

Aus dem Bereich Medizin
Innere Medizin V – Pneumologie, Allergologie,
Beatmungs- und Umweltmedizin
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Die Zusammensetzung des Mikrobioms bei Sarkoidose

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

Vorgelegt von: André Pascal Becker
geb. am: 22.11.1989 in 66424 Homburg

Tag der Promotion: 15.06.2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Robert Bals

Prof. Sören Becker

Abstrakt/Zusammenfassung

Einleitung: Sarkoidose ist eine entzündliche Systemerkrankung mit einer nicht vollständig geklärten Ätiologie. Es existieren mehrere Hypothesen über ein auslösendes Antigen, welches eine Immunreaktion initiiert. Im Vordergrund stehen dabei mikrobielle Erreger, welche durch vorausgehende Studien als potentielle Auslöser identifiziert wurden. Durch neue Verfahren der Mikrobiomanalyse können deutlich breitere Spektren an potentiellen Erregern erfasst werden.

Ziele: Diese Arbeit vergleicht das Mikrobiom von Patienten mit Sarkoidose und dem von Patienten mit anderen interstitiellen Lungenerkrankungen und hat zum Ziel, einen mikrobiellen Auslöser der Sarkoidose zu identifizieren.

Methoden: Im Rahmen der PULMOHOM Studie wurden Patienten mit Sarkoidose und anderen interstitiellen Lungenerkrankungen rekrutiert und einer Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage unterzogen. Wichtige klinische Patientendaten, sowie die zelluläre Zusammensetzung der bronchoalveolären Lavage (BAL) in Bezug auf die Immunzellen wurden zwischen beiden Gruppen verglichen. Die BAL wurde durch Sequenzierung der mikrobiellen 16sRNA Gene und folgender biostatistischer Auswertung auf Unterschiede im Mikrobiom untersucht.

Ergebnisse: Es zeigten sich wenige signifikante Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung der BAL zwischen beiden Gruppen. Dabei war in der Sarkoidosegruppe ein höherer CD4/CD8 Quotient, sowie ein höherer Anteil an Alveolarmakrophagen, sowie Lymphozyten vorhanden. Jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Mikrobioms zwischen Patienten mit Sarkoidose und anderen interstitiellen Lungenerkrankungen. Der direkte Vergleich verschiedener Bakterienstämme mittels Heatmap, sowie der Alpha-Diversität, Hauptkomponentenanalyse und Korrespondenzanalyse zeigten keine signifikanten Unterschiede. Eine Betrachtung von Mykobakterien und Propionibakterien zeigte ebenso keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassung: Das Mikrobiom der Sarkoidose unterscheidet sich in der vorliegenden Arbeit nicht von dem anderer interstitiellen Lungenerkrankungen,

basierend auf einer Sequenzierung der 16sRNA Gene und einer multivarianten statistischen Auswertung. Hinweise auf eine Beteiligung von Mykobakterien oder Propionibakterien bei der Genese der Sarkoidose wurden nicht gesehen. Die Analysen konnten eine mikrobielle Genese der Sarkoidose nicht bekräftigen. Die aufgeführten Daten widerlegen allerdings auch nicht eine mikrobiologische Komponente in der Pathogenese der Sarkoidose. Diverse Faktoren, zum Beispiel der Ort der Materialgewinnung, das Krankheitsstadium oder Komorbiditäten könnten das Mikrobiom maßgeblich beeinflussen. Die vorliegenden Daten zeigen nur einen kleinen Ausschnitt des Gesamtbildes Mikrobiom der Lunge. Gegenstand zukünftiger Studien könnte die Untersuchung dieser Faktoren mit ihren Auswirkungen sein um eine möglichst standardisierte Herangehensweise bei Mikrobiomanalysen zu ermöglichen.

Inhaltsverzeichnis

Abstract/Zusammenfassung.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	7
1.1 Übersicht.....	7
1.2 Epidemiologie.....	7
1.3 Klinische Manifestation.....	8
1.4 Diagnostik.....	9
1.5 Immunopathogenese.....	9
1.6 Genetik.....	10
1.7 Mikrobiom.....	11
1.8 Analyse von 16s rRNA Genen.....	12
2 Fragestellung.....	13
3 Methodik.....	14
3.1. Allgemeiner Studienaufbau.....	14
3.3. Materialgewinnung.....	15
3.4 Primäre Verarbeitung der Proben.....	16
3.5 Sekundäre Verarbeitung der Proben.....	17
3.6 Statistische Auswertung.....	19
4 Ergebnisse.....	20
4.1 Patientencharakteristika.....	20
4.2 Qualitätskontrolle und Eliminierung von Hintergrundrauschen.....	23
4.1 Übersicht der registrierten OTUs.....	24
4.2 Vergleich der relativen Häufigkeiten auf Ebene des Phylums.....	25
4.3 Alpha Diversität der OTUs.....	28
4.4 Ordination mittels Hauptkomponentenanalyse und Korrespondenzanalyse.....	30
4.5 Darstellung einer hierarchischen Clustering mittels Heatmap.....	33
4.6. Spezifische Analyse der Taxa „Mycobacterium“ und „Propionibacterium“.....	39
5 Diskussion.....	43
6 Anhang.....	48
Literaturverzeichnis.....	48

Lebenslauf/Vita..... 53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Basisdaten Patientenkollektiv.....	21
Tabelle 2: Lungenfunktion im Median	22
Tabelle 3: Quantifizierung BAL im Median	22

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fast QC - Mean Quality Scores	23
Abbildung 2: Alle OTUs und ihre Taxonomie nach Phylum, V1V2	24
Abbildung 3: Alle OTUs und ihre Taxonomie nach Phylum, V3V4	25
Abbildung 4: Relative Häufigkeit nach Phylum, V1V2.....	26
Abbildung 5: Relative Häufigkeit nach Phylum, V3V4.....	26
Abbildung 6: Relative Häufigkeit nach Phylum, V1V2 in Prozent, dargestellt als Kastengrafik..	27
Abbildung 7: Relative Häufigkeit nach Phylum, V3V4 in Prozent, dargestellt als Kastengrafik..	28
Abbildung 8: Alpha-Diversität der Region V1V2	29
Abbildung 9: Alpha-Diversität der Region V3V4	29
Abbildung 10: Korrespondenzanalyse der Region V1V2.....	31
Abbildung 11: Korrespondenzanalyse der Region V3V4.....	31
Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse der Region V1V2.....	32
Abbildung 13: Hauptkomponentenanalyse der Region V3V4	32
Abbildung 14: Darstellung einer Clusterung nach Klasse mittels Heatmap, V1V2 Sarkoidose..	33
Abbildung 15: Darstellung einer Clusterung nach Klasse mittels Heatmap, V1V2 Kontrolle	34
Abbildung 16: Darstellung einer Clusterung nach Klasse mittels Heatmap, V3V4 Sarkoidose..	35
Abbildung 17: Darstellung einer Clusterung nach Klasse mittels Heatmap, V3V4 Kontrolle	35
Abbildung 18: Darstellung einer Clusterung nach Phylum mittels Heatmap, V1V2 Sarkoidose	36
Abbildung 19: Darstellung einer Clusterung nach Phylum mittels Heatmap, V1V2 Kontrolle	37
Abbildung 20: Darstellung einer Clusterung nach Phylum mittels Heatmap, V3V4 Sarkoidose	38
Abbildung 21: Darstellung einer Clusterung nach Phylum mittels Heatmap, V3V4 Kontrolle	38
Abbildung 22: Relative Häufigkeit von Mykobakterien in beiden Vergleichsgruppen, V1V2	39
Abbildung 23: Relative Häufigkeit von Mykobakterien in beiden Vergleichsgruppen, V3V4	40
Abbildung 24: Relative Häufigkeit von Propionibakterien in beiden Vergleichsgruppen, V1V2 .	41
Abbildung 25: Relative Häufigkeit von Propionibakterien in beiden Vergleichsgruppen, V3V4 .	41

