

Spatial transcriptomics uncovers hybrid, proinflammatory, and profibrotic cellular niches in pulmonary granuloma of patients with chronic sarcoidosis

Leonard Christian^{1,2,†}, Hande Yilmaz^{1,2,†}, Jannik Ruwisch^{1,2}, Leon Giercke^{1,2}, Benjamin Seeliger^{1,2}, Jan C. Kamp^{1,2}, Sirvan Bayraktar¹, Raphael Ewen^{1,2}, Theresa Graalmann^{2,3,4, ID}, Jan Fuge^{1,2}, Mark Greer^{1,2, ID}, Fabio Ius^{2,5, ID}, Tobias Welte^{1,2,†, ID}, Shu-Yi Liao^{6, ID}, Ivana V. Yang^{7,8}, Jens M. Hohlfeld^{1,2,9}, Marius M. Hoepfer^{1,2}, Jens Gottlieb^{1,2}, Naftali Kaminski¹⁰, Antje Prasse^{1,2,9,11}, Danny Jonigk^{2,12,13}, Yang Li^{14,15,16,17,18}, Christine Falk^{2,19, ID}, Lavinia Neubert^{2,12,†}, Jonas C. Schupp^{1,2,9,10,†,★}

¹Department of Respiratory Medicine and Infectious Diseases, Hannover Medical School (MHH), Hannover, Germany

²Biomedical Research in End-Stage and Obstructive Lung Disease (BREATH), Hannover Medical School (MHH), German Center for Lung Research (DZL), Hannover, Germany

³Junior Research Group Translational Immunology, TWINCORE, Center for Experimental and Clinical Infection Research, a Joint Venture between the Helmholtz Center for Infection Research (HZI) and the Hannover Medical School (MHH), Hannover, Germany

⁴Department for Rheumatology and Immunology, Hannover Medical School (MHH), Hannover, Germany

⁵Clinic for Cardiac, Thoracic, Transplant and Vascular Surgery, Hannover Medical School (MHH), Hannover, Germany

⁶Department of Medicine, National Jewish Health, Denver, CO, United States

⁷Department of Medicine, University of Colorado Anschutz Medical Campus, Aurora, CO, United States

⁸Department of Epidemiology, Colorado School of Public Health, Aurora, CO, United States

⁹Division of Airway Research, Fraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicine (ITEM), Hannover, Germany

¹⁰Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine, Yale University, New Haven, CT, United States

¹¹Clinics of Respiratory Medicine, University Hospital Basel, University of Basel, Basel, Switzerland

¹²Institute of Pathology, Hannover Medical School (MHH), Hannover, Germany

¹³University Clinic of the RWTH Aachen, Aachen, Germany

¹⁴Computational Biology for Individualised Medicine, TWINCORE, Center for Experimental and Clinical Infection Research, a Joint Venture between the Helmholtz Center for Infection Research (HZI) and the Hannover Medical School (MHH), Hannover, Germany

¹⁵Department of Computational Biology for Individualised Medicine, Center for Individualised Infection Medicine (CiIM), a Joint Venture between the Helmholtz Center for Infection Research (HZI) and the Hannover Medical School (MHH), Hannover, Germany

¹⁶Lower Saxony Center for Artificial Intelligence and Causal Methods in Medicine (CAIMed), Hannover, Germany

¹⁷Department of Internal Medicine and Radboud Center for Infectious Diseases, Radboud University Medical Center, Nijmegen, Netherlands

¹⁸Cluster of Excellence Resolving Infection Susceptibility (RESIST), Hannover, Germany

¹⁹Institute of Transplant Immunology, Hannover Medical School (MHH), Hannover, Germany

★Corresponding author: Jonas C. Schupp, Department of Respiratory Medicine and Infectious Diseases, Hannover Medical School (MHH), Hannover, Germany (schupp.jonas@mh-hannover.de, jonas.schupp@web.de)

†Died March 10, 2024.

‡Contributed equally.

Some of the results of these studies have been previously reported in the form of a preprint (bioRxiv, 12 Feb 2025, <https://doi.org/10.1101/2025.02.11.636632>).

Abstract

Background: Sarcoidosis is a disease of unknown etiology, characterized by the formation of immune cell accumulations (granulomas) in the lung and other tissues. Chronic sarcoidosis may lead to pulmonary fibrosis.

Aim: To unravel cellular niches within pulmonary granulomas of patients with chronic sarcoidosis using spatial transcriptomics.

Methods: Spatial transcriptomics using the Visium platform (10x Genomics) was performed on 9 granuloma-containing lung explants from patients with sarcoidosis. Validation of gene expression was performed through immunohistochemistry protein staining and RNA in situ hybridization.

Results: Spatial gene expression covered 30,587 gene expression spots and 173 granulomas. A CD68⁺ macrophage niche was localized in the center of the granuloma, with a CD3⁺ T-cell and CD20⁺ B-cell niche in close proximity, surrounded by a COL3A1⁺ fibroblast niche. In the Central Granuloma Macrophage niche, expression of the profibrotic macrophage genes *SPP1*, *CHIT1*,

Received: February 14, 2025. Accepted: October 5, 2025

© The Author(s) 2026. Published by Oxford University Press on behalf of the American Thoracic Society.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact reprints@oup.com for reprints and translation rights for reprints. All other permissions can be obtained through our RightsLink service via the Permissions link on the article page on our site—for further information please contact journals.permissions@oup.com.

and *CHI3L1* was observed, genes whose expression has recently been described for macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. Additionally, proinflammatory macrophage genes were expressed in the Central Granuloma Macrophage niche, suggesting that macrophages were armed for lysosomal degradation and ready for phagocytosis. Inner granuloma niches showed higher expression of interferon gamma (IFN- γ)-inducible genes. Higher collagen and *CTHRC1* expression were observed in fibroblast-containing granuloma niches, characteristics of profibrotic lung remodeling. Ligand-receptor analysis identified proinflammatory and profibrotic interactions between granuloma niches.

Conclusion: Taken together, macrophages in the center of the sarcoidosis granuloma form an armed-and-ready, hybrid proinflammatory and profibrotic niche, supporting granuloma persistence through continuous IFN- γ stimulation and collagen expression by fibroblasts localized in the periphery of the granuloma.

Keywords pulmonary fibrosis, fluorescence microscopy, interferon-gamma, homeostasis, extracellular matrix, macrophages

At a Glance Commentary

Scientific Knowledge on the Subject: Sarcoidosis is a chronic inflammatory disease that primarily affects the lungs, forming clusters of immune cells called granulomas. These granulomas can disrupt normal tissue structure, leading to organ dysfunction and scarring. Yet the cellular interactions that sustain these structures and contribute to chronic inflammation and fibrosis remain poorly understood. A deeper understanding of granuloma organization and cell-cell interactions is crucial for identifying new therapeutic approaches to reduce inflammation and prevent fibrosis in sarcoidosis.

What This Study Adds to the Field: Using spatial transcriptomics and fluorescent imaging, this study mapped the diverse cell types and communication networks within granulomas in chronic sarcoidosis. We identified SPP1⁺ macrophages located in the center of the granuloma that exhibited gene expression signatures linked to proinflammatory and profibrotic signaling pathways, suggesting they may drive persistent inflammation. We also found that these macrophages communicate with fibroblasts located in the outer layer of the granuloma, potentially promoting the fibrotic scarring often seen in chronic disease. These insights provide a clearer picture of granuloma organization and function and point toward potential molecular pathways that could be targeted for more precise therapies for sarcoidosis.

Introduction

Sarcoidosis is a multiorgan immune disease characterized by noncaseating granulomas and local inflammation. Lungs and intrathoracic lymph nodes are the most commonly affected organs.¹ In many patients, these granulomas resolve without specific treatment, while in around 20% of cases, chronic sarcoidosis may lead to lung fibrosis or organ failure.^{2,3} As granulomas are the histologic hallmark of sarcoidosis, their formation, structure, and significance have been studied over the past decades.^{4,5} However, the precise interactions at a cellular level and factors playing a role in granuloma persistence remain obscure.

The first step toward granuloma formation is carried out by sessile alveolar macrophages, reacting to a specific, yet unknown, antigen in the lung.⁶ Then, monocytes are attracted to the inflammatory region, forming the core of the granuloma, where they acquire an epithelioid phenotype or fuse to multinucleated giant cells.⁷ The middle layer of the granuloma consists of recruited lymphocytes, including CD8⁺T cells, T-helper (Th) Th1 cells, Th17/Th17.1 cells, and B cells.⁸ In patients with chronic sarcoidosis, fibroblasts accumulate in the periphery of the granuloma, forming the outer granuloma layer. Although the formation of a fibroblast layer may be an important step in fibrotic tissue remodeling, which drastically worsens the prognosis for patients with sarcoidosis, few advancements have been made toward characterizing these fibroblasts.^{9–11}

In this study, we employed spatial transcriptomics to explore the expression profiles, potential origins, and interactions between cellular niches within the pulmonary granuloma of patients with chronic sarcoidosis, which may ultimately contribute to pulmonary

fibrosis. Key findings were validated using immunohistochemistry (IHC) protein stainings and in situ RNA hybridization (ISH).

Methods

Methods are detailed in the supplement and only briefly summarized here. This study was approved by the local institutional review board (10142_BO_K_2022). Basic patient characteristics are displayed in [Table 1](#) and [Figure S1](#).

Processing of human lung tissue samples

Granuloma-containing lung specimens of nine patients with sarcoidosis, who underwent lung transplantation due to sarcoidosis and had provided informed consent, were obtained from the DZL biobank. The formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks were sectioned at a microtome. Sections were stained with hematoxylin and eosin to confirm the presence of granulomas. RNA quality was assessed using the RNeasy FFPE kit (Qiagen) for RNA isolation and DV200 measurement on a bioanalyzer using standard protocols.

Spatial transcriptomics

Spatial transcriptomics and library generation were performed using the Visium platform from 10x Genomics according to the manufacturer's instructions. Fragment size distribution and concentration were assessed using a bioanalyzer prior to sequencing. DNA library sequencing was carried out on the NovaSeq 6000 (Illumina) using associated reagents and standard procedures.

Table 1 Patient characteristics (sarcoidosis, n = 9).

Characteristic	Value
Female/male, No.	2/7
Median age at diagnosis, y [Q1/Q3]	36 [31/39]
Median age at lung transplant, y [Q1/Q3]	56 [44-59]
Median FVC % pretreatment [Q1/Q3]	45 [38-56]
Median DLCO % pretreatment [Q1/Q3]	32 [16-45] ^a
Pulmonary hypertension, yes/no, No.	6/3
Prednisone, yes/no, No.	4/5
Tadalafil, yes/no, No.	3/6
Endothelin blocker, yes/no, No.	1/8
Scadding type, I/II/III/IV, No.	0/2/0/7

Basic characteristics of the patients with sarcoidosis included in the dataset. Continuous variables are depicted as median and interquartile range. Age is given in years. FVC and DLCO are calculated as a percentage of the baseline values. All lung function values show the last available lung function before lung transplantation.

Abbreviations: DLCO, diffusing capacity for carbon monoxide; FVC, forced vital capacity; Q, quartile.

^aMissing values.

Visium data acquisition, processing, and analysis

Processing and visualization of spatial expression data were performed with the “Seurat” package in R software. Nine Visium samples passed the quality checks. A cluster of cells was identified through a clustering algorithm based on shared nearest neighbor modularity optimization. Clusters were annotated using LungMap¹² and canonical cell-type markers (Table S1). Marker genes for each cluster were generated with the Wilcoxon rank-sum test, as implemented in the FindAllMarkers function of the Seurat R package (Table S2). To correct for multiple testing, *P* values were adjusted using the Benjamini-Hochberg false discovery rate method. Genes with false discovery rate-adjusted *P* values ≤ 0.05 were considered statistically significant. Downstream analyses included gene set enrichment analysis and ligand-receptor analysis to explore niche-niche signaling networks.

Validation

To confirm spatial transcriptomics findings, multicolor immunofluorescence protein stains and RNA ISH were performed on slides of 4 patients included in the spatial transcriptomics cohort, each. RNA ISH was performed using the standard protocol of the RNAscope assay (ACD Bio), while IHF protein stainings were conducted using the standard procedure of deparaffinization, decrosslinking, blocking, primary and secondary antibody incubation, quenching, and coverslipping. Protein and RNA targets for validation were based on their differential gene expression and relevance to sarcoidosis pathology. Control stainings are displayed in the Supplement (Figure S2). Fluorescence microscopy images were analyzed with StarDist for cell segmentation and QuPath for automated cell classification.^{13,14} Frequencies are shown as mean \pm SD across samples, with the total detected cell proportions normalized to 1. Top gene expression of granuloma-associated clusters was compared with the datasets of Krausgruber et al.⁵ and Liao et al.⁶ using Venny 2.1.0.¹⁷

Results

To characterize the cellular and transcriptomic landscape of the chronic pulmonary sarcoidosis granuloma, we performed spatial transcriptomics using the Visium platform (10x Genomics) on nine samples featuring granulomas of an adequate number and RNA quality (Figure 1A, B, Figure S3). In total, 30,587 tissue-covered gene expression spots were analyzed covering 173 granulomas. Cell-type annotation based on the expression of distinct marker genes in each gene expression spot identified 13 distinct clusters (Figure 1C-E). These clusters reflect the gene expression of various cells in each gene expression spot, resembling cellular niches. Four granuloma-associated niches were identified: the Central Granuloma Macrophage niche in the granuloma core, surrounded by a mix of the Granuloma Fibroblasts and Macrophage (M Φ) niche and occasional involvement of the Granuloma T Cells, Dendritic Cells (DCs), and M Φ niche, with the Peri-Granuloma Fibrotic Fibroblasts niche being present around the fibrotic granuloma and in fibrotic lesions. External validation using the datasets of Liao et al.⁶ and Krausgruber et al.⁵ demonstrated an overlapping gene expression of 8.7% to 22% between granuloma-associated clusters with matching cell types (Figure S4).

The main cell populations within the granuloma were uncovered based on marker gene expression, showing CD68⁺ macrophages in the granuloma center with a dense layer of COL3A1⁺ fibroblasts around it (Figure 1F). CD3⁺T cells were loosely scattered between the macrophage core and the fibroblast layer (Figure 1F). Expression of dendritic cell marker genes (Figure S5) and B-cell marker genes such as MS4A1 (CD20, Figure 1E) were detected around the granuloma, predominantly in the Granuloma T Cells, DCs, and M Φ niche. Expression of neutrophil-related genes was low (Figure S6). The observed cellular distribution was confirmed through IHF protein staining of CD3, CD4, and CD20 (Figure 1G-J) alongside staining for CD68 and COL1A1 (Figure 1K). Automated cell annotation demonstrated frequencies of 0.45 ± 0.14 for CD3⁺ cells, 0.63 ± 0.12 for CD4⁺ cells, 0.09 ± 0.12 for CD20⁺, 0.16 ± 0.15 for CD68⁺, and 0.57 ± 0.19 for COL3A1⁺ cells in the granuloma (mean \pm SD; Figure 1J, Figure S7). The relatively high proportion of COL3A1⁺ cells in the granuloma might reflect the progressed disease state of studied patients.

Central granuloma macrophages occupy a hybrid, proinflammatory, and profibrotic niche

First, we explored the gene expression profile of granuloma macrophages, the main cells in the Central Granuloma Macrophages niche. We observed high expression of *SPP1*, *CHIT1*, and *CHI3L1* in the granuloma center (Figure 2A), genes associated with profibrotic macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF),¹⁸ and markers of alternatively activated (M2) macrophages.^{19,20} In parallel, high expression of *LYZ*, *IL1B*, *IL18*, and *CYBB*, proinflammatory genes associated with conventionally activated (M1) macrophages, was observed in the Central Granuloma Macrophages niche (Figure 2B), suggesting that central granuloma macrophages exhibit both profibrotic and proinflammatory characteristics. *GPNCB*, a novel marker for giant cells in sarcoidosis displaying characteristics of M1 and M2 macrophage polarization,²¹

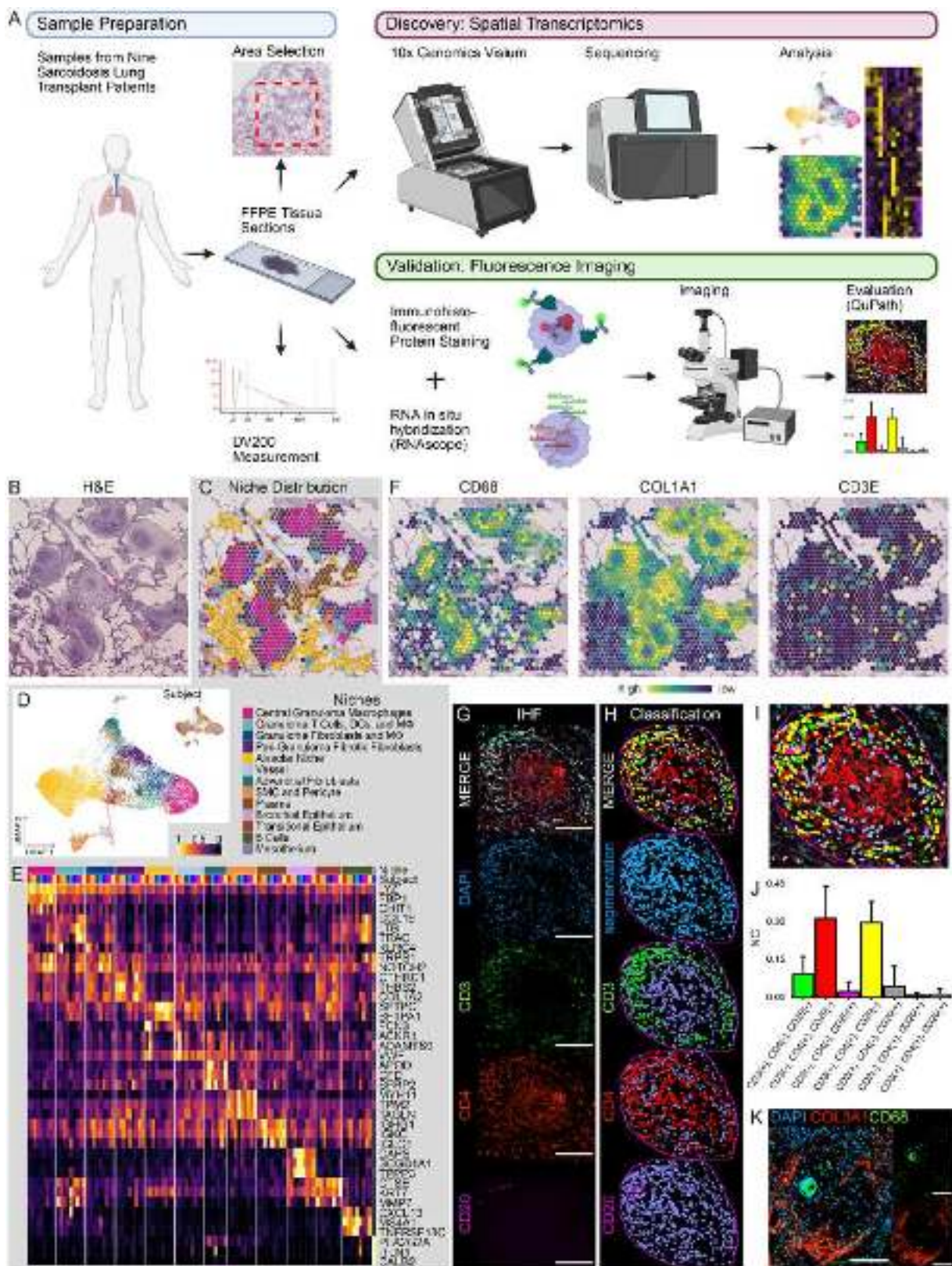


Figure 1 (A) Biobanked formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples of nine patients with chronic sarcoidosis undergoing lung transplantation were used. Spatial transcriptomics was performed on these samples using the Visium platform (10x Genomics). DNA libraries were sequenced, and the data were analyzed. Based on spatial transcriptomics findings, validation via immunohistochemistry (IHC) protein staining and RNA in situ hybridization (ISH) was performed. Created in BioRender. Schupp, J. (2025), <https://BioRender.com/sx42e7t>. (B) Exemplary hematoxylin and eosin staining of a lung section containing a granuloma. (C) Spatial dimension plot showing the distribution of the cell-type niches, with each niche represented by a color-coded dot and niches identified based on marker gene expression in spatial transcriptomics. (D) Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) of spatial transcriptomics niches from all samples, with each niche color-coded and every dot representing a

was detected in the granuloma center (Figure 2A). The IHF protein staining demonstrated the expression of M2 polarization markers CD16, CD163, and CD206 in granulomas (Figure S8). Validation through IHF protein staining confirmed the presence of SPP1⁺CHIT1⁺ macrophages in the central granuloma (Figure 2C). While SPP1 was distributed across the central granuloma, CHIT1 was colocalized specifically with CD68.

To uncover the potential origin of granuloma macrophages, we examined the expression of alveolar and monocyte markers (Figure 2B, E).²² While genes predominantly expressed in alveolar macrophages, such as *FABP4*, were expressed in the alveolar niche, monocyte markers such as *CD14* were expressed in the granuloma center. The expression of *FABP4* in alveolar but not granuloma macrophages and *CD14* in central granuloma macrophages alongside *SPP1* was confirmed through ISH (Figure 2D).

Taken together, these data suggest that central granuloma macrophages are monocyte-derived, forming a hybrid, proinflammatory, and profibrotic niche.

