiegel sein²⁴.

Ein anderer, im klinischen Alltag verwendeter Marker ist der lösliche Interleukin-2 Rezeptor, welcher von CD4+ Typ1-T-Helferzellen ausgeschüttet wird. Dieser kann zur Prognosebestimmung verwendet werden, eignet sich aber aufgrund seiner geringen Spezifität nicht zur Diagnosestellung ^{28,29}.

Daneben existieren weitere Marker wie der Chitotriosidase-Spiegel, Chemokine wie CXCL9 (C-X-C motif chemokine 9) und CXCL10 oder Serum-Amyloid, die vor allem innerhalb von Studien als Aktivitäts- und Progressionsmarker herangezogen wurden. Ihre Verwendung im klinischen Alltag ist limitiert ³⁰⁻³².

2.3 Tuberkulose

2.3.1. Epidemiologie

Weltweit ist Tuberkulose die häufigste letale Infektionskrankheit und zugleich unter den 10 führenden Todesursachen. Bei ca. 7 Millionen Menschen wurde im Jahr 2019 die Erstdiagnose gestellt. 1,2 Millionen HIV-negative und 0,2 Millionen HIV-positive Tuberkulose-Patienten starben im gleichen Jahr daran. 2/3 aller Neuinfektionen fanden in 8 Ländern statt, darunter Indien, Indonesien, China und die Philippinen. Insgesamt wird mit einer Rate latenter Infektionen von etwa einem Viertel der Weltbevölkerung gerechnet ³³.

In Deutschland betrug die Tuberkulose-Inzidenz im Jahr 2019 5,8 pro 100 000 Einwohner mit den höchsten Raten bei den 20-24-jährigen Männern. Ein - mittlerweile gebremster - Anstieg der Zahlen gemeldeter Erkrankungen kann auf die Flüchtlingswelle von 2015 zurückgeführt werden. So konnte eine ca. 15 mal höhere Inzidenzrate unter Personen ausländischer Staatsangehörigkeit im Vergleich zu deutschen Staatsbürgern nachgewiesen werden. Davon gaben die Erkrankten am häufigsten Eritrea (6,9%) als Geburtsland an, gefolgt von Somalia (6,8%) und Rumänien (6,1%) ³⁴.

2.3.2. Pathogenese

Bei dem Haupterreger der Tuberkulose handelt es sich um das Bakterium *Mycobacterium tuberculosis*, ein aerobes, unbewegliches, langsam wachsendes und aufgrund seines Färbeverhaltens als säurefest beschriebenes Stäbchen. Neben anderen Spezies wird es zum *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex gerechnet ³⁵.

Eine Ansteckung finde nahezu immer über aerogene Tröpfcheninfektion durch einen an aktiver Tuberkulose-Infizierten statt. Gelangen einzelne Bakterien in die Alveolen, werden diese von Makrophagen phagozytiert, verhindern jedoch dessen Phagosomen-

Reifung sowie die Fusion mit Lysosomen. Die Mykobakterien können einem Abtöten entgehen und vermehren sich intrazellulär weiter ³⁶⁻³⁸. Durch Ausschütten proinflammatorischer Zyto- und Chemokine wie TNF- α von infizierten Alveolarmakrophagen und Pneumozyten kommt es zur Einwanderung von Monozyten und Neutrophilen in die Alveolen sowie zur Bildung von Granulomen ³⁹. Infizierte dendritische Zellen induzieren in lokalen Lymphknoten eine Th1-Zell- dominierte Immunantwort. Die gedrückten B- und T-Lymphozyten lagern sich um das Granulom (siehe Abb. 2) ^{40,41}.

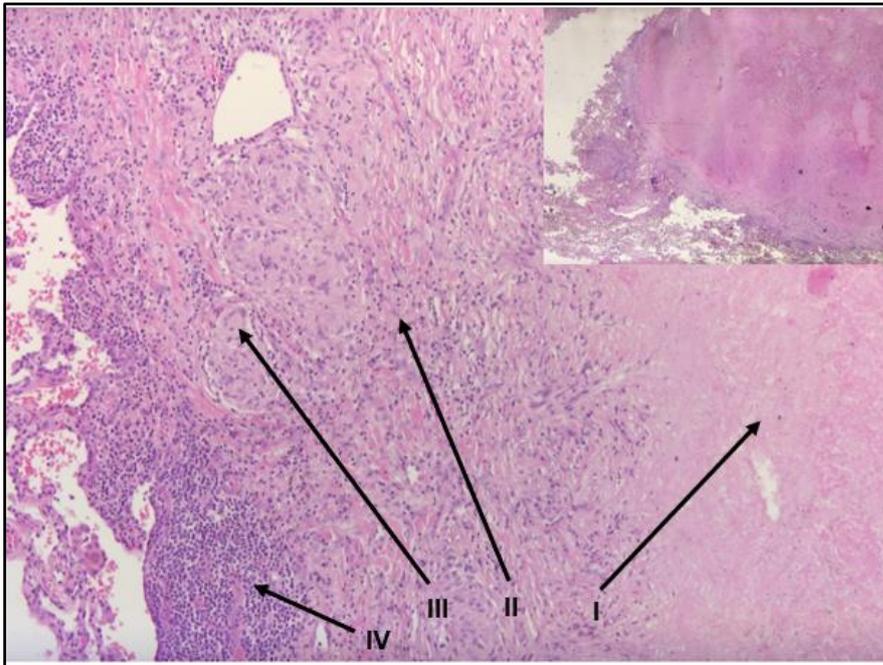


Abbildung 2: Aufbau des klassischen Tuberkulosegranuloms, bestehend aus einem zentralen Nekroseherd mit zu Grunde gehenden Makrophagen und Erregern (I) sowie umgebende Epitheloidzellen (II), Langhans-Riesenzellen (III) und weiteren Zellen der Immunantwort wie Lymphozyten und Plasmazellen (IV). HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung. Oben rechts: Übersichtsaufnahme des Granuloms, HE-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung.

2.3.3. Klinik

In den meisten Fällen kann nach einer Infektion die weitere Vermehrung des Bakteriums ausgehend vom Primärkomplex durch eine Zell-vermittelte Immunantwort verhindert werden, wobei eine vollständige Elimination oft nicht möglich ist. So kann das *Mycobacterium tuberculosis* asymptomatisch im Rahmen einer latenten Tuberkuloseinfektion über Jahrzehnte persistieren und bei Schwächung der zellulären Immunabwehr reaktiviert werden ⁴². Nur etwa 5-10% aller Infizierten entwickeln im Laufe ihres Lebens eine aktive - sogenannte postprimäre - Tuberkulose, wobei Patienten mit HIV, Unter-

ernährung, Diabetes oder anderen immunsupprimierenden Erkrankungen und Therapien ein deutlich höheres Risiko aufweisen ⁴³. Schreitet die Erkrankung bereits initial nach Infektion fort, wird diese als primär-progressive Tuberkulose bezeichnet ⁴⁴.

Mit einer Häufigkeit von 80% manifestiert sich die Erkrankung besonders an der Lunge, kann aber grundsätzlich über hämatogene Ausbreitung jedes Organ betreffen und dementsprechend organspezifische Symptome hervorrufen ³⁵. Als Zeichen einer Lungenbeteiligung sind ein persistierender Husten, Hämoptysen oder Thoraxschmerzen anzusehen ⁴⁵.

Allgemeinsymptome können aus Fieber mit einem typischem Anstieg der Temperatur am Nachmittag sowie nächtlichem Schwitzen bei gleichzeitigem Abfall der Körpertemperatur bestehen, wie auch aus Gewichtsverlust, Müdigkeit und/oder körperlichem Leistungsabfall ⁴⁶.

2.3.4. Histopathologie der Lungentuberkulose

Das klassische Tuberkulosegranulom besteht aus einem Kern verkäsender Nekrose und infizierten Makrophagen, um die sich ein Ring an Alveolarmakrophagen und den aus diesen differenzierten Epitheloidzellen, Riesenzellen und Schaumzellen sowie neutrophile Granulozyten legen. Im Verlauf bildet sich eine fibröse Kapsel, an der sich CD4+- und CD8+ Lymphozyten sammeln ⁴⁷. In Abhängigkeit von Einflussfaktoren der direkten Umgebung, wie etwa Bakterienlast und lokal modulierter Entzündungsreaktion, oder Alter einer Läsion, existiert jedoch intraindividuell ein großes Spektrum, was den Aufbau der Granulome betrifft: Zum Teil besitzen sie keine zentrale Nekrose, können aus reinen Makrophagen- oder Fibroblastenansammlungen gebildet werden, oder kalzifizieren im Verlauf ⁴⁸. Als Funktionseinheit bildet das Granulom einen Interaktionsort zwischen Bakterium und Immunsystem, an dem zum einen das Mycobacterium persistieren kann, zum anderen eine weitere Ausbreitung verhindert werden soll ⁴¹.

Bei der primären Tuberkulose manifestiert sich die Erkrankung pulmonal vor allem im Mittel- und Unterlappen, während sich die postprimäre Tuberkulose eher in den apikalen Bereichen mit Konsolidierungen, Kavernen und Pleuraverdickungen präsentiert, die im Rahmen der granulomatösen Entzündungsreaktion entstanden sind ⁴⁹.

2.3.5. Diagnostik

Für die Diagnostik muss zwischen einer aktiven Tuberkulose und einer latenten Infektion (LTBI - latente Tuberkulose Infektion) unterschieden werden, da jeweils unterschiedliche Verfahren angewendet werden: Gemäß Empfehlung des Robert Koch Institutes ist der Interferon-Gamma-Release-Assay (IGRA) als primäre Testmethode zur Detektion einer latenten Infektion anzusehen. Er löste sukzessive ab 2005 den Tuberkulin-Hauttest aufgrund dessen geringeren Spezifität in Deutschland ab ³⁵.

Bei dem IGRA handelt sich um einen indirekten Nachweis einer Tuberkulose-Infektion. Im Rahmen der zugelassenen Bluttests Quantiferon-Tb Gold In-Tube® (Cellestis) und T SPOT.TB® (Oxford Immunotec) wird die Interferon-Gamma-Produktion sensibilisierter T-Lymphozyten nach einer Stimulation mit den *M. tuberculosis*-spezifischen Antigenen ESAT-6 und CFP-10 gemessen ⁵⁰.

Desweiteren ist eine Röntgenthoraxaufnahme zum Screening, zur Diagnostik und Verlaufskontrolle Standard und kann bei spezifischen Fragestellungen radiologisch um ein CT oder MRT erweitert werden ⁴⁵.

Zur Erkennung einer aktiven Tuberkulose und Bestimmung der Infektiosität werden mikroskopische und kulturelle Nachweise, sowie Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) an Proben wie Sputum, Sekreten und Biopsien durchgeführt. Der mikroskopische Nachweis erfolgt entweder mittels lichtmikroskopischer Untersuchung auf säurefeste Stäbchen nach Ziehl-Neelsen-Färbung oder mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Auramin-Färbung ⁵¹. Die kulturelle Anzucht des Mykobakteriums stellt jedoch nach wie vor den diagnostischen Goldstandard bei Verdacht auf Tuberkulose dar: Ein positiver Nachweis sichert die Verdachtsdiagnose und macht im nächsten Schritt eine genaue Bestimmung der Mykobakterienspezies erforderlich. Ein negatives Ergebnis kann aufgrund des langsamen Wachstums der Bakterien allerdings erst nach 8-12 Wochen festgestellt werden ⁵².

2.4 Schwächen in der diagnostischen Unterscheidung von Sarkoidose und Tuberkulose

Weltweit wurden im Jahr 2018 nur 55% aller verzeichneten Fälle mit neu diagnostizierter pulmonaler Tuberkulose oder Rezidiv mikrobiologisch bzw. bakteriologisch bestätigt, in Europa lag der Wert bei 66%. Klinik, Radiologie und Histopathologie besitzen jedoch in der Diagnostik eine geringe Spezifität und bergen daher das Risiko einer Fehldiagnose ⁴³.

Die Symptomatik beider Erkrankungen ist unspezifisch und besitzt bei pulmonaler Beteiligung deutliche Überschneidungspunkte: Husten, Dyspnoe, Abgeschlagenheit und Thoraxschmerzen. Auch Symptome, welche klassischerweise eher einer Erkrankung zugerechnet werden, wie z.B. Hämoptysen der Tuberkulose, können bei der anderen vorkommen: In diesem Fall bei bis zu 6% der Sarkoidose-Erkrankten ⁵³.

Zusätzlich zu der Klinik ist die Abwesenheit nekrotisierender Granulome bei Sarkoidose bzw. ein Nachweis von Verkäsung bei Tuberkulose ein wichtiger Anhaltspunkt in der histopathologischen Befundung und damit der Diagnosestellung. Jedoch lassen sich bei Patienten mit Sarkoidose in bis zu 20% der transbronchialen Biopsien nekrotisierende Anteile nachweisen ²³. Ausgedehntere Nekrosen, als Entität des nekrotisierendes Sarkoid-Granulom (NGS) bezeichnet, werden in bis zu 4% der Fälle mit pulmonaler Sarkoidose beschrieben ^{54,55}. Andererseits können sich bei Tuberkulose nicht- nekrotisierende Granulome in der Histologie präsentieren ⁵⁶.

In Ländern wie Indien, in denen eine hohe Tuberkuloseprävalenz in der Bevölkerung bei vergleichsweise niedriger Sarkoidoseprävalenz vorliegt, können atypische Manifestationen, wie die bereits genannten Tuberkulosegranulome ohne Nekrose, sogar - unter Berücksichtigung der absoluten Fallzahlen - häufiger auftreten, als die für Sarkoidose typischen nicht-verkäsenden Granulome ⁵⁷.

Bei Verdacht auf Sarkoidose ist es in jenen Ländern, in denen die Aussagekraft der Histopathologie in der Diagnostik gering ist, besonders wichtig, eine Tuberkulose mittels der dafür zugelassenen Testverfahren auszuschließen oder den Erreger im Fall einer initial falschen Verdachtsdiagnose nachzuweisen. Die diagnostischen Verfahren haben jedoch Schwächen in Sensitivität und Spezifität: Im Gegensatz zur kulturellen Anzucht als Nachweis einer aktiven Infektion, gibt es für die LTBI keinen Goldstandard in der Diagnostik. Für die Ermittlung der Prävalenz der latenten Infektion und die Bestimmung der Testgenauigkeit der üblicherweise verwendeten Verfahren - wie beispielsweise den Quantiferon-Tests -, wurde daher die Methodik der (Bayesschen) latenten Klassenanalyse angewandt ^{58,59}: Unter Verwendung dieser und Einbeziehung von 157 Studien, wurde bei Immunkompetenten ohne bisherige BCG (Bacillus-Calmette-Guérin)-Impfung eine mittlere Sensitivität von 84% bei einer Spezifität von 100% des Tuberkulin-Hauttests (TST) bestimmt. Auch wenn dieser in Deutschland bei Erwachsenen nicht mehr empfohlen wird, so wird er immer noch in vielen Ländern angewandt. Bezüglich des Quantiferon-Gold in Tube® (GIT)-Tests betrug Sensitivität und Spezifität nur 52% bzw. 97%, die des T-SPOT.TB® lag bei 68% bzw. 97%. Bei jenen Erkrankten mit Impfung sank die Spezifität des Tuberkulin-Hauttests aufgrund der Kreuzreaktivität auf 79%, die

des Quantiferon GIT-Tests lag bei 93%⁶⁰. Pai *et al.* ermittelten in ihrer Metaanalyse eine Sensitivität von 70% des Quantiferon-Tests sowie 77% bei dem TST mit ebenfalls abfallender Spezifität auf 59% des letzteren bei BCG-Impfung⁶¹.

Gupta *et al.* untersuchten, inwiefern die Aussagekraft der oben genannten Testverfahren zur Unterscheidung der beiden Erkrankungen von der allgemeinen Tuberkuloseprävalenz in der Bevölkerung beeinflusst wird: In Indien, einem Land mit hoher Tbc-Prävalenz, fiel der Tuberkulin-Hauttest bei 76,6% der Tbc-Erkrankten positiv aus, bei Sarkoidosepatienten ebenfalls in 10,5% aller Fälle. Bei Verwendung des Quantiferon-Tests war das Ergebnis sogar in 34,2% der Sarkoidosefälle positiv, bei den Tuberkuloseerkrankten in 60%. Die Spezifität des Verfahrens, d.h. die Wahrscheinlichkeit eines negativen Testergebnisses bei Sarkoidoseerkrankung, lag somit bei lediglich 50% Prozent. Die des Tuberkulin-Hauttests lag bei 76,7% (siehe Tabelle 1)⁶².