1 Einleitung

1.1 Übersicht Sarkoidose

Die Sarkoidose ist eine Systemerkrankung, welche charakterisiert ist durch eine Inflammation mit Manifestation an verschiedensten Organen. Dabei reagieren Immunzellen mit der Bildung von nicht-verkäsenden Epitheloid- und Riesenzellhaltigen Granulomen[36]. Die Inflammation beeinflusst die Funktion des betroffenen Organs und kann zum vollständigen Versagen der Organfunktion führen. Aus epidemiologischer (Inzidenz), sowie klinischer Sicht (akut, chronisch) zeigt die Erkrankung eine signifikante Variabilität. Hohe Raten an Spontanheilungen bei akuten Verlaufsformen stehen den chronischen Verlaufsformen mit häufig fortschreitender Destruktion des betroffenen Organs gegenüber. Eine gezielte Therapie existiert aufgrund eines unvollständigen Verständnis der Pathogenese noch nicht[36].

1.2 Epidemiologie der Sarkoidose

Die Inzidenz der Sarkoidose ist stark variabel, abhängig von Region, Ethnizität und somit von genetischen Faktoren. Die höchste jährliche Inzidenz findet man in nordeuropäischen Ländern (5-40 pro 100.000 Einwohner)[28]. In Japan finden sich niedrigere Inzidenzraten mit 1-2 pro 100.000 Einwohner[28]. Ein Hinweis, dass die Sarkoidose stark von genetischen Faktoren abhängt zeigt die Unterschiedlichkeit der Inzidenz bei dunkelhäutigen Amerikanern im Vergleich zu hellhäutigen Amerikanern. (35.5 / 100.000 gegen 10.9/100.000)[28]. Außerdem präsentieren sich zwei Erkrankungsgipfel, einen im jungen Erwachsenenalter von 20-40 Jahren und einen um das 65. Lebensjahr[36]. Bei jungen Erwachsenen sieht man häufig einen akuten Verlauf, bei dem die spontane Heilungsrate sehr hoch ist. Bei älteren Patienten sieht man eher subakute, chronisch-fibrosierende Verlaufsformen[36].

1.3 Klinische Manifestation der Sarkoidose

Die Entzündungsreaktion bei Sarkoidose betrifft in circa 90% der Fälle die Lunge, potentiell kann aber jedes Organ bei einer Sarkoidose betroffen sein[22]. Weitere häufigere Manifestationsorte sind Leber, Milz, Auge, periphere Lymphknoten, Haut, Herz, zentrales und peripheres Nervensystem[11]. Die häufigsten Symptome bei Befall der Lunge sind Husten, thorakale Schmerzen, Dyspnoe. Die Spannbreite der Symptomlast präsentiert sich als sehr groß und reicht von fast völliger Symptombefreiheit bis respiratorischer Insuffizienz mit terminalem Lungenversagen[11]. Verlaufen kann die Sarkoidose dabei sowohl akut, als auch chronisch, mit der Möglichkeit von einer akuten in eine chronische Form überzugehen[11]. Bei jungen Erwachsenen sieht man häufig einen akuten Verlauf, bei dem die spontane Heilungsrate sehr hoch ist. Diese Verlaufsformen spiegeln sich in den verschiedenen Röntgentypen der Sarkoidose wider. Der häufigste röntgenologische Befund ist dabei Stadium I, die bilaterale Lymphadenopathie (Häufigkeit 40%, Remission 70-90%). Stadium II mit beginnenden Lungeninfiltraten findet sich in 25 % der Fälle (40-70% Remissionsrate). Stadium III und Stadium IV zeigen Lungenparenchyminfiltrate ohne Hiluslymphknotenvergrößerungen und ein Fibroestadium (Häufigkeit 5 – 15 %, Remission 0- 20 %)[11]. Typischerweise manifestiert sich die akute Sarkoidose auch in Form eines Löfgren Syndroms, welches charakterisiert ist durch eine bilaterale Lymphadenopathie, einem Erythema nodosum und Sprunggelenksarthritids[30].

Patienten mit einer chronischen Verlaufsform, leiden häufig unter einer progredienten pulmonalen Fibrosierung der Lunge, welche schließlich zu einem Organversagen führen kann. Analog zu anderen Lungenerkrankungen mit fortschreitender Fibrose bleibt als Therapie schließlich nur die Option einer Transplantation[35].

Aber auch extrapulmonale Manifestationen präsentieren sich klinisch mit einem breiten Spektrum. Dieses reicht zum Beispiel bei einer kardialen Beteiligung von asymptomatischen Verläufen bis hin zu Herzrhythmusstörungen oder dem plötzlichen Herztod[11].

1.4 Diagnostik der Sarkoidose

Die Diagnostik wird heutzutage bei pulmonaler Beteiligung üblicherweise durch eine Kombination mehrerer Verfahren durchgeführt. Es obliegt häufig der klinischen Präsentation, also Anamnese und klinische Untersuchung, andere Diagnosen mit höherer Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Weiterhin haben die radiodiagnostischen Verfahren, also Röntgen-Thorax, Computertomographie (HighResolution-CT), aber auch Magnetresonanztomographie und Positronen-Emissions-Tomographie-CT bei extrapulmonalen Manifestationen einen hohen Stellenwert. Durch die Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage (BAL), transbronchialer Biopsie oder ultraschallgesteuerter Feinnadelaspiration (EBUS-TBNA) kann die diagnostische Trefferquote auf über 90 % gesteigert werden[29]. Eine BAL alleine kann eine Sarkoidose von anderen interstitiellen Lungenerkrankungen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% diskriminieren, wenn der CD4/CD8 Quotient über 4:1 liegt und andere Zellpopulationen entsprechend niedrig vorhanden sind. (Eosinophile < 1 %, verminderte Neutrophilenzahl)[14].

1.5 Immunopathogenese der Sarkoidose

Eine zentrale Stellung in der Pathogenese stellt die Granulombildung dar. Genauer entstehen bei der Sarkoidose nicht-verkäsende Epitheloidzellgranulome. Diese sind durch das Vorhandensein von spezialisierten Bindegewebszellen, den Epitheloidzellen gekennzeichnet. Die Anwesenheit der Epitheloidzellen stellt histopathologisch ein diagnostisches Kriterium der Sarkoidose dar, ist allerdings nicht pathognomonisch. Eine Vielzahl anderer Erkrankungen führen ebenfalls zur Bildung von Granulomen[17]. Weitere histopathologische Kriterien einer Sarkoidose sind Langerhand-Riesenzellen, Lymphozyten, sowie das Fehlen einer zentralen Nekrose in den Granulomen[38]. Granulome bilden sich meistens, wenn ein Agens nicht vollständig von Makrophagen eliminiert werden kann[32]. Am Beginn der Granulombildung steht somit die Aktivierung des Immunsystems, genauer T-Zellen und Makrophagen, letztere erkennen über Pattern-Recognition

Rezeptoren bestimmte Oberflächenstrukturen (PAMPs). Die aktivierten Makrophagen exprimieren folgend Zytokine, z.B. CXCL10, IL-12 und IL18. Diese Zytokine wiederum locken weitere T-Zellen, speziell vom CD4/Th1-Phänotyp an, welche sich durch endogen produziertes IL-2 weiter teilen. Die Sekretion von IL-12 und IL-18 dient dazu, dass sich weiterhin T-Zellen vom CD4/Th1-Typ differenzieren. Diese wiederum exprimieren Interferon- γ , TNF- α und GM-CSF. Diese Zytokine fördern dann die Bildung von Aggregaten aus Makrophagen und die Fusion zu mehrkernigen Riesenzellen. Durch diese Verkettung von Immunreaktionen entsteht das nicht-nekrotisierende Granulom[41]. Bei der akuten Form der Sarkoidose kann das Agens innerhalb des Granuloms gebunden und beseitigt werden. Die Immunreaktion wird folgend durch Reduktion von TNF- α deaktiviert. Bei der chronischen Form zeigt sich eine verminderte sekretorische Aktivität der Makrophagen. Dies hat eine verminderte Anzahl an T-Lymphozyten zur Folge, was wiederum die Beseitigung des Agens verhindert. Als Konsequenz zeigt sich eine fortbestehende Granulombildung mit Aktivierung von Fibrozyten, unter anderem via IL-10. Diese Fibrozyten fördern dann eine zunehmende Vernarbung der Lunge[32].