Central granuloma macrophages are primed to eliminate pathogens

To expand upon the inflammatory signaling within the Central Granuloma Macrophages niche, we performed a pathway enrichment analysis using EnrichR, revealing associations with phagocytosis and endocytosis (GO:0050764, GO:0045807, and GO:0006896), as well as Toll-like receptor (TLR) signaling, phagosome, and lysosome pathways (Figure 3A, Figure S9A). This matches the high expression of lysosomal genes *CTSB* and *CTSS* in granuloma regions (Figure 3B). Expression of *TLR2* and its coreceptor *TLR1* and *TLR8* were highest in the Central Granuloma Macrophages niche (Figure 3C). Although *TLR4* expression was detected in the central granuloma, its expression was low compared to its coreceptors *LY96* and *CD14* and downstream *TLR2/4* signaling genes, such as *MYD88* and *IRAK1* (Figure 3C). Besides pathogen recognition, central granuloma macrophages displayed activity in pathogen uptake through expression of endocytosis-related genes (Figure 3C). The prominent expression of *CTSB* and *CTSS* was accompanied by expression of *DNASE2*, *LIPA*, and *LYZ*, among other genes, related to lysosomal degradation in the Central Granuloma Macrophages niche (Figure 3B, C, Figure S10). Expression of *HK3*, *GALM*, *TKT*, and *FBP1* was observed in the Central Granuloma Macrophages niche (Figure 3B-D, Figure S10). These genes are associated with glycolysis and pentose phosphate pathway metabolism, pathways that may facilitate

quick immune cell proliferation and provide NADPH for oxidative stress response.²³ Comparing spatial gene expression of *HK3* and *CD14* demonstrates an overlap with their protein expression, with *CD14*⁺*HK3*⁺ cells having a frequency of 0.32 ± 0.24 (mean \pm SD) in granulomas (Figure 3E, Figure S7).

In summary, high expression of genes involved in pathogen recognition, uptake, and clearance alongside shifted energy metabolism suggests that macrophages in the Central Granuloma Macrophages niche are primed to eliminate—potentially long-gone—pathogens.

Interferon- γ signaling associated with a proinflammatory environment characterizes chronic granulomas

Next, we examined how lymphocytes are involved in maintaining this proinflammatory and profibrotic niche. Pathway analysis of the granuloma T cells, DCs, and M Φ niche revealed higher expression of genes involved in downstream interferon gamma (IFN- γ) signaling by granuloma-associated niches (Figure 4A, Figure S9B, C). These results are in line with high gene expression of IFN- γ -induced genes *CD74*, *CXCL9*, and interferon-gamma-inducible protein 30 (*IFI30*) in the granuloma center (Figure 4B). In addition, genes encoding IFN- γ -inducible chemokines *CCL5*, *CCL22*, and *CXCL10* were prominently expressed in granuloma-associated niches (Figure 4C), which indicates the recruitment of activated T cells and regulatory T cells.^{24,25} *CXCL9/CXCL10* and *CCL5/CCL22* gene expression were similar in the Central Granuloma Macrophages and the Granuloma T Cells, DCs, and M Φ niche, underlining the ongoing lymphocyte recruitment to the granuloma. The highest gene expression of *CXCL16* and *IRF8* was observed in the central granuloma and the B Cell niche, respectively (Figure 4C). Evaluating the expression of 45 other genes inducible by IFN- γ revealed a specific spatial distribution of these genes across three different niches: (1) Central Granuloma Macrophages; (2) Granuloma T Cells, DCs, and M Φ ; and (3) B cells (Figure 4D). While no unique gene related to IFN- γ was expressed in the Central Granuloma Macrophages niche, *IFI6*, *ADAR*, and *CD38* were more highly expressed in the Granuloma T cells, DCs, and M Φ niche than in other niches. IFN- γ was also observed at protein level, colocalized with SPP1 in the center region of the granuloma (Figure 4E). In addition, IFN- γ colocalized with *IFI16* with a frequency of 0.13 ± 0.11 (mean \pm SD, Figure 4F, G). Taken together, proinflammatory IFN- γ signaling is maintained within the pulmonary granuloma of patients with chronic sarcoidosis.

spot on a spatial plot. (E) Heatmap displaying exemplary marker genes used to define the cell-type niches in spatial transcriptomics. (F) Spatial gene expression plot shows expression of macrophage marker *CD68* in the granuloma center (left), fibroblast marker *COL3A1* in the peri-granulomatous region (center), and weak expression of *CD3E* around the granuloma (right). (G) Representative immunohistofluorescence protein staining of T-cell markers CD3 (green) and CD4 (red), B-cell marker CD20 (pink), and DAPI (blue) reveals the presence of T cells and B cells around the granuloma core; scale bar = 100 μ m. (H) Exemplary evaluation of the CD3, CD4, and CD20 IHF panel in the QuPath software. Top image represents the applied classifiers and includes double and triple positives (CD3⁺CD4⁺ in yellow, CD3⁺CD20⁺ in dark gray, CD4⁺CD20⁺ in dark purple, CD3⁺CD4⁺CD20⁺ in light gray). The second image from the top represents the automated cell segmentation (blue) using StarDist based on the DAPI signal. The bottom three images represent the training of the classifiers for CD3⁺ (green), CD4⁺ (red), and CD20⁺ (bright purple) cells. Cells negative for classifiers are depicted in violet. (I) Overlay of the IHF microscopy image with applied classifiers for CD3, CD4, and CD20. (J) Normalized counts (NCs) of cells positive for CD3, CD4, and CD20 within the granuloma. (K) Representative immunohistofluorescence protein staining of macrophage marker *CD68* (green) and fibroblast marker *COL3A1* (red) and DAPI (blue) confirms the presence of macrophages in the granuloma and fibroblasts surrounding it; scale bar = 100 μ m.

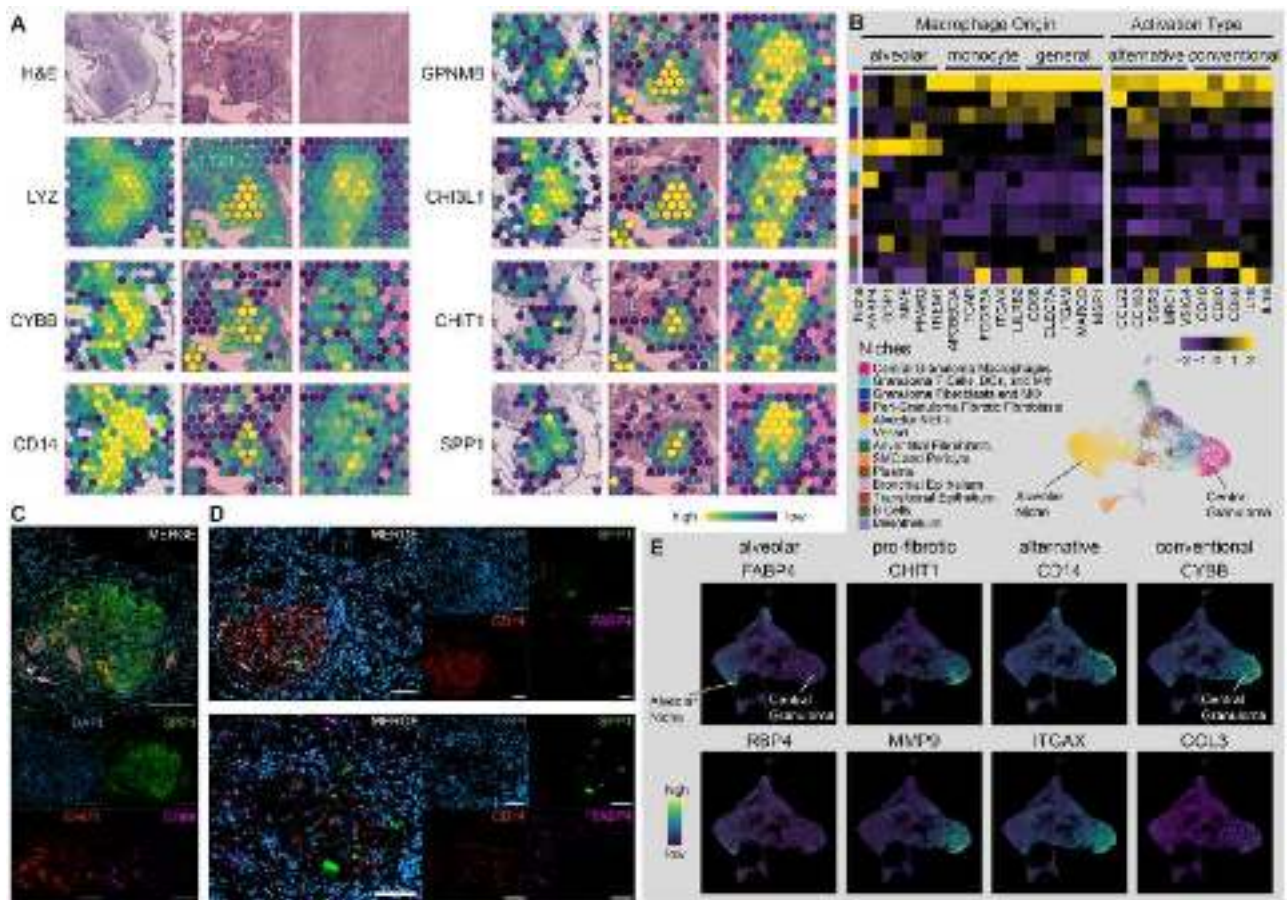


Figure 2 (A) Spatial gene expression plot displaying genes associated with proinflammatory conventional macrophages (*LYZ* and *CYBB*), monocyte-derived macrophages (*CD14*), and profibrotic alternatively activated macrophages (*CHI3L1*, *GPNMB*, *CHIT1*, *SPP1*) in a granuloma. (B) Heatmap featuring the gene expression across all subjects of pan-macrophage marker genes, macrophage origin marker genes (alveolar and monocyte), and markers for macrophage activation types alternative (M2) and conventional (M1). (C) Representative IHC protein staining of the profibrotic macrophage markers osteopontin (*SPP1*, green) and chitinase 1 (*CHIT1*, red), as well as macrophage marker *CD68* (violet) and DAPI (blue), shows their presence in the center of the granuloma but not in the surrounding tissue; scale bar = 100 μ m. (D) RNA in situ hybridization staining shows the presence of *SPP1* (green) and *CD14* (red) in the center of the granuloma, while alveolar macrophage-associated gene *FABP4* (violet) is expressed by tissue-resident macrophages; scale bar = 100 μ m. (E) UMAP feature plot displaying the expression of macrophage marker genes across all niches. Alveolar macrophage-associated genes *FABP4* and *RBP4* are highly expressed in the alveolar niche, while monocyte, alternative (M2), and conventional (M1) marker genes are expressed in the Central Granuloma Macrophages niche.

The outer granuloma fibroblast niches contain *CTHRC1*⁺ fibrotic fibroblasts

Spatial transcriptomics revealed three fibroblast niches that were identified and classified by their location and gene expression: fibroblasts near small alveolar vessels (“Adventitial Fibroblasts”), fibroblasts in fibrotic lesions near granulomas (“Peri-Granuloma Fibrotic Fibroblasts”), and fibroblasts around granulomas near immune cells (“Granuloma Fibroblasts and Macrophages”).

Granuloma-associated fibroblast niches (Peri-Granuloma Fibrotic Fibroblasts and Granuloma Fibroblasts and Macrophages) showed no clear expression of adventitial and alveolar fibroblast markers but expressed general fibroblast and myofibroblast markers (Figure 5A, Figure S11), while displaying prominent expression of the fibroblast marker genes *COL1A1*, *COL6A3*, *LUM*, and *SPARC* (Figure 5B). The Peri-Granuloma Fibrotic Fibroblasts niche was characterized by high expression of *CTHRC1*, which has recently been associated with IPF myofibroblasts.^{26,27} The Granuloma Fibroblasts and Macrophages niche was characterized by its expression of *THY1*

and *TNC* (Figure 5A). Additionally, all granuloma-associated niches showed high expression of *FAP*, a marker for collagen-producing fibroblasts in IPF.^{28,29} Pathway enrichment analysis of the Peri-Granuloma Fibrotic Fibroblasts niche revealed high levels of extracellular matrix (ECM) remodeling (GO:0030198; Figure 5C, Figure S9D). RNA ISH confirmed the expression of *COL1A1*, *CTHRC1*, and *TNC* in fibroblasts surrounding the sarcoidosis granuloma (Figure 5D). In summary, ECM remodeling was very active around the sarcoidosis granuloma, and granuloma-associated fibroblasts show similarities to fibroblasts in IPF.

Proinflammatory and profibrotic ligand-receptor interactions support granuloma integrity

Previous results demonstrated the expression and role of proinflammatory and profibrotic genes in the granuloma, but their importance in the crosstalk between granuloma niches and

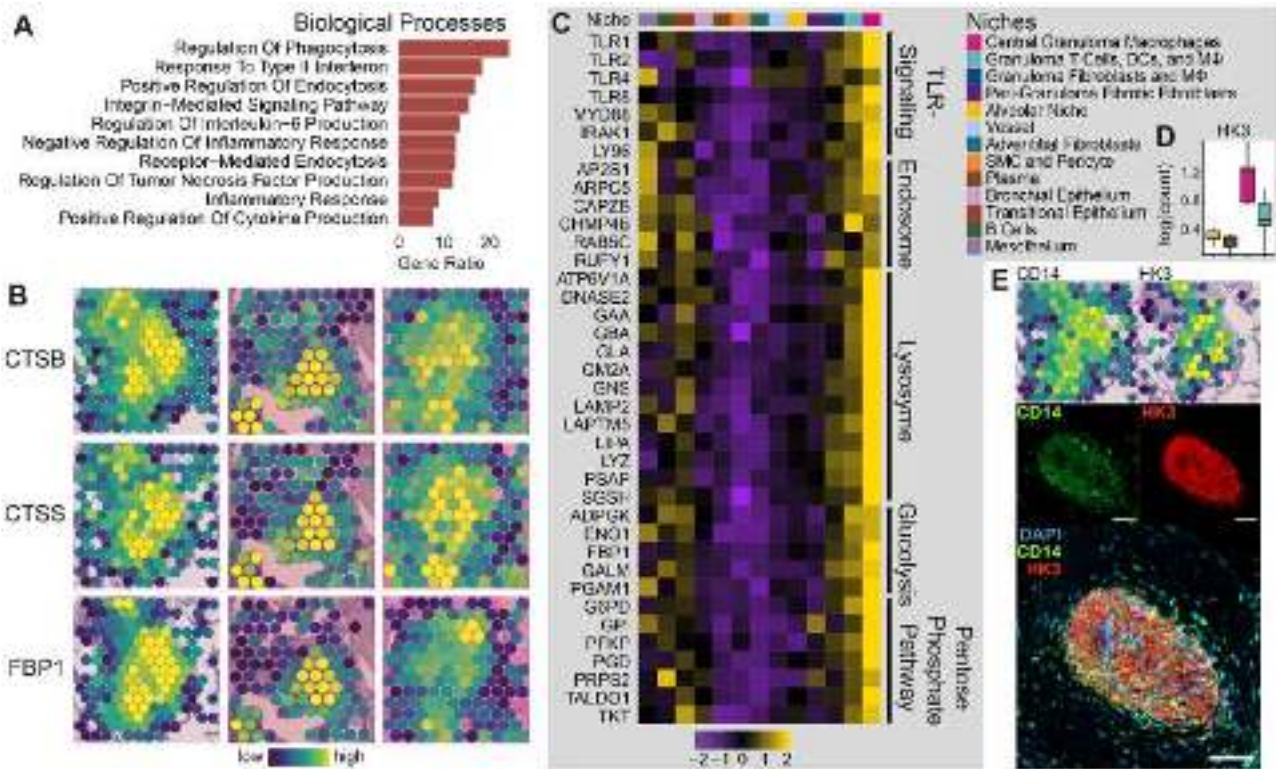


Figure 3 (A) Gene Ontology (GO) analysis of the top 200 genes expressed in the central granuloma macrophage niche by average log₂(fold change). Reference database: Biological Processes. (B) Spatial gene expression plot of lysosomal genes (*CTSB*, *CTSS*) and the pentose phosphate pathway gene *FBP1* in a granuloma. (C) Heatmap displaying the expression of genes involved in inflammatory pathways in the granuloma center. (D) Expression of *HK3* is higher in macrophage-containing granuloma niches compared to the alveolar niche and the B Cells niche. (E) Spatial gene expression of *CD14* and *HK3* in the granuloma of one patient (top), together with a representative immunohistochemistry protein staining of *CD14* (green) and *HK3* (red) in a different section of the same patient (bottom), demonstrates spatial coexpression. Nuclei are stained with DAPI (blue); scale bar = 100 μ m.

involvement in homeostasis and maintenance of the granuloma remained inconclusive. To bridge this gap, we aimed to further characterize this crosstalk by employing ligand-receptor analysis of the four granuloma-associated niches distinguished in this study.

This approach confirmed proinflammatory signaling of the Central Granuloma Macrophages niche via *CCL5* alongside profibrotic signaling through *TGF β 1*, *SPP1*, and *MMP9* (Figure 6A, Figure S12, S13). *SPP1* and *MIF* signaling were found to be initiated by the Central Granuloma Macrophages niche as the main sender, with interaction partners such as *CD44*, *CD74*, and *CXCR4* being expressed in all granuloma niches (Figure 6B). Complement signaling via *C3* was sent by all niches, as highlighted by the strong expression of *C3* in and around the granuloma, with its receptors *ITGAX* and *ITGB2* being expressed predominantly in the Central Granuloma Macrophages niche (Figure 6C). Signaling via *CXC* ligands showed strong involvement of *CXCL12*, whose receptor *CXCR4* was expressed in all granuloma-associated niches except the Fibrotic Fibroblasts niche (Figure S12). Collagen and *CXCL* chemokines interactions were especially prominent in fibroblast-containing outer niches, due to the strong gene expression of the associated ligands *COL1A1*, *COL1A2*, and *CXCL12* (Figure 6B). Spatial gene expression showed overlapping expression of ligand-receptor pairs such as *SPP1* and *CD44* within the boundaries of the granuloma (Figure 6C). The IHF stainings of ligand-receptor pairs confirmed colocalization on a protein level (Figure 6D). Taken together, active proinflammatory and profibrotic signaling persists within the chronic sarcoidosis granuloma,

with *SPP1*, *CXCL* chemokines, and collagen interactions playing a central role in this microenvironment (Figure 7).

Discussion

In this study, we employed spatial transcriptomics on lung tissue samples from nine patients with chronic pulmonary sarcoidosis to examine the gene expression in key niches in the granuloma, aiming to understand the mechanisms driving fibrotic remodeling and granuloma maintenance. Spatial transcriptomics revealed the expression of genes associated with proinflammatory and profibrotic macrophages in the Central Granuloma Macrophages niche, reflecting a hybrid proinflammatory and profibrotic niche. In the center of the granuloma, the expression of profibrotic genes such as *SPP1*, *CHI3L1*, and *CHIT1* was detected in addition to genes involved in pathogen detection and clearance, such as *TLR1*, *TLR2*, *TLR8*, *LYZ*, and *LIPA*. Pathway analysis revealed the expression of genes related to IFN- γ signaling, indicating a role of IFN- γ in chronic sarcoidosis granulomas. Granulomas were surrounded by a prominent fibroblast layer, featuring increased expression of collagen genes and *CTHRC1* with high ECM remodeling activity. Although the signal from T cells was weak compared to macrophages and fibroblasts, we were able to detect a distinct expression of receptors binding to T-cell-derived chemokines in granuloma niches.

While the presence of proinflammatory and profibrotic macrophages in the sarcoidosis granuloma has been observed before,

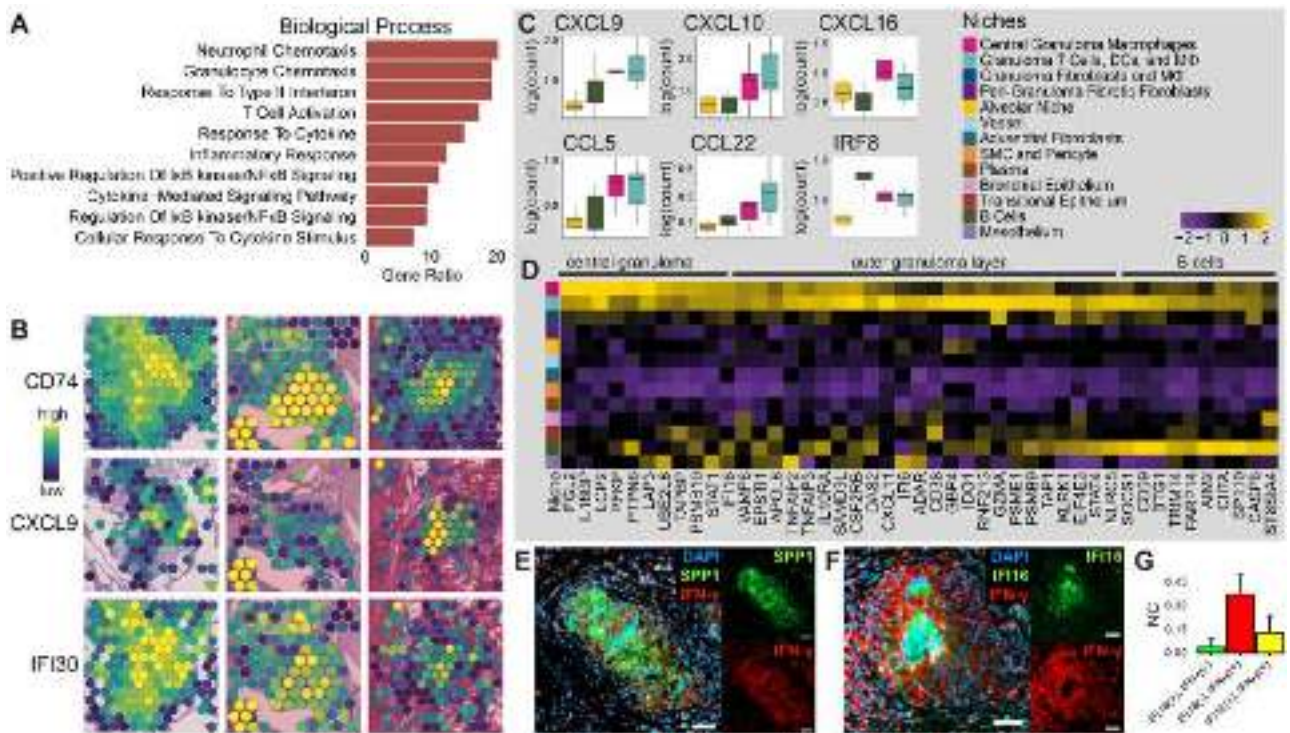


Figure 4 (A) Gene Ontology (GO) analysis of the top 200 genes expressed in the Granuloma T Cells, DCs, and M Φ niche by log₂(fold change). Reference database: Biological Processes. (B) Spatial gene expression plot of interferon gamma (IFN- γ) response-related genes in a granuloma. (C) Comparison of the expression of selected genes involved in IFN- γ response between the alveolar niche, B Cells niche, Central Granuloma Macrophages niche, and the Granuloma T Cells, Dendritic Cells (DCs), and M Φ niche. (D) Heatmap displaying the expression of genes related to IFN- γ response. (E) Representative immunohistochemistry (IHF) protein stainings of SPP1 (green) and IFN- γ (red). Nuclei are stained with DAPI (blue); scale bar = 50 μ m. (F) Representative IHF protein stainings of IFN- γ -inducible gene IFI16 (green) and IFN- γ (red). Nuclei are stained with DAPI (blue); scale bar = 50 μ m. (G) Normalized counts (NCs) of IFI16⁺ cells (green), IFN- γ ⁺ cells, and IFI16⁺IFN- γ ⁺ cells.