Performance indices of a negative TST or QFT in patients of sarcoidosis compared to tuberculosis

	Sarcoidosis vs. Tuberculosis	
	Negative TST	Negative QFT
Sensitivity	89.5 (75.2-97.1)	65.8 (48.9-80.4)
Specificity	76.7 (57.7-90.1)	50 (31.3-68.7)
Positive predictive value	66.9 (49-84.5)	62.5 (45.8-77.3)
Negative predictive value	66.1 (48.1-84.2)	53.6 (33.9-72.5)

All values are represented as percentage (95% confidence intervals)

Tabelle 1: Im Rahmen einer Studie durchgeführte Tuberkulin-Hauttests und Quantiferon-Tests zur Unterscheidung zwischen Sarkoidose und Tuberkulose zeigen, dass Sensitivität und Spezifität, d.h. die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines negativen Ergebnisses bei Sarkoidose, bei dem Hauttest höher liegt als bei dem Quantiferon-Test⁶².

Die Studien verdeutlichen die Schwächen der Verfahren hinsichtlich Sensitivität und Spezifität für die Differenzierung der Erkrankungen. Besonders in Ländern mit einer hohen Tuberkulose-Prävalenz sinkt die Aussagekraft der eingesetzten Tests.

Liegt bei einem Patienten eine aktive Tuberkulose vor, so ist die Kultur, wie oben erwähnt, der Goldstandard. Wie eine Studie, bei der Kulturen aus Biopsien von pleuraler Tuberkulose angelegt und eine Sensitivität von 41% und Spezifität von 100% bestimmt wurde, nahelegt, werden viele Infektionen jedoch nicht detektiert⁶³. Bei Sputum-Kulturen, angezchtet auf Löwenstein-Jensen-Medium, zeigte sich außerdem eine Sensitivität von lediglich 76-84%^{64,65}.

Durch die Schwachstellen dieser Verfahren könnten Tuberkuloseinfektionen aufgrund von falsch-negativen Testergebnissen und Kulturen nicht als solche erkannt werden und somit die Fehldiagnose einer Sarkoidose gestellt werden. Biomarker können Klinikern bei Unsicherheiten unter Anwendung bisheriger Methoden deshalb eine Hilfestellung bieten.

2.5 IgG-Subklassen als Biomarker

2.5.1. Aufbau und Funktion der Subklassen

Als Teil der humoralen Immunantwort auf Antigene werden von Plasmazellen fünf verschiedene Immunglobulin-Klassen gebildet, von denen Immunglobulin G mit einem Anteil von 70% im Serum gesunder Erwachsener am häufigsten vorkommt. IgG wird seinerseits in vier Unterklassen unterteilt ^{66,67}.

Die Immunglobulin G-Subklassen entsprechen in der Reihenfolge absteigend ihrem Vorkommen im Plasma: IgG1 macht mehr als 60-70% des Gesamt-IgG aus, IgG2 20-30%, IgG3 5-8%, während IgG4 einen Anteil von weniger als 5% besitzt ^{68,69}. Ein Immunglobulin-Antikörper besteht aus 2 jeweils identischen Leicht- und Schwereketten, welche gemeinsam zwei 2 Fab-Fragmente mit gleichen Antigenbindungsstellen bilden. Die schweren Ketten bilden zudem eine Fc-Region, welche Komplement - C1q - oder Fc-Rezeptoren bindet und darüber spezifische Effekte wie Neutralisation und Opsonierung von Pathogenen, Komplementaktivierung sowie die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität vermittelt ⁶⁹. Die Subklassen unterscheiden sich strukturell unter anderem in ihren Fc-Fragmenten und übernehmen so unterschiedliche Effektorfunktionen ⁷⁰. IgG3 ist beispielsweise effizienter als IgG1 in der Komplementaktivierung- IgG2 bindet Komplement nur schwach, IgG4 hingegen gar nicht ⁷¹.

Bei Infektionen sind daher je nach Pathogen unterschiedliche IgG-Subklassen dominant, sodass als Folge unterschiedliche Subklassen-Profile entstehen: Gegen bakterielle Polysaccharid- Antigene werden als Immunantwort vorwiegend IgG2-Antikörper gebildet ⁷². IgG1 und IgG3 werden bei Bekämpfung viraler Antigene verstärkt exprimiert, wohingegen die Rolle von IgG4 bislang weitgehend unverstanden ist ^{73,74}.

2.5.2. Anwendung als Biomarker in der Diagnostik

Mit dem Begriff ‚Biomarker‘ werden objektiv messbare biologische Parameter beschrieben, welche als Indikatoren für physiologische und pathologische Prozesse gelten oder eine Antwort auf eine Exposition abbilden ^{75,76}. Die Bestimmung der IgG-

Subklassen und ihre Anwendung als Biomarker für Diagnostik, Verlaufs- und Therapie-monitoring sowie zur Prognoseabschätzung bei Erkrankungen wird seit langem praktiziert: In der Nephrologie ist die Bestimmung der Immunglobuline beispielsweise ein etabliertes Verfahren zur Diagnostik glomerulärer Erkrankungen wie der membranösen Glomerulonephritis ⁷⁷. Bei einem primären Antikörpermangelsyndrom wird der Nachweis der Subklassen für die Diagnosestellung sowie zum Therapiemonitoring eingesetzt ⁷⁸.

In der aktuellen Forschung wird der Biomarker beispielsweise als prädiktiver Marker für das Ansprechen von Medikamenten bei Melanom-Patienten getestet oder bei Untersuchungen von Lebererkrankungen verwendet ^{79,80}.

2.6 Anwendung eines P38-MAPK-Inhibitors bei Tuberkulose

In einer an diese Arbeit angegliederten Studie hatte ich mich mit Doramapimod, einem p38-MAPK-Inhibitor (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase-Inhibitor), und der Bedeutung dieser Kinase in der Pathogenese bzw. den Nutzen einer Kinasehemmung als mögliche Therapie für Tuberkulose beschäftigt ⁸¹. Bei dem Versuch wurde an Tuberkulose-infizierten Mäusen untersucht, inwiefern die Gabe des Kinasinhibitors Doramapimod Auswirkungen auf die lokale Entzündung im Lungengewebe hat.

Im Rahmen von klinischen Studien war bei dem Medikament bislang vor allem die therapeutische Wirksamkeit bei Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis oder Psoriasis durch seine antiinflammatorische Effekte mittels Immunmodulation geprüft worden ⁸².

Aufgrund ihrer Bedeutung für die Immunantwort bzw. bei der Vermittlung inflammatorischer Prozesse könnte die p38-MAP-Kinase für die Immunglobulinproduktion bei Tuberkulose ebenfalls von Bedeutung sein.

2.7 Ziele der Arbeit

Besonders in Ländern mit hoher Tuberkuloseprävalenz und dadurch limitierter Aussagekraft der aktuell verwendeten diagnostischen Verfahren, aber auch aufgrund der Überschneidungen beider Erkrankungen in ihrem klinisch-pathologischen Bild, gibt es Bemühungen, weitere Biomarker zu finden, die eine Differenzierung erleichtern.

Ziel der Arbeit ist es deshalb zu überprüfen, inwiefern sich die Bestimmung der IgG-Subklassen als neuer Biomarker eignet, um die richtige Zuordnung der Biopsie zu einer der Erkrankungen, und damit eine korrekte Diagnosestellung zu ermöglichen. Hierfür wurden erstmalig mittels Immunhistochemie die Immunglobulin G-Subklassenprofile für

die Erkrankungen Sarkoidose und Tuberkulose an Lungenbiopsien bestimmt (Einführung der Methode). Anschließend wurde geprüft, ob für eine Unterscheidung der beiden Erkrankungen signifikante Differenzen in der Produktion der einzelnen IgG-Subklassen bestehen, und ob Korrelationen bezüglich der Anzahl ihrer exprimierenden Plasmazellen – getrennt nach Erkrankung - nachweisbar sind.

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist die Überprüfung, inwieweit der Kinaseinhibitor Doramapimod durch seinen Einfluss auf proinflammatorische Zytokine Auswirkungen auf die perigranulomatöse Immunglobulinproduktion hat.

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

3.1.1. Auswahl der Studienteilnehmer

Vom 18.02.-15.03.2018 wurden alle in dem Institut der Pathologie des Uniklinikums Köln eingegangenen Sarkoidose- und Tuberkulosefälle der Jahre 2006 bis einschließlich März 2018 mittels des Programms PathoPro Version 9.0.9070 erfasst.

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Daten und Proben wurde von den Patienten zur routinemäßigen Diagnosestellung und nicht für wissenschaftliche Projekte erhoben bzw. entnommen. Die Patienten willigten in der BioMaSOTA-Einverständniserklärung ein, dass die bei der Diagnostik nicht verbrauchten Proben eingelagert und für weitere Forschungszwecke verwendet werden dürfen.

Zusätzlich erfolgte eine für die Forschung an dem menschlichen Biomaterial erforderliche Beratung der Ethikkommission (AZ 20-1260_2).

Nach Auswahl geeigneter Patienten wurde das Probanden- und Datenmaterial pseudonymisiert und ausschließlich codiert aufbewahrt bzw. ausgewertet.

Sarkoidose:

Von den ursprünglich 199 Treffern für die Schlagwörter „1. LUN 2. Sarkoidose“ in dem gesuchten Zeitraum 01.01.2012-31.12.2016 wurden bei PathoPro jene Fälle herausgefiltert, die eine entsprechende klinische Symptomatik aufwiesen und nach ihrer histopathologischen Untersuchung von erfahrenen Fachärzten des Instituts der Pathologie als Sarkoidose diagnostiziert wurden.

Von dieser Auswahl wurden nur Patienten eingeschlossen, bei denen zur Diagnostik eine Biopsie (transbronchiale-, Kryo- oder Zangenbiopsie) durchgeführt und ausgewertet wurde. In einigen Fällen war zusätzlich im Rahmen einer EBUS-TBNA Lymphknotengewebe gewonnen worden.

Patienten mit einer Tuberkulose-Erkrankung in der Vorgeschichte, mit interstitiellen Lungenerkrankungen oder aktuellen Infektionen und solche, bei denen in der Akte ein Malignom vermerkt war, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

Eine Auswahl nach neu diagnostizierten Patienten bzw. Dauer der Erkrankung wurde nicht vorgenommen.

Die Präparate der verbleibenden 46 Sarkoidose-Fälle wurden aus dem Archiv herausgesucht und unter dem Mikroskop untersucht.

Jene, deren Material auf den Trägern nicht für eine immunhistochemische Untersuchung ausgereicht hat, und solche, bei denen sich keine Plasmazellen um den Granulomwall herum befanden – und somit keine auswertbaren Zellen im Auszählbereich - wurden aussortiert.

Insgesamt ergab sich eine Gruppengröße von 39 Sarkoidose-Patienten. Die Paraffinblöcke dieser Fälle bzw. die Gewebeproben wurden herausgesucht, per Mikrotom geschnitten und nach den immunhistochemischen Färbungen unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

Tuberkulose:

Von den 141 Treffern für die Schlagwörter „1. LUN 2. Tbc“ im Zeitraum 01.01.2008 - 15.03.2018 wurden die Fälle herausgesucht, bei denen aufgrund eines Nachweises mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese DNA-Fragmente der Insertionsfrequenz IS6110 in der erwarteten Größe von *Mycobacterium tuberculosis* detektiert werden konnte und gepaart mit der histologischen Morphologie die Diagnose Tuberkulose gestellt wurde.

Präparate, bei denen mittels molekularbiologischen Methoden atypische Mykobakterien nachgewiesen werden konnten, wurden aussortiert.

Zusätzlich wurden – wie bei den Sarkoidosefällen - nur Präparate von Patienten berücksichtigt, bei denen mittels Biopsie Probematerial entnommen wurde, und solche aussortiert, bei denen unter dem Mikroskop keine Granulome, keine Plasmazellen um den Granulomwall herum oder zu wenig Material für die immunhistochemischen Untersuchungen zu finden war. Ausgeschlossen wurden ebenfalls Patienten mit Malignomen, bekannten Lungenerkrankungen sowie mit HIV als Koinfektion.

Insgesamt ergab sich eine Fallgröße von 19 Patienten, deren zugehörige Blöcke in dem Archiv herausgesucht, und für die Immunhistochemie weiterverarbeitet wurden.

3.1.2. Studienobjekte

Die in der Studie enthaltenen Patienten werden in Tabelle 2 (siehe Seite 26) beschrieben.

Die Sarkoidose-Gruppe besteht aus insgesamt 39 Patienten. Mit einem Anteil von 59% (23 von 39) bilden Männer die größere Gruppe. Der Altersdurchschnitt beträgt 50 Jahre.

Mit einem mittleren Alter von 52 Jahren ist die Tuberkulosegruppe, bestehend aus 19 Patienten, ähnlich strukturiert. Männer machen einen Anteil von 74% (14 von 19) aus.

	Sarkoidose	Tuberkulose
Mann/ Frau	23/16	14/5
Altersmedian/Mittelwert (Spannweite)	47/50 (25-77)	47/52 (24-76)

Tabelle 2: Charakteristika der Studiengruppen. Insgesamt gingen in die Arbeit mehr Sarkoidose- als Tuberkulosepräparate ein. Hinsichtlich des Geschlechterverhältnisses zeigt sich ein höherer Männeranteil, der in der Tuberkulosegruppe ausgeprägter ist als in der Sarkoidosegruppe. Bezüglich des Altersmedians sind beide Gruppen vergleichbar.

3.2 Grundlagen der Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen basieren auf dem Prinzip der Immunreaktion, genauer gesagt einer Antigen-Antikörper-Reaktion: Die Antigenbindungsstelle des Antikörpers (Paratop) bindet über ein Zusammenwirken mehrerer Kräfte mit hoher Spezifität an das Epitop des Antigens, welches eine komplementäre Raumstruktur besitzt. Diese Bindung wird anschließend mit Hilfe spezieller Detektionssysteme sichtbar gemacht – dabei zeigen sich folgende Reaktionsmuster der Antikörper: (i) Zytoplasmatisch, (ii) nukleär, und (iii) membranständig. Außerdem gibt es Kombinationsformen⁸³. Diese Technik ermöglicht es, die Verteilung der Proteinkomplexe im Gewebe zu erkennen sowie spezifische Zelltypen- und Bestandteile nachzuweisen. Die Immunhistochemie nimmt so in der Histopathologie einen festen Platz in der Diagnostik und Erforschung verschiedener Erkrankungen ein.

Um das gesuchte Antigen zu detektieren, gibt es zwei übergeordnete Methoden. Zum einen gibt es das direkte Verfahren, bei dem der verwendete Antikörper direkt an ein Markermolekül, z.B. an ein Enzym wie Peroxidase oder an einen fluoreszierenden Farbstoff wie Fluorochrom bindet. Vorteil ist vor allem die Schnelligkeit dieser Methode. Das Verfahren wird heute allerdings nur noch selten eingesetzt, da es aufgrund der notwendigen hohen Antikörperkonzentrationen teuer ist, eine hohe Hintergrundfärbung erzeugt wird und die Herstellung des spezifischen Konjugats aufwendig ist⁸⁴.

Zum anderen gibt es die indirekte Methode, bei der ein unkonjugierter Primärantikörper zwischengeschaltet wird, an den wiederum ein Brücken- bzw. Sekundärantikörper bindet, welcher sich spezifisch gegen den Primärantikörper richtet. Dieser Brückenantikörper ist mit einem Markerenzym konjugiert, das anschließend die Farbreaktion katalysiert. Unter die indirekte Methode fallen die gebräuchlichen Verfahren wie die

Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Methode, die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Technik, die Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische (APAAP)- Methode und die Polymerkonjugat-Technik, die bei der hier vorliegenden Arbeit angewendet wurde ⁸⁵.

Diese basiert auf einem Dextranpolymersystem, welches durchschnittlich 70 Enzyme und 10 Sekundärantikörper konjugiert (siehe Abb. 3). Aufgrund der höheren Spezifität der Antikörper kommt es zur Signalverstärkung sowie einer Reduktion der Hintergrundfärbung. Durch Vermeidung von Avidin und Biotin, die zum Beispiel bei der ABC-Technik zum Einsatz kommen und aufgrund einer endogenen Aktivität unspezifische Färbungen verursachen, kann die Hintergrundfärbung zusätzlich verringert werden ⁸⁶.