1.6 Genetik der Sarkoidose

Bisher bekannt ist, dass der Entstehung der Sarkoidose eine genetische Disposition voraus geht. Dabei sind bestimmte Genvarianten der humanen Leukozytenantigene (HLA) und Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) hervorzuheben, welche eine gewisse Empfänglichkeit für die Entstehung einer Sarkoidose verursachen. MHC-Klasse I Genkomplexe wie HLA-B7 und HLA-B8 wurden häufig mit der Erkrankung in Verbindung gebracht[25] [42]. MHC-Klasse II Genkomplexe, wie HLA-DRB1, DRB3 werden ebenso mit der Entstehung einer Sarkoidose assoziiert[39]. Neuere Studien haben auch weitere genetische Varianten, betreffend das BTNL2-Gen[43] und das TNF-Gen[45] als Risikokonstellationen identifizieren können. Diese genetischen Varianten beeinflussen die Antigenpräsentation (HLA-DR, HLA-B) und Aktivierung von Immunzellen (BTNL2, TNF). Durch diese genetischen Veränderungen kommt es zu einer nicht adäquaten Immunreaktion, welche die Bildung von epitheloid- und riesenzellhaltigen Granulomen nach sich zieht.

Weiterhin zeigt sich in der ersten genomweiten Assoziationsstudie zum Thema Sarkoidose ein Zusammenhang mit Sarkoidose und dem Annexin A11 Gen auf Chromosom 10q22.3[27]. Dieses Gen besitzt einen Stellenwert unter anderem bei der Apoptose und Proliferation von Zellen und scheint ebenfalls eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen zu spielen[27].

1.7 Mikrobiom

Die Ansicht, dass die Lunge ein steriles Milieu darstellt, ist bereits seit einiger Zeit nicht mehr vertretbar. Vielmehr stellt die Lunge ein Reservoir für diverse Bakterien dar, welches mit der Umwelt und sich selbst in Interaktion steht[12]. Kulturunabhängige Methoden konnten eine Vielzahl von mikrobiellen Erregern in den unteren Atemwegen nachweisen[13] [19] Es zeigte sich, dass die mikrobielle Zusammensetzung der Lunge einem dynamischen Prozess unterliegt[13]. Außerdem konnte durch Untersuchungen des Darmmikrobioms bereits der Einfluss der bakteriellen Flora auf bestimmte Erkrankungen, zum Beispiel Clostridium difficile Infektionen, oder andere Erkrankungen gezeigt werden[19]. Daher stellt sich die Frage, ob auch Veränderungen des Mikrobioms der Lunge an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sind. Bei der Sarkoidose wird schon seit längerem von der Theorie ausgegangen, dass ein übertragbares Agens bei gegebener genetischer Prädisposition eine Sarkoidose auslösen kann. Da von Fällen berichtet wurde, bei denen durch eine Herztransplantation eines an Sarkoidose erkrankten Donors, der Spender ebenfalls an einer Sarkoidose erkrankte[4], liegt der Verdacht eines übertragbaren Agens nahe. Gerade mikrobielle Erreger werden schon seit geraumer Zeit zum Kreis der Verdächtigen gezählt. So haben sich im Laufe der Jahre Mykobakterien und Propionibakterien als Puzzlestücke der Pathogenese bei Sarkoidose herauskristallisiert [15] [8] [31]. In mehreren Studien konnten Nukleinsäuren und Proteine von Mykobakterien aus Proben von Sarkoidosepatienten isoliert werden[10] Es konnte außerdem eine spezifische Immunreaktion von Sarkoidosepatienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Diese Immunreaktion betrifft B-Zellen und Th-1 Zellen, welche auf mykobakterielle Antigene, z.B. mKatG, ESAT-6, Superoxid-dismutasen oder Hitzeschockproteine reagieren[7] [33]. Ebenso konnten Nukle-

insäuren und Proteine von Propionibakterien in Lymphknoten von Sarkoidosepatienten identifiziert werden[16]. Als eindeutige Auslöser konnte bisher keiner der beiden verantwortlich gemacht werden. Viele Versuche einen mikrobiellen Erreger zu finden bedienten sich Verfahren, bei denen nur ein Bruchteil der vorhandenen mikrobiellen Flora identifiziert wird[44]. Durch neuere Verfahren, z.B. Next-Generation sequencing ist es möglich die Gesamtheit an mikrobiellen Erregern in einer Probe nachzuweisen[1]. Somit kann ein Versuch, nicht nur einzelne Erreger ins Visier zu nehmen, sondern das Mikrobiom bei Sarkoidosepatienten mittels 16s rRNA Gen Sequenzierung darzustellen, ein Schritt in Richtung Verständnis der Pathogenese sein. Wie bei anderen Lungenerkrankungen stellt sich auch die Frage, ob eine pulmonale Sarkoidose mit Veränderungen der mikrobiellen Flora der Lunge einhergeht. Dies ist zum Beispiel der Fall bei anderen Lungenerkrankungen, wie bei einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung[23]. Auch konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung des Mikrobioms bei Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen mit einer Progression der Erkrankung einhergeht[24]. Veränderungen des Mikrobioms bei Sarkoidose könnten daher einen Stellenwert im Verlauf und der Manifestation der Erkrankung haben.

1.8 Analyse von 16s rRNA Genen

Bei Untersuchungen des Mikrobioms wird heutzutage häufig eine Sequenzierung der 16s rRNA Gene durchgeführt. Die 16s rRNA ist Teil des bakteriellen Ribosoms und besteht aus unterschiedlichen Regionen, V1-V9. Diese Regionen weisen eine hohe Variabilität auf, anhand welcher eine Identifikation und Diskriminierung der Bakterien auf verschiedenen Ebenen der Taxonomie möglich ist[46]. Die Sequenzierung findet dabei häufig mittels Next-Generation-Sequencing statt. Bei dieser Methode werden viele einzelne Fragmente der rRNA gleichzeitig amplifiziert und sequenziert, sodass eine große Menge an Material analysiert werden kann[1].

2 Fragestellung

Es bestehen Hinweise auf eine mikrobielle Komponente in der Genese der Sarkoidose, jedoch konnte bisher kein spezifischer Erreger identifiziert werden. Daher macht es Sinn das gesamte Mikrobiom bei Sarkoidose mit einer Kontrollgruppe zu vergleichen. Dieses kann durch neue Methoden mittels Next-Generation Sequencing und 16srRNA Gensequenzierung untersucht werden. Aus diesem Grund wurde das Mikrobiom bei Sarkoidose und das Mikrobiom anderer interstitieller Lungenerkrankungen bei Patienten der PULMOHOM Studie verglichen. Das Ziel dieser Arbeit war die Darstellung des Mikrobioms bei Sarkoidose im Vergleich zu anderen interstitiellen Lungenerkrankungen. Dabei wurden bronchoalveoläre Lavagen von Patienten mit Sarkoidose und Patienten mit anderen interstitiellen Lungenerkrankungen gesammelt. In diesen wurden dann die bakteriellen 16s rRNA Gene sequenziert und biostatistisch ausgewertet. Die konkreten Fragestellungen lauten:

Gibt es Unterschiede des Mikrobioms zwischen Patienten mit Sarkoidose und anderen interstitiellen Lungenerkrankungen?