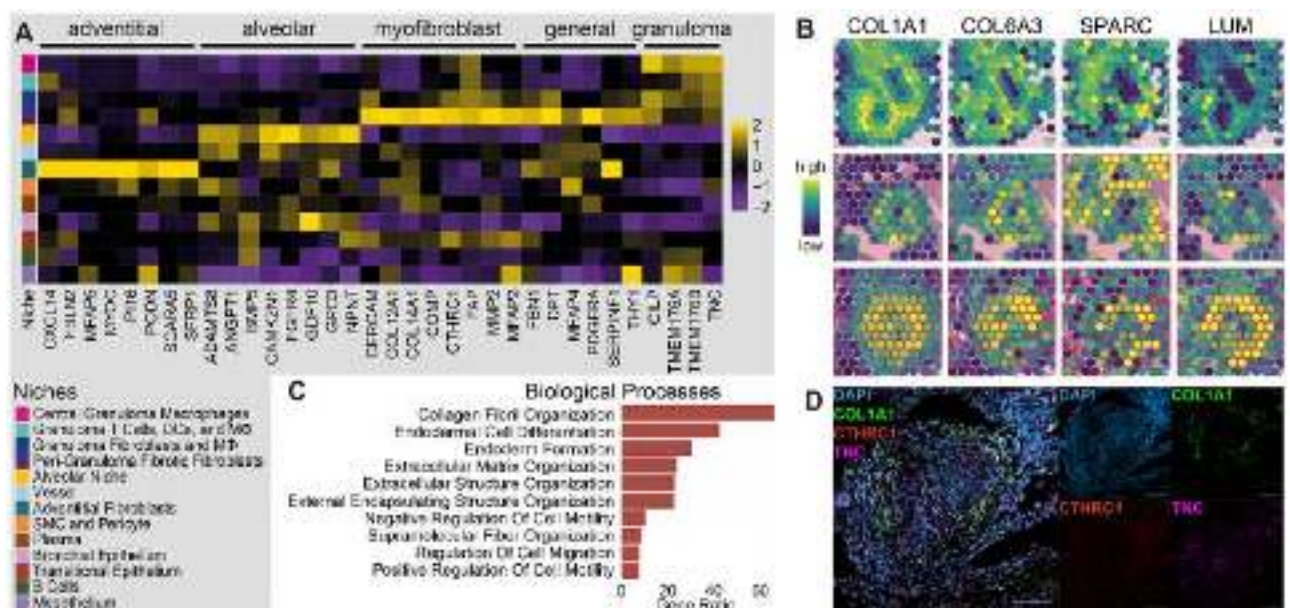


Figure 5 (A) Heatmap displaying the expression of marker genes for adventitial fibroblasts, alveolar fibroblasts, and myofibroblasts, as well as pan-fibroblast markers and genes expressed primarily in the Granuloma Fibroblasts and Macrophages niche. (B) Spatial gene expression plot of fibroblast-associated genes around a granuloma. (C) Gene Ontology (GO) analysis of the top 200 genes expressed in the Peri-Granuloma Fibrotic Fibroblasts niche by log₂(fold change). Reference database: Biological Processes. (D) RNA in situ hybridization stains show the presence of COL1A1 (green), CTHRC1 (red), and TNC (violet) surrounding the granuloma. Nuclei are stained with DAPI (blue); scale bar = 100 μ m.

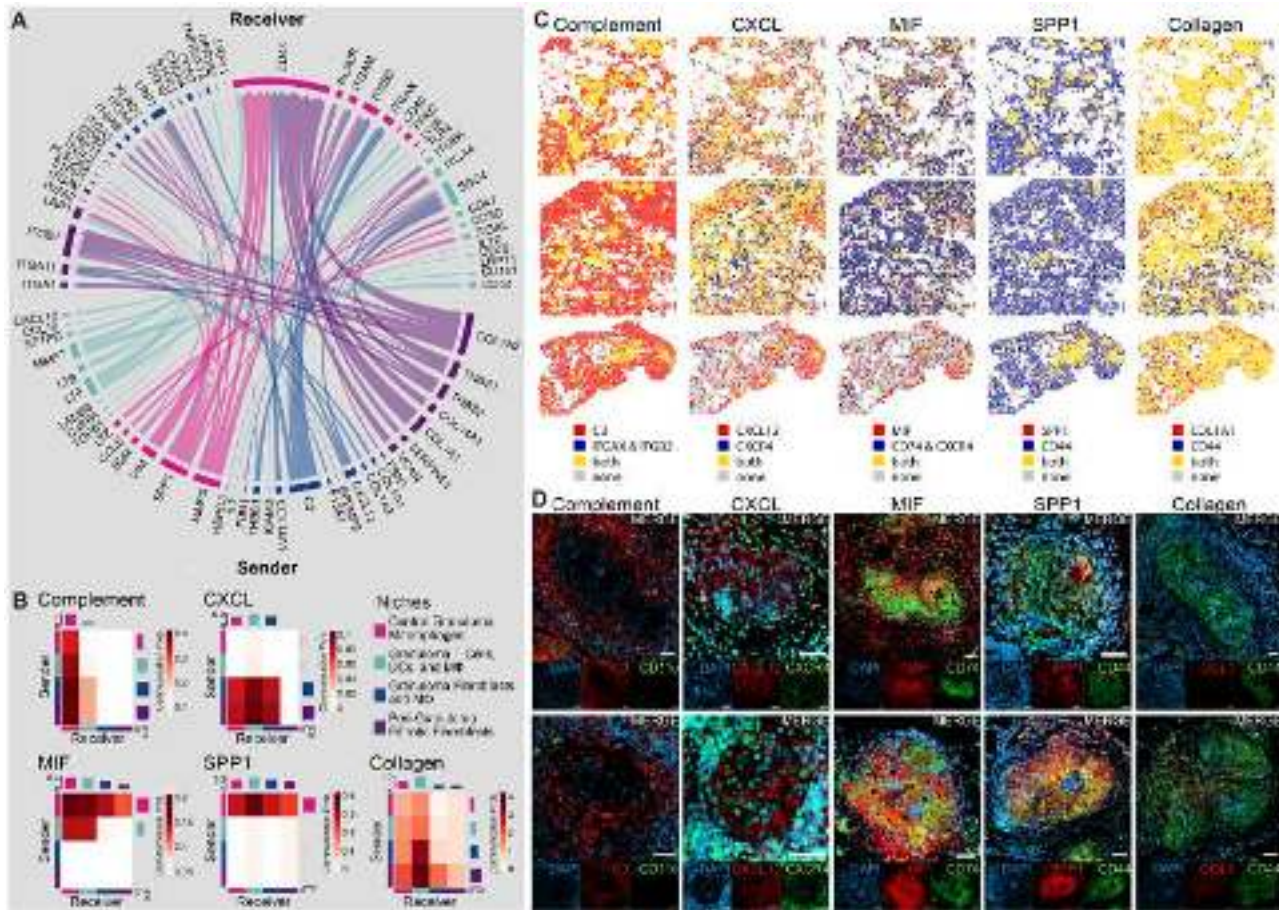


Figure 6 (A) Circos plot showing the main ligand-receptor interactions within a granuloma. (B) Heatmaps featuring ligand-receptor interactions within a granuloma. Depicted are proinflammatory (Complement, CXCL) and profibrotic (MIF, SPP1, Collagen) signaling networks. (C) Spatial gene expression of a ligand (red), its receptor (blue), the co-expression of ligand and receptor (gold), and spots with expression of neither ligand nor receptor (gray), involved in proinflammatory (Complement, CXCL) and profibrotic (MIF, SPP1, Collagen) signaling networks. (D) Representative IHC protein stainings for ligand-receptor pairs in proinflammatory (Complement, CXCL) and profibrotic (MIF, SPP1, Collagen) signaling networks. Ligand (red), receptor (green), and nuclei stained with DAPI (blue); scale bar = 50 μ m.

their significance remains uncertain. A possible explanation is that a transition from proinflammatory to profibrotic macrophages is concomitant with disease progression,^{23,30} as progressive, peri-granulomatous fibrosis is a typical characteristic of chronic sarcoidosis.³ Through this study, we found that genes associated with proinflammatory macrophages were still expressed within chronic sarcoidosis granulomas. In parallel, we observed that macrophages in the granuloma center resemble SPP1⁺ macrophages first described in IPF^{18,26} and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease (ILD).³¹ SPP1⁺ macrophages in IPF similarly show expression of *GNMB*,³² alongside *CHIT1* and *CHI3L1*, which have been associated with the development and progression of fibrosis in different kinds of ILD.³³ High serum levels of chitinase 1 and YKL-40, encoded by the *CHIT1* and *CHI3L1* genes, respectively, have been shown to correlate with disease activity and progression in sarcoidosis.^{34–37} The expression of *SPP1*, *CHIT1*, and *MMP9* by granuloma macrophages was recently shown on a single-cell level,³⁸ and *SPP1*, *CHIT1*, and *CHI3L1* were detected in the center of dermal granulomas from patients with sarcoidosis.¹⁵ Ligand-receptor analysis demonstrated the expression of *SPP1* receptors involved in ECM remodeling in granuloma proximity, such as *CD44*, supporting the role of *SPP1* in maintaining the granuloma

structure. Additionally, *CXCR4* has recently been identified as a distinct player in recruiting immune cells to sarcoidosis granulomas, complementing our spatial data.³⁹ While novel in pulmonary sarcoidosis, a similar gene expression profile of macrophages has been described in skin and muscular granuloma.^{15,39–41}

The expression of pathogen recognition receptors by granuloma macrophages supports the hypothesis that stimulation of innate immune receptors triggers granuloma formation,⁸ while their expression in chronic sarcoidosis suggests a role in granuloma maintenance. The Central Granuloma Macrophages niche displayed high expression of *TLR2*, which is involved in the recognition of mycobacteria.⁴² Moreover, we observed the expression of core lysosomal genes *LYZ*, *DNASE2*, and *LIPA* in granuloma, which are necessary for pathogen degradation. Besides their function in lysosomal degradation, these genes are involved in the granuloma formation through mTORC1/S6/STAT3 signaling.^{43–45} Additionally, we found expression of genes involved in glycolysis, a hallmark of disease progression in sarcoidosis,⁴⁶ which also supports phagocytic and bactericidal activity management.⁴⁷ Consistent with a recent report from a single-cell sequencing sarcoidosis study,²³ we observed high expression of pentose phosphate pathway-related genes in macrophages. As high pentose phosphate pathway activity is often

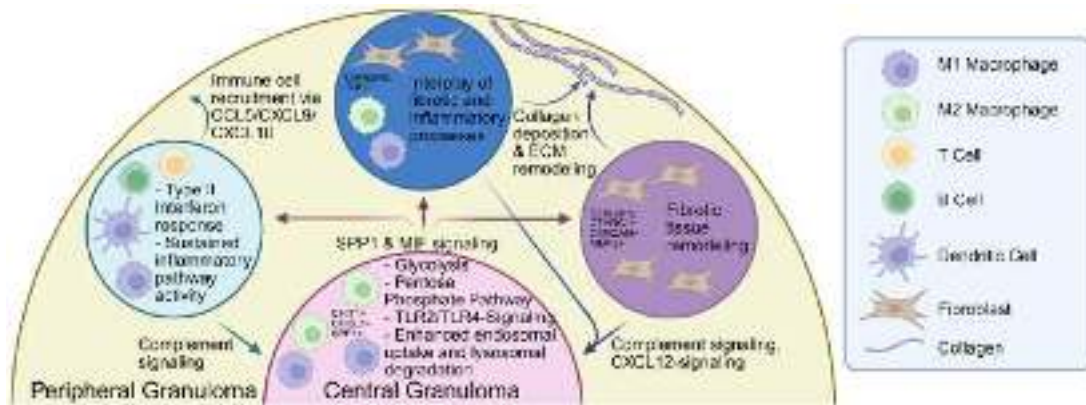


Figure 7 Summary of the observed gene expression, pathway activity, and signaling network of the 4 described granuloma-associated niches: central granuloma macrophage niche (pink half-circle); granuloma T cells, dendritic cells (DCs), and M Φ niche (light blue circle); granuloma fibroblast and macrophage niche (dark blue circle); and peri-granuloma fibrotic fibroblast niche (purple circle). Figure created in BioRender. Schupp, J. (2025), <https://BioRender.com/x20pgd8>.

observed during macrophage activation, this metabolic shift might promote granuloma formation in sarcoidosis. As a shift to glycolysis and type 2 immunity was also observed in skin granulomas,⁴⁰ it is likely that these pathways play a fundamental role in granuloma response. Whether the complement, MIF, and CXC ligand interactions observed through ligand-receptor analysis might contribute to this proinflammatory environment remains unclear.

Despite the reported involvement of alveolar macrophages in the initiation of granuloma formation,⁸ granuloma macrophages did not express alveolar macrophage marker genes. Instead, granuloma macrophages expressed the monocyte marker *CD14*. While alveolar macrophages might participate in granuloma initiation, subsequently accumulating macrophages appear to be blood-derived. This is in line with the findings that SPP1⁺ recruited macrophages were demonstrated to be derived from monocytes⁴⁸ and that monocytes are able to promote fibrosis in IPF.⁴⁹ Considering the above, the dysregulated expression of proinflammatory genes in the Central Granuloma Macrophages niche throughout granuloma maturation, combined with profibrotic genes, might be the key to understanding the maintenance of the granuloma.

Previous studies showed the importance of T-cell-derived IFN- γ in sarcoidosis granuloma formation.^{50,51} While our assay did not detect IFN- γ itself, we found that *CXCL9*, *CXCL10*, and other genes involved in IFN- γ signaling pathways were expressed in both the central granuloma and the granuloma lymphocyte niches. Additionally, IHF protein staining demonstrated IFN- γ in these chronic SPP1⁺ granulomas, indicating that IFN- γ signaling continues to play a role in sustaining established granulomas, supporting the potential use of drugs intercepting the IFN- γ pathway also in chronic patients. The importance of ongoing IFN- γ stimulation of these macrophages is underscored by evidence showing that elevated serum levels of *CXCL9* and *CXCL10* are linked to disease severity and help to regulate regulatory T-cell recruitment,^{52,53} as well as attract Th1 lymphocytes to the sarcoidosis lungs.⁵⁴

One of the most prominent complications associated with chronic sarcoidosis is loss of functional lung parenchyma due to fibrotic remodeling, which has been proposed to originate from the granuloma.⁵⁵ Granulomas in patients with chronic pulmonary sarcoidosis were surrounded by fibroblasts that expressed high levels of *CTHRC1*, a gene expressed in fibrotic lungs of patients with IPF but not in healthy people.²⁷ *CTHRC1*⁺ fibroblasts have not been described for sarcoidosis yet but may play a similar role in the development of

fibrosis around pulmonary granulomas as their counterparts in IPF. *CTHRC1* has been proposed to be both an activator and an inhibitor of Wnt/ β -catenin signaling,^{21,56} suggesting a role in the differentiation of myofibroblasts participating in pulmonary fibrosis. This underlines the finding that granuloma-associated fibroblasts express myofibroblast-associated genes but only low amounts of alveolar or adventitial fibroblast-associated genes. While *TNC* was described as an inducer of collagen expression in patients with systemic sclerosis-associated ILD,⁵⁷ it is also an endogenous activator of TLR4 signaling,⁵⁸ indicating that granuloma fibroblasts may harbor an undiscovered role in proinflammatory signaling within the granuloma.

This study is not without limitations. Statistically, our findings are mainly limited by the small sample size, with granuloma counts varying greatly between patients. As this potentially leads to skewed observations, we used averages per subject to minimize the impact of individual outliers. The small sample size limited the assessment of niche heterogeneity, potentially stemming from interindividual or microenvironmental differences. Clinically, pulmonary manifestations are most common among patients with sarcoidosis, but granulomas may form in different organs, such as lymph nodes, skin, and heart, and may differ from pulmonary ones. Similarly, interstitial, peribronchial, or subpleural granulomas might differ. Additionally, we focused solely on patients with chronic sarcoidosis who required lung transplantation due to disease severity. This limits the ability to draw conclusions about earlier stages of sarcoidosis, and the findings presented should be interpreted with caution. Gene expression in chronic granulomas does not necessarily reflect early disease stages and thus cannot distinguish between genes that drive disease or are a consequence of chronic damage. While aspects of the data reflect fibrotic granuloma remodeling, we cannot distinguish whether these changes reflect granuloma evolution or simply overlap with chronic or end-stage lung injury, like IPF. Technologically, the limited resolution of the Visium assay only allowed the characterization of cell-type niches, not of single-cell types, necessitating further in-depth studies on a larger scale.

Taken together, the sarcoidosis granuloma is a complex structure whose maintenance involves the crosstalk of diverse immune cells and fibroblasts. Using spatial transcriptomics, we explored the expression profile of the main niches within the chronic pulmonary sarcoidosis granuloma to elucidate their role within the granuloma. Our data suggest that macrophages present in the Central Granuloma Macrophages niche possess seemingly contradictory functions, as they express genes involved in path-

ogen clearance and fibrotic ECM remodeling. While it is unclear if macrophages exhibiting a proinflammatory M1 phenotype later acquire the profibrotic M2 phenotype or whether two macrophage populations both occupy the central granuloma, forming an armed-and-ready proinflammatory and profibrotic M1/M2 hybrid niche, single-cell analysis is required to uncover this conundrum. Nonetheless, a fine balance of proinflammatory and profibrotic factors appears to be the key to granuloma maintenance. Both SPP1⁺ macrophages and CTHRC1⁺ fibroblasts previously discovered in IPF emerged in our chronic sarcoidosis dataset. Translation from IPF research to sarcoidosis might advance chronic sarcoidosis research or open new avenues for sarcoidosis treatment in the future.

Acknowledgments

The authors thank the Research Core Unit for Laser Microscopy and the Research Core Unit Genomics (RCUG) at Hannover Medical School for their support, as well as all study participants for their permission to use their respective tissue specimens for research.

Author contributions

J.C.S., L.N., and T.W. conceived the project. J.C.S. acquired funding. L.C. and L.G. performed spatial barcoding and library preparation. L.C., L.G., and S.B. performed IHF and ISH. Histologic images were evaluated by L.N. and D.J. H.Y., L.C., J.R., L.N., and J.C.S. performed data analysis. Patient recruitment and care were performed by M.G., J.G., R.W., T.G., B.S., and J.C.S. Sample procurement was performed and supervised by F.I., J.C.K., D.J., and L.N. T.W., J.H., T.G., J.C.K., B.S., M.M.H., N.K., A.P., and D.J. provided critical interpretation, annotation, and comment on data and the manuscript. S.Y.L. and I.V.Y. provided supplemental data for validation. Y.L., C.F., L.N., and J.C.S. supervised the project. L.C., H.Y. and J.C.S. drafted the manuscript, which was reviewed, edited, and approved by all authors.

Supplementary material

Supplementary material is available at *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* online.

Conflicts of interest

Please see the ICMJE disclosure forms, which have been provided as supplementary material.

Funding

J.C.S. is supported by the Fritz Thyssen Foundation (10.21.2.021MN) and the Else Kröner-Fresenius Foundation (2023_EKCS.18). L.N. and J.C.S. are supported by the Ann Theodore Foundation and the German Center for Lung Research (FKZ 82DZL002B1, FKZ 82DZL002C1, and FKZ 82DZLT82C1).

Data availability

This article has an online data supplement, which is accessible at the Supplements tab.

Artificial intelligence disclaimer

No artificial intelligence tools were used in writing this manuscript.