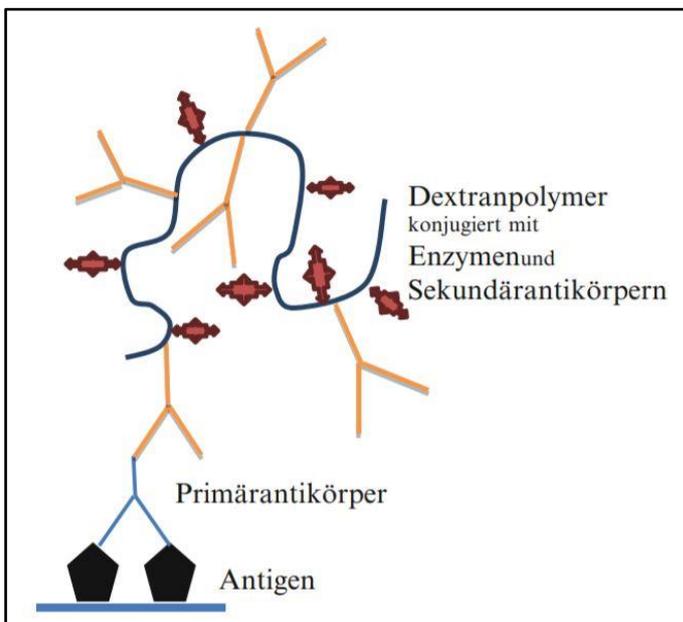


Abbildung 3: Antigennachweis mittels Dextranpolymersystem. Der spezifische Primärantikörper bindet an das zu detektierende Antigen. Zur Visualisierung wird ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, welcher an ein mit Enzymen konjugiertes Dextranpolymer gebunden ist. Die Enzyme katalysieren die Immunreaktion, sodass der Komplex als Präzipitat sichtbar wird ⁸⁶.

3.3 Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen

Für die Nachweise der Immunglobulin-Subtypen IgG1-IgG4 wurden die immunhistochemischen Untersuchungen an den Paraffinschnitten auf dem Leica BOND MAX - einem vollautomatisiertem Färbeautomat - mit Hilfe des Bond™ Polymer Refine Detection-Kits (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Dieses basiert auf einem biotinfreien, polymeren Meerrettichperoxidase-Linker-Antikörper-Konjugat-

system. Das Protokoll wurde an noch nicht entparaffinierten Präparaten entsprechend der Herstellerempfehlung durchgeführt. Die einzelnen Schritte stellen sich wie folgt dar:

- 1) Entparaffinierung mittels Dewax Lösung
- 2) Hydratisierung mit Isopropanol (100%) und Aqua dem. (demineralisiertem Wasser)

3) Antigendemaskierung

Bei der Fixierung der Gewebeproben mit Formalin kommt es in Folge von Aldehydvernetzungen und Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Antigens zu einem Verlust der Immunreaktion: die Epitope der Antigene können nicht von Antikörpern erkannt werden (Maskierung). Um eine Antigendemaskierung zu erreichen, wurde im Färbeautomat für den immunhistochemischen Nachweis der Immunglobuline IgG1, IgG2 und IgG4 eine Hitze-demaskierung („heat induced epitope retrieval“ (HIER)) in einem EDTA-Puffer (pH 9) für zwanzig Minuten durchgeführt. Für den Nachweis von IgG3 wurden die Schnitte im Rahmen einer proteolytischen Demaskierung („proteolytic induced epitope retrieval“ (PIER)) unter Verwendung des BOND Enzyme Pretreatment Kit bei 25°C für zehn Minuten vorbehandelt.

4) Peroxidase-Block

Bei der immunhistochemischen Färbung erfolgt die Visualisierung der Antigen-Antikörperreaktion durch Zugabe des Chromogens Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB), einem Peroxidasesubstrat. Das im Konjugatsystem verwendete Enzym, eine Peroxidase, wandelt dieses in einen Farbkomplex um. Da das zu untersuchende Gewebe trotz Fixierung noch eine endogene Enzymaktivität besitzt, die das Chromogen des Detektionssystems umsetzen und damit falsch positive Ergebnisse hätte erzeugen können, wurde die endogene Peroxidase mittels Wasserstoffperoxid blockiert (Inkubationszeit fünf Minuten).

Peroxid Block: 30ml 3-4% Wasserstoffperoxid

5) Auftragung des primären Antikörpers

Die primären, monoklonalen Antikörper gegen die Immunglobulin G-Subklassen wurden mit BOND Primary Antibody Diluent (Leica Biosystems) optimal verdünnt (siehe Tabelle 3, Seite 29), auf die Präparate aufgetragen und für jeweils zwanzig

Minuten inkubiert. Der Primärantikörper bindet dabei spezifisch an das gesuchte Antigen.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung (vol/vol)
Mouse anti-human IgG1 antibody, (2C11cc)	Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA	1:50
Rabbit anti-human IgG2 antibody, (EPR4418)	Abcam, Cambridge, UK	1:20.000
Rabbit anti-human IgG3 antibody, (RM119)	Abcam, Cambridge, UK	1:2000
Mouse anti-human IgG4 antibody, (MRQ-44)	Cell Marque, Rocklin, CA, USA	1:100

Tabelle 3: Verwendete Antikörper und ihre optimale Verdünnung für die immun-histochemischen Untersuchungen

6) Auftragung des sekundären Antikörpers

Zur Lokalisation der verwendeten Mausantikörper, welche an das Antigen binden, wurde ein Post-Primary-IgG-Linker-Reagenz aufgetragen und für acht Minuten inkubiert. Die Kaninchenantikörper wurden mit einem Poly-HRP-IgG-Reagenz für ebenfalls acht Minuten behandelt. Dabei bindet der primäre unkonjugierte Antikörper an das Epitop des Sekundären, welcher mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-markierten Polymerkonjugat konjugiert ist.

Post Primary Kaninchen-anti-Maus-IgG: 30ml in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung/0,09% ProClin 950 mit 10% Tierserum

Polymer Anti-Kaninchen-Poly-HRP-IgG: in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung/0,09% ProClin 950 mit 10% Tierserum

7) Auftragung des Substratchromogens

Das Substratchromogen 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung (DAB) wurde auf die Schnitte pipettiert und für zehn Minuten inkubiert. Die konjugierte Peroxidase wandelt das farblose DAB um und macht den Komplex als braunes Präzipitat sichtbar.

DAB Part 1: 2,4ml 66mM Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung Hydrat mit Stabilisator

DAB Part 2: 30ml <0.1% Wasserstoffperoxid in Stabilisatorlösung

8) Gegenfärbung

Zur Kontrastfärbung und leichterem Erkennen eines positiven Komplexes durch eine besser sichtbare Gewebesstruktur wurde Hämatoxylin (fünf Minuten Inkubationszeit) verwendet, welches die Zellkerne blau färbt.

Hämatoxylin: 30ml <0,1%

3.4 Lichtmikroskopische Auswertung

Die immunhistochemisch angefärbten Schnitte wurden lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung (entsprechend High Power Field, HPF; 40x Objektivvergrößerung mittels Leica 40x/0.8 HC Pl. Fluotar, 10x Okularvergrößerung Leica HC Plan s 10x/25 M) ohne Kenntnis der Erkrankung des vorliegenden Falls oder weiterer personenbezogener Daten ausgewertet. Der Durchmesser des HPF betrug 0,625 mm².

Falls die Größe der Schnitte dies ermöglichte, wurden jeweils 5 x 10 aneinanderhängende HPF betrachtet, sodass insgesamt eine maximale Anzahl von fünfzig Gesichtsfeldern in die Analyse einging. Erlaubte die Präparatgröße keine Auswertung von fünfzig HPF's, wurde die maximal erreichbare Anzahl an Feldern gewertet. Die Auszählung wurde so durchgeführt, dass die Lymphozyten entlang des Granulomwalls ausgewertet wurden. Die Zahl der angefärbten, Immunglobulin G-Subklassen produzierenden Zellen je HPF wurde in Exceltabellen dokumentiert, addiert und anschließend der arithmetische Mittelwert der gefärbten Plasmazellen pro Gesichtsfeld - getrennt für jede Subklasse und Präparat - berechnet.

Aufgrund des bei der immunhistochemischen Färbung verwendeten Chromogens Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) erschienen Stellen des Antigens im Gewebeschnitt braun.

Um andere Zelltypen mit schwacher Anfärbung, darunter vor allem Mastzellen, auszuschließen, wurden nur Zellen gewertet, die morphologisch Plasmazellen entsprachen und ein immunhistochemisch braun gefärbtes Zytoplasma besaßen. Da sich vor allem bei der Anfärbung der IgG1-Antikörper eine Hintergrundfärbung zeigte (siehe Abb. 4, Seite 31), wurden einheitlich nur Plasmazellen gewertet, bei denen sich die Immunglobulin G-Antikörper der spezifischen Klasse stark braun gefärbt zeigten - schwache Färbungen wurden nicht gewertet.

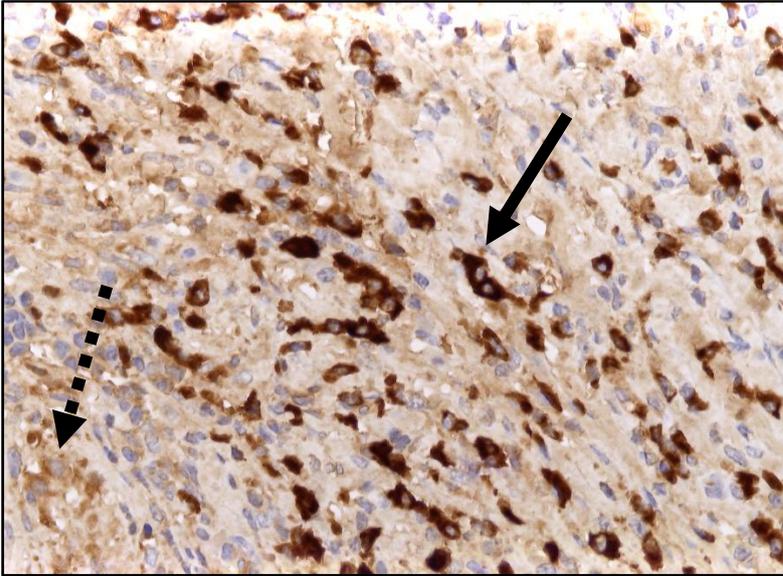


Abbildung 4: Immunhistochemischer Nachweis von IgG1 mit Hintergrundfärbung, 400- fache Vergrößerung. Der gestrichelte Pfeil (linke Bildhälfte) zeigt einen Lymphozyt mit unspezifischer Hintergrundreaktion (nicht gewertet). Der durchgängige Pfeil (rechte Bildhälfte) zeigt auf eine Plasmazelle mit starker zytoplasmatischer Reaktion (positiv gewertet).

3.5 Statistik

Zur Datenauswertung wurde das Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 25.0 benutzt. Hierfür wurden die berechneten Mittelwerte der Antikörper produzierenden Plasmazellen pro Gesichtsfeld für jedes Präparat und jede Immunglobulin G-Subklasse (s.o.) verwendet und getrennt nach ihrer Erkrankung - Sarkoidose oder Tuberkulose - eingetragen.

Alle metrische Variablen wurden mit Hilfe des arithmetischen Mittelwertes, Standardabweichung (SD) sowie Minimum (Min) und Maximum (Max) als Maß für die Spannweite charakterisiert und ihre Werte auf jeweils eine Nachkommastelle gerundet.

Zunächst wurden die Werte der einzelnen Variablen auf Normalverteilung überprüft. Bei einem Großteil der Variablen zeigte sich beim Test nach Kolmogorov Smirnov keine Normalverteilung. Daher wurden zur Überprüfung und Berechnung statistischer Unterschiede zwischen Sarkoidose und Tuberkulose in der Häufigkeit der IgG-Subklassenproduktion der nichtparametrische Mann Whitney U-Test bei unabhängigen Stichproben verwendet.

Für die Berechnung des Signifikanzniveaus beim Vergleich der Subklassenproduktion innerhalb einer Erkrankung, Sarkoidose oder Tuberkulose, wurde der Friedman-Test und Post-Hoc-Test für abhängige Stichproben angewendet.

Das Signifikanzniveau wurde wie folgt beschrieben: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)
Bei einem Niveau von $p < 0,05$ wurden die Werte als signifikant angesehen.

3.6 Histopathologische Auswertung der Mäuselungen

Für die Versuche wurden Tuberkulose-infizierten Mäuse für achtundzwanzig Tage mit dem Kinaseinhibitor Doramapimod (orale Gabe) behandelt. Eine Vergleichsgruppe erhielt Polyethylenglykol (Vehikel). Anschließend wurde der Nutzen einer Therapie mit dem Kinaseinhibitor hinsichtlich einer Reduktion der Entzündung innerhalb des Lungengewebes beurteilt. Als Parameter wurden die Ausprägung der Peribronchiolitis, Perivaskulitis, Alveolitis sowie der Granulombildung herangezogen. Zusätzlich wurden 14 und 28 Tage nach Beginn der Doramapimod-Gabe die Menge an gebildeten proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF α (Tumornekrosefaktor alpha) oder IFN γ (Interferon gamma) gemessen.

Die histopathologische Auswertung der Hämatoxylin/Eosin (HE)-gefärbten Schnitte der fixierten Mäuselungen erfolgte wie in der Publikation beschrieben ⁸¹.

4. Ergebnisse

4.1 Charakteristika

Die Präparate von 59 Patienten gingen in die Auswertung ein. 39 stammten von Sarkoidose-Erkrankten, 19 von Tuberkulose-Infizierten. Weitere Parameter wie Alter des Patienten, Dauer der Erkrankung und medizinische Vorbehandlungen wurden nicht berücksichtigt.

Zur statistischen Auswertung wurden die arithmetischen Mittelwerte der High Power Fields (HPF) eines Präparates für die jeweiligen IgG-Subklassen berechnet und diese – nach Erkrankung getrennt – miteinander verglichen.

Abbildung 5 gibt einen Überblick über die Mittelwerte der angefärbten, Immunglobulin produzierenden Plasmazellen eines HPF pro Subklasse beider Erkrankungen.

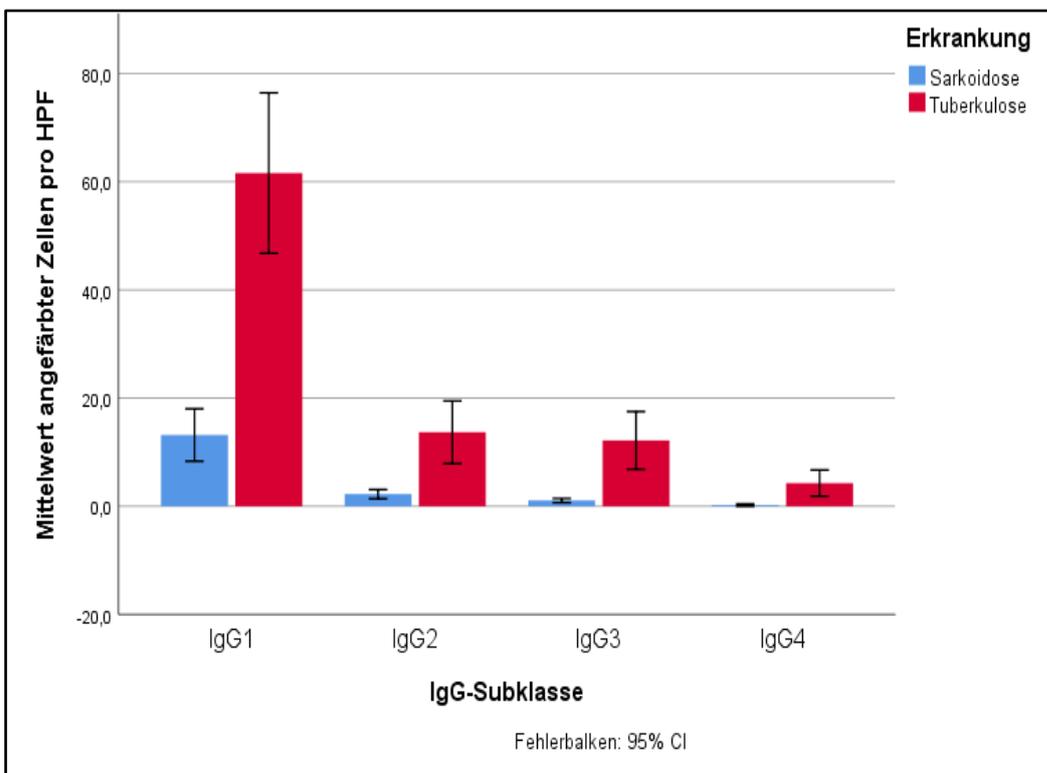


Abbildung 5: Vergleich der Mittelwerte der IgG Subklassen-produzierenden Zellen pro HPF bei Sarkoidose und Tuberkulose. Sowohl bei den Sarkoidose- als auch bei den Tuberkulosepräparaten zeigt sich eine Abnahme der Antikörperproduktion von IgG1 hin zu IgG4. Im direkten Vergleich der Erkrankungen zeigt sich bei den Tuberkulosefällen eine über alle Subklassen hinweg signifikant höhere Zahl an Immunglobulin produzierenden Plasmazellen.