Gibt es ein spezielles Bakterium, welches bei Patienten mit Sarkoidose gehäuft in der Lunge vorhanden ist?

Sind Propionibakterien oder Mykobakterien bei Patienten mit Sarkoidose in der Lunge zu finden oder gehäuft zu finden?

3 Methodik

3.1. Allgemeiner Studienaufbau

Im Rahmen der PULMOHOM Studie wurde das Mikrobiom einer standardisierten bronchoalveolären Lavage von Patienten mit Sarkoidose und anderen interstitiellen Lungenerkrankungen ausgewertet.

Die Materialgewinnung erstreckte sich über 2 Jahre und 4 Monate von April 2014 bis Juli 2016. In diesem Zeitraum wurden Patienten aus dem ambulanten, sowie stationären Bereich der Inneren Medizin V (Klinik für Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin) des Universitätsklinikums des Saarlandes rekrutiert, bei denen der Verdacht einer Sarkoidose oder interstitiellen Lungenerkrankung bestand. Die Patienten wurden anhand der vorliegenden Diagnostik (Anamnese, klinische Untersuchung, Radiologie, Labor, Bronchoskopiebefund) in zwei Gruppen aufgeteilt, eine Untersuchungsgruppe (Arbeitsdiagnose: Sarkoidose) und eine Kontrollgruppe (Arbeitsdiagnose: andere interstitielle Lungenerkrankungen). Einschlusskriterium war die Diagnose einer Sarkoidose oder einer interstitiellen Lungenerkrankung.

Die Diagnose „Sarkoidose“ wurde gestellt, wenn:

- Eine Lymphknotenbiopsie den histologischen Nachweis von nicht-verkäsenden, epitheloidzelligen Granulomen erbrachte und eine andere Diagnose unwahrscheinlich war
- Klinik, radiologischer Befund, CD4/CD8-Quotient pathognomonisch für eine Sarkoidose waren und eine andere Diagnose unwahrscheinlich war

Die Diagnose „interstitielle Lungenerkrankung“ wurde gestellt, wenn:

- Klinik, radiologische Kriterien in Zusammenschau mit Histologie die Diagnose erbrachten (z.B. IPF, EAA)

Die Patienten gaben vor der Untersuchung ihr schriftliches Einverständnis, dass ein Teil des gewonnenen Materials zu Studienzwecken verwendet werden darf. Der PULMOHOM Studie wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammer des Saarlandes zugestimmt.

3.3. Materialgewinnung

Die Untersuchung wurde im Funktionsbereich Endoskopie der Inneren Medizin V (Klinik für Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin) des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt. Der Eingriff wurde von der zuständigen Oberärztin der Endoskopie mit einem flexiblen Bronchoskop durchgeführt. Lavagiert wurde standardisiert der Mittellappen, also Segment 4 und 5 der rechten Lunge. Zuerst wurden die Patienten zur Untersuchung sediert. Danach wurde mit dem flexiblen Bronchoskop ein nasaler oder oraler Zugang gewählt. Im Anschluss wurden Kehlkopf, Trachea und das einsehbare Bronchialsystem auf makroskopische Pathologien beurteilt. Nach der Befundung wurde der Abgang des Mittellappens aufgesucht und nach Erreichen einer Wedge Position durch einen Arbeitskanal des Bronchoskops ein steriler Lavagekatheter eingeführt. Im Anschluss wurden 100 ml bis 140 ml einer 0,9 % Kochsalzlösung fraktioniert in 20 ml Spritzen eingespült. Nachdem die Flüssigkeit im Mittellappen instilliert war, wurde die Kochsalzlösung wieder über den Arbeitskanal extrahiert.

Je nach individueller anatomischer Beschaffenheit des Mittellappenabgangs, sowie des Mittellappens selbst, wurde ein Rücklauf von 50 % – 55 % im Median erreicht. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Lavage makroskopisch nicht rot verfärbt war, da dies ein Hinweis auf eine Blutungsquelle und somit eine Verfälschung der Messwerte darstellen kann. Die erste rückgewonnene Portion aus der BAL wurde verworfen, die übrigen rückgewonnenen Proben wurden dann gepoolt.

3.4 Primäre Verarbeitung der Proben

Nach Gewinnung der BAL wurden 10 ml der gesamten Lavage separiert in ein 15 ml Falcon Röhrchen umgefüllt und mittels Zentrifuge in Flüssigkeit (BAL-Fluid) und Zellen (BAL-Zellen) getrennt. Die Zentrifuge (Hettich TYP: Rotixa P 4201) wurde für 10 Minuten bei 1200 rpm (= ca. 250 G) und 20 Grad Celsius konfiguriert. Nachdem Flüssigkeit und Zellen getrennt waren, wurden 12 Mikroreaktionsgefäße (E-Cups) per Mikroliterpipette mit jeweils 750 Mikroliter des BAL-Fluids befüllt. Die mit Fluid befüllten E-Cups (Aliquots) wurden auf einer FX-96-well Platte gesammelt. Der Restanteil des zentrifugierten Überstandes wurde abgekippt, sodass nur noch ein schmaler Randsaum an Überstand im Falcon Röhrchen sichtbar war. Der noch vorhandene Bodensatz, wurde mit 200 Mikroliter BAL-Fluid resuspendiert und in ein weiteres E-Cup gegeben, welches sich auf einer zweiten FX-96-well Platte befand. Nach dieser Bearbeitung wurden beide FX-96-well Platten zu einem Gefrierschrank (Panasonic Ultra-Low Temperature Freezer MDF-U700VX) transportiert. Dort wurden sie in jeweils zwei neue FX-96 Platten umgelagert. Diese neuen Platten waren bereits bei -80 Grad Celsius im Gefrierschrank gelagert. Diese Trennung von Transport- und Lagerungsboxen diente dazu, Temperaturschwankungen der Proben weitestgehend zu vermeiden.

Die maximale Bearbeitungszeit, vom Entnahmezeitpunkt der BAL bis zur Lagerung im Gefrierschrank durfte 30 min nicht überschreiten. Dies wurde als Ausschlusskriterium der Probe festgelegt und diente als Qualitätsmerkmal.

Die FX-96-well Platten, sowie die E-Cups waren bereits vor der Abfüllung mit Barcodes versehen, sodass die Wahrscheinlichkeit einer Verwechslung von Probenmaterial minimiert wurde. Die Barcodes wurden vom Personal einer Biomaterialbank generiert und auf die E-Cups, sowie Platten aufgeklebt. Diese Barcodes waren auf Listen notiert, jeweils 1x BAL-Fluid und 1x BAL-Zellen. Während der 10 Minuten dauernden Zentrifugation der Gesamtlavage, wurden die jeweiligen Barcodes auf der Liste mit einer ID (LAB-ID) versehen. Diese LAB-ID war für

jede Probe und somit auch jeden Patienten einzigartig. Somit konnte eine eindeutige Nachverfolgung von Proben und Patientendaten mittels LAB-ID und Barcode-Listen erfolgen.

Zur weiteren Absicherung wurde ein Labor-Begleitschein mit der LAB-ID versehen. Auf dem Laborschein waren außerdem das Datum und der Bearbeitungszeitpunkt notiert. Im Folgenden wurde der Fragebogen, welcher bereits für die Basisdaten verwendet wurde ebenfalls mit der LAB-ID versehen. Die gesammelten Daten, inklusive LAB-ID wurden dann in der Open Clinica Datenbank der Inneren V eingegeben.