References

- Schupp JC, Freitag-Wolf S, Bargagli E, et al. Phenotypes of organ involvement in sarcoidosis. *Eur Respir J*. 2018;51:1700991. <https://doi.org/10.1183/13993003.00991-2017>
- Baughman RP, Teirstein AS, Judson MA, et al.; Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS) research group. Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1885-1889. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.10.2104046>
- Patterson KC, Strek ME. Pulmonary fibrosis in sarcoidosis. Clinical features and outcomes. *Ann Am Thorac Soc*. 2013;10:362-370. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201303-069FR>
- Thomson AD. The pathology of sarcoidosis. *Postgrad Med J*. 1958;34:248-253. <https://doi.org/10.1136/pgmj.34.391.248>
- Schupp JC, Vukmirovic M, Kaminski N, Prasse A. Transcriptome profiles in sarcoidosis and their potential role in disease prediction. *Curr Opin Pulm Med*. 2017;23:487-492. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000403>
- Broos CE, van Nimwegen M, Hoogsteden HC, Hendriks RW, Kool M, van den Blink B. Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis. *Front Immunol*. 2013;4:437. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00437/abstract>
- Mishra BB, Poulter LW, Janossy G, James DG. The distribution of lymphoid and macrophage like cell subsets of sarcoid and Kveim granulomata: possible mechanism of negative PPD reaction in sarcoidosis. *Clin Exp Immunol*. 1983;54:705-715.
- Zhang H, Costabel U, Dai H. The role of diverse immune cells in sarcoidosis. *Front Immunol*. 2021;12:788502. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.788502>
- Nardi A, Brillet P-Y, Letoumelin P, et al. Stage IV sarcoidosis: comparison of survival with the general population and causes of death. *Eur Respir J*. 2011;38:1368-1373. <https://doi.org/10.1183/09031936.00187410>
- Jeny F, Uzunhan Y, Lacroix M, et al. Predictors of mortality in fibrosing pulmonary sarcoidosis. *Respir Med*. 2020;169:105997. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105997>
- Kirkil G, Lower EE, Baughman RP. Predictors of mortality in pulmonary sarcoidosis. *Chest*. 2018;153:105-113. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.07.008>
- Ardini-Poleske ME, Clark RF, Ansong C, et al.; LungMAP Consortium. LungMAP: the molecular atlas of lung development program. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;313:L733-L740. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00139.2017>
- Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al. QuPath: open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017;7:16878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Schmidt U, Weigert M, Broaddus C, Myers G. Cell detection with star-convex polygons. In: *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018*. Lecture Notes in Computer Science(), Vol 11071. Cham: Springer, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00934-2_30
- Krausgruber T, Redl A, Barreca D, et al. Single-cell and spatial transcriptomics reveal aberrant lymphoid developmental programs driving granuloma formation.

- Immunity*. 2023;56:289-306.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.01.014>
16. Liao S-Y, Atif SM, Mould K, et al. Single-cell RNA sequencing identifies macrophage transcriptional heterogeneities in granulomatous diseases. *Eur Respir J*. 2021;57:2003794. <https://doi.org/10.1183/13993003.03794-2020>
 17. Oliveros JC, Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams 2007. 2015. Accessed August 28, 2025. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
 18. Morse C, Tabib T, Sembrat J, et al. Proliferating SPP1/MERTK-expressing macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2019;54:1802441. <https://doi.org/10.1183/13993003.02441-2018>
 19. Zhao T, Su Z, Li Y, Zhang X, You Q. Chitinase-3 like-protein-1 function and its role in diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5:201. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00303-7>
 20. Kitamoto S, Egashira K, Ichiki T, et al. Chitinase inhibition promotes atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Am J Pathol*. 2013;183:313-325. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.04.003>
 21. Liu J, Ma P, Lai L, et al. Transcriptional and immune landscape of cardiac sarcoidosis. *Circ Res*. 2022;131:654-669. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.320449>
 22. Schupp JC, Adams TS, Cosme C, et al. Integrated single-cell atlas of endothelial cells of the human lung. *Circulation*. 2021;144:286-302. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052318>
 23. Nakamizo S, Sugiura Y, Ishida Y, et al. Activation of the pentose phosphate pathway in macrophages is crucial for granuloma formation in sarcoidosis. *J Clin Invest*. 2023;133:e171088. <https://doi.org/10.1172/JCI171088>
 24. Liu J, Li F, Ping Y, et al. Local production of the chemokines CCL5 and CXCL10 attracts CD8+ T lymphocytes into esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6:24978-24989. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4617>
 25. Kohli K, Pillarisetty VG, Kim TS. Key chemokines direct migration of immune cells in solid tumors. *Cancer Gene Ther*. 2022;29:10-21. <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00303-x>
 26. Adams TS, Schupp JC, Poli S, et al. Single-cell RNA-seq reveals ectopic and aberrant lung-resident cell populations in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci Adv*. 2020;6:eaba1983. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1983>
 27. Tsukui T, Sun K-H, Wetter JB, et al. Collagen-producing lung cell atlas identifies multiple subsets with distinct localization and relevance to fibrosis. *Nat Commun*. 2020;11:1920. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15647-5>
 28. Acharya PS, Zukas A, Chandan V, Katzenstein ALA, Puré E. Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol*. 2006;37:352-360. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.11.020>
 29. Yang P, Luo Q, Wang X, et al. Comprehensive analysis of fibroblast activation protein expression in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2023;207:160-172. <https://doi.org/10.1164/rccm.202110-2414OC>
 30. Miedema J, Cinetto F, Smed-Sörensen A, Spagnolo P. The immunopathogenesis of sarcoidosis. *J Autoimmun*. 2024;149:103247. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2024.103247>
 31. Christmann RB, Sampaio-Barros P, Stifano G, et al. Association of interferon- and transforming growth factor β -regulated genes and macrophage activation with systemic sclerosis-related progressive lung fibrosis. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66:714-725. <https://doi.org/10.1002/art.38288>
 32. Wang J, Zhang X, Long M, et al. Macrophage-derived GPNMB trapped by fibrotic extracellular matrix promotes pulmonary fibrosis. *Commun Biol*. 2023;6:136. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04333-5>
 33. Lee CG, Herzog EL, Ahangari F, et al. Chitinase 1 is a biomarker for and therapeutic target in scleroderma-associated interstitial lung disease that augments TGF- β 1 signaling. *J Immunol*. 2012;189:2635-2644. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201115>
 34. Grosso S, Margollicci MA, Bargagli E, et al. Serum levels of chitotriosidase as a marker of disease activity and clinical stage in sarcoidosis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2004;64:57-62. <https://doi.org/10.1080/00365510410004092>
 35. Bargagli E, Bennett D, Maggiorelli C, et al. Human chitotriosidase: a sensitive biomarker of sarcoidosis. *J Clin Immunol*. 2013;33:264-270. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9754-4>
 36. Kruit A, Grutters JC, Ruven HJT, van Moorsel CCM, van den Bosch JMM. A CHI3L1 gene polymorphism is associated with serum levels of YKL-40, a novel sarcoidosis marker. *Respir Med*. 2007;101:1563-1571. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.12.006>
 37. Johansen JS, Milman N, Hansen M, Garbarsch C, Price PA, Gaudal N. Increased serum YKL-40 in patients with pulmonary sarcoidosis—a potential marker of disease activity? *Respir Med*. 2005;99:396-402. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2004.09.016>
 38. Moore C, Liao S-Y, Wood C, et al. Single cell transcriptome signatures of sarcoidosis in lung immune cell populations. *Genomics*. bioRxiv. 2025. Accessed September 1, 2025. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2025.01.20.633917>
 39. Sati S, Huang J, Kersh AE, et al. Recruitment of CXCR4+ type 1 innate lymphoid cells distinguishes sarcoidosis from other skin granulomatous diseases. *J Clin Invest*. 2024;134:e178711. <https://doi.org/10.1172/JCI178711>
 40. Daccache J, Park E, Junejo M, et al. Spatial transcriptomics reveals organized and distinct immune activation in cutaneous granulomatous disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2024;154:1216-1231. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2024.07.021>
 41. Lequain H, Déglétagne C, Streichenberger N, et al. Spatial transcriptomics reveals signatures of histopathological changes in muscular sarcoidosis. *Cells*. 2023;12:2747. <https://doi.org/10.3390/cells12232747>
 42. Hu W, Spaink HP. The role of TLR2 in infectious diseases caused by mycobacteria: from cell biology to therapeutic target. *Biology*. 2022;11:246. <https://doi.org/10.3390/biology11020246>
 43. Crouser ED, Locke LW, Julian MW, et al. Phagosome-regulated mTOR signalling during sarcoidosis granuloma biogenesis. *Eur Respir J*. 2021;57:2002695. <https://doi.org/10.1183/13993003.02695-2020>
 44. Adouli J, Fried A, Swier R, Ghio A, Petrache I, Tilley S. Cellular recycling gone wrong: the role of dysregulated autophagy and hyperactive mTORC1 in the pathogenesis of sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2023;40:e2023016. <https://doi.org/10.36141/svdl.v40i2.13498>

45. Pacheco Y, Lim CX, Weichhart T, Valeyre D, Bentaher A, Calender A. Sarcoidosis and the mTOR, Rac1, and autophagy triad. *Trends Immunol.* 2020;41:286-299. <https://doi.org/32122794>
46. Linke M, Pham HTT, Katholnig K, et al. Chronic signaling via the metabolic checkpoint kinase mTORC1 induces macrophage granuloma formation and marks sarcoidosis progression. *Nat Immunol.* 2017;18:293-302. <https://doi.org/10.1038/ni.3655>
47. Ryan DG, O'Neill LAJ. Krebs cycle reborn in macrophage immunometabolism. *Annu Rev Immunol.* 2020;38:289-313. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-081619-104850>
48. Zhang M, Zhang J, Hu H, et al. Multiomic analysis of monocyte-derived alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Transl Med.* 2024;22:598. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05398-y>
49. Gibbons MA, MacKinnon AC, Ramachandran P, et al. Ly6C^{hi} monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:569-581. <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1719OC>
50. Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, et al. IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN- γ production in sarcoid lungs. *J Immunol.* 2001;166:642-649. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.642>
51. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, et al. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *J Exp Med.* 2006;203:359-370. <https://doi.org/10.1084/jem.20050648>
52. 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>
53. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol.* 2011;89:207-215. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.158>
54. Nishioka Y, Manabe K, Kishi J, et al. CXCL9 and 11 in patients with pulmonary sarcoidosis: a role of alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2007;149:317-326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03423.x>
55. Bandyopadhyay D, Mirsaeidi MS. Sarcoidosis-associated pulmonary fibrosis: joining the dots. *Eur Respir Rev.* 2023;32:230085. <https://doi.org/10.1183/16000617.0085-2023>
56. Lam AP, Gottardi CJ. β -Catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target. *Curr Opin Rheumatol.* 2011;23:562-567. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32834b3309>
57. Bhattacharyya S, Wang W, Morales-Nebreda L, et al. Tenascin-C drives persistence of organ fibrosis. *Nat Commun.* 2016;7:11703. <https://doi.org/10.1038/ncomms11703>
58. Suzuki H, Fujimoto M, Kawakita F, et al. Toll-like receptor 4 and tenascin-C signaling in cerebral vasospasm and brain injuries after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl.* 2020;127:91-96. https://doi.org/10.1007/978-3-030-04615-6_15

Die räumliche Transkriptomik deckt hybride, proinflammatorische und profibrotische Zellnischen in pulmonalen Granulomen von Patienten mit chronischer Sarkoidose auf.

Leonard Christian^{1,2,‡}, Hande Yilmaz^{1,2,‡}, Jannik Ruwisch^{1,2}, Leon Giercke^{1,2}, Benjamin Seeliger^{1,2}, Jan C. Kamp^{1,2}, Sirvan Bayraktar¹, Raphael Ewen^{1,2}, Theresa Graalmann^{2,3,4,‡}, Jan Fuge^{1,2}, Mark Greer^{1,2,‡}, Fabio Ius^{2,5,‡}, Tobias Welte^{1,2,†}, Shu-Yi Liao⁶, Ivana V. Yang^{7,8}, Jens M. Hohlfeld^{1,2,9}, Marius M. Hoepfer^{1,2}, Jens Gottlieb^{1,2}, Naftali Kaminski¹⁰, Antje Prasse^{1,2,9,11}, Danny Jonigk^{2,12,13}, Yang Li^{14,15,16,17,18}, Christine Falk^{2,19}, Lavinia Neubert^{2,12,‡}, Jonas C. Schupp^{1,2,9,10,‡,*}

¹Abteilung für Pneumologie und Infektionskrankheiten, Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Hannover, Deutschland

²Biomedizinische Forschung bei terminalen und obstruktiven Lungenerkrankungen (BREATH), Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL), Hannover, Deutschland

³Nachwuchsforschungsgruppe Translationale Immunologie, TWINCORE, Zentrum für Experimentelle und Klinische Infektionsforschung, ein Gemeinschaftsprojekt des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung (HZI) und der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH), Hannover, Deutschland

⁴Abteilung für Rheumatologie und Immunologie, Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Hannover, Deutschland

⁵Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie, Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Hannover, Deutschland

⁶Medizinische Abteilung, National Jewish Health, Denver, CO, Vereinigte Staaten

⁷Medizinische Fakultät, Anschutz Medical Campus der Universität von Colorado, Aurora, CO, USA

⁸Abteilung für Epidemiologie, Colorado School of Public Health, Aurora, CO, USA

⁹Abteilung Atemwegsforschung, Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Hannover, Deutschland

¹⁰Abteilung für Pneumologie, Intensivmedizin und Schlafmedizin, Yale-Universität, New Haven, CT, USA

¹¹Klinik für Pneumologie, Universitätsspital Basel, Universität Basel, Basel, Schweiz

¹²Institut für Pathologie, Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Hannover, Deutschland

¹³Universitätsklinik der RWTH Aachen, Aachen, Deutschland

¹⁴Computational Biology for Individualised Medicine, TWINCORE, Center for Experimental and Clinical Infection Research, ein Joint Venture zwischen dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) und der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH), Hannover, Deutschland

¹⁵Abteilung für Computergestützte Biologie für personalisierte Medizin, Zentrum für personalisierte Infektionsmedizin (CiIM), ein Gemeinschaftsprojekt des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung (HZI) und der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH), Hannover, Deutschland

¹⁶Niedersächsisches Zentrum für Künstliche Intelligenz und Kausalmethoden in der Medizin (CAIMed), Hannover, Deutschland

¹⁷Abteilung für Innere Medizin und Radboud-Zentrum für Infektionskrankheiten, Radboud Universitätsklinikum, Nijmegen, Niederlande

¹⁸Exzellenzcluster zur Auflösung von Infektionsanfälligkeit (RESIST), Hannover, Deutschland

¹⁹Institut für Transplantationsimmunologie, Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Hannover, Deutschland

*Korrespondierender Autor: Jonas C. Schupp, Abteilung für Pneumologie und Infektionskrankheiten, Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Hannover, Deutschland (schupp.jonas@mh-hannover.de, jonas.schupp@web.de)

[‡]Gestorben am 10. März 2024.

[†]Gleichberechtigt beigetragen.

Einige Ergebnisse dieser Studien wurden bereits in Form eines Preprints veröffentlicht (bioRxiv, 12. Februar 2025). <https://doi.org/10.1101/2025.02.11.636632>.

Abstrakt

Hintergrund: Die Sarkoidose ist eine Erkrankung unbekannter Ursache, die durch die Bildung von Ansammlungen von Immunzellen (Granulomen) in der Lunge und anderen Geweben gekennzeichnet ist. Chronische Sarkoidose kann zu Lungenfibrose führen.

Ziel: Ziel dieser Studie war es, mithilfe der räumlichen Transkriptomik zelluläre Nischen innerhalb von Lungengranulomen bei Patienten mit chronischer Sarkoidose zu entschlüsseln.

Methoden: Mithilfe der Visium-Plattform (10x Genomics) wurde eine räumliche Transkriptomik an neun Granulom-haltigen Lungenexplantaten von Patienten mit Sarkoidose durchgeführt. Die Validierung der Genexpression erfolgte durch Immunhistofluoreszenzfärbung von Proteinen und RNA-In-situ-Hybridisierung.

Ergebnisse: Die räumliche Genexpression umfasste 30.587 Genexpressionsspots und 173 Granulome. Ein CD68-Die Makrophagennische befand sich im Zentrum des Granuloms, mit einem CD3-T-Zelle und CD20-B-Zell-Nische in unmittelbarer Nähe, umgeben von einem COL3A1-Fibroblastennische. In der Makrophagennische des zentralen Granuloms findet eine Expression der profibrotischen Makrophagengene statt. *SPP1*, *CHIT1*,

Erhalten: 14. Februar 2025. **Akzeptiert:** 5. Oktober 2025

© Die Autoren 2026. Veröffentlicht von Oxford University Press im Auftrag der American Thoracic Society.

Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution-NonCommercial License verbreitet wird (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Diese Lizenz erlaubt die nichtkommerzielle Weiterverwendung, Verbreitung und Vervielfältigung in beliebigen Medien, sofern das Originalwerk ordnungsgemäß zitiert wird. Für die kommerzielle Weiterverwendung kontaktieren Sie bitte [Kontaktinformationen einfügen], reprints@oup.com. Für Nachdruck- und Übersetzungsrechte an Nachdruckern wenden Sie sich bitte an uns. Alle weiteren Genehmigungen erhalten Sie über unseren RightsLink-Service über den Link „Genehmigungen“ auf der Artikelseite unserer Website. Für weitere Informationen kontaktieren Sie uns bitte journals.permissions@oup.com.

Und *CHI3L1* Es wurden Gene beobachtet, deren Expression kürzlich für Makrophagen bei idiopathischer Lungenfibrose beschrieben wurde. Zusätzlich wurden proinflammatorische Makrophagengene in der zentralen Granulom-Makrophagennische exprimiert, was darauf hindeutet, dass die Makrophagen für den lysosomalen Abbau vorbereitet und zur Phagozytose bereit waren. Innere Granulomnischen zeigten eine höhere Expression von Interferon-gamma (IFN- γ)-induzierbaren Genen. Höhere Kollagen- und *CTHRC1* in Fibroblasten-haltigen Granulomnischen wurde eine Expression beobachtet, die charakteristisch für profibrotisches Lungenremodeling ist. Die Ligand-Rezeptor-Analyse identifizierte proinflammatorische und profibrotische Interaktionen zwischen den Granulomnischen.

Abschluss:Zusammengenommen bilden die Makrophagen im Zentrum des Sarkoidose-Granuloms eine Art „aktivierte und bereite“ Hybrid aus proinflammatorischen und profibrotischen Zellen, die das Fortbestehen des Granuloms durch kontinuierliche IFN- γ -Stimulation und Kollagenexpression durch Fibroblasten in der Peripherie des Granuloms unterstützen.

SchlüsselwörterLungenfibrose, Fluoreszenzmikroskopie, Interferon-gamma, Homöostase, extrazelluläre Matrix, Makrophagen

Kurzkommentar

Wissenschaftlicher Kenntnisstand zum Thema:Sarkoidose ist eine chronische Entzündungskrankheit, die vorwiegend die Lunge betrifft und zur Bildung von Ansammlungen von Immunzellen, sogenannten Granulomen, führt. Diese Granulome können die normale Gewebestruktur stören und so Organfunktionsstörungen und Vernarbungen verursachen. Die zellulären Interaktionen, die diese Strukturen aufrechterhalten und zu chronischer Entzündung und Fibrose beitragen, sind jedoch noch weitgehend unerforscht. Ein tieferes Verständnis der Granulomorganisation und der Zell-Zell-Interaktionen ist entscheidend für die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Reduzierung von Entzündungen und zur Prävention von Fibrose bei Sarkoidose.

Was diese Studie zum Forschungsgebiet beiträgt:Mithilfe räumlicher Transkriptomik und Fluoreszenzbildgebung kartierte diese Studie die verschiedenen Zelltypen und Kommunikationsnetzwerke innerhalb von Granulomen bei chronischer Sarkoidose. Wir identifizierten SPP1-Makrophagen im Zentrum des Granuloms zeigten Genexpressionsmuster, die mit proinflammatorischen und profibrotischen Signalwegen verknüpft sind, was darauf hindeutet, dass sie eine persistierende Entzündung antreiben könnten. Wir fanden außerdem heraus, dass diese Makrophagen mit Fibroblasten in der äußeren Schicht des Granuloms kommunizieren und möglicherweise die bei chronischen Erkrankungen häufig beobachtete fibrotische Vernarbung fördern. Diese Erkenntnisse liefern ein klareres Bild der Organisation und Funktion von Granulomen und weisen auf potenzielle molekulare Signalwege hin, die für präzisere Therapien der Sarkoidose genutzt werden könnten.

Einführung

Die Sarkoidose ist eine Multiorganerkrankung, die durch nicht-verkäsendes Granulomgewebe und lokale Entzündungen gekennzeichnet ist. Lunge und intrathorakale Lymphknoten sind die am häufigsten betroffenen Organe. Bei vielen Patienten bilden sich diese Granulome ohne spezifische Behandlung zurück, während in etwa 20 % der Fälle eine chronische Sarkoidose zu Lungenfibrose oder Organversagen führen kann.^{2,3} Da Granulome das histologische Kennzeichen der Sarkoidose sind, wurden ihre Entstehung, Struktur und Bedeutung in den letzten Jahrzehnten untersucht.^{4,5} Die genauen Wechselwirkungen auf zellulärer Ebene und die Faktoren, die bei der Persistenz von Granulomen eine Rolle spielen, sind jedoch weiterhin unklar.