4.2 Ergebnisse getrennt nach Erkrankung

4.2.1. Subklassen-Verteilung bei Sarkoidose

Die Immunglobulin G-Produktion bei 39 an Sarkoidose erkrankten Patienten wurde ausgewertet. Tabelle 4 (siehe Seite 35) zeigt Mittelwerte, Standardabweichung sowie Signifikanzniveau und Effektstärke der Immunglobulin G Subklassen im Vergleich von Sarkoidose und Tuberkulose.

Die Effektstärke r ermittelt die Bedeutsamkeit eines statistisch signifikanten Ergebnisses. Sie berechnet sich mittels des Pearson-Korrelationskoeffizienten $r = \left| \frac{z}{\sqrt{n}} \right|$ und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. z entspricht dabei dem z-Wert (Standardwert), n der Stichprobengröße.

Nach Cohen lässt sich die Bedeutung wie folgt einteilen ⁸⁷:

r -Wert	Effektstärke
$0,1 \leq r < 0,3$	schwach
$0,3 \leq r < 0,5$	mittel
$r \geq 0,5$	stark

Bei den Sarkoidosepräparaten wurden mit durchschnittlich 13 angefärbten Plasmazellen pro HPF am meisten Immunglobuline der Subklasse IgG1 gebildet. Antikörper der Klasse IgG2 wurden im Mittel von 2,2 Lymphozyten/HPF exprimiert, IgG3 von 1,1 und IgG4 von keiner Plasmazelle (0,2).

Für den Vergleich der Subklassen innerhalb der Sarkoidosekohorte wurde der Friedman-Test für abhängige Stichproben durchgeführt. Dieser zeigte einen signifikanten Unterschied bezüglich der Mittelwerte der einzelnen Subklassen.

Um zu differenzieren, welche Subklassen untereinander jeweils signifikante Mittelwertunterschiede aufweisen, wurde desweiteren der Post-Hoc-Test für abhängige Stichproben angewendet: Es ließen sich signifikante Differenzen zwischen IgG1 und IgG2 ($r=0,16$), IgG1 und IgG3 ($r=0,28$), IgG2 und IgG4 ($r=0,24$) mit jeweils schwacher Effektstärke, sowie zwischen IgG1 und IgG4 ($r=0,40$) mit mittlerer Effektstärke nachweisen.

Für die Sarkoidosegruppe lässt sich somit ableiten, dass IgG1 das prädominant gebildete Immunglobulin ist. Mit Ausnahme der Differenz zwischen IgG3 und IgG4 bestehen außerdem signifikante Unterschiede in der Anzahl der Subklassenproduzierenden Plasmazellen.

4.2.2. Subklassen-Verteilung bei Tuberkulose

Die Präparate von 19 an Tuberkulose erkrankten Patienten wurden in die Auswertung aufgenommen.

Die Mittelwerte belegen, dass IgG1 bei Tuberkulosepatienten mit einem Wert von 64,5 Zellen/HPF die dominierende Subklasse ist. IgG2 und IgG3 wurden mit 13,7 Zellen/HPF bzw. 12,2 Zellen/HPF von ähnlich vielen Plasmazellen produziert, IgG4 hingegen mit 4,2 angefärbten Zellen pro HPF am wenigsten (siehe Tabelle 4).

Im Friedman-Test erwies sich ein insgesamt signifikanter Unterschied bezüglich der Mittelwerte der Subklassen.

IgG - Subklasse	Patienten		Ergebnisse				
	Erkrankung	Anzahl n	Mittelwert μ	Std.-abw. σ	Signifikanz p	z-Wert z	Effektstärke r
IgG1	Sarkoidose	39	13,0	14,6	<0,001(***)	5,608	0,74
	Tuberkulose	23	64,5	29,8			
IgG2	Sarkoidose	39	2,2	2,6	<0,001(***)	4,177	0,55
	Tuberkulose	23	13,7	12,0			
IgG3	Sarkoidose	39	1,2	1,2	<0,001(***)	4,926	0,65
	Tuberkulose	23	11,1	10,4			
IgG4	Sarkoidose	39	0,2	0,7	<0,001(***)	4,943	0,65
	Tuberkulose	23	4,2	5,0			

Tabelle 4: Deskriptive Statistik und Signifikanzen im durchgeführten Mann Whitney U-Test. Im direkten Vergleich der Erkrankungen zeigt sich für alle Immunglobulin-Subklassen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Mittelwerts der gezählten Antikörper produzierenden Zellen. Für alle Mittelwertdifferenzen lässt sich eine starke Effektstärke r nachweisen.

Um eine differenziertere Betrachtung zu ermöglichen, wurde der Post-Hoc-Test für abhängige Stichproben durchgeführt. Beim Vergleich der Mittelwerte, konnte für die Differenzen zwischen IgG1 und IgG2 ($r=0,35$) sowie IgG1 und IgG3 ($r=0,41$) eine Signifikanz mittlerer Effektstärke, zwischen IgG1 und IgG4 ($r=0,62$) starker Effektstärke, außerdem zwischen IgG2 und IgG4 mit schwacher Effektstärke gezeigt werden.

Es zeigt sich somit, dass in der Tuberkulosekohorte IgG1 das prädominant gebildete Immunglobulin ist (siehe Abb. 6). Mit Ausnahmen der Mittelwertdifferenzen von IgG2 und IgG3 sowie zwischen IgG3 und IgG4, zeigen sich außerdem signifikante Unterschiede bzgl. ihrer Produktion zwischen den einzelnen Subklassen.

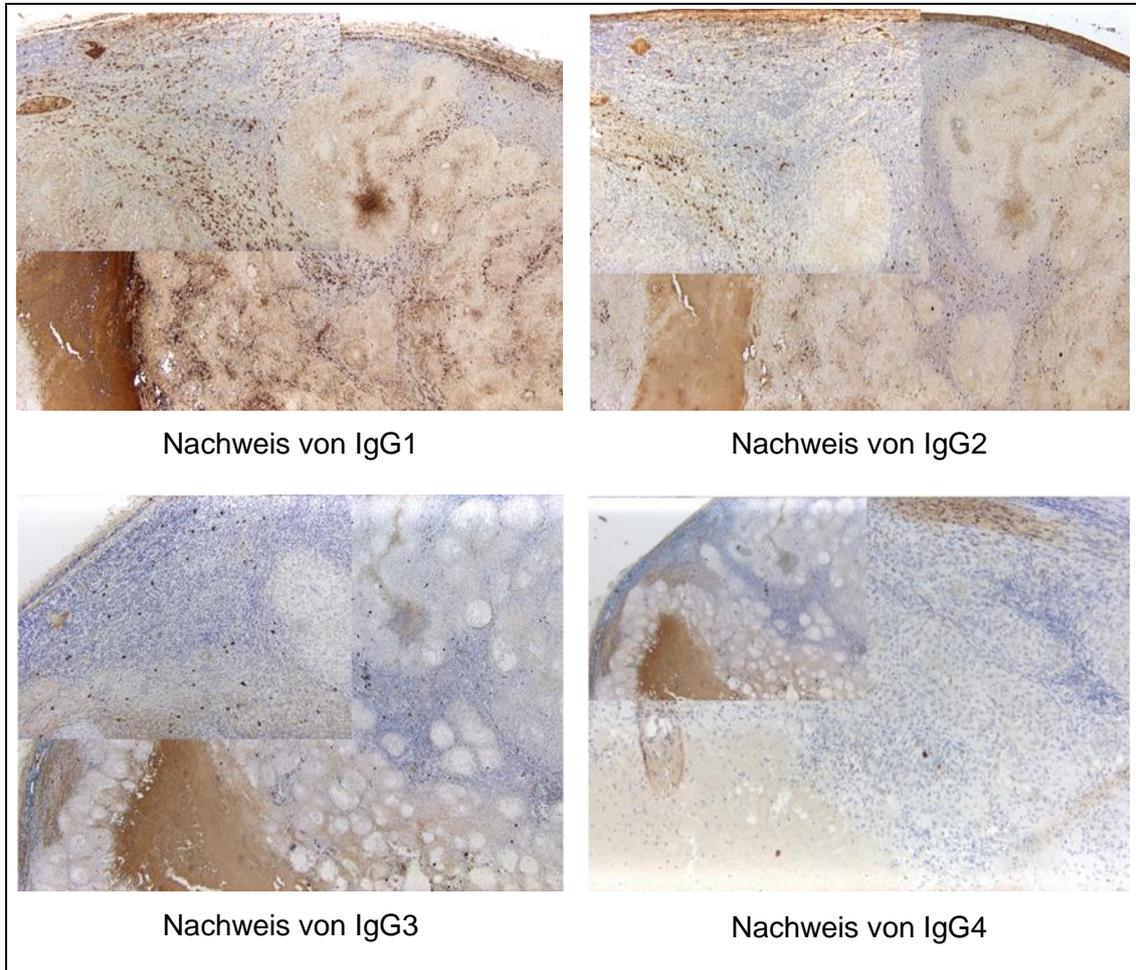


Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis der IgG-Subklassen bei einem Tuberkulosefall. Zu sehen ist, wie die Anzahl der jeweiligen Immunglobulin produzierenden Plasmazellen (braun dargestellt) von IgG1 bis IgG4 abnimmt.

4.3 Vergleich beider Erkrankungen

Die IgG-Subklassenproduktion bzw. die Anzahl angefärbter Zellen ist bei den Tuberkulosepräparaten für alle IgG1 bis IgG4 größer als bei denen von Sarkoidose-Patienten.

Mit einer Mittelwertdifferenz von 51,5 angefärbten Plasmazellen pro HPF ist der Unterschied bei IgG1 am größten (siehe Abb. 7, Seite 37). Bei IgG2 liegt diese bei 11,5 Zellen,

IgG3 weist eine Differenz von 9,9 Antikörper produzierenden Zellen je Blickfeld auf, IgG4 hingegen nur eine von 4,0 Zellen/HPF.

Bei allen Immunglobulin G-Subklassen zeigten sich im Mann Whitney U Test im direkten Vergleich beider Erkrankungen signifikante Unterschiede mit starker Effektstärke nach Cohen ⁸⁷.

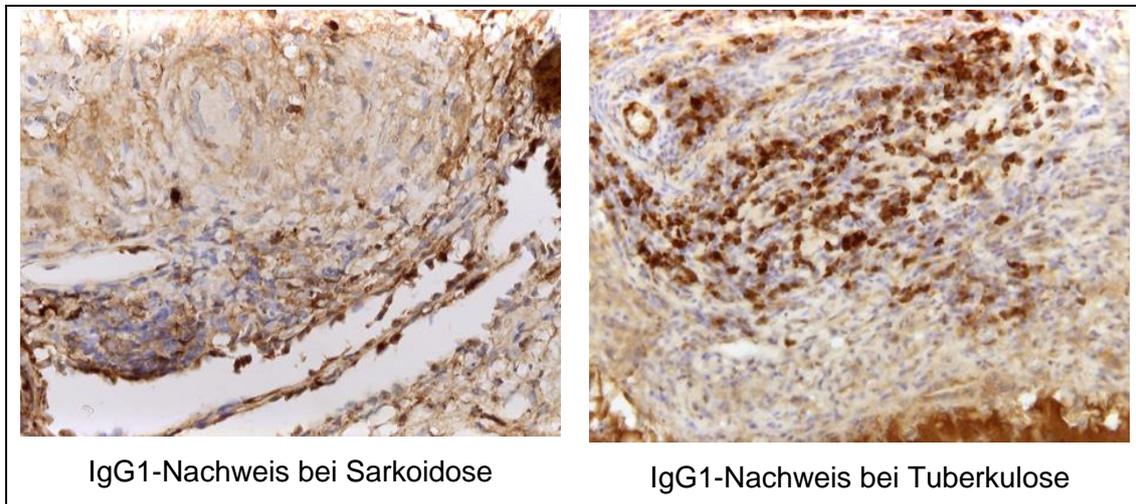


Abbildung 7: Exemplarischer Vergleich der Immunglobulin G1-Produktion bei Sarkoidose (links) - und Tuberkuloseerkrankung (rechts). Bei Tuberkulose wird signifikant mehr IgG1 von Plasmazellen, die das Granulom umgeben (braun markiert) gebildet.

Betrachtet man die prozentuale Verteilung der Subklassen - getrennt nach Erkrankung -, so macht bei den Sarkoidosepräparaten IgG1 mit 78,8% den größten Anteil aus, gefolgt von IgG2 mit 13,5% und IgG3 mit 6,4%. IgG4 mit 1,3% ist die Subklasse, welche anteilmäßig am wenigsten exprimiert wurde (siehe Abb. 8, Seite 38).

Im Vergleich dazu besitzt bei den Färbungen an Tuberkulosepräparaten IgG1 einen Anteil von 68,2% bezogen auf die IgG-produzierenden Plasmazellen, IgG2 von 14,5%, IgG3 von 12,9% sowie IgG4 von 4,5%.

Zusammenfassend lässt sich folgendes feststellen: Bei einem direkten Vergleich der Immunglobulin-exprimierenden Plasmazellen beider Erkrankungen sind für alle Subklassen signifikante Differenzen mit starker Effektstärke nachweisbar. Bei IgG1 ist diese am größten. Außerdem zeigt sich, dass sowohl bei Sarkoidose als auch bei Tuberkulose der Anteil der Antikörper von IgG1 zu IgG4 abnimmt.

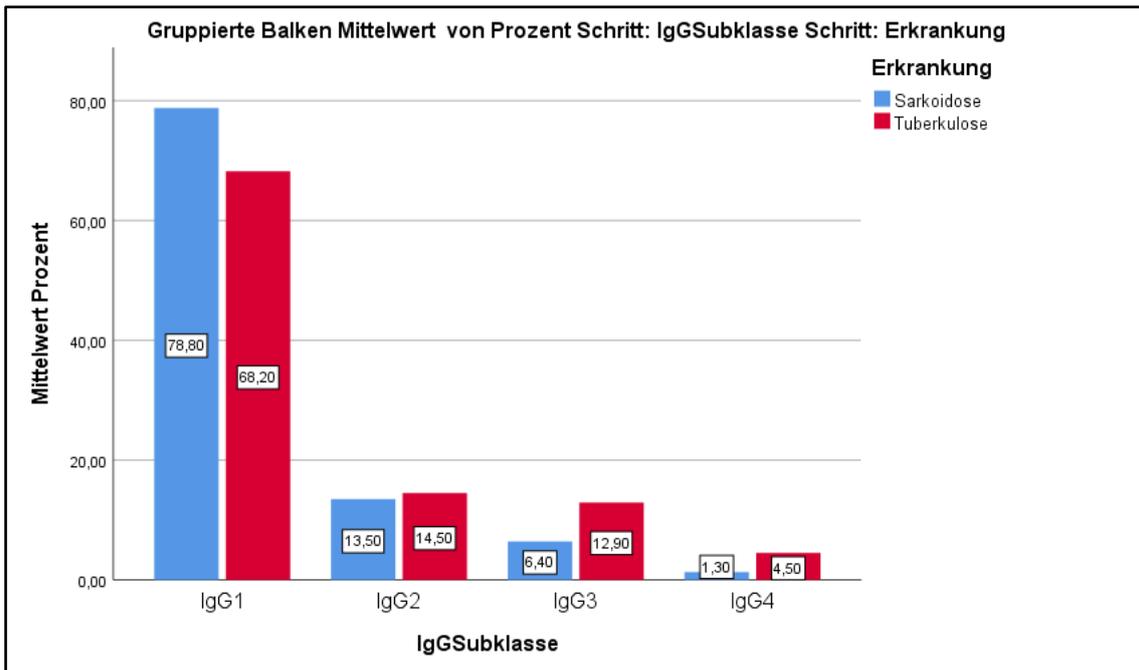


Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der Subklassen. Sowohl bei den Sarkoidose - als auch bei den Tuberkulosepräparaten nimmt der prozentuale Anteil von IgG1 hin zu IgG4 ab. Im direkten Vergleich beider Erkrankungen bestehen für alle IgG-Subklassen signifikante Unterschiede. IgG1-IgG3 wird bei Tuberkuloseerkrankung anteilmäßig häufiger gebildet als bei Sarkoidose, für IgG4 ist die Verteilung umgekehrt.

4.4 Korrelationen der Subklassen untereinander

Für die Frage, ob eine hohe Anzahl Antikörper produzierender Plasmazellen einer IgG-Subklasse mit hohen Werten anderer Subklassen korrelieren, wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient (rsp) für die Sarkoidose- und Tuberkulosegruppen berechnet.

Dieser ergab bei den Sarkoidosepräparaten eine signifikante Korrelation der IgG2- mit IgG3-Werten (rsp=0,358) auf dem Niveau $p < 0,05$ (*).