3.5 Sekundäre Verarbeitung der Proben

Die sekundäre Bearbeitung der bei -80 Grad Celsius eingefrorenen Proben erfolgte, nachdem eine ausreichende Anzahl an Analysematerial vorhanden war.

Die Sequenzierung der BAL-Proben wurde im Institut für Biowissenschaften Bereich Genetik / Epigenetik an der Universität des Saarlandes vorgenommen. Zuvor wurden die Proben an der Universität Homburg von der Biologin Giovanna Vella weiterbearbeitet und somit für die Analyse vorbereitet. Die Vorbereitung wurde nach Protokoll des ZR Tissue Insect DNA MiniPrep der Firma Zymo Research durchgeführt. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden aufgezeigt.

1. Das Untersuchungsmaterial wurde in ein ZR BashingBead Lysis Tube umgefüllt. In dieses Reaktionsgefäß wurden 750 µl einer Lyse Flüssigkeit hinzugegeben.
2. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert mittels einem Zell Disruptor.
3. Der nächste Schritt bestand im Zentrifugieren der Proben bei 10.000 x g für 60 Sekunden.

4. Anschließend wurden 400 µl des Überstands in ein Zymo-Spin IV Spin Filter Collection Tube umgefüllt und bei 7.000 x g für 60 Sekunden zentrifugiert.
5. Im nächsten Arbeitsschritt wurden 1.200 µl eines Genomlysis Puffers zum Filtrat aus dem Collection Tube aus Schritt 4 hinzugegeben und dieses vermischt.
6. 800 µl dieser Mischung wurden dann in ein Zymo-Spin IIC Column Collection Tube transferiert und für 60 Sekunden bei 10.000 x g zentrifugiert.
7. Das nun im Collection Tube vorhandene Filtrat wird verworfen und der Schritt 6 wird wiederholt.
8. Danach werden 200 µl DNA Pre-Wash Puffer zum Zymo-Spin IIC Column in ein neues Collection Tube hinzugefügt und dieses bei 10.000 x g für 1 Minute zentrifugiert.
9. Danach werden 500 µl g-DNA Wash Puffer zum Zymo-Spin IIC Column hinzugefügt und dieses wiederum bei 10.000 x g für 60 Sekunden zentrifugiert.
10. Der letzte Arbeitsschritt besteht im Überführen des Materials in ein unbenutztes 1.5 ml E-Cup, der Hinzugabe von 50 µl DNA Elution Puffer und der Zentrifugation bei 10.000 x g für 30 Sekunden um die DNA herauszulösen.

Nach der Vorbereitung des Materials, wurde die DNA Konzentration und Reinheit photometrisch bemessen (Spektralphotometer: Nanoprop 2000c). Nach dieser Qualitätskontrolle wurden die Proben sequenziert. Zuerst wurden PCRs von den V1 und V2 Regionen der 16S rRNA Gene durchgeführt (10-50 ng Matritzen, 80 mM Tris-HCL, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween-20, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM von jedem dNTP, 2.5U HotFirePol (Solis BioDyne)), indem 200 pmol von jedem Primer (forw: 5'-agagtttgatcctggctcag-3', rev: 5'tgctgcctcccgtaggagt-3') an einer Illumina Universaladaptersequenz am 5'-Ende angefügt wurden. Ebenso wurden von den V3 und V4 Regionen der 16S rRNA PCRs durchgeführt (10-50 ng Matritzen, 80 mM Tris-HCL, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween-20, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM

von jedem dNTP, 2.5U HotFirePol (Solis BioDyne)), indem 200 pmol von jedem Primer (forw: 5'cctacgggnggcwgcag-3', rev: 5'-gactachvgggtatctaacc-3') an einer Illumina Universaladaptersequenz am 5'-Ende angefügt wurden.

Die PCRs wurden in einem Thermocycler in verschiedenen Stufen durchgeführt. Der erste Zyklus mit 95 Grad Celsius für 15 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen bei 95 Grad Celsius für 1 Minute, dann für 1 Minute bei 54 Grad Celsius und ein abschließender Zyklus mit 72 Grad Celsius für 5 Minuten. Die Amplifikationen wurden anschließend gereinigt mit dem Agencourt Ampure XP-Kit (BeckmanCoulter, Krefeld, Deutschland), verdünnt, zusammengeführt und sequenziert. Die Sequenzierung (v3 chemistry: 2x300 bp paired-end) wurde mittels Illumina MiSeq durchgeführt, dabei nach Anweisung der Herstellerangaben, mit dem Ziel von 50,000 Auslesungen pro Probe. Die Auslesungen wurden anschließend in digitalisierter Form zusammengetragen und zur statistischen Auswertung verwendet.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Rohdaten wurde zusammen mit dem Institut für Klinische Bioinformatik der Universität des Saarlandes von Prof. Andreas Keller und Valentina Galata übernommen. Zuerst wurden „operational taxonomic units“ (OTUs) für die erhaltenen Amplifikationen definiert mittels LotuS (version 1.565). Die erhaltenen OTUs wurden zusätzlich in der BLAST nr/nt Datenbank verglichen mit Hilfe des Tools BLASTn (version 2.6.0+) und in der NCBI Datenbank mit Hilfe des Tools EDirect (version 9.50). Jede Amplifikation wurde anhand dieser Datenbanken gefiltert um Verunreinigungen zu beseitigen. Gefilterte OTUs waren zum Beispiel OTUs mit der Bezeichnung „Eukaryot“ laut BLAST-Datenbank, oder bei einer Auslesung über alle nicht-Kontrollproben. Die gefilterten OTUs wurden darauf entfernt. Eine Übersicht der dann noch vorhandenen OTUs wurde mit dem Tool Krona (version 2.5) erstellt. Für die statistischen Auswertungen wurden nur die gefilterten OTUs verwendet.

Für die Berechnung und Darstellung der Alpha-Diversität, sowie der Hauptkomponentenanalyse, Korrespondenzanalyse und der Heatmap-Darstellung wurde

„R“ (R-package „ampvis2, version 2.3.2, R-package „ALDEx2, version 1.8.0) verwendet. Die Alpha-Diversität zwischen beiden Untersuchungsgruppen wurde mittels des Wilcox-Test (zweiseitig, Konfidenzintervall 0.95) berechnet.

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Darstellung von Unterschieden im Mikrobiom zwischen Patienten mit Sarkoidose und Patienten mit anderen interstitiellen Lungenerkrankungen. Zuerst werden die Patientencharakteristika aufgeführt, dann wird eine Übersicht aller gemessenen OTUs, zusammengefasst nach Phylum, aufgeführt. Dabei werden die beiden Untersuchungsgruppen noch nicht unterschieden. Dann werden die beiden Untersuchungsgruppen bezüglich den häufigsten Bakteriengruppen gegenübergestellt. Folgend werden die Alpha-Diversität und weitere Redundanzanalysen dargestellt. Schließlich werden die beiden Untersuchungsgruppen direkt mit Hilfe einer Heatmap verglichen und zuletzt wird die Häufigkeit von Mykobakterien und Propionibakterien als quantitativer Vergleich dargestellt. Die Darstellungen zeigen jeweils die Analysen der 16s rRNA aufgeteilt nach V1 und V2, sowie V3 und V4 Regionen.