Der erste Schritt zur Granulombildung wird von sessilen Alveolarmakrophagen durchgeführt, die auf ein spezifisches, aber noch unbekanntes Antigen in der Lunge reagieren.⁶ Anschließend werden Monozyten in die entzündete Region gelockt und bilden den Kern des Granuloms, wo sie einen epitheloiden Phänotyp annehmen oder mit mehrkernigen Riesenzellen verschmelzen.⁷ Die mittlere Schicht des Granuloms besteht aus rekrutierten Lymphozyten, einschließlich CD8-T-Zellen, T-Helferzellen (Th) Th1-Zellen, Th17/Th17.1-Zellen und B-Zellen.⁸ Bei Patienten mit chronischer Sarkoidose lagern sich Fibroblasten am Rand des Granuloms ab und bilden die äußere Granulomschicht. Obwohl die Bildung dieser Fibroblastenschicht ein wichtiger Schritt im fibrotischen Gewebeumbau sein kann, der die Prognose für Sarkoidosepatienten drastisch verschlechtert, wurden bisher nur wenige Fortschritte bei der Charakterisierung dieser Fibroblasten erzielt.⁹⁻¹¹

In dieser Studie nutzten wir die räumliche Transkriptomik, um die Expressionsprofile, potenziellen Ursprünge und Wechselwirkungen zwischen zellulären Nischen innerhalb des pulmonalen Granuloms von Patienten mit chronischer Sarkoidose zu untersuchen, was letztendlich zur pulmonalen Erkrankung beitragen könnte.

Fibrose. Die wichtigsten Ergebnisse wurden mittels Immunhistofluoreszenz (IHF)-Proteinfärbungen und In-situ-RNA-Hybridisierung (ISH) validiert.

Methoden

Die Methoden sind im Anhang detailliert beschrieben und werden hier nur kurz zusammengefasst. Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission (10142_BO_K_2022) genehmigt. Die grundlegenden Patientenmerkmale sind in der Tabelle dargestellt. [Tabelle 1](#) und [Abbildung S1](#) Die

Verarbeitung von menschlichen Lungengewebeproben

Granulomhaltige Lungenproben von neun Sarkoidose-Patienten, die aufgrund ihrer Erkrankung eine Lungentransplantation erhalten hatten und ihre Einwilligung zur Studienteilnahme gegeben hatten, wurden aus der DZL-Biobank entnommen. Die formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeproben wurden mit einem Mikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, um das Vorhandensein von Granulomen zu bestätigen. Die RNA-Qualität wurde mittels RNA-Isolierung mit dem RNeasy FFPE Kit (Qiagen) und anschließender DV200-Messung auf einem Bioanalyzer nach Standardprotokollen überprüft.

Räumliche Transkriptomik

Die räumliche Transkriptomik und die Bibliothekserstellung erfolgten mit der Visium-Plattform von 10x Genomics gemäß den Herstellerangaben. Fragmentgrößenverteilung und -konzentration wurden vor der Sequenzierung mit einem Bioanalyzer bestimmt. Die DNA-Bibliotheksequenzierung wurde auf dem NovaSeq 6000 (Illumina) unter Verwendung der zugehörigen Reagenzien und Standardverfahren durchgeführt.

Tabelle 1 Patientenmerkmale (Sarkoidose, n = 9).

Merkmal	Wert
Weiblich/männlich, Nr.	2/7
Medianes Alter bei Diagnosestellung, Jahre [Q1/Q3]	36 [31/39]
Medianes Alter bei Lungentransplantation, Jahre [Q1/Q3]	56 [44-59]
Medianer FVC-Wert in % vor Behandlungsbeginn [Q1/Q3]	45 [38-56]
Medianer DLCO-Wert in % vor Behandlungsbeginn [Q1/Q3]	32 [16-45] ^a
Pulmonale Hypertonie, ja/nein, Nein. Prednison, ja/nein, Nein.	6/3
Tadalafil, ja/nein, Nein.	4/5
Endothelin-Blocker, ja/nein, Nein.	3/6
Scadding-Typ, I/II/III/IV, Nein.	1/8
	0/2/0/7

Grundlegende Merkmale der in den Datensatz eingeschlossenen Sarkoidose-Patienten. Kontinuierliche Variablen werden als Median und Interquartilsabstand dargestellt. Das Alter wird in Jahren angegeben. FVC und DLCO werden als Prozentsatz der Ausgangswerte berechnet. Alle Lungenfunktionswerte geben die letzte verfügbare Lungenfunktion vor der Lungentransplantation an. Abkürzungen: DLCO, Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid; FVC, forcierte Vitalkapazität; Q, Quartil. ^aFehlende Werte.

Visium-Datenerfassung, -verarbeitung und -analyse

Die Verarbeitung und Visualisierung der räumlichen Expressionsdaten erfolgte mit dem „Seurat“-Paket in R. Neun Visium-Proben bestanden die Qualitätsprüfung. Mithilfe eines Clustering-Algorithmus, der auf der Optimierung der gemeinsamen nächsten Nachbarn basiert, wurde ein Zellcluster identifiziert. Die Cluster wurden mit LungMap annotiert.¹² und kanonische Zelltypmarker (Tabelle S1) Die Marker-Gene für jedes Cluster wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentests generiert, wie er in der Funktion FindAllMarkers des Seurat R-Pakets implementiert ist (Tabelle S2) Um das Problem multipler Tests zu korrigieren,¹³ Die Werte wurden mithilfe der Benjamini-Hochberg-Methode zur Korrektur der Fehlendeckungsrate (FDR) angepasst. Gene mit FDR-korrigierten Werten P Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Zu den nachfolgenden Analysen gehörten die Gen-Set-Anreicherung und die Ligand-Rezeptor-Analyse zur Untersuchung von Nischen-Nischen-Signalnetzwerken.

Validierung

Zur Bestätigung der Ergebnisse der räumlichen Transkriptomik wurden an Objektträgern von jeweils vier Patienten der räumlichen Transkriptomik-Kohorte mehrfarbige Immunfluoreszenz-Proteinfärbungen und RNA-ISH durchgeführt. Die RNA-ISH erfolgte nach dem Standardprotokoll des RNAscope-Assays (ACD Bio), während die IHF-Proteinfärbungen nach dem Standardverfahren der Entparaffinierung, Entkreuzung, Blockierung, Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern, Quenching und Eindecken durchgeführt wurden. Die zu validierenden Protein- und RNA-Zielsequenzen basierten auf ihrer differentiellen Genexpression und ihrer Relevanz für die Sarkoidose-Pathologie. Kontrollfärbungen sind im Anhang dargestellt (Abbildung S2) Die Fluoreszenzmikroskopiebilder wurden mit StarDist zur Zellsegmentierung und mit QuPath zur automatisierten Zellklassifizierung analysiert.^{13,14} Die Häufigkeiten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung über alle Proben hinweg dargestellt, wobei die gesamten detektierten Zellanteile auf 1 normiert wurden. Die Top-Genexpression von Granulom-assoziierten Clustern wurde mit den Datensätzen von Krausgruber et al. verglichen.¹⁵ und Liao et al.¹⁶ Verwendung von Venny 2.1.0.¹⁷

Ergebnisse

Um die zelluläre und transkriptomische Landschaft des chronischen pulmonalen Sarkoidose-Granuloms zu charakterisieren, führten wir eine räumliche Transkriptomik mit der Visium-Plattform (10x Genomics) an neun Proben durch, die Granulome in ausreichender Anzahl und RNA-Qualität aufwiesen (Abbildung 1A, B, Abbildung S3) Insgesamt wurden 30.587 gewebebedeckte Genexpressionsspot analysiert, die 173 Granulome umfassten. Die Zelltyp-Annotation basierend auf der Expression spezifischer Marker-Gene in jedem Genexpressionsspot identifizierte 13 unterschiedliche Cluster (Abbildung 1C-E) Diese Cluster spiegeln die Genexpression verschiedener Zellen in jedem Genexpressionsgebiet wider und ähneln zellulären Nischen. Vier Granulom-assoziierte Nischen wurden identifiziert: die zentrale Granulom-Makrophagen-Nische im Granulomkern, umgeben von einer Mischung aus Granulom-Fibroblasten und Makrophagen (M Φ) sowie gelegentlicher Beteiligung der Granulom-T-Zellen, dendritischen Zellen (DCs) und M Φ -Nische; die peri-Granulom-Fibroblasten-Nische befindet sich um das fibrotische Granulom herum und in fibrotischen Läsionen. Externe Validierung anhand der Datensätze von Liao et al.¹⁶ und Krausgruber et al.¹⁵ Es wurde eine überlappende Genexpression von 8,7 % bis 22 % zwischen Granulom-assoziierten Zellclustern mit übereinstimmenden Zelltypen nachgewiesen (Abbildung S4).

Die wichtigsten Zellpopulationen innerhalb des Granuloms wurden anhand der Markergenexpression identifiziert, wobei CD68 nachgewiesen wurde. Makrophagen im Granulomzentrum mit einer dichten Schicht von COL3A1-Fibroblasten umgeben davon (Abbildung 1F) CD3. Die T-Zellen waren locker zwischen dem Makrophagenkern und der Fibroblastenschicht verteilt (Abbildung 1F) Expression von dendritischen Zellmarkergenen (Abbildung S5) und B-Zell-Marker-Gene wie MS4A1 (CD20, Abbildung 1E) wurden um das Granulom herum nachgewiesen, vorwiegend in der Granulom-T-Zell-, DC- und M Φ -Nische. Die Expression von neutrophilenbezogenen Genen war gering (Abbildung S6) Die beobachtete zelluläre Verteilung wurde durch IHF-Protein-Färbung von CD3, CD4 und CD20 bestätigt (Abbildung 1G-J) zusammen mit der Färbung für CD68 und COL1A1 (Abbildung 1K) Die automatisierte Zellannotation ergab Häufigkeiten von $0,45 \pm 0,14$ für CD3-Zellen, $0,63 \pm 0,12$ für CD4-Zellen, $0,09 \pm 0,12$ für CD20-, $0,16 \pm 0,15$ für CD68- und $0,57 \pm 0,19$ für COL3A1-Zellen im Granulom (Mittelwert \pm Standardabweichung); Abbildung 1J, Abbildung S7) Der relativ hohe Anteil an COL3A1-Zellen im Granulom könnten den fortgeschrittenen Krankheitszustand der untersuchten Patienten widerspiegeln.

Zentrale Granulommakrophagen besetzen eine hybride, proinflammatorische und profibrotische Nische.

Zunächst untersuchten wir das Genexpressionsprofil von Granulommakrophagen, den Hauptzellen in der zentralen Granulommakrophagennische. Wir beobachteten eine hohe Expression von *SPP1*, *CHIT1*, und *CHI3L1* im Granulomzentrum (Abbildung 2A), Gene, die mit profibrotischen Makrophagen bei idiopathischer Lungenfibrose (IPF) assoziiert sind,¹⁸ und Marker von alternativ aktivierten (M2) Makrophagen.^{19,20} Parallel dazu hohe Expression von *LYZ*, *IL1B*, *IL18*, und *CYBB*, proinflammatorische Gene, die mit konventionell aktivierten (M1) Makrophagen assoziiert sind, wurden in der Nische der zentralen Granulom-Makrophagen beobachtet (Abbildung 2B), was darauf hindeutet, dass zentrale Granulommakrophagen sowohl profibrotische als auch proinflammatorische Eigenschaften aufweisen. *GPNMB*, ein neuartiger Marker für Riesenzellen bei Sarkoidose, der Merkmale der M1- und M2-Makrophagenpolarisation aufweist,²¹

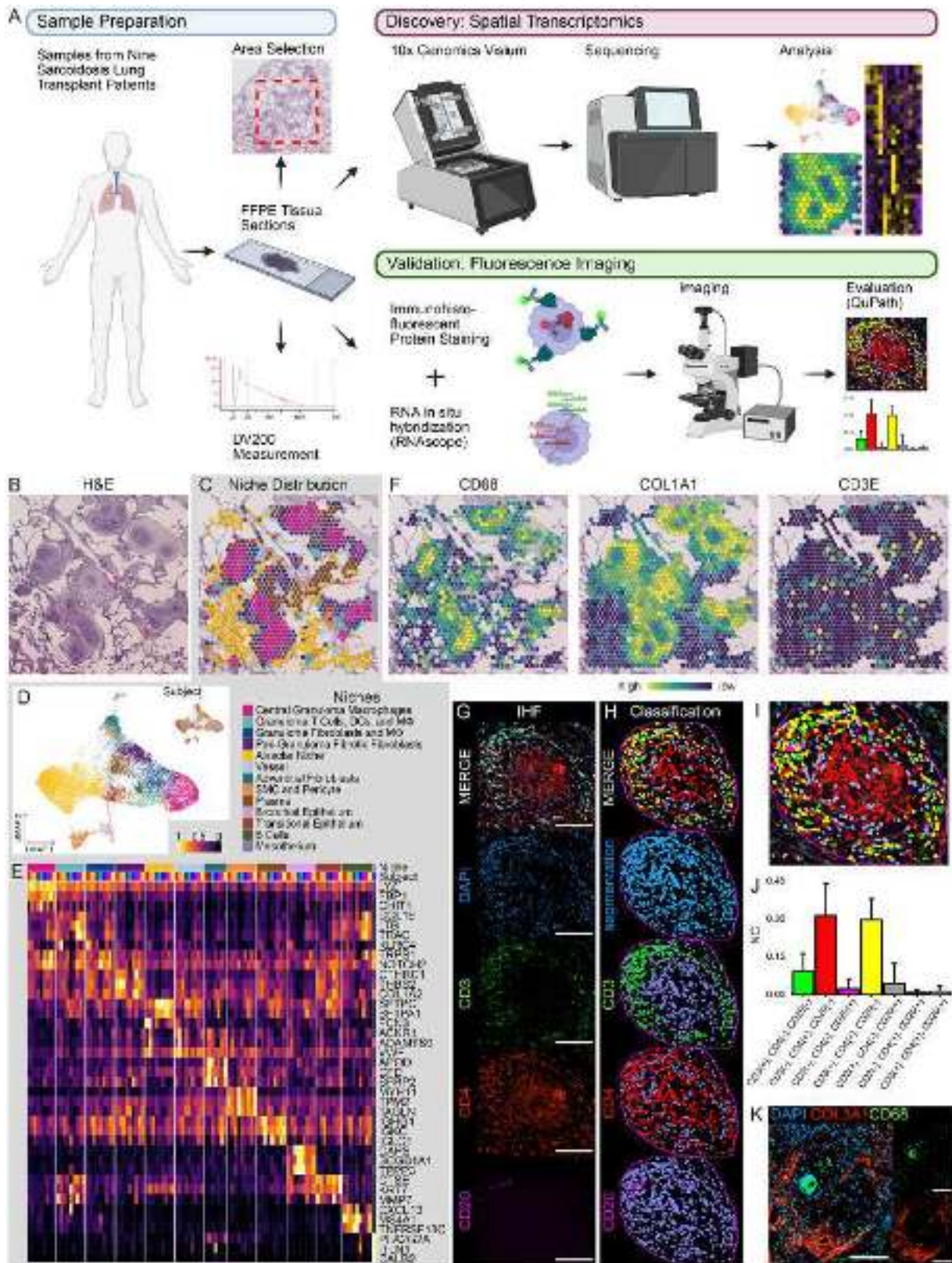


Abbildung 1(A) Es wurden formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeproben aus Biobanken von neun Patienten mit chronischer Sarkoidose verwendet, die sich einer Lungentransplantation unterzogen. Mittels der Visium-Plattform (10x Genomics) wurde eine räumliche Transkriptomik dieser Proben durchgeführt. DNA-Bibliotheken wurden sequenziert und die Daten analysiert. Basierend auf den Ergebnissen der räumlichen Transkriptomik erfolgte eine Validierung mittels Immunhisto-fluoreszenz-(IHF)-Proteinfärbung und RNA-In-situ-Hybridisierung (ISH). Erstellt in BioRender. Schupp, J. (2025).<https://BioRender.com/sx42e7t>(B) Beispielhafte Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Lungenschnitts mit einem Granulom. (C) Räumliche Dimensionsdarstellung der Zellnischen, wobei jede Nische durch einen farbcodierten Punkt dargestellt und anhand der Markergenexpression in der räumlichen Transkriptomik identifiziert wurde. (D) Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) der räumlichen Transkriptomik-Nischen aller Proben, wobei jede Nische farbcodiert ist und jeder Punkt eine Nische repräsentiert.

wurde im Granulomzentrum festgestellt (Abbildung 2A). Die IHF-Protein-Färbung zeigte die Expression der M2-Polarisationsmarker CD16, CD163 und CD206 in Granulomen (Abbildung 5B). Die Validierung mittels IHF-Proteinfärbung bestätigte das Vorhandensein von SPP1⁺-CHIT1-Makrophagen im zentralen Granulom (Abbildung 2C). Während SPP1 über das gesamte zentrale Granulom verteilt war, war CHIT1 spezifisch mit CD68 kolokalisiert.

Um den potenziellen Ursprung von Granulommakrophagen aufzudecken, untersuchten wir die Expression von Alveolar- und Monozytenmarkern (Abbildung 2B, E). Während Gene, die überwiegend in Alveolarmakrophagen exprimiert werden, wie zum Beispiel *FABP4* wurden in der alveolären Nische exprimiert, Monozytenmarker wie zum Beispiel *CD14* wurden im Granulomzentrum exprimiert. Die Expression von *FABP4* in Alveolarmakrophagen, aber nicht in Granulommakrophagen und *CD14* in zentralen Granulommakrophagen neben *SPP1* wurde durch ISH bestätigt (Abbildung 2D).

Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass die Makrophagen im zentralen Granulom von Monozyten abstammen und eine hybride, proinflammatorische und profibrotische Nische bilden.

Zentrale Granulommakrophagen sind darauf vorbereitet, Krankheitserreger zu eliminieren.

Um die entzündlichen Signalwege innerhalb der Nische der zentralen Granulom-Makrophagen genauer zu untersuchen, führten wir eine Pathway-Anreicherung mit EnrichR durch, die Assoziationen mit Phagozytose und Endozytose (GO:0050764, GO:0045807 und GO:0006896) sowie mit Toll-like-Rezeptor (TLR)-Signalwegen, Phagosomen- und Lysosomen-Signalwegen aufdeckte (Abbildung 3A, Abbildung 5A). Dies entspricht der hohen Expression lysosomaler Gene. *CTSB* und *CTSS* in Granulomregionen (Abbildung 3B). Ausdruck von *TLR2* und sein Korezeptor *TLR1* und *TLR8* waren am höchsten in der Nische der zentralen Granulom-Makrophagen (Abbildung 3C). Obwohl *TLR4* die Expression wurde im zentralen Granulom nachgewiesen, war aber im Vergleich zu den Korezeptoren gering. *LY96* und *CD14* und nachgeschaltete TLR2/4-Signalgene, wie zum Beispiel *MYD88* und *IRAK1* (Abbildung 3C). Neben der Pathogenerkennung zeigten zentrale Granulommakrophagen Aktivität bei der Pathogenaufnahme durch die Expression von Endozytose-bezogenen Genen (Abbildung 3C). Der prominente Ausdruck von *CTSB* und *CTSS* wurde von einem Ausdruck begleitet *DNASE2*, *LIPA*, und *LYZ*, unter anderem Gene, die mit dem lysosomalen Abbau in der Nische der zentralen Granulom-Makrophagen in Zusammenhang stehen (Abbildung 3B, C, Abbildung 510). Ausdruck von *HK3*, *GALM*, *TKT*, und *FBP1* wurde in der Nische der zentralen Granulom-Makrophagen beobachtet (Abbildung 3B-D, Abbildung 510). Diese Gene sind mit dem Glykolyse- und dem Pentosephosphatweg-Stoffwechsel assoziiert, Stoffwechselwegen, die möglicherweise erleichtern

schnelle Vermehrung von Immunzellen und Bereitstellung von NADPH für die Reaktion auf oxidativen Stress.²³ Vergleich der räumlichen Genexpression von *HK3* und *CD14* zeigt eine Überlappung mit ihrer Proteineexpression, mit CD14⁺-HK3⁺-Zellen mit einer Häufigkeit von $0,32 \pm 0,24$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) in Granulomen (Abbildung 3E, Abbildung 57).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hohe Expression von Genen, die an der Erkennung, Aufnahme und Beseitigung von Krankheitserregern beteiligt sind, zusammen mit einem veränderten Energiestoffwechsel darauf hindeutet, dass Makrophagen in der Nische der zentralen Granulom-Makrophagen darauf vorbereitet sind, auch längst verschwundene Krankheitserreger zu eliminieren.

Interferon- γ -Signalisierung in Verbindung mit einem proinflammatorischen Milieu charakterisiert chronische Granulome.