Bei Betrachtung der Tuberkulosefälle ergeben sich Korrelationen mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ (**) für die Werte IgG2 und IgG3 (rsp=0,704), sowie IgG2 und IgG4 (rsp=0,637). Außerdem signifikant ist eine Korrelation der Werte der IgG3-Bestimmung mit denen von IgG4 mit rsp=0,681 bei $p < 0,01$ (**).

Die lineare Funktion der Regressionsgerade für die signifikanten Subklassenkorrelationen bei den Sarkoidose- und Tuberkulosegruppen wird in Abbildung 9 (siehe Seite 39) dargestellt. Für einzelne Subklassen lassen sich somit bei beiden Erkrankungen Korrelationen nachweisen.

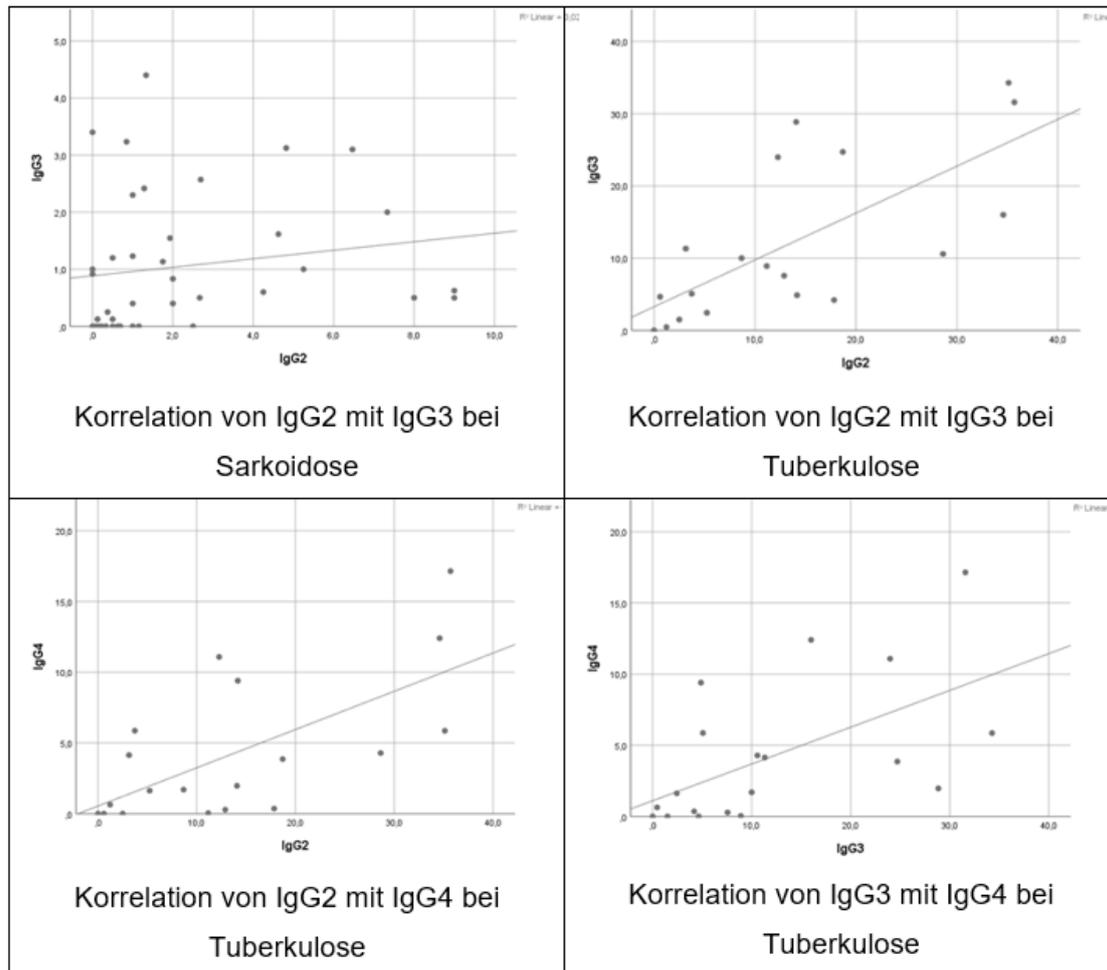


Abbildung 9: Regressionsgrade der signifikanten Subklassenkorrelationen: Ein hohe Anzahl Immunglobulin produzierender Plasmazellen einer Subklasse geht mit einer hohen Zahl einer anderen einher. Bei Sarkoidose konnte eine signifikante Korrelation von IgG2 und IgG3 (oben links) gezeigt werden, bei Tuberkulose eine Korrelation von IgG2 und IgG3 (oben rechts), IgG2 und IgG4 (unten links), sowie von IgG3 und IgG4 (unten rechts).

4.5 Analyse der Mäuselungen

Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaarten t-Tests sowie einfaktorieller Varianzanalyse (siehe Publikation ⁸¹).

Es zeigte sich in der histopathologischen Auswertung eine signifikante Reduktion im Score für die Parameter Peribronchiolitis und Perivaskulitis sowie der Anzahl der Granulome im Lungengewebe (siehe Abb. 10, Seite 40). Zusätzlich konnte eine verringerte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α , IFN γ und IL6 gemessen werden.

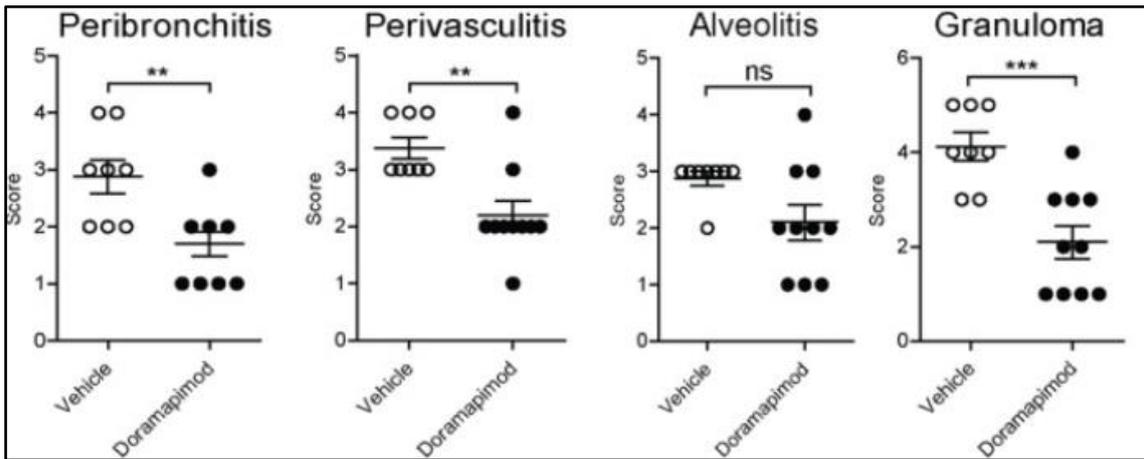


Abbildung 10: Vergleich der histopathologischen Scores für die Parameter Peribronchiolitis, Perivaskulitis, Alveolitis sowie für die Granulombildung am Lungengewebe von Placebo- und Doramapimod-behandelten Mäusen. Für die Marker Peribronchitis, Perivaskulitis und Granulombildung zeigt sich eine signifikante Abnahme der Punktzahl

81

5. Diskussion

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass die immunhistochemische Bestimmung des Immunglobulin G-Subklassenprofils an Lungenbiopsien sowohl bei Sarkoidose- als auch bei Tuberkuloseerkrankung möglich ist. Die signifikanten Unterschiede in der Immunglobulin-Expression zwischen beiden Kohorten indizieren außerdem, dass die Anwendung dieser Methode als Biomarker eine Hilfe bei der Diagnosestellung sein kann. Zusätzlich ließ sich nachweisen, dass die Anzahl IgG-Subklassen exprimierender Antikörper innerhalb einer Erkrankung zum Teil miteinander korrelieren.

Zur Einordnung der Ergebnisse ist es jedoch wichtig zu identifizieren, inwiefern sie mit denen anderer Studien übereinstimmen.

5.1 Immunglobulin G-Subklassenbestimmung bei Sarkoidose

Bei Sarkoidose kann in 31-44% der Fälle eine allgemeine Hypergammaglobulinämie im Serum festgestellt werden. Betrachtet man nur IgG, so ist laut Studdy *et al.* bei 56% der Erkrankten eine Vermehrung nachweisbar⁸⁸. Ebenso neigen die Konzentrationen bei allen IgG-Subklassen im Serum gegenüber denen der gesunden Kontrollgruppe erhöht zu sein⁸⁹. Betrachtet man den relativen Anteil der Plasmazellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten, so konnte im Serum von Sarkoidose-Patienten im Vergleich zu Gesunden kein vermehrter Anteil IgG-produzierender Plasmazellen pro 10^3 Lymphozyten (und IgA, IgM) festgestellt werden. In der bronchoalveolären Lavage (BAL) liegt er jedoch gegenüber dem der Kontrolle signifikant höher. Vergleicht man Blut- und Lavagewerte bei Sarkoidose direkt miteinander, zeigte sich sogar, dass der Anteil der IgG-Plasmazellen in der BAL um das 8-fache gegenüber dem im Blut gesteigert ist. In der gesunden Kontrollgruppe ließ sich hier kein signifikanter Unterschied feststellen. Hunninghake *et al.* werten diesen Anstieg bei den Sarkoidose-Erkrankten als Hinweis auf eine lokale Antikörperproduktion und mögliche Ursache für die Serum-Hypergammaglobulinämie⁹⁰.

Statt lediglich den prozentualen Anteil eines Immunglobulins an der Gesamtzahl der Plasmazellen zu bestimmen, ist es ebenfalls möglich, die Konzentrationen der einzelnen Subklassen in der BAL zu vergleichen und Aussagen darüber zu treffen, welcher Teil davon lokal in der Lunge produziert wurde: aufgrund der erhöhten vaskulären Permeabilität bei einer Sarkoidose-Erkrankung und einer damit steigenden Transsudation von Proteinen ist es dafür notwendig, nicht nur die absoluten Immunglobulin-Konzentrationen zu bestimmen, sondern ebenso diejenigen im Serum und gleichzeitig Albumin in Serum und BAL als Korrekturfaktor heranzuziehen. So ist der IgG/Albumin-Quotient

der BAL signifikant gegenüber dem bei Gesunden erhöht^{91,92}. Vergleicht man Serum und BAL-Werte von Sarkoidose-Patienten, zeigen sich unter Einbeziehung von Albumin für alle IgG-Subklassen erhöhte Werte⁹³.

Milburn *et al.* konnten nachweisen, dass die Menge (in mg/dl) der in der Lunge gebildeten Subklassen mit Ausnahme von IgG4, signifikant über denen der gesunden Kohorte liegt. Die Studie wies einen Anteil von IgG1 an der lokal produzierten Gesamt-IgG Konzentration (gemessen in der BAL) von 76,1% nach, während er für IgG2 19,5%, für IgG3 2,8% und IgG4 1,6% betrug⁸⁹.

Bei Gesunden stellte sich die Verteilung mit einem Anteil bei IgG4 von 38,5% als höchstem Wert, gefolgt von IgG1 mit 30% anders dar. Vergleicht man die Verteilung bei der Kontrollgruppe und den Patienten, so fällt vor allem der deutlich verminderte Anteil von IgG4 bei Sarkoidose auf (38,5 bei Gesunden vs. 1,6% bei Sarkoidoseerkrankten)⁸⁹. Rankin *et al.* bestätigen diese Ergebnisse: Gemessen als Albuminquotient sind laut Studie IgG1 und IgG3 in der BAL von Erkrankten signifikant gegenüber denen von Gesunden erhöht, IgG2 ebenfalls - wenn auch nicht statistisch signifikant -, während IgG4 signifikant verringert ist⁹³. Im Gegensatz zu den anderen Studien wiesen Bergman *et al.* ein erhöhtes IgG4 nach⁹¹. Dieser Umstand könnte damit zu erklären sein, dass in dieser Studie mittels SDS-Page eine Konzentration bzw. das Molekulargewicht in Serum und BAL bestimmt wurde, während sich Milburn *et al.* auf den prozentualen Anteil am Gesamt-IgG beziehen. Bei Rankin *et al.* wurde wiederum mit ELISA als Verfahren eine andere Methode für den Nachweis der Immunglobuline benutzt.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit stützen die Resultate von Rankin *et al.* und Milburn *et al.*: Mit 78,8% Prozent macht IgG1 bei den immunhistochemischen Färbungen an den Lungenbiopsien den größten Anteil aus, gefolgt von IgG2 mit 13,5% und IgG3 mit 6,4%. Ebenfalls ließ sich ein niedriger IgG4-Anteil von 1,3% darstellen. Dabei zu beachten ist jedoch, dass es sich hier zum einen um die Verteilung der Subklassen an der Gesamtanzahl an IgG-produzierenden Plasmazellen handelt, während es sich in oben genannten Studien um prozentuale Anteile an Gesamt-Konzentrationen bzw. deren Quotienten mit Albumin handelt.

Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass speziell bei Sarkoidose-Patienten die Zahl der Immunglobulin G-exprimierenden Zellen in der bronchoalveolären Lavage hochsignifikant mit den IgG-Konzentrationen in der BAL (Ig/Alb%, $r=0,571$) und dem peripheren Blut (ml/l, $r=0,658$) korreliert. Für andere Immunglobulin-Klassen sowie bei Gesunden gilt dies nicht⁹⁴.

Zum anderen beziehen sich die genannten Studien auf Untersuchungen der BAL, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden jedoch anhand von Lungenbiopsien gewonnen. Hunninghake *et al.* konnten bei Sarkoidose-Erkrankten keinen signifikanten Unterschied zwischen dem in der Lungenbiopsie bestimmten Anteil an IgG an der Gesamt-Lymphozytenzahl und dem in der BAL gemessenen Anteil messen. Daraus kann gefolgert werden, dass die Werte der Lavage repräsentativ für das Lungenparenchym stehen ⁹⁰.

Zusammenfassend kann eine lokale Produktion der Immunglobuline bei Sarkoidose bestätigt werden. Dabei kann eine vermehrte Expression von IgG1 bis IgG3 sowie eine Verminderung des Anteils von IgG4 beobachtet werden.

Geht man einen Schritt zurück und betrachtet mit diesen Erkenntnissen die Veränderung der IgG-Konzentrationen zwischen BAL und Serum von Gesunden, findet man gegen-teilige Ergebnisse: In der bronchoalveolären Lavage fanden sich bei gesunden Probanden im Sinne einer lokalen Produktion - prozentual und absolut - erhöhte Mengen von IgG4 gegenüber dem Serum. Merrill *et al.* sprechen deshalb IgG4 eine besondere Rolle für das Immunsystem des Respirationstraktes zu. Die Anteile von IgG1 und IgG2 sind vergleichbar, IgG3 ist absolut gesehen ebenfalls in der BAL erhöht ^{89,95,96}. Out *et al.* konnten die Immunglobuline hingegen nur als Folge einer alveolären Transsudation nachweisen und somit keine lokale Produktion feststellen ⁹⁷.

Wie kann bei Sarkoidose die veränderte Zusammensetzung der IgG-Subklassen in Lavage und Lungenbiopsie mit einer Erniedrigung von IgG4 erklärt werden? Der Klassenwechsel bei B-Zellen zu IgG4 sowie die Sekretion dieser Antikörper wird primär durch die von Th2-Helferzellen ausgeschütteten Zytokine IL4 und IL13 vermittelt. Diese sind daher bei IgG4-assoziierten Erkrankungen erhöht ⁹⁸⁻¹⁰⁰. Ebenfalls für eine vermehrte IgG4-Produktion verantwortlich ist das Zytokin IL10, welches von regulatorischen T-Zellen (Treg) sezerniert wird ^{101,102}.

Bei Sarkoidose handelt es sich hingegen um eine Th1- gewichtete Immunantwort, bei der in der BAL eine gegenüber Gesunden signifikant erhöhte, spontane Freisetzung von IFN- γ durch mononukleäre Zellen (T-Lymphozyten und Alveolarmakrophagen) der Lunge nachgewiesen wurde ^{89,96,103}. IFN- γ als Markerzytokin der Th1- Zellen inhibiert jedoch sowohl IL4 als auch IL10 und hemmt damit eine Th2-vermittelte Immunreaktion ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Zusätzlich ist eine verringerte Zahl IL4-produzierender CD4+- und CD8+ Zellen sowie eine Vermehrung IFN γ -produzierender Zellen in der BAL im Vergleich zum peripheren Blut zu finden, sodass in der Lunge ein erhöhte IFN γ /IL4-Verhältnis vorliegt

¹⁰⁷. Diese lokale Zytokinzusammensetzung könnte die anteilige IgG4-Verminderung im betroffenen Lungenparenchym erklären.