4.1 Patientencharakteristika

Das Patientenkollektiv von insgesamt 50 Patienten bestand aus einer Untersuchungsgruppe „Sarkoidose“ mit 31 Patienten (62 %) und einer Vergleichsgruppe „interstitielle Lungenerkrankungen“ mit 19 Patienten (38 %). Jeder Patient wurde mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens (CRF) am Tag der Materialgewinnung befragt. In dem CRF wurden anonymisiert Alter, Geschlecht, Größe (m), Gewicht (kg), Ethnische Zugehörigkeit, Raucherstatus, sowie Vorerkrankungen und die aktuelle Medikation erfasst. Außerdem wurden aus dem klinikinternen Programm SAP® eine Lungenfunktion (Bodyplethysmographie) und das CRP,

sowie die Leukozytenzahl erfasst. Die BAL der Patienten wurde außerdem zytologisch untersucht, zwecks einer Quantifizierung der enthaltenen Immunzellen.

	Sarkoidose	interstitielle Lungenerkrankungen	p-Wert
Anzahl an Subjekten	31 (62%)	19 (38%)	-
Geschlecht			
Weiblich	14	8	-
Männlich	17	11	-
Alter im Median	51 (22-79)	66 (57-82)	0.0003
Raucherstatus			
Current-Smoker	7	2	0.06
Ex-Smoker	6	9	0.25
Never-Smoker	18	6	0.05
BMI im Median	27 (17 - 37,1)	24,7 (16,8 - 34,9)	0.5
Ethnische Zugehörigkeit			
Kaukasisch	27	19	-
Türkisch	2	0	-
Asiatisch	1	0	-

Tabelle 1: Basisdaten Patientenkollektiv

Bezüglich der Geschlechterverteilung zeigte sich ein nahezu ausgewogenes Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Patienten, weiblich n=14 vs. männlich n=17 in der Sarkoidosegruppe, ebenso in der Gruppe mit interstitiellen Lungenerkrankungen, weiblich n=8 vs. männlich n=11. In der Sarkoidosegruppe war ein größerer Anteil an Patienten Nie-Raucher n=18, als Raucher oder Ex-Raucher n=13. Bezüglich der Ethnizität zeigten sich hauptsächlich Kaukasier als Untersuchungsgruppe.

Lungenfunktion	Sarkoidose	interstitielle Lungenerkrankungen	p-Wert
FEV1 in %	81,5	66,8	0.66
FEV1/VC in %	79,8	85,7	0.02
TLC in l	5,54	4,2	0.26
ERV in l	0,78	0,55	0.89

RV in l	2,12	1,76	0.60
VC in l	3,34	2,34	0.26

Tabelle 2: Lungenfunktion im Median

Eine lungenfunktionelle Auswertung der Patientengruppen zeigte eine leichte Verminderung des Tiffeneau-Index in der Sarkoidose Gruppe, was zur obstruktiven Komponente der Sarkoidose passt. In der Patientengruppe mit interstitiellen Lungenerkrankungen waren eher restriktive Lungenvolumina abgebildet, passend zum Krankheitsbild einer Lungenfibrose.

BAL	Sarkoidose	interstitielle Lungenerkrankungen	p-Wert
Recovery %	50	55	-
Neutrophile %	9	14	0.05
Alveolarmakrophagen %	49	62	0.01
Lymphozyten in %	38	25,5	0.02
Eosinophile in %	1	2	0.19
Basophile in %	0	0	-
CD4/CD8 Ratio	3,2	0,8	0.03

Tabelle 3: Quantifizierung BAL im Median

Die physiologische Zellverteilung einer BAL ist in der Literatur meistens wie folgt angegeben: Alveolarmakrophagen: >80%, Lymphozyten <15%, Neutrophile <3%, Eosinophile < 3%, Basophile < 0.5% und CD4/CD8 Quotient 1,8 - 2,5 ⁽³⁵⁾

In den Untersuchungsgruppen stellt sich ein lymphozytäres Zellbild dar, wobei die Sarkoidosegruppe deutlich mehr Lymphozyten in der BAL vorweisen konnte. Ebenso zeigt sich ein erhöhter CD4/CD8 Quotient in der Gruppe der Sarkoidose Patienten, passend zum BAL Befund der Sarkoidose.

4.2 Qualitätskontrolle und Eliminierung von Hintergrundrauschen

Nach der Sequenzierung wurde die Qualität der Rohdaten dargestellt. Der Qualitätsreport (QC) wurde mit Hilfe des Programmes FastQC durch Erstellung von FASTQ-Dateien generiert. Eine Zusammenfassung wurde mittels MultiQC erstellt.



Abbildung 1: Fast QC - Mean Quality Scores

In dieser Abbildung ist der Qualitätsreport grafisch illustriert. Der Phred Score auf der y-Achse dargestellt. Dieser beschreibt die Wahrscheinlichkeit einer richtigen Zuordnung der Basen im Verlauf der Sequenzierung. Es ist ein Score, welcher

von einer theoretischen Wahrscheinlichkeit eines inkorrekten „Base-Calls“ ausgeht. Bei einem Wert über 30 ist bei einer Wahrscheinlichkeit von 99.9 % von einer Korrekten Basenzuordnung im Sequenzierungsprozess auszugehen. Bei einem Wert von 20 nur von einer Wahrscheinlichkeit von 99 %. Die Abbildung 1 zeigt, dass je mehr Basen während des Sequenzierungsprozesses ausgelesen werden, desto häufiger kommt es zu einer Fehlmessung der Basen. Die verwendeten Sequenzierungsdaten haben bis zur Basenposition 200 mit einem Phred-Score von größer als 30 und bis zur Basenposition 250 mit einem Score größer 20. Insgesamt ist eine akzeptable bis gute Qualität der Proben anzunehmen.

4.1 Übersicht der registrierten OTUs

Die sequenzierten 16sRNA Gene wurden anhand der „BLAST“ Datenbank mit bereits bekannten Genen von Eukaryonten verglichen und mit dem Tool „Krona“ im Folgenden zu einer Übersicht zusammengefasst. Die Bakterien sind dabei auf der Ebene des Phylums gruppiert. Die Ergebnisse wurden bereits gefiltert und Störmessungen aus der Systematik entnommen, wie oben beschrieben.