Anschließend untersuchten wir, wie Lymphozyten an der Aufrechterhaltung dieser proinflammatorischen und profibrotischen Nische beteiligt sind. Die Pathway-Analyse der Granulom-T-Zellen, DCs und M Φ -Nische ergab eine höhere Expression von Genen, die an der nachgeschalteten Interferon-gamma (IFN- γ)-Signalübertragung durch granulomassoziierte Nischen beteiligt sind (Abbildung 4A, Abbildung 59B, C). Diese Ergebnisse stimmen mit einer hohen Genexpression von IFN- γ -induzierten Genen überein. *CD74*, *CXCL9* und Interferon-gamma-induzierbares Protein 30 (*IFI30*) im Granulomzentrum (Abbildung 4B). Darüber hinaus werden Gene identifiziert, die für IFN- γ -induzierbare Chemokine kodieren. *CCL5*, *CCL22*, und *CXCL10* wurden in Granulom-assoziierten Nischen prominent exprimiert (Abbildung 4C), was auf die Rekrutierung aktivierter T-Zellen und regulatorischer T-Zellen hinweist.^{24,25} *CXCL9*/*CXCL10* und *CCL5*/*CCL22* die Genexpression war in den zentralen Granulommakrophagen und den Granulom-T-Zellen, den dendritischen Zellen und der Makrophagen-nische ähnlich, was die fortlaufende Rekrutierung von Lymphozyten in das Granulom unterstreicht. Die höchste Genexpression von *CXCL16* und *IRF8* wurde im zentralen Granulom bzw. in der B-Zell-Nische beobachtet (Abbildung 4C). Die Auswertung der Expression von 45 weiteren durch IFN- γ induzierbaren Genen ergab eine spezifische räumliche Verteilung dieser Gene in drei verschiedenen Nischen: (1) Zentrale Granulom-Makrophagen; (2) Granulom-T-Zellen, DCs und M Φ ; und (3) B-Zellen (Abbildung 4D). Obwohl in der Nische der zentralen Granulom-Makrophagen kein spezifisches, mit IFN- γ verwandtes Gen exprimiert wurde, *IFI6*, *ADAR*, und *CD38* sie wurden in den Granulom-T-Zellen, den dendritischen Zellen und der M Φ -Nische stärker exprimiert als in anderen Nischen. IFN- γ wurde auch auf Proteinebene beobachtet und kolokalisierte mit SPP1 in der zentralen Region des Granuloms (Abbildung 4E). Darüber hinaus kolokalisierte IFN- γ mit IFI16 mit einer Häufigkeit von $0,13 \pm 0,11$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, Abbildung 4F). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die proinflammatorische IFN- γ -Signalgebung im Lungengranulom von Patienten mit chronischer Sarkoidose aufrechterhalten wird.

Punkt in einer räumlichen Darstellung. (E) Heatmap mit beispielhaften Markergenen zur Definition der Zellnischen in der räumlichen Transkriptomik. (F) Räumliche Genexpressionsdarstellung der Expression des Makrophagenmarkers. *CD68* im Granulomzentrum (links), Fibroblastenmarker *COL3A1* in der perigranulomatösen Region (Mitte) und schwache Expression von *CD3E* um das Granulom herum (rechts). (G) Repräsentative Immunhistofluoreszenz-Proteinfärbung der T-Zell-Marker CD3 (grün) und CD4 (rot), des B-Zell-Markers CD20 (pink) und DAPI (blau) zeigt das Vorhandensein von T- und B-Zellen um den Granulomkern; Maßstabsbalken = 100 μ m. (H) Beispielhafte Auswertung des CD3-, CD4- und CD20-IHF-Panels in der QuPath-Software. Das obere Bild zeigt die angewendeten Klassifikatoren und umfasst doppelt und dreifach positive Zellen (CD3⁺-CD4⁺-in Gelb, CD3⁺-CD20⁺-in Dunkelgrau, CD4⁺-CD20⁺-in Dunkelviolett, CD3⁺-CD4⁺-CD20⁺-in hellgrau). Das zweite Bild von oben zeigt die automatisierte Zellsegmentierung (blau) mit StarDist basierend auf dem DAPI-Signal. Die drei unteren Bilder zeigen das Training der Klassifikatoren für CD3⁺- (grün), CD4⁺- (rot) und CD20⁺- (hellviolette) Zellen. Zellen ohne Klassifikator sind violett dargestellt. (I) Überlagerung des IHF-Mikroskopiebildes mit angewendeten Klassifikatoren für CD3, CD4 und CD20. (J) Normalisierte Zellzahlen (NCs) von CD3⁺-, CD4⁺- und CD20⁺-positiven Zellen innerhalb des Granuloms. (K) Repräsentative Immunhistofluoreszenz-Proteinfärbung mit den Markern Makrophagen-CD68 (grün) und Fibroblasten-COL3A1 (rot) sowie DAPI (blau) bestätigt das Vorhandensein von Makrophagen im Granulom und umgebenden Fibroblasten; Maßstabsbalken = 100 μ m.

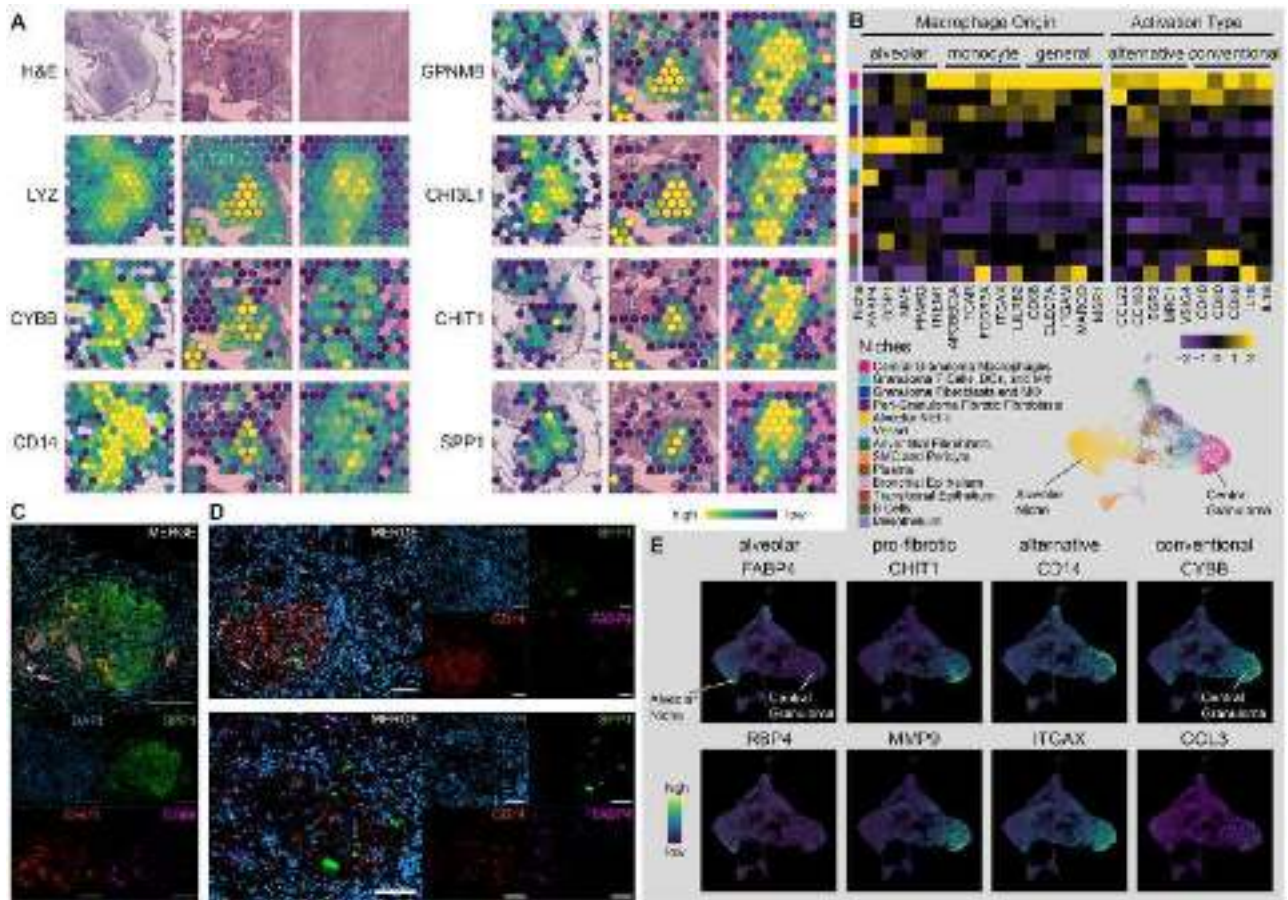


Abbildung 2(A) Räumliche Genexpressionsdarstellung von Genen, die mit proinflammatorischen konventionellen Makrophagen assoziiert sind (*LYZ* und *CYBB*), Monozyten-abgeleitete Makrophagen (*CD14*), und profibrotische, alternativ aktivierte Makrophagen (*CH13L1*, *GPNMB*, *CHIT1*, *SPP1*) (A) Heatmap der Genexpression von Pan-Makrophagen-Markergenen, Markergenen des Makrophagenursprungs (alveolär und monozytär) sowie Markern für die Makrophagenaktivierungstypen alternativ (M2) und konventionell (M1). (B) Repräsentative IHC-Proteinfärbung der profibrotischen Makrophagenmarker Osteopontin (*SPP1*, grün) und Chitinase 1 (*CHIT1*, rot) sowie der Makrophagenmarker *CD68* (violett) und DAPI (blau) zeigt deren Vorhandensein im Zentrum des Granuloms, nicht jedoch im umgebenden Gewebe; Maßstabsbalken = 100 µm. (C) RNA-In-situ-Hybridisierungs-färbung zeigt das Vorhandensein von *SPP1* (grün) und *CD14* (rot) im Zentrum des Granuloms, während alveoläre Makrophagen-assoziierte Gene *FABP4* (violett) wird von gewebsständigen Makrophagen exprimiert; Maßstabsbalken = 100 µm. (D) IHC-Färbung zeigt die Expression von *SPP1* (grün) und *CHIT1* (rot) im Zentrum des Granuloms, nicht jedoch im umgebenden Gewebe; Maßstabsbalken = 100 µm. (E) UMAP-Feature-Plot, der die Expression von Makrophagen-Markergenen in allen Nischen darstellt. Alveolarmakrophagen-assoziierte Gene *FABP4* und *RBP4* werden in der alveolären Nische stark exprimiert, während Monozyten-, alternative (M2) und konventionelle (M1) Marker-Gene in der Nische der zentralen Granulom-Makrophagen exprimiert werden.

Die äußeren Granulom-Fibroblastennischen enthalten *CTHRC1*-fibrotische Fibroblasten

Mithilfe der räumlichen Transkriptomik wurden drei Fibroblastennischen identifiziert und anhand ihrer Lage und Genexpression klassifiziert: Fibroblasten in der Nähe kleiner Alveolargefäße („Adventitielle Fibroblasten“), Fibroblasten in fibrotischen Läsionen in der Nähe von Granulomen („Peri-Granulom-Fibroblasten“) und Fibroblasten um Granulome in der Nähe von Immunzellen („Granulom-Fibroblasten und Makrophagen“).

Granulomassoziierte Fibroblastennischen (Peri-Granulom-Fibroblasten und Granulom-Fibroblasten und Makrophagen) zeigten keine eindeutige Expression von Adventitia- und Alveolarfibroblastenmarkern, exprimierten aber allgemeine Fibroblasten- und Myofibroblastenmarker (Abbildung 5A, Abbildung S11), während sie eine ausgeprägte Expression der Fibroblasten-Marker-Gene aufweisen *COL1A1*, *COL6A3*, *LUM*, und *SPARC* (Abbildung 5B). Die perigranulomatöse fibrotische Fibroblastennische war durch eine hohe Expression von *CTHRC1*, das kürzlich mit IPF-Myofibroblasten in Verbindung gebracht wurde,^{26,27} Die Nische der Granulom-Fibroblasten und Makrophagen war durch ihre Expression von ... charakterisiert. *THY1*

Und *TNCF* (Abbildung 5A). Darüber hinaus zeigten alle Granulom-assoziierten Nischen eine hohe Expression von *FAP*, ein Marker für Kollagen-produzierende Fibroblasten bei IPF.^{28,29} Eine Pathway-Anreicherung-Analyse der Peri-Granulom-Fibroblastennische ergab hohe Konzentrationen an extrazellulärer Matrix (ECM)-Remodellierung (GO:0030198; Abbildung 5C, Abbildung S9D). Die RNA-ISH bestätigte die Expression von *COL1A1*, *CTHRC1*, und *TNCF* in Fibroblasten, die das Sarkoidose-Granulom umgeben (Abbildung 5D). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ECM-Remodellierung im Bereich des Sarkoidose-Granuloms sehr aktiv war und dass Granulom-assoziierte Fibroblasten Ähnlichkeiten mit Fibroblasten bei IPF aufweisen.

Proinflammatorische und profibrotische Ligand-Rezeptor-Interaktionen unterstützen die Integrität des Granuloms.

Frühere Ergebnisse zeigten die Expression und Rolle proinflammatorischer und profibrotischer Gene im Granulom, aber ihre Bedeutung für die Wechselwirkung zwischen Granulomnischen und

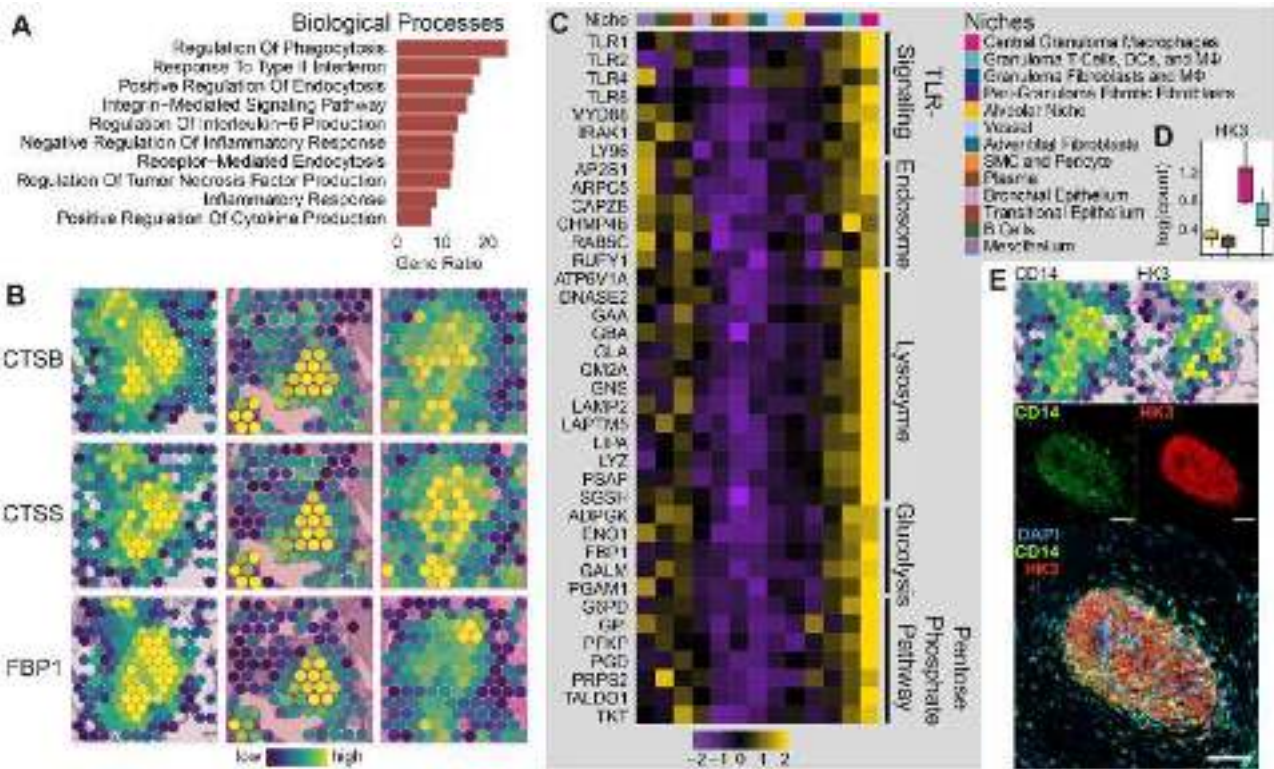


Abbildung 3(A) Genontologie-Analyse (GO) der 200 am stärksten exprimierten Gene in der zentralen Granulom-Makrophagennische anhand des durchschnittlichen Logarithmus der Expressionsänderung (Fold Change). Referenzdatenbank: Biologische Prozesse. (B) Räumliche Darstellung der Genexpression lysosomaler Gene (*CTSB*, *CTSS*) und des Pentosephosphatweg-Gen *FBP1* in einem Granulom. (C) Heatmap zur Darstellung der Expression von Genen, die an Entzündungsprozessen im Granulomzentrum beteiligt sind. (D) Expression von *HK3* ist in Makrophagen-haltigen Granulomnischen höher als in der alveolären Nische und der B-Zell-Nische. (E) Räumliche Genexpression von *CD14* und *HK3*. Die Abbildung zeigt die räumliche Koexpression von *CD14* (grün) und *HK3* (rot) im Granulom eines Patienten (oben) sowie eine repräsentative Immunhistochemische Färbung in einem anderen Schnitt desselben Patienten (unten). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt; Maßstabsbalken = 100 µm.

Die Beteiligung an der Homöostase und der Aufrechterhaltung des Granuloms blieb unklar. Um diese Wissenslücke zu schließen, zielten wir darauf ab, diese Wechselwirkung durch eine Ligand-Rezeptor-Analyse der vier in dieser Studie identifizierten Granulom-assoziierten Nischen genauer zu charakterisieren.

Dieser Ansatz bestätigte die proinflammatorische Signalgebung der zentralen Granulom-Makrophagennische über *CCL5* neben profibrotischer Signalgebung durch *TGFβ1*, *SPP1*, und *MMP9* (Abbildung 6A, Abbildung S12, S13). *SPP1* und *MIF* wurde festgestellt, dass die Signalübertragung von der zentralen Granulom-Makrophagen-Nische als Hauptsender initiiert wird, mit Interaktionspartnern wie beispielsweise *CD44*, *CD74*, und *CXCR4* wird in allen Granulomnischen exprimiert (Abbildung 6B). Komplementsignalisierung über *C3* wurde von allen Nischen gesendet, wie der starke Ausdruck von *C3a* und um das Granulom herum, mit seinen Rezeptoren *ITGAX* und *ITGB2* wird vorwiegend in der Nische der zentralen Granulom-Makrophagen exprimiert (Abbildung 6C). Die Signalübertragung über CXCL-Liganden zeigte eine starke Beteiligung von *CXCL12*, dessen Rezeptor *CXCR4* wurde in allen Granulom-assoziierten Nischen exprimiert, mit Ausnahme der Nische der fibrotischen Fibroblasten (Abbildung S12). Die Wechselwirkungen von Kollagen und CXCL-Chemokinen waren in fibroblastenhaltigen äußeren Nischen besonders ausgeprägt, was auf die starke Genexpression der zugehörigen Liganden zurückzuführen ist. *COL1A1*, *COL1A2*, und *CXCL12* (Abbildung 6B). Die räumliche Genexpression zeigte eine überlappende Expression von Ligand-Rezeptor-Paaren wie z. B. *SPP1* und *CD44* innerhalb der Grenzen des Granuloms (Abbildung 6C). Die IHF-Färbungen von Ligand-Rezeptor-Paaren bestätigten die Kollokalisierung auf Proteinebene (Abbildung 6D). Zusammengefasst persistiert eine aktive proinflammatorische und profibrotische Signalgebung im Granulom der chronischen Sarkoidose,

wobei *SPP1*, CXCL-Chemokine und Kollageninteraktionen eine zentrale Rolle in dieser Mikroumgebung spielen (Abbildung 7).

Diskussion

In dieser Studie untersuchten wir mittels räumlicher Transkriptomik die Genexpression in Schlüsselbereichen des Granuloms von Lungengewebe von neun Patienten mit chronischer pulmonaler Sarkoidose. Ziel war es, die Mechanismen der fibrotischen Umgestaltung und des Granulomerhalts zu verstehen. Die räumliche Transkriptomik zeigte die Expression von Genen, die mit proinflammatorischen und profibrotischen Makrophagen in der zentralen Granulom-Makrophagennische assoziiert sind und somit eine hybride proinflammatorische und profibrotische Nische widerspiegeln. Im Zentrum des Granuloms war die Expression profibrotischer Gene wie beispielsweise *SPP1*, *CHI3L1*, und *CHIT1* wurde zusätzlich zu Genen, die an der Erkennung und Beseitigung von Krankheitserregern beteiligt sind, wie zum Beispiel *TLR1*, *TLR2*, *TLR8*, *LYZ*, und *LIP4*. Die Pathway-Analyse zeigte die Expression von Genen, die mit der IFN- γ -Signalübertragung in Zusammenhang stehen, was auf eine Rolle von IFN- γ bei chronischen Sarkoidose-Granulomen hindeutet. Die Granulome waren von einer ausgeprägten Fibroblastenschicht umgeben, die eine erhöhte Expression von Kollagen-Genen aufwies. *CTHRC1* mit hoher ECM-Remodellierungsaktivität. Obwohl das Signal von T-Zellen im Vergleich zu Makrophagen und Fibroblasten schwach war, konnten wir eine deutliche Expression von Rezeptoren nachweisen, die an von T-Zellen stammende Chemokine in Granulomnischen binden.