Andersherum betrachtet, zeigte sich in der bronchoalveolären Lavage bei Sarkoidose-Patienten im Rahmen der Kortikosteroidtherapie eine deutliche Verringerung der IFN- γ -Freisetzung - teilweise bis unter die Nachweisgrenze - sowie eine Steigerung der IL4-Konzentration. Einhergehend damit ließ sich ein relativer Anstieg des lokal produzierten IgG4 nachweisen ^{89,96,103}.

5.2 Immunglobulin G-Subklassenbestimmung bei Tuberkulose

Auch wenn die Immunantwort gegen *M. tuberculosis*, einem intrazellulären Erreger, primär Zell-mediert ist, lassen sich dennoch erhöhte Immunglobulinkonzentrationen sowie spezifische Antikörper gegen das Mykobakterium als Teil einer humoralen Immunreaktion nachweisen.

Im Serum von Patienten mit positiver Sputumkultur konnten signifikante Erhöhungen des Gesamt-IgGs gegenüber den gesunden Kontrollgruppen gezeigt werden ¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Vergleicht man die IgG-Subklassen im Serum mit denen von Gesunden, so weist die Studie von Sousa *et al.* ein erhöhtes IgG1 und IgG3 bei Tuberkulose-Erkrankten nach ¹¹¹. Differenziert man dies genauer hinsichtlich einer begleitenden HIV-Erkrankung und der Schwere ihrer Tuberkuloseerkrankung, zeigt die Studie, dass bei HIV-Positiven die IgG1- und IgG3- Konzentrationen signifikant erhöht sind, bei einer gleichzeitigen Verminderung der IgG2-Konzentration. Litten diese unter einer Miliartuberkulose, war das gemessene IgG1 gegenüber solchen mit lokalisierter Erkrankung höher, IgG2 niedriger. Betrachtet man hingegen nur HIV-negative Patienten, unterscheiden sich die IgG-Konzentrationen bei unterschiedlichem Erkrankungsverlauf nicht.

Insgesamt war IgG1 unabhängig von dem Krankheitsverlauf die Subklasse mit der höchsten Konzentration, gefolgt von - in absteigender Reihenfolge - IgG2, IgG3 und IgG4. In dieser Studie wurden ebenfalls die spezifischen Antikörper der einzelnen Subklassen gegen LAM und 38-kD Protein Antigen im Serum gemessen . Die Abbildungen 11 und 12 (siehe Seite 45) zeigen ihre Verteilung:

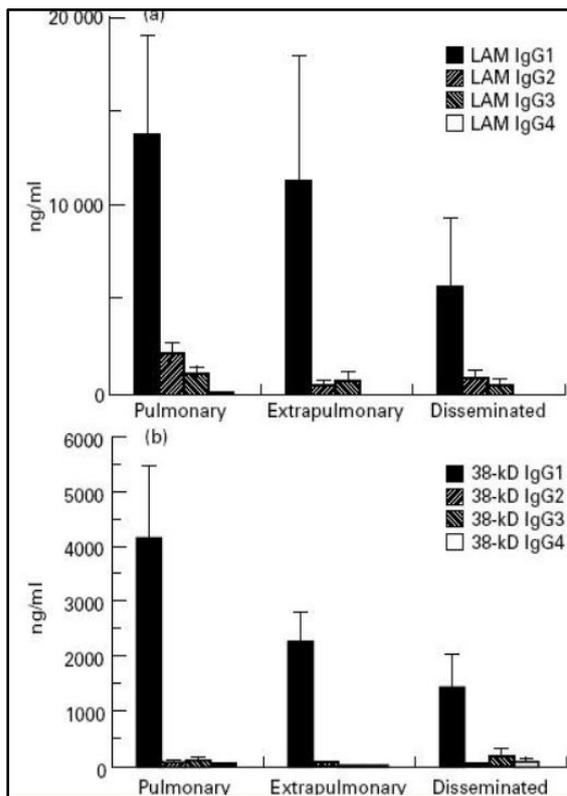


Abbildung 11: LAM- und 38-kD-Subklassenverteilung ¹¹⁵. In der Antikörperantwort gegen LAM zeigt sich eine dominierende IgG1-Produktion, gegen das 38-kD Protein Antigen eine fast ausschließliche. Der jeweilige Anteil der Subklasse unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Klinik nur kaum.

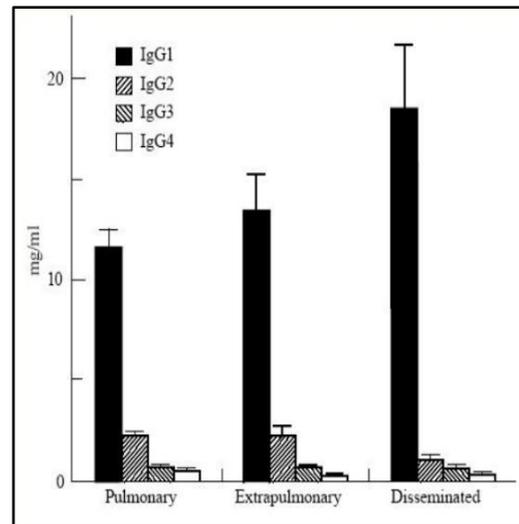


Abbildung 12: IgG-Subklassenverteilung in Abhängigkeit von der Klinik ¹¹⁵. Mit zunehmender klinischer Ausprägung steigt der Anteil des gebildeten IgG1 im Verhältnis zu den anderen Subklassen. IgG1 wird über alle Krankheitsstadien hinweg am meisten gebildet, von IgG2 zu IgG4 nimmt die Menge ab.

LAM bezeichnet dabei ein Glykolipid an der Oberfläche des Mykobakteriums, welches als Virulenzfaktor dient ¹¹². Auch in der bronchoalveolären Lavage ließen sich gegenüber Gesunden erhöhte Konzentrationen dieser spezifischen, gegen LAM- gerichteten IgG-Antikörper sowie solche gegen 39 kDa nachweisen.

Hussain *et al.* wiesen in ihrer Studie nach, dass spezifisches IgG1 als Antwort auf ein *M. tuberculosis*-Kulturfiltrat bei pulmonaler Erkrankung im Vergleich zu Gesunden - gemessen als optische Dichte - erhöht ist. Im Rahmen einer polyklonalen Antwort zeigten sich außerdem gesteigerte IgG1 und IgG3-Konzentrationen ¹¹³. Auch bei Antikörpern gegen mykobakterielle Serin-Protease konnte unabhängig von der Dauer der Erkran-

kung, dafür zunehmend mit steigender Bakterienlast, eine erhöhte Menge an IgG1 und IgG3 festgestellt werden. Zudem zeigte sich ein Anstieg von IgG4 bei chronischen Verläufen ¹¹⁴.

Trotz vielfältiger Untersuchungen bzgl. spezifischer Antikörperkonzentrationen (wie PPD-, LAM-, Anti-BCG-Antikörpern) im Serum gibt es nur wenige Studien zu jenen in der bronchoalveolären Lavage. Literatur, welche die allgemeinen IgG-Subklassen-Konzentrationen in BAL und Lungenbiopsie bzw. einen direkten immunhistochemischen Nachweis von IgG(-Subklassen) beschreiben, ist zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit nicht vorhanden.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit lassen sich dennoch in bisherige Erkenntnisse einreihen: So ist wie bei Sousa *et al.* ebenfalls IgG1 die prädominante Subklasse in Hinsicht auf die absolute Zahl an Immunglobulin exprimierenden Plasmazellen, gefolgt von IgG2 und IgG3 mit einer ähnlichen Anzahl und abschließend IgG4. Bezüglich der prozentualen Verteilung ergab sich für IgG1 ein Anteil von 68,2%, IgG2 macht insgesamt 14,5% der angefärbten Plasmazellen aus, IgG3 12,9% und IgG4 4,5%. Bei Betrachtung dieser Werte und einem Blick auf die Subklassenkonzentrationen in der BAL bei Gesunden (s.o.) liegt die Vermutung nahe, dass IgG1 und IgG3 bei Tuberkulose anteilmäßig vermehrt exprimiert sein könnten, wie dies bereits bei Hussain *et al.* und Sousa *et al.* beschrieben wurde ^{89,111,113}. Zusätzliche Studien mit direktem Vergleich von Tuberkulose-Erkrankten und einer gesunden Kontrollgruppe sind jedoch für weitere Aussagen nötig.

Wie könnte es zu der Erhöhung der Subklassen IgG1 und IgG3 in der BAL von Tuberkulosepatienten kommen? IgG1 und IgG3 haben unter den Subklassen die höchste Bindungsaffinität zu den Fc-Rezeptoren (Fcγ1 and Fcγ3) von Monozyten und Makrophagen, die konsekutiv aktiviert werden und Zytokine ausschütten. Zusätzlich besitzen sie die höchste Komplementaktivierung ¹¹⁵⁻¹¹⁷. Bei mit PPD (purified protein derivative) stimulierten Monozyten konnte unter anderem durch PPD-spez. IgG1-Antikörper eine vermehrte TNF-alpha-Sekretion nachgewiesen werden ¹¹⁸. Als PPD wird eine Proteinmischung bezeichnet, welche mittels *M. tuberculosis*-Bakterien hergestellt wird ¹¹⁹. Das bei der Stimulation freigesetzte TNF-alpha ist wiederum für die Phagozytose und Apoptose infizierter Makrophagen und damit für die Bekämpfung des Erregers von elementarer Bedeutung ^{120,121}.

Bei Infektionen mit *Mycobacterium leprae* sowie mit intrazellulär lebenden Bakterien im Allgemeinen konnten ebenfalls IgG1- und IgG3-Erhöhungen nachgewiesen werden,

sodass von einer besonderen Rolle dieser Subklassen bei der Immunreaktion gegen Mykobakterien bzw. intrazelluläre Erreger auszugehen ist ^{122,123}.

5.3 Einfluss der P38-MAPK auf die Immunglobulinbildung

Die P38-MAPK liegt bei Tuberkulose in den perigranulomatösen Makrophagen in phosphorylierter Form vor und vermittelt unter anderem die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL1 β und TNF ^{124,125}. TNF rekrutiert wiederum antigen-spezifische CD4+-T-Zellen und Monozyten und sorgt für die Differenzierung letzterer zu Makrophagen und dendritischen Zellen. Diese Vorgänge ermöglichen eine Stimulation und Reifung der B-Lymphozyten zu Antikörper-bildenden Plasmazellen und sind die Grundlage für eine gesteigerte Immunglobulinbildung ^{126,127}.

In der Studie konnte nachgewiesen werden, dass durch Inhibierung von p38-MAPK mittels Doramapimod eine Abschwächung der inflammatorischen Immunantwort als Reaktion auf eine Tbc-Infektion erzielt werden kann. So zeigte sich durch die Therapie eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF sowie eine Abnahme der Granulomanzahl ⁸¹.

Die durch die Kinase vermittelte TNF-Freisetzung könnte somit einen Einfluss auf die bei Tuberkulose lokal erhöhte Anzahl von Plasmazellen als Bestandteil des Granuloms und - damit verbunden- auf die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Steigerung der Immunglobulinbildung haben.

5.4 Vergleich der Erkrankungen und Bedeutung für Diagnostik

Vergleicht man nun die Anzahl der immunhistochemisch angefärbten Plasmazellen bei der Erkrankungen – jeweils getrennt nach Subklasse- so fällt auf, dass bei Tuberkulose signifikant mehr Plasmazellen die einzelnen Immunglobuline exprimieren. Am größten ist dieser Unterschied bei IgG1 (Mittelwertdifferenz von 47 Plasmazellen pro HPF), gefolgt von - in absteigender Reihenfolge- Ig3 (11), IgG2 (10,2) und abschließend IgG4 (3,8 Zellen).

Da bisher keine Untersuchungen in Hinblick auf einen direkten Vergleich beider Erkrankungen bezüglich unstimulierter und unspezifischer Immunglobulin-konzentrationen in Serum oder BAL, sowie kein Vergleich jener Klassen durch immunhistochemische Färbungen durchgeführt wurde, gestaltet sich eine Einordnung in bisherige Studienergebnisse schwierig.

Eine Studie, welche das Zytokin-Profil (Th1- und Th2-Zytokine) in der bronchoalveolären Lavage beider Erkrankungen bestimmte, konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen finden. Lediglich im Serum wurden kleine Differenzen festgestellt: so war die Konzentration von IL2 und IL8 bei Sarkoidose signifikant höher. IL4, IL5 und IL13 waren bei beiden Erkrankungen im Vergleich zum Gesunden signifikant erniedrigt, bei Tuberkulose jedoch in größerem Ausmaß ¹²⁸.

Eine weitere Untersuchung, bei der die mit Granulomen befallenen Lymphknoten dieser Erkrankungen auf Zytokin-mRNA untersucht wurde, zeigte bei Sarkoidose-Granulomen ein Th1-Zytokinmuster, Tuberkulose ein Th1 und Th0-Muster mit mehr detektierbarem IL4 und IL8. Als Grund für den Unterschied bei IL4 zwischen den Erkrankungen in diesen Studien erscheint, dass die IL4-produzierenden Th2-Zellen bei Tuberkulose möglicherweise perigranulomatös lokalisiert sind und ihre Konzentration im Serum deshalb niedriger ist ¹²⁹. Die geringen Differenzen in der Zytokinexpression- und -konzentration erklären jedoch nicht die erhöhte Antikörperproduktion bei Tuberkulose.

In einer Studie von Starshinova *et al.* wurde Plasma von Sarkoidose- und Tuberkulosepatienten sowie von einer gesunden Kohorte mit einem Extrakt aus gesundem Lungengewebe stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass in der Sarkoidose-Kohorte im Sinne einer autoimmunen Antwort signifikant mehr Immunkomplexe der Klassen IgG1 und IgG3 (IgG2 und IgG4 wurden hier nicht bestimmt) gebildet wurde als bei den beiden anderen Gruppen. Als Reaktion auf eine Stimulation mit den mykobakteriellen ESAT-6- und SFP-10-Antigenen waren wiederum bei Tuberkulose die Immunkomplexe der oben genannten Subklassen vermehrt ¹³⁰.

Möglicherweise sind die spezifischen mykobakteriellen Antigene und die lokal hohe Last an Bakterien bei Tuberkulose ein stärkerer Stimulus für die Immunreaktion und Antikörperproduktion als die autoimmun getriggerte Reaktion bei Sarkoidose. Bei letzter wird vermutet, dass umliegende T-Zellen die Plasmazellen unspezifisch aktivieren können ⁹¹. Die Anzahl der T-Zellen in der BAL korreliert dabei direkt mit den IgG-produzierenden Plasmazellen ⁹⁰. Angelehnt an oben genannte These zeigt sich bei aktiver Tuberkulose, dass bei einer höherer Bakterienlast und damit stärkerem Stimulus, eine Erhöhung der spezifischen Antikörperkonzentrationen gegenüber derjenigen bei der latenten Form nachzuweisen ist ¹²³.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit ließ sich außerdem zeigen, dass vor allem bei Tuberkulose die Zahl der Immunglobulin exprimierenden Plasmazellen einer Subklasse in gewissem Maße (s.o.) mit der Anzahl anderer korreliert. Es liegt die Vermutung nahe, dass hier ein gemeinsamer Stimulus die Antikörperproduktion über alle Subklassen hin-

weg anregt, während dies bei Sarkoidose nicht in einer solchen Ausprägung erkennbar wird.

Vergleicht man neben den absoluten Zahlen der angefärbten Plasmazellen auch die prozentuale Verteilung der Subklassen (s. Abb. 8, Seite 38), zeigen sich deutliche Unterschiede bei den beiden Erkrankungen, die mit den bereits in den obigen, krankheitsspezifischen Kapiteln beschriebenen Veränderungen im Einklang stehen: Deutlich wird dies bei IgG4, welches bei Sarkoidose einen Anteil von 1,3% besitzt, während es bei Tuberkulose einen von 4,5% ausmacht. Hier zeigt sich erneut die geringe Subklassen-Produktion von IgG4 bei Sarkoidose, die im Vergleich mit Gesunden schon aufgefallen war (s.o.). Auffällig ist außerdem der gesteigerte IgG3-Anteil bei Tuberkulose von 12,9% vs. 6,4% bei Sarkoidose. Der Unterschied unterstreicht die besondere Bedeutung dieser Subklasse bei der Immunreaktion gegen intrazelluläre Erreger wie *M. tuberculosis*.