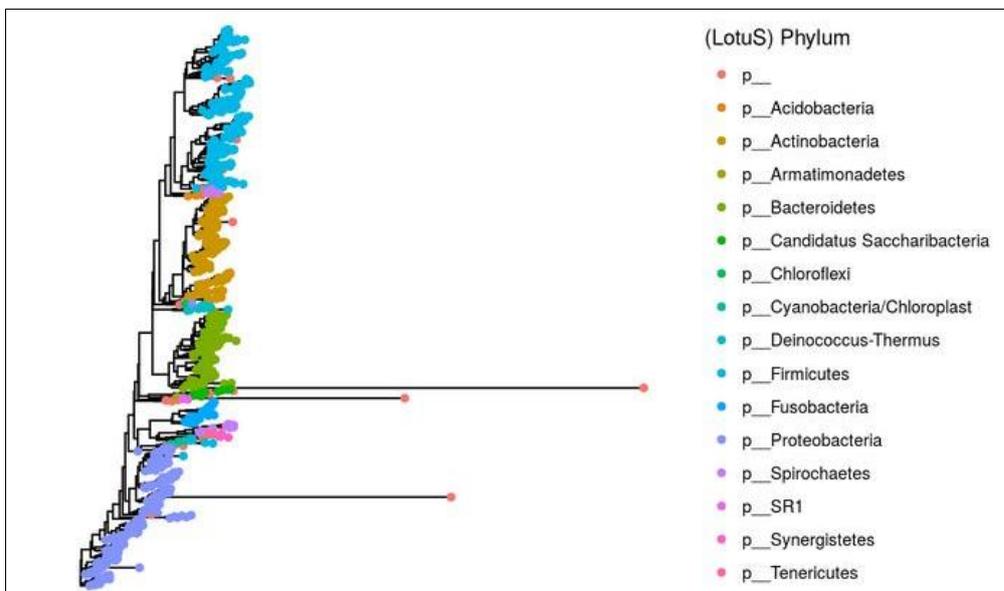


Abbildung 2: Alle OTUs und ihre Taxonomie nach Phylum, V1V2

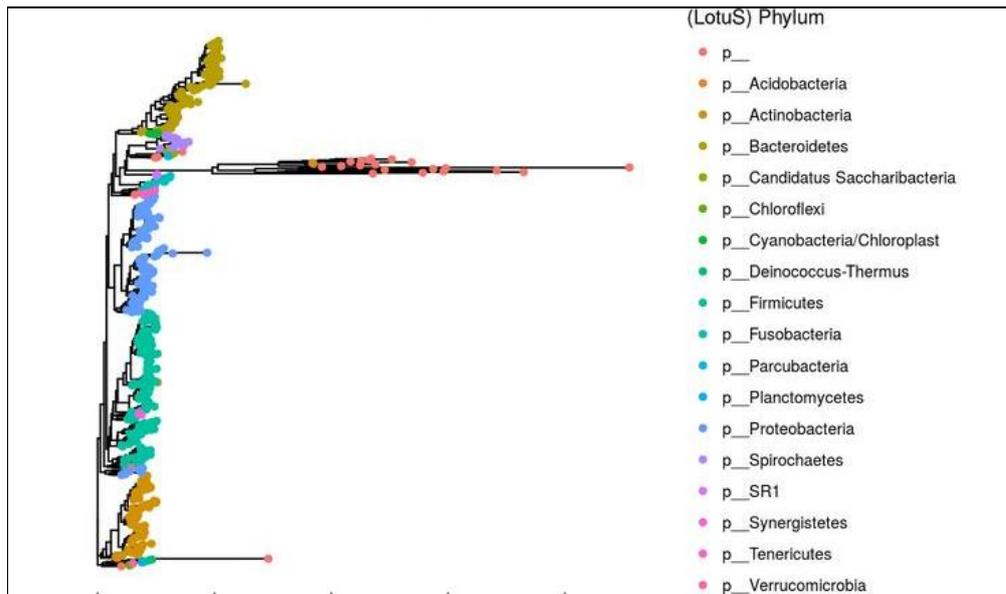


Abbildung 3: Alle OTUs und ihre Taxonomie nach Phylum, V3V4

Abbildung 2 und 3 zeigen das jeweilige Phylum der Bakterien unterschieden nach V1V2 und V3V4 Region der bakteriellen 16sRNA. Es sind beide Untersuchungsgruppen in einer Grafik dargestellt. Mittels „LotuS“ wurden verschiedene OTUs definiert und gruppiert. Diese wurden dann nach BLAST und NCBI Datenbank gefiltert und zeigen schließlich die verschiedenen Bakterienstämme, z.b. hier am häufigsten vertreten *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*.

4.2 Vergleich der relativen Häufigkeiten auf Ebene des Phylums

Nach Darstellung der OTUs, also Bakteriengruppen als Gesamtheit werden nun beide Gruppen gegenübergestellt. Im Folgenden sind die zehn häufigsten OTUs in den beiden Untersuchungsgruppen quantitativ ausgewertet. Die beiden Gruppen sind jeweils in einer Tabelle gegenübergestellt. Weiterhin wird die relative

Häufigkeit in einer weiteren Grafik als Boxplot dargestellt. Hier wurde jeweils nach V1V2 und V3V4 Region der 16sRNA unterschieden.

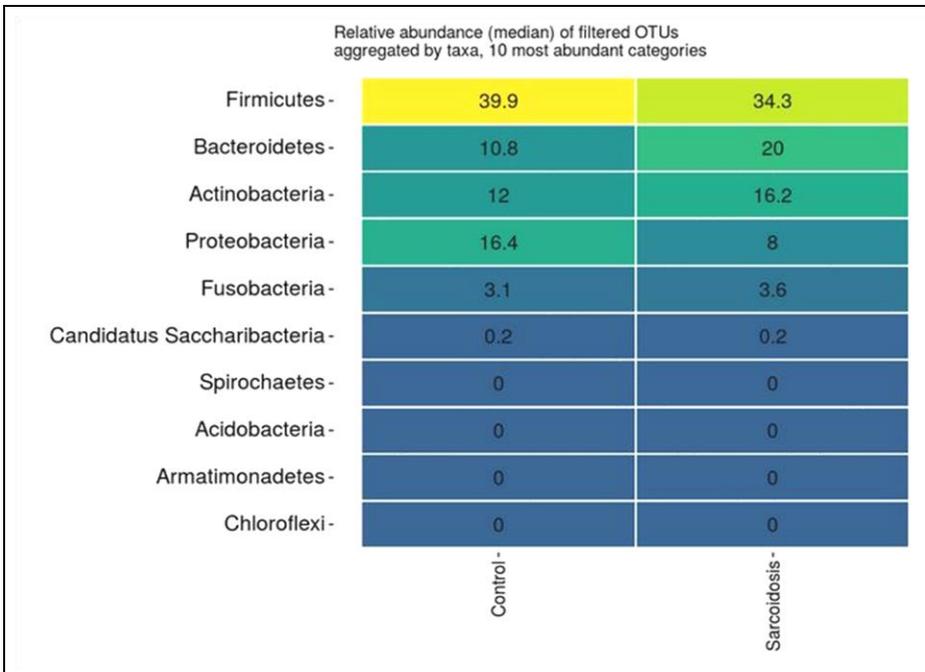


Abbildung 4: Relative Häufigkeit nach Phylum, V1V2

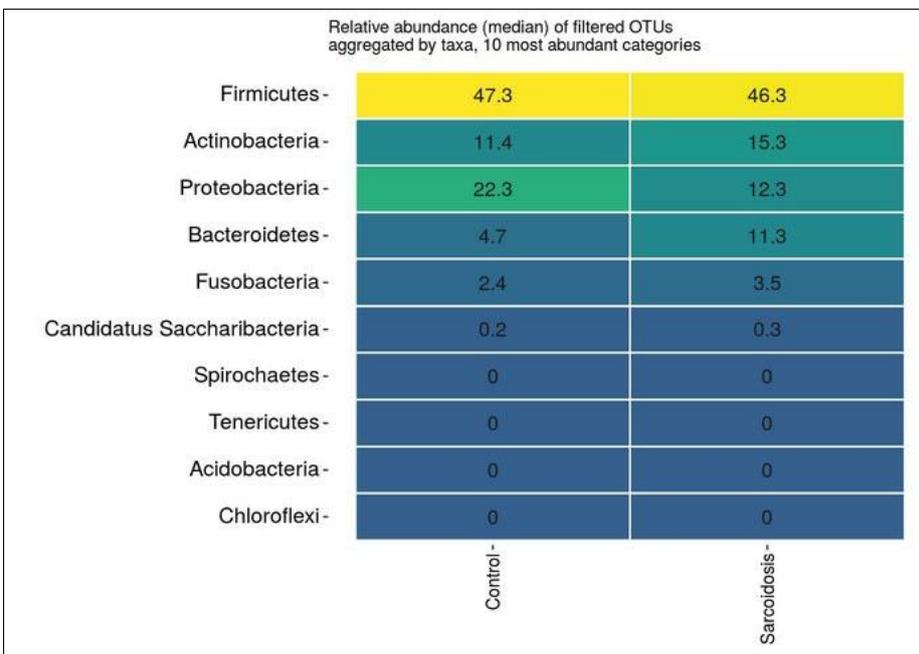


Abbildung 5: Relative Häufigkeit nach Phylum, V3V4

Abbildung 4 und 5 zeigt, dass jedes Phylum der 10 häufigsten Bakterien sowohl in der Sarkoidosegruppe, als auch in der Kontrollgruppe vertreten ist. Es zeigt sich ein relativer Unterschied des Phylum „*Proteobacteria*“ mit 16.4 % in V1V2 und 22.3 % in V3V4 der Kontrollgruppe zu 8 % in V1V2 und 12.3 % in V3V4 der Sarkoidosegruppe. Ebenso zeigt sich ein relativer Unterschied des Phylum „*Bacteroidetes*“ in V1V2 der Sarkoidosegruppe im Vergleich zu 10.8 % in V1V2 der Kontrollgruppe. Insgesamt also ein Unterschied der Häufigkeiten einzelner Bakterienphyla zwischen beiden Untersuchungsgruppen.