Das Vorhandensein von proinflammatorischen und profibrotischen Makrophagen im Sarkoidose-Granulom wurde zwar schon zuvor beobachtet,

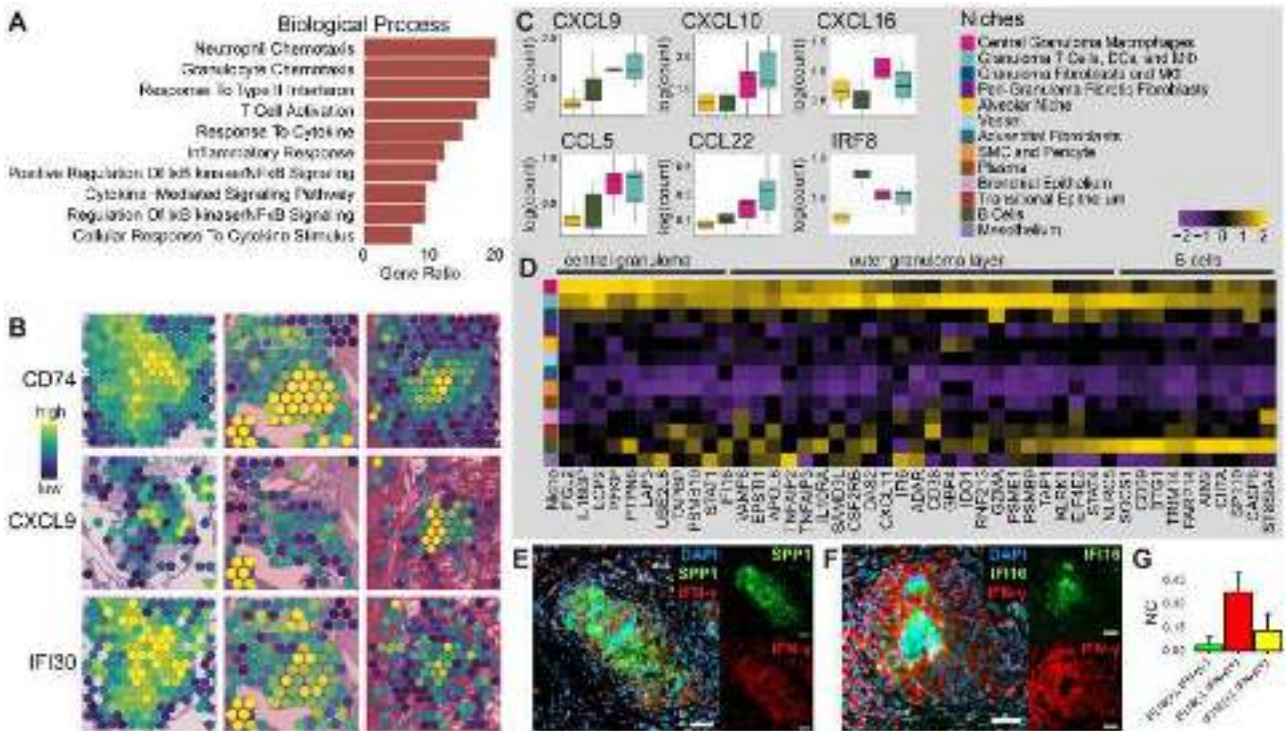


Abbildung 4(A) Genontologie-Analyse (GO) der 200 am stärksten exprimierten Gene in der Granulom-T-Zell-, DC- und Makrophagen-Nische (logarithmische Änderung der Expression). Referenzdatenbank: Biological Processes. B) Räumliche Darstellung der Genexpression von Genen, die mit der Interferon-gamma-(IFN- γ)-Antwort in einem Granulom assoziiert sind. C) Vergleich der Expression ausgewählter Gene, die an der IFN- γ -Antwort beteiligt sind, zwischen der alveolären Nische, der B-Zell-Nische, der zentralen Granulom-Makrophagen-Nische und der Granulom-T-Zell-, DC- und Makrophagen-Nische. D) Heatmap zur Darstellung der Expression von Genen, die mit der IFN- γ -Antwort in Zusammenhang stehen. (E) Repräsentative Immunhistofluoreszenz-(IHF)-Proteinfärbungen von SPP1 (grün) und IFN- γ (rot). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt; Maßstabsbalken = 50 μ m. (F) Repräsentative IHF-Proteinfärbungen des IFN- γ -induzierbaren Gens IFI16 (grün) und von IFN- γ (rot). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt; Maßstabsbalken = 50 μ m. (G) Normalisierte Zellzahlen (NCs) von IFI16-Zellen (grün), IFN- γ -Zellen und IFI16-IFN- γ -Zellen.

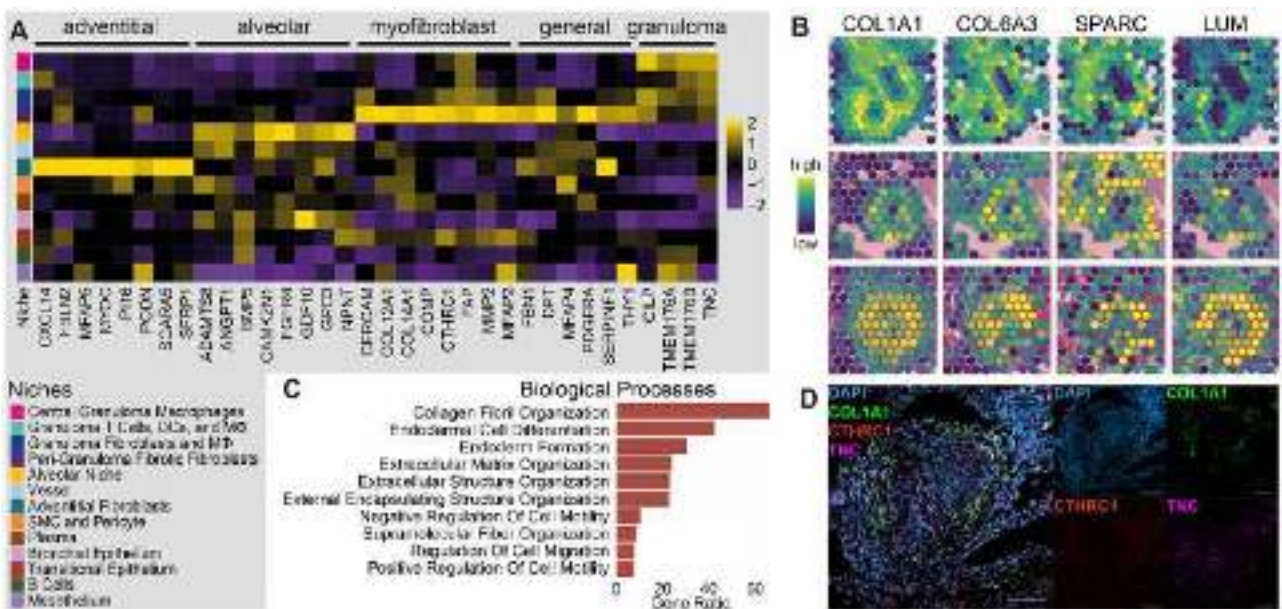


Abbildung 5(A) Heatmap zur Darstellung der Expression von Markergenen für Adventitiafibroblasten, Alveolarfibroblasten und Myofibroblasten sowie von Pan-Fibroblasten-Markern und Genen, die primär in der Nische der Granulom-Fibroblasten und -Makrophagen exprimiert werden. B) Räumliche Darstellung der Genexpression von Fibroblasten-assoziierten Genen um ein Granulom. C) Genontologie-Analyse (GO) der 200 am stärksten exprimierten Gene in der perigranulomatösen fibrotischen Fibroblastennische (logarithmische Änderung der Expressionsstärke). Referenzdatenbank: Biological Processes. D) RNA-In-situ-Hybridisierungsfärbungen zeigen das Vorhandensein von ...*COL1A1* (Grün), *CTHRC1* (rot), und *TNF* (violett) das Granulom umgebend. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt; Maßstabsbalken = 100 μ m.

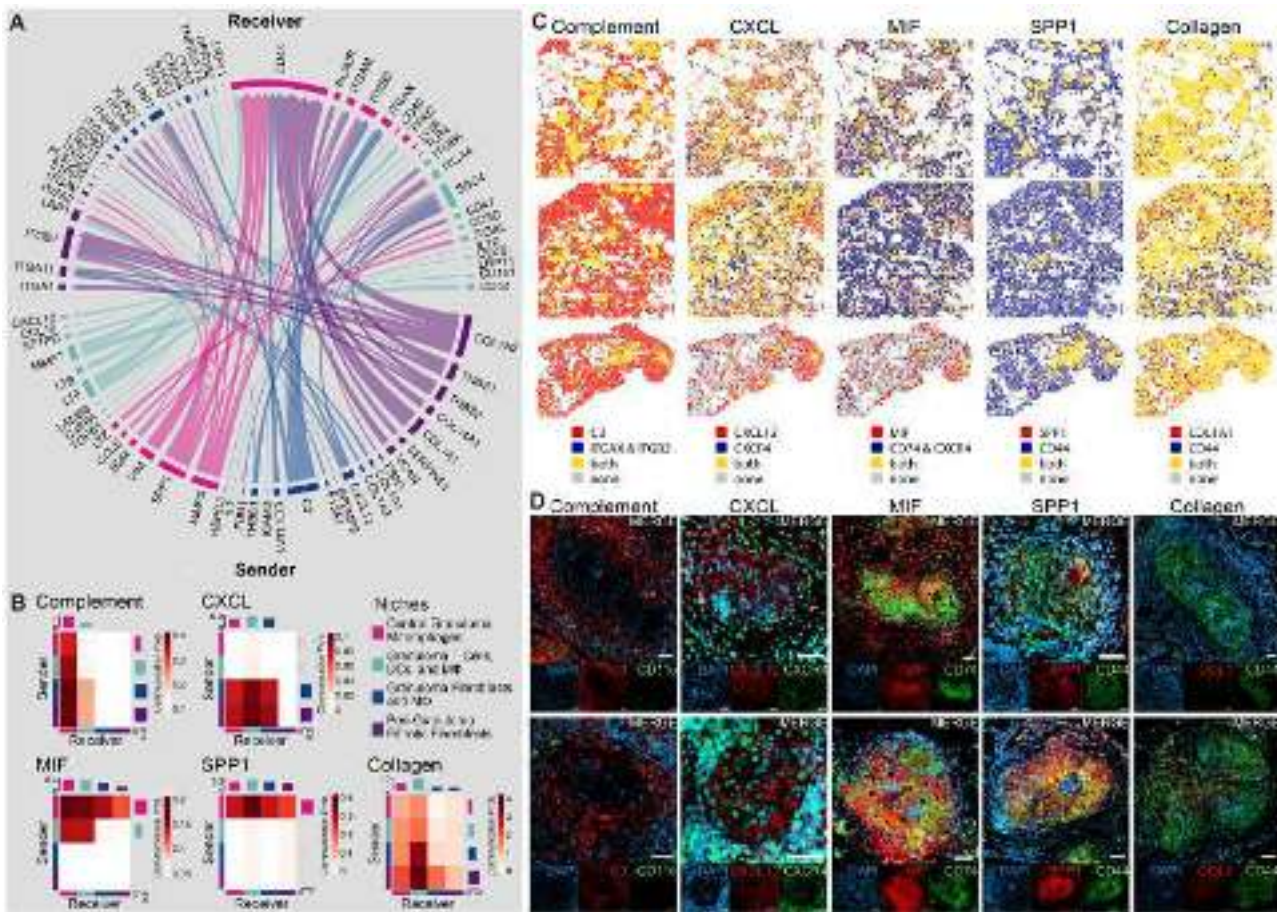


Abbildung 6 (A) Circos-Diagramm der wichtigsten Ligand-Rezeptor-Interaktionen innerhalb eines Granuloms. (B) Heatmaps der Ligand-Rezeptor-Interaktionen innerhalb eines Granuloms. Dargestellt sind proinflammatorische (Komplement, CXCL) und profibrotische (MIF, SPP1, Kollagen) Signalnetzwerke. (C) Räumliche Genexpression eines Liganden (rot), seines Rezeptors (blau), die Koexpression von Ligand und Rezeptor (gold) sowie Bereiche ohne Expression von Ligand oder Rezeptor (grau), die an proinflammatorischen (Komplement, CXCL) und profibrotischen (MIF, SPP1, Kollagen) Signalnetzwerken beteiligt sind. (D) Repräsentative IHC-Färbungen für Ligand-Rezeptor-Paare in proinflammatorischen (Komplement, CXCL) und profibrotischen (MIF, SPP1, Kollagen) Signalnetzwerken. Ligand (rot), Rezeptor (grün) und Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt; Maßstabsbalken = 50 μ m.

Ihre Bedeutung bleibt unklar. Eine mögliche Erklärung ist, dass ein Übergang von proinflammatorischen zu profibrotischen Makrophagen mit dem Fortschreiten der Krankheit einhergeht.^{23,30} da eine fortschreitende, perigranulomatöse Fibrose ein typisches Merkmal der chronischen Sarkoidose ist.³¹ In dieser Studie stellten wir fest, dass Gene, die mit proinflammatorischen Makrophagen assoziiert sind, auch in Granulomen bei chronischer Sarkoidose exprimiert werden. Parallel dazu beobachteten wir, dass Makrophagen im Granulomzentrum SPP1 ähneln.³² Makrophagen, die erstmals bei IPF beschrieben wurden^{18,26} und mit systemischer Sklerose assoziierte interstitielle Lungenerkrankung (ILD).³³ SPP1. Auch Makrophagen bei IPF zeigen eine ähnliche Expression von *GNMB*,³² neben *CHIT1* und *CH13L1*, die mit der Entwicklung und dem Fortschreiten der Fibrose bei verschiedenen Arten von ILD in Verbindung gebracht wurden.³³ Hohe Serumspiegel von Chitinase 1 und YKL-40, kodiert durch das *CHIT1* und *CH13L1*. Es wurde gezeigt, dass bestimmte Gene mit der Krankheitsaktivität und dem Fortschreiten der Sarkoidose korrelieren.³⁴⁻³⁷ Der Ausdruck von *SPP1*, *CHIT1*, und *MMP9* durch Granulommakrophagen wurde kürzlich auf Einzelzellebene gezeigt.³⁸ Und *SPP1*, *CHIT1*, und *CH13L1* wurden im Zentrum von dermalen Granulomen bei Patienten mit Sarkoidose nachgewiesen.¹⁵

Die Ligand-Rezeptor-Analyse zeigte die Expression von *SPP1* Rezeptoren, die an der ECM-Remodellierung in der Nähe von Granulomen beteiligt sind, wie zum Beispiel *CD44*, die Rolle von *SPP1* bei der Aufrechterhaltung des Granuloms

Struktur. Darüber hinaus wurde CXCR4 kürzlich als ein eigenständiger Akteur bei der Rekrutierung von Immunzellen in Sarkoidose-Granulome identifiziert, was unsere räumlichen Daten ergänzt.³⁹ Obwohl dies bei pulmonaler Sarkoidose neu ist, wurde ein ähnliches Genexpressionsprofil von Makrophagen bereits bei Haut- und Muskelgranulomen beschrieben.^{15,39-41}

Die Expression von Pathogenerkennungsrezeptoren durch Granulommakrophagen stützt die Hypothese, dass die Stimulation angeborener Immunrezeptoren die Granulombildung auslöst.⁴² Während ihre Expression bei chronischer Sarkoidose auf eine Rolle bei der Granulom-Aufrechterhaltung hindeutet, zeigte die zentrale Granulom-Makrophagen-Nische eine hohe Expression von *TLR2*, das an der Erkennung von Mykobakterien beteiligt ist.⁴³ Darüber hinaus beobachteten wir die Expression von zentralen lysosomalen Genen. *LYZ*, *DNASE2*, und *LIPA* im Granulom sind diese Gene für den Abbau von Krankheitserregern notwendig. Neben ihrer Funktion beim lysosomalen Abbau sind sie über die mTORC1/S6/STAT3-Signalübertragung auch an der Granulombildung beteiligt.⁴³⁻⁴⁵ Darüber hinaus stellten wir die Expression von Genen fest, die an der Glykolyse beteiligt sind, einem Kennzeichen des Krankheitsverlaufs bei Sarkoidose.⁴⁶ was auch die Steuerung der phagozytären und bakteriziden Aktivität unterstützt.⁴⁷ Im Einklang mit einem kürzlich erschienenen Bericht einer Einzelzellsequenzierungsstudie zu Sarkoidose,²³ Wir beobachteten eine hohe Expression von Genen des Pentosephosphatwegs in Makrophagen. Da eine hohe Aktivität des Pentosephosphatwegs häufig vorkommt

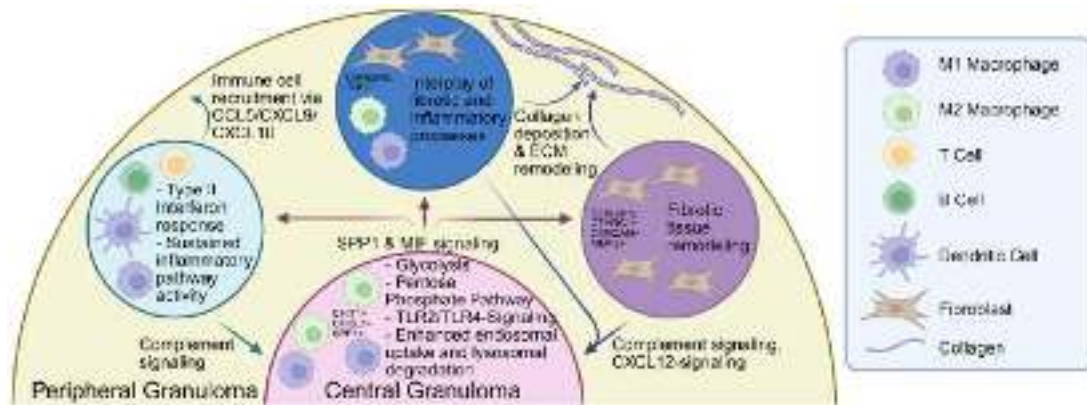


Abbildung 7 Zusammenfassung der beobachteten Genexpression, Signalwegaktivität und des Signalnetzwerks der vier beschriebenen Granulom-assoziierten Nischen: zentrale Granulom-Makrophagennische (rosa Halbkreis); Granulom-T-Zellen-, dendritische Zellen (DCs)- und M Φ -Nische (hellblauer Kreis); Granulom-Fibroblasten- und Makrophagennische (dunkelblauer Kreis); und perigranulomatöse fibrotische Fibroblastennische (violetter Kreis). Abbildung erstellt mit BioRender. Schupp, J. (2025). <https://BioRender.com/x20pgd8Die>

Dieser während der Makrophagenaktivierung beobachtete Stoffwechselwandel könnte die Granulombildung bei Sarkoidose begünstigen. Da auch in Hautgranulomen ein Wechsel zur Glykolyse und zur Typ-2-Immunität beobachtet wurde,⁴⁰ Es ist wahrscheinlich, dass diese Signalwege eine grundlegende Rolle bei der Granulomreaktion spielen. Ob die mittels Ligand-Rezeptor-Analyse beobachteten Interaktionen von Komplement, MIF und CXC-Liganden zu diesem proinflammatorischen Milieu beitragen, bleibt unklar.

Trotz der berichteten Beteiligung von Alveolarmakrophagen an der Entstehung von Granulomen,⁸ Granulommakrophagen exprimierten keine Markergenen von Alveolarmakrophagen. Stattdessen exprimierten Granulommakrophagen den Monozytenmarker *CD14*. Während Alveolarmakrophagen möglicherweise an der Granulombildung beteiligt sind, scheinen die sich anschließend ansammelnden Makrophagen aus dem Blut zu stammen. Dies steht im Einklang mit den Befunden, dass SPP1- Es wurde gezeigt, dass die rekrutierten Makrophagen von Monozyten abstammen,⁴⁸ und dass Monozyten in der Lage sind, Fibrose bei IPF zu fördern.⁴⁹ In Anbetracht dessen könnte die dysregulierte Expression von proinflammatorischen Genen in der Nische der zentralen Granulom-Makrophagen während der Granulomreife, kombiniert mit profibrotischen Genen, der Schlüssel zum Verständnis der Aufrechterhaltung des Granuloms sein.

Frühere Studien haben die Bedeutung von T-Zell-abgeleitetem IFN- γ bei der Granulombildung bei Sarkoidose gezeigt.^{50,51} Obwohl unser Test IFN- γ selbst nicht nachweisen konnte, stellten wir fest, dass *CXCL9*, *CXCL10* weitere Gene, die an IFN- γ -Signalwegen beteiligt sind, wurden sowohl im zentralen Granulom als auch in den Lymphozytennischen des Granuloms exprimiert. Darüber hinaus zeigte die IHC-Protein-Färbung IFN- γ in diesen chronischen SPP1-Granulomen, was darauf hindeutet, dass die IFN- γ -Signalübertragung weiterhin eine Rolle bei der Aufrechterhaltung bestehender Granulome spielt und den potenziellen Einsatz von Medikamenten, die in den IFN- γ -Signalweg eingreifen, auch bei chronischen Patienten unterstützt. Die Bedeutung der anhaltenden IFN- γ -Stimulation dieser Makrophagen wird durch den Nachweis erhöhter Serumspiegel von IFN- γ unterstrichen. *CXCL9* und *CXCL10* sind mit dem Schweregrad der Erkrankung verknüpft und tragen zur Regulierung der Rekrutierung regulatorischer T-Zellen bei.^{52,53} sowie Th1-Lymphozyten in die Lunge von Sarkoidosepatienten zu locken.⁵⁴

Eine der auffälligsten Komplikationen bei chronischer Sarkoidose ist der Verlust von funktionsfähigem Lungengewebe aufgrund fibrotischer Umbauprozesse, die vermutlich vom Granulom ausgehen.⁵⁵ Granulome bei Patienten mit chronischer pulmonaler Sarkoidose waren von Fibroblasten umgeben, die hohe Konzentrationen von *CTHRC1*, ein Gen, das in den fibrotischen Lungen von Patienten mit IPF exprimiert wird, nicht aber in denen gesunder Menschen.²⁷ *CTHRC1*-Fibroblasten wurden im Zusammenhang mit Sarkoidose noch nicht beschrieben, könnten aber eine ähnliche Rolle bei der Entwicklung von

Fibrose um pulmonale Granulome herum als deren Gegenstücke bei IPF. *CTHRC1* wurde sowohl als Aktivator als auch als Inhibitor der Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung vorgeschlagen.^{21,56} Dies deutet auf eine Rolle bei der Differenzierung von Myofibroblasten hin, die an der Lungenfibrose beteiligt sind. Dies unterstreicht den Befund, dass Granulom-assoziierte Fibroblasten Myofibroblasten-assoziierte Gene exprimieren, jedoch nur geringe Mengen an Alveolar- oder Adventitia-Fibroblasten-assoziierten Genen. *TNC* wurde als Induktor der Kollagenexpression bei Patienten mit systemischer Sklerose-assoziiierter interstitieller Lungenerkrankung beschrieben.⁵⁷ Es ist außerdem ein endogener Aktivator der TLR4-Signalübertragung.⁵⁸ Dies deutet darauf hin, dass Granulomfibroblasten möglicherweise eine bisher unentdeckte Rolle bei der proinflammatorischen Signalgebung innerhalb des Granuloms spielen.