Auch wenn eine weitergehende Forschungstätigkeit zu diesem Themenkomplex notwendig ist, so hat diese Studie gezeigt, dass bei der Bestimmung der Immunglobulin G-Subklassen für jede einzelne von ihnen große Differenzen mit hohen Effektstärken zwischen den Erkrankungen bestehen. Bei Schwierigkeiten in der Diagnostik mittels der üblichen eingesetzten Verfahren, könnte die immunhistochemische Bestimmung des Subklassenprofils daher eine neue Hilfestellung darstellen. Darüber hinaus kann festgehalten werden, dass die immunhistochemische Anfärbung der Immunglobulin G-Subklassen sowie die Auswertung jener mittels Lichtmikroskopie geeignete Verfahren sind, das Subklassenprofil von Plasmazellen im Lungenparenchym anhand von Biopsien zu bestimmen. Zukünftig könnte dies auch für andere Lungenerkrankungen im Sinne von Diagnose- und Prognosebestimmungen erforscht werden und an Relevanz gewinnen.

5.5 Kritik an der Methode

Trotz der signifikanten Ergebnisse dieser Studie ist es wichtig, ihre Limitationen zu benennen. Aufgrund mangelnder Angaben konnte die Erkrankungsdauer sowie eine mögliche Vortherapie der eingeschlossenen Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme nicht berücksichtigt werden. Es ist allerdings davon auszugehen, dass es sich um Erstdiagnosen der Patienten handelt, nachdem in den Einsendeformularen unter dem Punkt ‚klinische Angaben‘ diese Erkrankungen nicht als Vordiagnose vermerkt waren und bei PathoPro für die entsprechenden Patientenfälle eine Ersterfassung der Diagnose erfolgt ist.

Nicht mit einbezogen wurde die Schwere der Erkrankung sowie der ethnische Hintergrund, der z.B. bei Sarkoidose einen Einfluss auf die Immunglobulin-Werte haben könnte⁸⁸. Auch hier war eine differenzierte Untersuchung aufgrund mangelnder Angaben auf dem Anforderungsschein nicht möglich.

Eine weitere Limitation besteht in der Fallzahl des Untersucherkollektivs, die sich vorrangig durch die Einschlusskriterien sowie die begrenzte Zahl an asservierten Proben von Patienten mit Sarkoidose und Tuberkulose ergibt.

Es ist daher notwendig, weitere Studien mit Berücksichtigung der oben genannten Problemstellung durchzuführen.

Mögliche Fehler bei der lichtmikroskopischen Auswertung sollten zum einen durch eine große Anzahl ausgewerteter Gesichtsfelder reduziert werden, zum anderen durch die Tatsache, dass gleichartige Fehler eines Untersuchers bei allen Präparaten einen geringeren Einfluss auf das Ergebnis haben.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Badar F, Azfar SF, Ahmad I, Yasmeen S, Kirmani S. Diagnostic difficulties in differentiating sarcoidosis from tuberculosis. *Oman Med J* 2011; 26: 210–11. <https://doi.org/10.5001/omj.2011.53>.
- 2 Rana S, Kaur R, Kajal N, PS N. A Case of Pulmonary Sarcoidosis Misdiagnosed as Tuberculosis. *J Assoc Chest Physicians* 2018; 6: 65. https://doi.org/10.4103/jacp.jacp_32_17.
- 3 Vozoris NT, Seemangal J, Batt J. Prevalence, screening and treatment of latent tuberculosis among oral corticosteroid recipients. *Eur Respir J* 2014; 44: 1373–75. <https://doi.org/10.1183/09031936.00076714>.
- 4 Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001; 345. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011110>.
- 5 Diel R, Hauer B, Loddenkemper R, Manger B, Krüger K. Empfehlungen für das Tuberkulosescreening vor Gabe von TNF-alpha-Inhibitoren bei rheumatischen Erkrankungen. *Pneumologie* 2009; 63: 329–34. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1214673>.
- 6 Kneitz C, Krüger K. Infektionsprophylaxe bei rheumatologischen Erkrankungen. *Z Rheumatol* 2020: 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00393-020-00938-5>.
- 7 Costabel U, Skowasch D, Pabst S, et al. Konsensuspapier der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz und Kreislaufforschung (DGK) zur Diagnostik und Therapie der kardialen Sarkoidose. *Kardiologie* 2014; 8: 13–25. <https://doi.org/10.1007/s12181-013-0550-z>.
- 8 Baughman RP, Valeyre D. *Sarcoidosis. A clinician's guide*. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2018.
- 9 Prasse A. The Diagnosis, Differential Diagnosis, and Treatment of Sarcoidosis. *Dtsch Arztebl Int* 2016; 113: 565–74. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0565>.
- 10 Brito-Zerón P, Kostov B, Superville D, Baughman RP, Ramos-Casals M. Geoepidemiological big data approach to sarcoidosis: geographical and ethnic determinants. *Clin Exp Rheumatol* 2019.
- 11 Moller DR, Rybicki BA, Hamzeh NY, et al. Genetic, Immunologic, and Environmental Basis of Sarcoidosis. *Ann Am Thorac Soc* 2017; 14: S429–36. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201707-565OT>.
- 12 Negi M, Takemura T, Guzman J, et al. Localization of *Propionibacterium acnes* in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium. *Mod Pathol* 2012; 25: 1284–97. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.80>.
- 13 Gupta D, Agarwal R, Aggarwal AN, Jindal SK. Molecular evidence for the role of mycobacteria in sarcoidosis: a meta-analysis. *Eur Respir J* 2007; 30: 508–16. <https://doi.org/10.1183/09031936.00002607>.

- 14 Baughman RP, Teirstein AS, Judson MA, et al. Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1885–89. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.10.2104046>.
- 15 Iannuzzi MC, Fontana JR. Sarcoidosis: clinical presentation, immunopathogenesis, and therapeutics. *JAMA* 2011; 305: 391–99. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.10>.
- 16 Valeyre D, Prasse A, Nunes H, Uzunhan Y, Brillet P-Y, Müller-Quernheim J. Sarcoidosis. *The Lancet* 2014; 383: 1155–67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60680-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60680-7).
- 17 Baughman RP, Lower EE, Du Bois RM. Sarcoidosis. *The Lancet* 2003; 361: 1111–18. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12888-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12888-7).
- 18 Bonham CA, Streck ME, Patterson KC. From granuloma to fibrosis: sarcoidosis associated pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2016; 22: 484–91. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000301>.
- 19 Karakaya B, Kaiser Y, van Moorsel CHM, Grunewald J. Löfgren's Syndrome: Diagnosis, Management, and Disease Pathogenesis. *Semin Respir Crit Care Med* 2017; 38: 463–76. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1602380>.
- 20 Fraga RC, Kakizaki P, Valente NYS, Portocarrero LKL, Teixeira MFS, Senise PF. Do you know this syndrome? Heerfordt-Waldenström syndrome*. *An Bras Dermatol* 2017; 92: 571–72. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20175211>.
- 21 Ma Y, Gal A, Koss MN. The pathology of pulmonary sarcoidosis: update. *Semin Diagn Pathol* 2007; 24: 150–61.
- 22 El-Zammar OA, Katzenstein A-LA. Pathological diagnosis of granulomatous lung disease: a review. *Histopathology* 2007; 50: 289–310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02546.x>.
- 23 Rossi G, Cavazza A, Colby TV. Pathology of Sarcoidosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2015; 49: 36–44. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8479-6>.
- 24 Baughman RP, Culver DA, Judson MA. A Concise Review of Pulmonary Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 183: 573–81. <https://doi.org/10.1164/rccm.201006-0865CI>.
- 25 Studdy PR, Bird R. Serum angiotensin converting enzyme in sarcoidosis--its value in present clinical practice. *Ann Clin Biochem* 1989; 26 (Pt 1): 13–18. <https://doi.org/10.1177/000456328902600102>.
- 26 Studdy PR, James D.G., eds. The specificity and sensitivity of serum angiotensin-converting enzyme in sarcoidosis and other diseases. Paris, France: Pergamon Press, 1983.
- 27 Tomita H, Ina Y, Sugiura Y, et al. Polymorphism in the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 255–59. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.156.1.9612011>.
- 28 Ziegenhagen MW, Benner UK, Zissel G, Zabel P, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Sarcoidosis: TNF-alpha release from alveolar macrophages and serum level of sIL-2R are prognostic markers. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1586–92. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.156.5.97-02050>.

- 29 Chopra A, Kalkanis A, Judson MA. Biomarkers in sarcoidosis. *Expert Rev Clin Immunol* 2016; 12: 1191–208. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2016.1196135>.
- 30 Terceelj M, Salobir B, Simcic S, Wraber B, Zupancic M, Rylander R. Chitotriosidase activity in sarcoidosis and some other pulmonary diseases. *Scand J Clin Lab Invest* 2009; 69: 575–78. <https://doi.org/10.1080/00365510902829362>.
- 31 Su R, Nguyen M-LT, Agarwal MR, et al. Interferon-inducible chemokines reflect severity and progression in sarcoidosis. *Respir Res* 2013; 14: 121. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-121>.
- 32 Gungor S, Ozseker F, Yalcinsoy M, et al. Conventional markers in determination of activity of sarcoidosis. *Int Immunopharmacol* 2015; 25: 174–79. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.01.015>.
- 33 World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf> (accessed Dec 30, 2020).
- 34 Brodhun B, Altmann D, Hauer B, Haas W. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2019. Robert Koch-Institut, 2020.
- 35 Tuberkulose RKI-Ratgeber. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose.html?nn=2375460 (accessed May 04, 2020).
- 36 Zhai W, Wu F, Zhang Y, Fu Y, Liu Z. The Immune Escape Mechanisms of Mycobacterium Tuberculosis. *Int J Mol Sci* 2019; 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20020340>.
- 37 Deretic V, Singh S, Master S, et al. Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell Microbiol* 2006; 8: 719–27. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00705.x>.
- 38 Guirado E, Schlesinger LS, Kaplan G. Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Semin Immunopathol* 2013; 35: 563–83. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0388-2>.
- 39 Corleis B, Dorhoi A. Early dynamics of innate immunity during pulmonary tuberculosis. *Immunol Lett* 2020; 221: 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.02.010>.
- 40 Russell DG, Cardona P-J, Kim M-J, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* 2009; 10: 943–48. <https://doi.org/10.1038/ni.1781>.
- 41 Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol* 2011; 4: 271–78. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.14>.
- 42 Gomez JE, McKinney JD. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb)* 2004; 84: 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2003.08.003>.
- 43 World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (accessed May 08, 2020).

- 44 O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 475–527. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>.
- 45 Suárez I, Fünfer SM, Kröger S, Rademacher J, Fätkenheuer G, Rybniker J. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Dtsch Arztebl Int* 2019; 116: 729–35. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0729>.
- 46 Lyon SM, Rossman MD. Pulmonary Tuberculosis. *Microbiol Spectr* 2017; 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0032-2016>.
- 47 Cadena AM, Fortune SM, Flynn JL. Heterogeneity in tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2017; 17: 691–702. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.69>.
- 48 Subbian S, Tsenova L, Kim M-J, et al. Lesion-Specific Immune Response in Granulomas of Patients with Pulmonary Tuberculosis: A Pilot Study. *PLoS ONE* 2015; 10: e0132249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132249>.
- 49 Stek C, Allwood B, Walker NF, Wilkinson RJ, Lynen L, Meintjes G. The Immune Mechanisms of Lung Parenchymal Damage in Tuberculosis and the Role of Host-Directed Therapy. *Front Microbiol* 2018; 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02603>.
- 50 Pai M, Behr M. Latent Mycobacterium tuberculosis Infection and Interferon-Gamma Release Assays. *Microbiol Spectr* 2016; 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0023-2016>.
- 51 Pai M, Nicol MP, Boehme CC. Tuberculosis Diagnostics: State of the Art and Future Directions. *Microbiol Spectr* 2016; 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0019-2016>.
- 52 Schaberg T, Bauer T, Brinkmann F, et al. S2k-Leitlinie: Tuberkulose im Erwachsenenalter. *Pneumologie* 2017; 71: 325–97. <https://doi.org/10.1055/s-0043-105954>.
- 53 Chang JC, Driver AG, Townsend CA, Kataria YP. Hemoptysis in sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1987; 4: 49–54.
- 54 Binesh F, Halvani H, Navabii H. Systemic sarcoidosis with caseating granuloma. *BMJ Case Rep* 2012; 2012. <https://doi.org/10.1136/bcr.05.2011.4278>.
- 55 Rosen Y. Four decades of necrotizing sarcoid granulomatosis: what do we know now? *Arch Pathol Lab Med* 2015; 139: 252–62. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0051-RA>.
- 56 Mukhopadhyay S, Gal AA. Granulomatous lung disease: an approach to the differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 667–90. <https://doi.org/10.1043/1543-2165-134.5.667>.
- 57 Bhalla AS, Das A, Naranje P, Goyal A, Guleria R, Khilnani GC. Dilemma of diagnosing thoracic sarcoidosis in tuberculosis endemic regions: An imaging-based approach. Part 1. *Indian J Radiol Imaging* 2017; 27: 369–79. https://doi.org/10.4103/ijri.IJRI_200_17.

- 58 van Smeden M, Naaktgeboren CA, Reitsma JB, Moons KGM, Groot JAH de. Latent class models in diagnostic studies when there is no reference standard--a systematic review. *Am J Epidemiol* 2014; 179: 423–31. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt286>.
- 59 Garrett ES, Eaton WW, Zeger S. Methods for evaluating the performance of diagnostic tests in the absence of a gold standard: a latent class model approach. *Stat Med* 2002; 21: 1289–307. <https://doi.org/10.1002/sim.1105>.
- 60 Doan TN, Eisen DP, Rose MT, Slack A, Stearnes G, McBryde ES. Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection: A latent-class analysis. *PLoS ONE* 2017; 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188631>.
- 61 Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic Review: T-Cell–based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. *Ann Intern Med* 2008; 149: 177–84.
- 62 Gupta D, Kumar S, Aggarwal AN, Verma I, Agarwal R. Interferon gamma release assay (QuantiFERON-TB Gold In Tube) in patients of sarcoidosis from a population with high prevalence of tuberculosis infection. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2011; 28: 95–101.
- 63 Akhter N, Sumalani KK, Chawla D, Ahmed Rizvi N. Comparison between the diagnostic accuracy of Xpert MTB/Rif assay and culture for pleural tuberculosis using tissue biopsy. *ERJ Open Res* 2019; 5. <https://doi.org/10.1183/23120541.00065-2019>.
- 64 Battaglioli T, Rintiswati N, Martin A, et al. Comparative performance of Thin Layer Agar and Löwenstein-Jensen culture for diagnosis of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: E502-8. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12265>.
- 65 Moore DAJ, Evans CAW, Gilman RH, et al. Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB. *N Engl J Med* 2006; 355: 1539–50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa055524>.
- 66 Mak TW, Saunders ME. B Cell Receptor Structure and Effector Function. In: *The Immune Response*. Elsevier, 2006: 93–120.
- 67 Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front Immunol* 2014; 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>.
- 68 Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 469–77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03207.x>.
- 69 Knutsen A. IgG subclasses: Physical properties, genetics, and biologic functions. <https://www.uptodate.com/contents/igg-subclasses-physical-properties-genetics-and-biologic-functions#H2829473188> (accessed 01/21).
- 70 Maguire GA, Kumaratne DS, Joyce HJ. Are there any clinical indications for measuring IgG subclasses? *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 374–77. <https://doi.org/10.1258/000456302760042678>.
- 71 Moss RB. Immunoglobulin G subclasses. *West J Med* 1991; 154: 458.

- 72 Siber GR, Schur PH, Aisenberg AC, Weitzman SA, Schiffman G. Correlation between serum IgG-2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N Engl J Med* 1980; 303: 178–82. <https://doi.org/10.1056/NEJM198007243030402>.
- 73 Stevens R, Dichek D, Keld B, Heiner D. IgG1 is the predominant subclass of in vivo- and in vitro- produced anti-tetanus toxoid antibodies and also serves as the membrane IgG molecule for delivering inhibitory signals to anti-tetanus toxoid antibody-producing B cells. *J Clin Immunol* 1983; 3: 65–69. <https://doi.org/10.1007/bf00919140>.
- 74 Spinsanti LI, Fariás AA, Aguilar JJ, del Pilar Díaz M, Contigiani MS. Immunoglobulin G subclasses in antibody responses to St. Louis encephalitis virus infections. *Arch Virol* 2011; 156: 1861–64. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1047-3>.
- 75 Food and Drug Administration (US). BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD), 2016.
- 76 Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med (Maywood)* 2018; 243: 213–21. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>.
- 77 Lai WL, Yeh TH, Chen PM, et al. Membranous nephropathy: a review on the pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Formos Med Assoc* 2015; 114: 102–11. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2014.11.002>.
- 78 Parker AR, Skold M, Ramsden DB, Ocejó-Vinyals JG, López-Hoyos M, Harding S. The Clinical Utility of Measuring IgG Subclass Immunoglobulins During Immunological Investigation for Suspected Primary Antibody Deficiencies. *Lab Med* 2017; 48: 314–25. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmx058>.
- 79 Diem S, Fässler M, Bomze D, et al. Immunoglobulin G and Subclasses as Potential Biomarkers in Metastatic Melanoma Patients Starting Checkpoint Inhibitor Treatment. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 2019; 42. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000255>.
- 80 Zheng W, Jiang F, Shan J, et al. Levels of serum IgG subclasses in patients with liver disease: A retrospective study. *Exp Ther Med* 2021; 21: 45. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9476>.
- 81 Hölscher C, Gräb J, Hölscher A, Müller AL, Schäfer SC, Rybniker J. Chemical p38 MAP kinase inhibition constrains tissue inflammation and improves antibiotic activity in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Sci Rep* 2020; 10: 13629. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70184-x>.
- 82 National Center for Advancing Translational Sciences. Doramapimod. <https://drugs.ncats.io/drug/HO1A8B3YVV>.
- 83 Ambrosius H, Luppá H. Immunhistochemie. Grundlagen und Techniken. Berlin: Akademie-Verlag, 1987.
- 84 Noll S, Schaub-Kuhnen S, Höfler H, eds. Praxis der Immunhistochemie. München: Urban & Fischer, 2000.