Diese Studie weist Einschränkungen auf. Statistisch gesehen sind unsere Ergebnisse hauptsächlich durch die geringe Stichprobengröße begrenzt, da die Granulomanzahl zwischen den Patienten stark variiert. Um die Ergebnisse zu verzerren, verwendeten wir Mittelwerte pro Patient, um den Einfluss einzelner Ausreißer zu minimieren. Die geringe Stichprobengröße schränkte die Beurteilung der Heterogenität der Nischen ein, die möglicherweise auf interindividuelle oder mikroökologische Unterschiede zurückzuführen ist. Klinisch sind pulmonale Manifestationen bei Sarkoidose-Patienten am häufigsten, Granulome können sich jedoch in verschiedenen Organen wie Lymphknoten, Haut und Herz bilden und sich von pulmonalen Granulomen unterscheiden. Auch interstitielle, peribronchiale oder subpleurale Granulome können Unterschiede aufweisen. Darüber hinaus konzentrierten wir uns ausschließlich auf Patienten mit chronischer Sarkoidose, die aufgrund des Schweregrads der Erkrankung eine Lungentransplantation benötigten. Dies schränkt die Aussagekraft hinsichtlich früherer Stadien der Sarkoidose ein, und die präsentierten Ergebnisse sollten mit Vorsicht interpretiert werden. Die Genexpression in chronischen Granulomen spiegelt nicht zwangsläufig frühe Krankheitsstadien wider und erlaubt daher keine Unterscheidung zwischen krankheitstreibenden Genen und solchen, die eine Folge chronischer Schädigung sind. Obwohl Teile der Daten auf ein fibrotisches Granulom-Remodeling hindeuten, lässt sich nicht feststellen, ob diese Veränderungen die Granulomentwicklung widerspiegeln oder sich lediglich mit chronischen oder terminalen Lungenschädigungen wie der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) überschneiden. Technologisch gesehen erlaubte die begrenzte Auflösung des Visium-Assays lediglich die Charakterisierung von Zellnischen, nicht aber einzelner Zelltypen, was weitere, detailliertere Studien in größerem Umfang erforderlich macht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Sarkoidose-Granulom eine komplexe Struktur darstellt, deren Aufrechterhaltung das Zusammenspiel verschiedener Immunzellen und Fibroblasten erfordert. Mithilfe der räumlichen Transkriptomik untersuchten wir das Expressionsprofil der wichtigsten Nischen innerhalb des chronischen pulmonalen Sarkoidose-Granuloms, um deren Rolle innerhalb des Granuloms aufzuklären. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die in der zentralen Granulom-Makrophagennische vorhandenen Makrophagen scheinbar widersprüchliche Funktionen besitzen, da sie Gene exprimieren, die an der Pathogenese beteiligt sind.

Clearance von Genen und fibrotisches ECM-Remodeling. Es ist unklar, ob Makrophagen mit einem proinflammatorischen M1-Phänotyp später den profibrotischen M2-Phänotyp annehmen oder ob beide Makrophagenpopulationen das zentrale Granulom besiedeln und so eine proinflammatorische und profibrotische M1/M2-Hybridnische bilden. Einzelzellanalysen sind erforderlich, um dieses Rätsel zu lösen. Dennoch scheint ein fein abgestimmtes Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und profibrotischen Faktoren der Schlüssel zur Granulom-Erhaltung zu sein. Sowohl SPP1-Makrophagen und CTHRC1-Fibroblasten, die zuvor bei IPF entdeckt wurden, traten auch in unserem Datensatz zur chronischen Sarkoidose auf. Die Übertragung von Forschungsergebnissen aus der IPF-Forschung auf die Sarkoidoseforschung könnte die Forschung zur chronischen Sarkoidose voranbringen oder zukünftig neue Wege für deren Behandlung eröffnen.

Danksagungen

Die Autoren danken der Forschungseinheit für Lasermikroskopie und der Forschungseinheit Genomik (RCUG) der Medizinischen Hochschule Hannover für ihre Unterstützung sowie allen Studienteilnehmern für ihre Erlaubnis, ihre jeweiligen Gewebeproben für Forschungszwecke zu verwenden.

Autorenbeiträge

JCS, LN und TW haben das Projekt konzipiert. JCS hat die Finanzierung eingeworben. LC und LG führten die räumliche Barcodierung und die Bibliothekspräparation durch. LC, LG und SB führten IHF und ISH durch. Die histologischen Bilder wurden von LN und DJHY ausgewertet. LC, JR, LN und JCS führten die Datenanalyse durch. Die Rekrutierung und Betreuung der Patienten erfolgte durch MG, JG, RW, TG, BS und JCS. Die Probenentnahme wurde von FI, JCK, DJ und LNTW durchgeführt und überwacht. JH, TG, JCK, BS, MMH, NK, AP und DJ lieferten wichtige Interpretationen, Annotationen und Kommentare zu den Daten und dem Manuskript. SYL und IVY stellten ergänzende Daten zur Validierung bereit. YL, CF, LN und JCS leitete das Projekt. LC, HY und JCS verfassten das Manuskript, das von allen Autoren geprüft, bearbeitet und genehmigt wurde.

Zusatzmaterial

Zusatzmaterial ist verfügbar unter *Amerikanisches Journal für Atemwegs- und Intensivmedizin* online.

Interessenkonflikte

Bitte beachten Sie die ICMJE-Offenlegungsformulare, die Ihnen zur Verfügung gestellt wurden als **Zusatzmaterial**. Die

Finanzierung

JCS wird von der Fritz Thyssen Stiftung (10.21.2.021MN) und der Else Kröner-Fresenius Stiftung (2023_EKCS.18) gefördert. LN und JCS werden von der Ann Theodore Stiftung und dem Deutschen Zentrum für Lungenforschung (FKZ 82DZL002B1, FKZ 82DZL002C1 und FKZ 82DZL82C1) unterstützt.

Datenverfügbarkeit

Dieser Artikel enthält einen **Online-Datenergänzung**, das zugänglich ist unter Registerkarte „Ergänzungsmittel“ Die

Haftungsausschluss für künstliche Intelligenz

Für die Erstellung dieses Manuskripts wurden keine Werkzeuge der künstlichen Intelligenz verwendet.

Referenzen

1. Schupp JC, Freitag-Wolf S, Bargagli E, et al. Phänotypen der Organbeteiligung bei Sarkoidose. *Eur Respir J*. 2018;51:1700991. <https://doi.org/10.1183/13993003.00991-2017>
2. Baughman RP, Teirstein AS, Judson MA, et al.; Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS) Forschungsgruppe. Klinische Merkmale von Patienten in einer Fall-Kontroll-Studie zu Sarkoidose. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1885-1889. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.10.2104046>
3. Patterson KC, Strek ME. Lungenfibrose bei Sarkoidose. Klinische Merkmale und Ergebnisse. *Ann Am Thorac Soc*. 2013;10:362-370. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201303-069FR>
4. Thomson AD. Die Pathologie der Sarkoidose. *Postgrad Med J*. 1958;34:248-253. <https://doi.org/10.1136/pgmj.34.391.248>
5. Schupp JC, Vukmirovic M, Kaminski N, Prasse A. Transkriptomprofile bei Sarkoidose und ihre potenzielle Rolle bei der Krankheitsvorhersage. *Curr Opin Pulm Med*. 2017;23:487-492. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000403>
6. Broos CE, van Nimwegen M, Hoogsteden HC, Hendriks RW, Kool M, van den Blink B. Granulombildung bei Lungensarkoidose. *Front Immunol*. 2013;4:437. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00437/abstract>
7. Mishra BB, Poulter LW, Janossy G, James DG. Die Verteilung von lymphoiden und makrophagenähnlichen Zellsubpopulationen in Sarkoidose- und Kveim-Granulomen: möglicher Mechanismus der negativen PPD-Reaktion bei Sarkoidose. *Klinische Experimentelle Immunologie*. 1983;54:705-715.
8. Zhang H, Costabel U, Dai H. Die Rolle verschiedener Immunzellen bei der Sarkoidose. *Front Immunol*. 2021;12:788502. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.788502>
9. Nardi A, Brillat PY, Letoumelin P, et al. Sarkoidose im Stadium IV: Vergleich der Überlebensrate mit der Allgemeinbevölkerung und der Todesursachen. *Eur Respir J*. 2011;38:1368-1373. <https://doi.org/10.1183/09031936.00187410>
10. Jency F, Uzunhan Y, Lacroix M, et al. Prädiktoren der Mortalität bei fibrosierender pulmonaler Sarkoidose. *Respir Med*. 2020;169:105997. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105997>
11. Kirkil G, Lower EE, Baughman RP. Prädiktoren der Mortalität bei pulmonaler Sarkoidose. *Breast*. 2018;153:105-113. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.07.008>
12. Ardini-Poleske ME, Clark RF, Ansong C, et al.; LungMAP-Konsortium. LungMAP: der molekulare Atlas des Lungenentwicklungsprogramms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;313:L733-L740. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00139.2017>
13. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al. QuPath: Open-Source-Software für die digitale Pathologie-Bildanalyse. *Wissenschaftliche Berichte*. 2017;7:16878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
14. Schmidt U, Weigert M, Broaddus C, Myers G. Zellerkennung mit sternkonvexen Polygonen. In: *Medizinische Bildverarbeitung und computergestützte Intervention – MICCAI 2018* Lecture Notes in Computer Science(), Band 11071. Cham: Springer, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00934-2_30
15. Krausgruber T, Redl A, Barreca D, et al. Einzelzell- und räumliche Transkriptomik enthüllen aberrante lymphoide Entwicklungsprogramme, die die Granulombildung antreiben.

- Immunität*. 2023;56:289-306.e7.<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.01.014>
16. Liao SY, Atif SM, Mould K, et al. Einzelzell-RNA-Sequenzierung identifiziert transkriptionelle Heterogenitäten von Makrophagen bei granulomatösen Erkrankungen. *Eur Respir J*. 2021;57:2003794. <https://doi.org/10.1183/13993003.03794-2020>
 17. Oliveros JC, Venny. Ein interaktives Werkzeug zum Vergleichen von Listen mit Venn-Diagrammen. 2007. 2015. Zugriff am 28. August 2025. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
 18. Morse C, Tabib T, Sembrat J, et al. Proliferierende SPP1/MERTK-exprimierende Makrophagen bei idiopathischer Lungenfibrose. *Eur Respir J*. 2019;54:1802441. <https://doi.org/10.1183/13993003.02441-2018>
 19. Zhao T, Su Z, Li Y, Zhang X, You Q. Funktion des Chitinase-3-ähnlichen Proteins-1 und seine Rolle bei Krankheiten. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5:201. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00303-7>
 20. Kitamoto S, Egashira K, Ichiki T, et al. Die Hemmung der Chitinase fördert die Atherosklerose bei hyperlipidämischen Mäusen. *Am J Pathol*. 2013;183:313-325. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.04.003>
 21. Liu J, Ma P, Lai L, et al. Transkriptionelle und immunologische Landschaft der kardialen Sarkoidose. *Circ Res*. 2022;131:654-669. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.320449>
 22. Schupp JC, Adams TS, Cosme C, et al. Integrierter Einzelzellatlas der Endothelzellen der menschlichen Lunge. *Verkehr*. 2021;144:286-302. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052318>
 23. Nakamizo S., Sugiura Y., Ishida Y. et al. Die Aktivierung des Pentosephosphatwegs in Makrophagen ist entscheidend für die Granulombildung bei Sarkoidose. *J Clin Invest*. 2023;133:e171088. <https://doi.org/10.1172/JCI171088>
 24. Liu J, Li F, Ping Y, et al. Lokale Produktion der Chemokine CCL5 und CXCL10 lockt CD8+ T-Lymphozyten in das Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre. *Oncotarget*. 2015;6:24978-24989. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4617>
 25. Kohli K, Pillarisetty VG, Kim TS. Wichtige Chemokine steuern die Migration von Immunzellen in soliden Tumoren. *Krebsgen-Ther*. 2022;29:10-21. <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00303-x>
 26. Adams TS, Schupp JC, Poli S, et al. Einzelzell-RNA-Sequenzierung deckt ektopische und aberrante lungenständige Zellpopulationen bei idiopathischer Lungenfibrose auf. *Wissenschaftliche Fortschritte*. 2020;6:eaba1983. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1983>
 27. Tsukui T, Sun KH, Wetter JB, et al. Ein Atlas von Kollagen-produzierenden Lungenzellen identifiziert mehrere Subsets mit unterschiedlicher Lokalisation und Relevanz für die Fibrose. *Nat Commun*. 2020;11:1920. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15647-5>
 28. Acharya PS, Zukas A, Chandan V, Katzenstein ALA, Puré E. Fibroblasten-Aktivierungsprotein: eine Serinprotease, die an der Remodellierungsgrenze bei idiopathischer Lungenfibrose exprimiert wird. *Hum Pathol*. 2006;37:352-360. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.11.020>
 29. Yang P, Luo Q, Wang X, et al. Umfassende Analyse der Expression von Fibroblasten-Aktivierungsproteinen bei interstitiellen Lungenerkrankungen. *Am J Respir Crit Care Med*. 2023;207:160-172. <https://doi.org/10.1164/rccm.202110-2414OC>
 30. Miedema J, Cinetto F, Smed-Sörensen A, Spagnolo P. Die Immunpathogenese der Sarkoidose. *J Autoimmun*. 2024;149:103247. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2024.103247>
 31. Christmann RB, Sampaio-Barros P, Stifano G, et al. Assoziation von Interferon und transformierendem Wachstumsfaktor β -regulierte Gene und Makrophagenaktivierung bei systemischer Sklerose-bedingter progressiver Lungenfibrose. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66:714-725. <https://doi.org/10.1002/art.38288>
 32. Wang J, Zhang X, Long M, et al. Von Makrophagen stammendes GPNMB, das durch fibrotische extrazelluläre Matrix eingeschlossen wird, fördert die Lungenfibrose. *Commun Biol*. 2023;6:136. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04333-5>
 33. Lee CG, Herzog EL, Ahangari F, et al. Chitinase 1 ist ein Biomarker und therapeutisches Ziel bei sklerodermieassoziiertes interstitieller Lungenerkrankung, das die TGF- β 1-Signalgebung verstärkt. *J Immunol*. 2012;189:2635-2644. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201115>
 34. Grosso S., Margollicci MA, Bargagli E. et al. Serumspiegel von Chitotriosidase als Marker für Krankheitsaktivität und klinisches Stadium bei Sarkoidose. *Scand J Clin Lab Invest*. 2004;64:57-62. <https://doi.org/10.1080/00365510410004092>
 35. Bargagli E, Bennett D, Maggiorelli C, et al. Humane Chitotriosidase: ein empfindlicher Biomarker für Sarkoidose. *J Clin Immunol*. 2013;33:264-270. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9754-4>
 36. Kruit A, Grutters JC, Ruven HJT, van Moorsel CCM, van den Bosch JMM. Ein CHI3L1-Genpolymorphismus ist mit den Serumspiegeln von YKL-40, einem neuartigen Sarkoidosemarker, verbunden. *Respir Med*. 2007;101:1563-1571. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.12.006>
 37. Johansen JS, Milman N, Hansen M, Garbarsch C, Price PA, Gaudal N. Erhöhtes Serum-YKL-40 bei Patienten mit pulmonaler Sarkoidose – ein potenzieller Marker der Krankheitsaktivität? *Respir Med*. 2005;99:396-402. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2004.09.016>
 38. Moore C, Liao SY, Wood C, et al. Einzelzell-Transkriptomsignaturen der Sarkoidose in Immunzellpopulationen der Lunge. *GenomkBioRxiv*. 2025. Abgerufen am 1. September 2025. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2025.01.20.633917>
 39. Sati S, Huang J, Kersh AE, et al. Die Rekrutierung von CXCR4+ Typ 1 angeborenen lymphoiden Zellen unterscheidet die Sarkoidose von anderen granulomatösen Hauterkrankungen. *J Clin Invest*. 2024;134:e178711. <https://doi.org/10.1172/JCI178711>
 40. Daccache J, Park E, Junejo M, et al. Räumliche Transkriptomik enthüllt organisierte und distinkte Immunaktivierung bei kutanen granulomatösen Erkrankungen. *J Allergy Clin Immunol*. 2024;154:1216-1231. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2024.07.021>
 41. Lequain H, Dégletagne C, Streichenberger N, et al. Räumliche Transkriptomik enthüllt Signaturen histopathologischer Veränderungen bei muskulärer Sarkoidose. *Zellen*. 2023;12:2747. <https://doi.org/10.3390/cells12232747>
 42. Hu W, Spaink HP. Die Rolle von TLR2 bei durch Mykobakterien verursachten Infektionskrankheiten: von der Zellbiologie zum therapeutischen Ziel. *Biologie*. 2022;11:246. <https://doi.org/10.3390/biology11020246>
 43. Crouser ED, Locke LW, Julian MW, et al. Phagosomenregulierte mTOR-Signalgebung während der Biogenese von Sarkoidose-Granulomen. *Eur Respir J*. 2021;57:2002695. <https://doi.org/10.1183/13993003.02695-2020>
 44. Adouli J, Fried A, Swier R, Ghio A, Petrache I, Tilley S. Zelluläres Recycling außer Kontrolle: Die Rolle der dysregulierten Autophagie und des hyperaktiven mTORC1 in der Pathogenese der Sarkoidose. *Sarkoidose, diffuse vaskuläre Lungenerkrankung*. 2023;40:e2023016. <https://doi.org/10.36141/svld.v40i2.13498>

45. Pacheco Y, LimCX, Weichhart T, Valeyre D, Bentaher A, Calender A. Sarkoidose und die mTOR-, Rac1- und Autophagie-Triade. *Trends Immunol.* 2020;41:286-299.<https://doi.org/32122794>
46. Linke M, Pham HTT, Katholnig K, et al. Chronische Signalgebung über die metabolische Checkpoint-Kinase mTORC1 induziert die Bildung von Makrophagengranulomen und kennzeichnet das Fortschreiten der Sarkoidose. *Nat Immunol.* 2017;18:293-302.<https://doi.org/10.1038/ni.3655>
47. Ryan DG, O'Neill LAJ. Krebs-Zyklus wiedergeboren im Immunmetabolismus von Makrophagen. *Annu Rev Immunol.* 2020;38:289-313. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-081619-104850>
48. Zhang M, Zhang J, Hu H, et al. Multiomische Analyse von aus Monozyten stammenden Alveolarmakrophagen bei idiopathischer Lungenfibrose. *J Transl Med.* 2024;22:598.<https://doi.org/10.1186/s12967-024-05398-y>
49. Gibbons MA, MacKinnon AC, Ramachandran P, et al. Ly6C^{hi}Monozyten steuern die alternativ aktivierte profibrotische Makrophagenregulation der Lungenfibrose. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:569-581. <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1719OC>
50. Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, et al. IL-12 und IL-18 sind in Sarkoidose-Lungen erhöht und stimulieren die IFN- γ -Produktion. *J Immunol.* 2001;166:642-649.<https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.642>
51. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, et al. Das Immunparadoxon von Sarkoidose und regulatorischen T-Zellen. *J Exp Med.* 2006;203:359-370. <https://doi.org/10.1084/jem.20050648>
52. Su R, Nguyen M-LT, Agarwal MR, et al. Interferon-induzierbare Chemokine spiegeln Schweregrad und Progression bei Sarkoidose wider. *Respir Res.* 2013;14:121.<https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-121>
53. Groom JR, Luster AD. CXCR3-Liganden: redundante, kollaborative und antagonistische Funktionen. *Immunol Zellbiologie.* 2011;89:207-215.<https://doi.org/10.1038/icb.2010.158>
54. Nishioka Y, Manabe K, Kishi J, et al. CXCL9 und 11 bei Patienten mit pulmonaler Sarkoidose: eine Rolle der Alveolarmakrophagen. *Klinische Experimentelle Immunologie.* 2007;149:317-326.<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03423.x>
55. Bandyopadhyay D, Mirsaeidi MS. Sarkoidose-assoziierte Lungenfibrose: Zusammenhänge erkennen. *Eur Respir Rev.* 2023;32:230085.<https://doi.org/10.1183/16000617.0085-2023>
56. Lam AP, Gottardi CJ. β -Catenin-Signalgebung: ein neuartiger Mediator der Fibrose und potenzielles therapeutisches Ziel. *Curr Opin Rheumatol.* 2011;23:562-567.<https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32834b3309>
57. Bhattacharyya S, Wang W, Morales-Nebreda L, et al. Tenascin-C führt zum Fortbestehen der Organfibrose. *Nat Commun.* 2016;7:11703.<https://doi.org/10.1038/ncomms11703>
58. Suzuki H, Fujimoto M, Kawakita F, et al. Toll-like receptor 4 and tenascin-C signaling in cerebral vasospasm and brain injuries after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl.* 2020;127:91-96.https://doi.org/10.1007/978-3-030-04615-6_15