- 85 Osterwalder E. Immunhistochemie kompakt. Eine Einführung in die wichtigsten Grundlagen zu Theorie und Praxis. www.histologietechnik.ch (accessed Feb 13, 2021).
- 86 Hantschke M, Palmedo G. Immunhistologische Techniken. In: Cerroni L, Garbe C, Metze D, Kutzner H, Kerl H, eds. *Histopathologie der Haut*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015: 1–28.
- 87 Cohen J. A power primer. *Psychol Bull* 1992; 112: 155–59. <https://doi.org/10.1037//0033-2909.112.1.155>.
- 88 Studdy PR, Bird R, Neville E, James DG. Biochemical findings in sarcoidosis. *J Clin Pathol* 1980; 33: 528–33.
- 89 Milburn HJ, Poulter LW, Dilmeç A, Cochrane GM, Kemeny DM. Corticosteroids restore the balance between locally produced Th1 and Th2 cytokines and immunoglobulin isotypes to normal in sarcoid lung. *Clin Exp Immunol* 1997; 108: 105–13. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1997.d01-979.x>.
- 90 Hunninghake GW, Crystal RG. Mechanisms of Hypergammaglobulinemia in Pulmonary Sarcoidosis: Site of increased antibody production and role of T lymphocytes. *J Clin Invest* 1981; 67: 86–92.
- 91 Bergmann M, Jonasson S, Klause N, Engler F, Kirsten D, Barth J. Analysis of immunoglobulins in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1997; 14: 139–45.
- 92 Vandenplas O, Depelchin S, Delaunois L, Delwiche JP, Sibille Y. Bronchoalveolar lavage immunoglobulin A and G and antiproteases correlate with changes in diffusion indices during the natural course of pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 1994; 7: 1856–64.
- 93 Rankin JA, Olchowski J, Naegel GP, Merrill WW, Reynolds HY. Immunoglobulin G Subclasses in Sarcoidosis. *Ann NY Acad Sci* 1986; 465: 122–29. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb18487.x>.
- 94 Rankin JA, Naegel GP, Schrader CE, Matthay RA, Reynolds HY. Air-space immunoglobulin production and levels in bronchoalveolar lavage fluid of normal subjects and patients with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127: 442–48. <https://doi.org/10.1164/arrd.1983.127.4.442>.
- 95 Merrill WW, Naegel GP, Olchowski JJ, Reynolds HY. Immunoglobulin G subclass proteins in serum and lavage fluid of normal subjects. Quantitation and comparison with immunoglobulins A and E. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131. <https://doi.org/10.1164/arrd.1985.131.4.584>.
- 96 Milburn HJ, Prentice HG, Grundy JE. IgG subclasses in the lungs of patients with interstitial pneumonitis following bone marrow transplantation. *Eur Respir J* 1993; 6: 944–50.
- 97 Out TA, van de Graaf EA, van den Berg NJ, Jansen HM. IgG subclasses in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *Scand J Immunol* 1991; 33: 719–27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1991.tb02546.x>.

- 98 Kleger A, Seufferlein T, Wagner M, Tannapfel A, Hoffmann TK, Mayerle J. IgG4-related autoimmune diseases: Polymorphous presentation complicates diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2015; 112: 128–35. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2015.0128>.
- 99 Akiyama M, Yasuoka H, Yoshimoto K, Takeuchi T. Interleukin-4 contributes to the shift of balance of IgG subclasses toward IgG4 in IgG4-related disease. *Cytokine* 2018; 110: 416–19. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.05.009>.
- 100 Karolena Kotowicz, Robin E. Callard. Human immunoglobulin class and IgG subclass regulation: Dual action of interleukin-4. *European Journal of Immunology* 1993; 23: 2250–56. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230930>.
- 101 Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008; 63: 1455–63. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01774.x>.
- 102 Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, Hoerauf A. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J Immunol* 2005; 174: 4718–26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4718>.
- 103 Robinson BW, McLemore TL, Crystal RG. Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. *J Clin Invest* 1985; 75: 1488–95. <https://doi.org/10.1172/JCI111852>.
- 104 Hu X, Paik PK, Chen J, et al. IFN- γ Suppresses IL-10 Production and Synergizes with TLR2 by Regulating GSK3 and CREB/AP-1 Proteins. *Immunity* 2006; 24: 563–74. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.02.014>.
- 105 Gajewski TF, Schell SR, Nau G, Fitch FW. Regulation of T-cell activation: differences among T-cell subsets. *Immunological Reviews* 1989; 111: 79–110. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1989.tb00543.x>.
- 106 Cope A, Le Friec G, Cardone J, Kemper C. The Th1 life cycle: molecular control of IFN- γ to IL-10 switching. *Trends Immunol* 2011; 32: 278–86. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.03.010>.
- 107 Wahlström J, Katchar K, Wigzell H, Olerup O, Eklund A, Grunewald J. Analysis of intracellular cytokines in CD4+ and CD8+ lung and blood T cells in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 115–21. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.1.9906071>.
- 108 Gatner EMS, Msibi V, Dauth J. Circulating immunoglobulin levels in patients with pulmonary tuberculosis with special reference to IgE. *Tubercle* 1982; 63: 113–17. [https://doi.org/10.1016/S0041-3879\(82\)80047-0](https://doi.org/10.1016/S0041-3879(82)80047-0).
- 109 Faulkner JB, Carpenter RL, Patnode RA. Serum protein and immunoglobulin levels in tuberculosis. *Am J Clin Pathol* 1967; 48: 556–60. <https://doi.org/10.1093/ajcp/48.6.556>.
- 110 Wong CT, Saha N. Changes in serum proteins (albumin, immunoglobulins and acute phase proteins) in pulmonary tuberculosis during therapy. *Tubercle* 1990; 71: 193–97. [https://doi.org/10.1016/0041-3879\(90\)90075-J](https://doi.org/10.1016/0041-3879(90)90075-J).

- 111 Sousa, Henry, Marja, et al. IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol* 1998; 111: 48–55. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00452.x>.
- 112 Demkow U, Białas-Chromiec B, Filewska M, et al. Humoral immune response against mycobacterial antigens in bronchoalveolar fluid from tuberculosis patients. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56 Suppl 4: 79–84.
- 113 Hussain R, Dawood G, Abrar N, et al. Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclass responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 726–32.
- 114 Gupta S, Shende N, Bhatia AS, Kumar S, Harinath BC. IgG subclass antibody response to mycobacterial serine protease at different stages of pulmonary tuberculosis. *Med Sci Monit* 2005; 11: CR585-8.
- 115 Huber H, Douglas SD, Nusbacher J, Kochwa S, Rosenfield RE. IgG subclass specificity of human monocyte receptor sites. *Nature* 1971; 229: 419–20. <https://doi.org/10.1038/229419a0>.
- 116 Anderson CL, Abraham GN. Characterization of the Fc receptor for IgG on a human macrophage cell line, U937. *J Immunol* 1980; 125: 2735–41.
- 117 Michaelsen TE, Sandlie I, Bratlie DB, Sandin RH, Ihle O. Structural difference in the complement activation site of human IgG1 and IgG3. *Scand J Immunol* 2009; 70: 553–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02338.x>.
- 118 Hussain R, Shiratsuchi H, Ellner JJ, Wallis RS. PPD-specific IgG1 antibody subclass upregulate tumour necrosis factor expression in PPD-stimulated monocytes: possible link with disease pathogenesis in tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 449–55. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01139.x>.
- 119 Hirtl TRV. Das Tuberkulin. Von der Geschichte der Tuberkulin-Anwendung über eine Bestandsaufnahme der Gegenwart bis zum Ausblick in eine geforderte Zukunft. Wien: Literas-Univ.-Verl., 2000.
- 120 Kisich KO, Higgins M, Diamond G, Heifets L. Tumor Necrosis Factor Alpha Stimulates Killing of Mycobacterium tuberculosis by Human Neutrophils. *Infect Immun* 2002; 70: 4591–99. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4591-4599.2002>.
- 121 Kornfeld H, Mancino G, Colizzi V. The role of macrophage cell death in tuberculosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 71–78. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400454>.
- 122 Hussain R, Kifayet A, Chiang TJ. Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies are markers of progressive disease in leprosy. *Infect Immun* 1995; 63: 410–15.
- 123 McLean MR, Lu LL, Kent SJ, Chung AW. An Inflammatory Story: Antibodies in Tuberculosis Comorbidities. *Front Immunol* 2019; 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02846>.

- 124 Rand L, Green JA, Saraiva L, Friedland JS, Elkington PTG. Matrix metalloproteinase-1 is regulated in tuberculosis by a p38 MAPK-dependent, p-aminosalicylic acid-sensitive signaling cascade. *J Immunol* 2009; 182: 5865–72. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801935>.
- 125 Arthur JS, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13. <https://doi.org/10.1038/nri3495>.
- 126 Yasui K. Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* and the risk of biologic anti-TNF- α reagents. *Pediatr Rheumatol Online J* 2014; 12. <https://doi.org/10.1186/1546-0096-12-45>.
- 127 Roach DR, Bean AGD, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 2002; 168: 4620–27. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.9.4620>.
- 128 Thillai M, Eberhardt C, Lewin AM, et al. Sarcoidosis and tuberculosis cytokine profiles: indistinguishable in bronchoalveolar lavage but different in blood. *PLoS ONE* 2012; 7: e38083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038083>.
- 129 Bergeron A, Bonay M, Kambouchner M, et al. Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas: correlations with histopathologic features of the granulomatous response. *J Immunol* 1997; 159: 3034–43.
- 130 Starshinova A, Zinchenko Y, Filatov M, et al. Specific features of immune complexes in patients with sarcoidosis and pulmonary tuberculosis. *Immunol Res* 2018. <https://doi.org/10.1007/s12026-018-9052-1>.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Sarkoidosegranuloms	13
Abbildung 2: Aufbau des klassischen Tuberkulosegranuloms	16
Abbildung 3: Antigennachweis mittels Dextranpolymersystem	27
Abbildung 4: Immunhistochemischer Nachweis von IgG1 mit Hintergrundfärbung	31
Abbildung 5: Vergleich der Mittelwerte der IgG Subklassen-produzierenden Zellen	33
Abbildung 6: Exemplarischer Nachweis von IgG1-IgG4	36
Abbildung 7: Exemplarischer Vergleich der IgG1-Expression beider Erkrankungen	37
Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der Subklassen	38
Abbildung 9: Regressionsgrade der signifikanten Subklassenkorrelationen	39
Abbildung 10: Auswirkung der Doramapimod-Gabe auf histopathologische Scores	40
Abbildung 11: LAM- und 38-kD-Subklassenverteilung	45
Abbildung 12: IgG-Subklassenverteilung in Abhängigkeit von der Klinik	45

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Statistische Beurteilung von Tuberkulose-Testverfahren	20
Tabelle 2: Charakteristika der Studiengruppen	26
Tabelle 3: Verwendete Antikörper für Immunhistochemie	29
Tabelle 4: Deskriptive Statistik und Signifikanzen	35

7.3 Rohdaten

Erkrankung	Präparatnr	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Tuberkulose	C11/15842	101,62963	35,12	34,275	5,86
Tuberkulose	C11/27733	103,36667	3,14	11,32	4,14
Tuberkulose	C11/36120	53,75	0	0	0
Tuberkulose	C12/22387	55,05556	0,59459	4,64865	0
Tuberkulose	C12/42217	28,85714	3,725	5,075	5,86667
Tuberkulose	C13/5231	59	2,5	1,5	0
Tuberkulose	C14/11169	75,7931	14,07407	28,84848	1,9697
Tuberkulose	C15/7140	67,25	5,23077	2,4375	1,625
Tuberkulose	C15/10082	41,6	8,66667	10	1,7
Tuberkulose	C15/30551	71,63333	34,59459	16	12,40476
Tuberkulose	C16/5243	87,22222	17,83333	4,19048	0,35714
Tuberkulose	C16/7731	49,25	14,16	4,875	9,4
Tuberkulose	C16/9090	27,33333	12,88235	7,56667	0,28

Tuberkulose	C16/18978	58	1,22222	0,45455	0,63636
Tuberkulose	C16/27095	38,381	12,26667	23,975	11,08333
Tuberkulose	C16/39474	129,5	18,69643	24,7	3,86
Tuberkulose	C17/29703	21	11,16	8,90385	0,04
Tuberkulose	C18/9907	105,7	28,62	10,58	4,28571
Tuberkulose	C18/9037	50,7037	35,69047	31,58	17,15

Erkrankung	Präparatnr	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Sarkoidose	C12/1638	7,16667	0,125	0,125	0,125
Sarkoidose	C12/18986	16,25	2,5	0	0
Sarkoidose	C12/20668	0,33333	1	0	0
Sarkoidose	C12/21212	0	0	1	0
Sarkoidose	C12/24042	5	0	3,4	0
Sarkoidose	C12/39144	3,75	1	1,23077	0
Sarkoidose	C12/44331	8,7	1,92857	1,54545	0
Sarkoidose	C13/1341	6,25	0	0,91667	0
Sarkoidose	C13/2795	10	1	2,3	0
Sarkoidose	C13/22548	33	0	0	0
Sarkoidose	C13/28552	6,69231	1,28571	2,41667	0,5
Sarkoidose	C13/31971	5,8	0,84615	3,23529	0
Sarkoidose	C13/35562	7,38462	1,33333	4,4	0,3
Sarkoidose	C13/41330	3,63636	4,81818	3,125	1,90909
Sarkoidose	C13/42867	17,8	1	0,4	0
Sarkoidose	C14/25412	3,83334	4,625	1,61538	0
Sarkoidose	C14/28848	4,33333	7,33333	2	0
Sarkoidose	C14/36078	38,1	0,5	1,2	0,5
Sarkoidose	C14/41281	11,5	8	0,5	0
Sarkoidose	C15/583	0,5	9	0,625	0
Sarkoidose	C15/9448	4	2,69231	2,57143	0
Sarkoidose	C15/14425	15,55556	0,69231	0	0
Sarkoidose	C15/16846	6,66667	2	0,4	0
Sarkoidose	C15/22918	4,71429	0,625	0	0
Sarkoidose	C15/31238	0,5	0,33333	0	0,2
Sarkoidose	C15/39848	40,125	1,15385	0	0,33333
Sarkoidose	C16/3813	0,61538	0,07692	0	0
Sarkoidose	C16/6348	6,16667	2	0,83333	0
Sarkoidose	C16/14307	4,28571	0,375	0,25	0
Sarkoidose	C16/18464	8,8	0,14286	0	0
Sarkoidose	C16/31754	10,25	6,46667	3,1	3,61538
Sarkoidose	C16/35487	39,8	0,5	0	0
Sarkoidose	C16/40399	8,4	4,25	0,6	0
Sarkoidose	C17/20674	7,6	0,5	0,125	0
Sarkoidose	C17/38000	59	2	0,5	0,66667
Sarkoidose	C17/38801	17	2,66667	0,5	0,66667
Sarkoidose	C17/40439	7,8	5,25	1	0
Sarkoidose	C17/47305	41,5	9	0,5	0
Sarkoidose	C17/48117	29,33333	0,22222	0	0

8. Vorabveröffentlichung

Hölscher C, Gräb J, Hölscher A, **Müller AL**, Schäfer SC, Rybniker J. Chemical p38 MAP kinase inhibition constrains tissue inflammation and improves antibiotic activity in Mycobacterium tuberculosis-infected mice. Sci Rep 2020; 10: 13629. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70184-x>