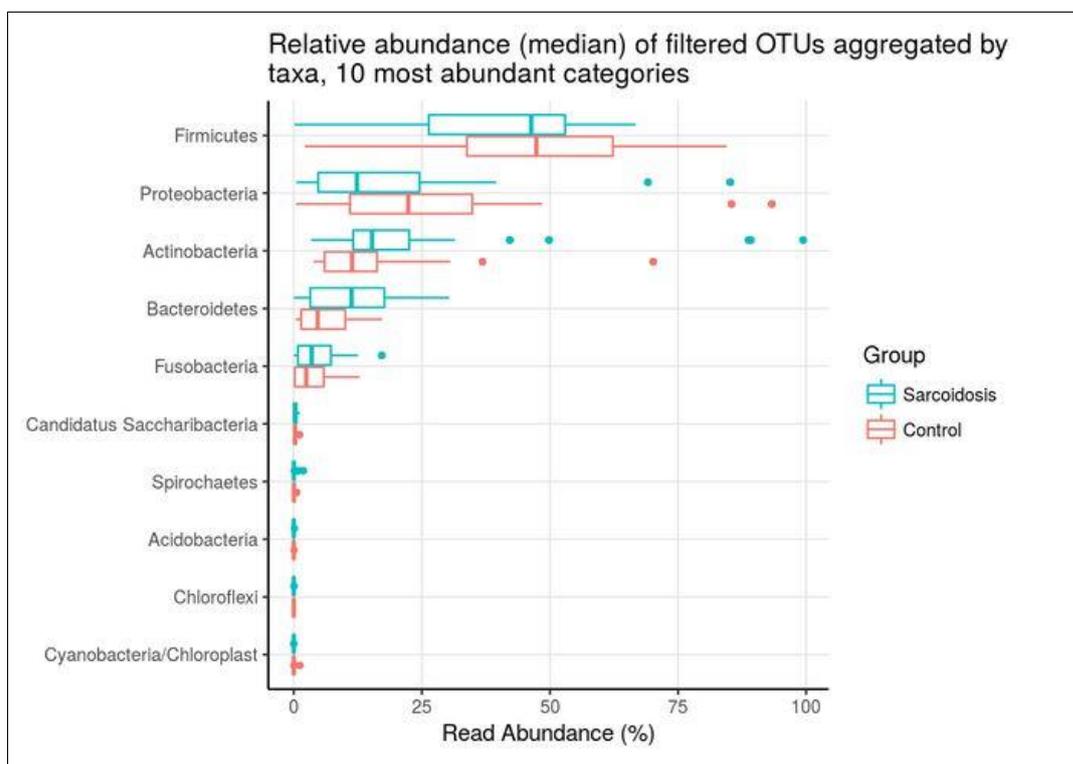


Abbildung 6: Relative Häufigkeit nach Phylum, V1V2 in Prozent, dargestellt als Kastengrafik

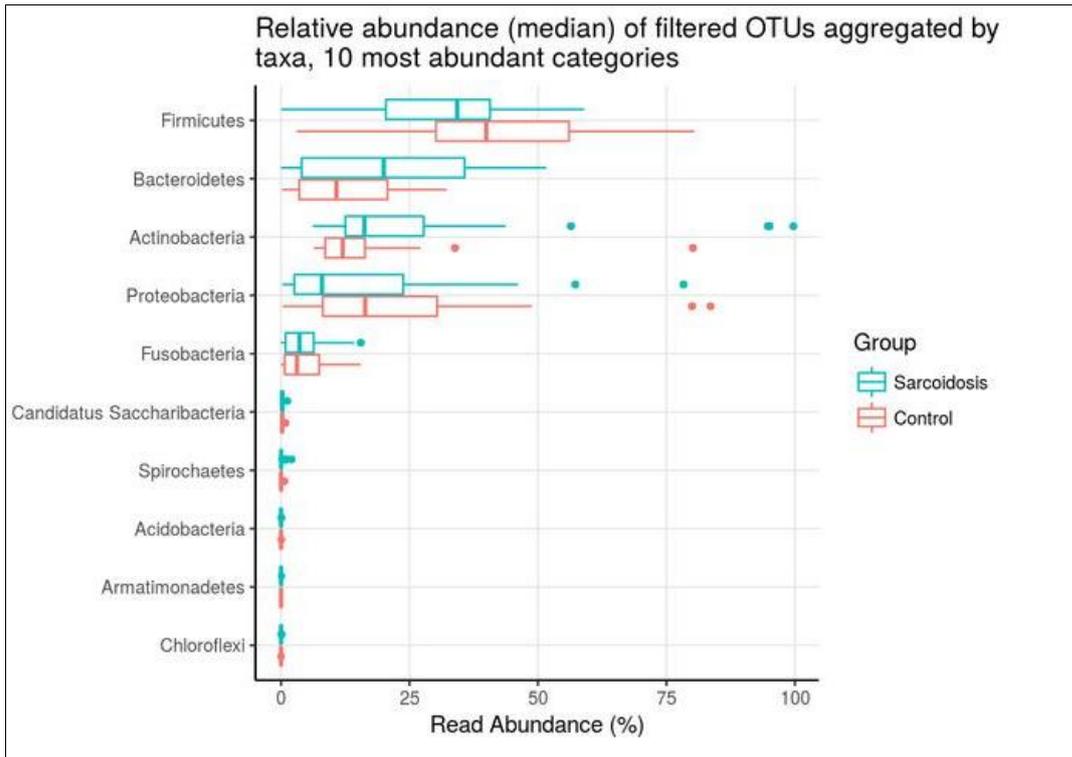


Abbildung 7: Relative Häufigkeit nach Phylum, V3V4 in Prozent, dargestellt als Kastengrafik

Abbildung 6 und 7 stellt die zehn häufigsten Bakterienstämme in Prozent, gegliedert nach Phylum und jeweils im Vergleich beider Untersuchungsgruppen zueinander dar. Wie bereits in Abbildung 4 und 5 beschrieben, ist das Phylum der „Proteobacteria“ in höherer Relation in der Kontrollgruppe, als in der Sarkoidosegruppe vertreten. Auch zeigt sich der Unterschied im Phylum der „Bacteroidetes“ in dieser Darstellung erneut. Dieses ist in der Sarkoidosegruppe in höherer Relation vorhanden, als in der Kontrollgruppe. Insgesamt ist jedes Phylum der Sarkoidosegruppe auch in der Kontrollgruppe vorhanden.

4.3 Alpha Diversität der OTUs

Die Alpha-Diversität der beiden Gruppen, also die Bakterienvielfalt der beiden Untersuchungsgruppen werden folgend dargestellt. Die Gesamtheit der registrierten OTUs ist zunächst gegenübergestellt. Danach werden der Shannon und Simpson Index gezeigt, welche ein Maß für die Vielfalt der bakteriellen Flora sind.

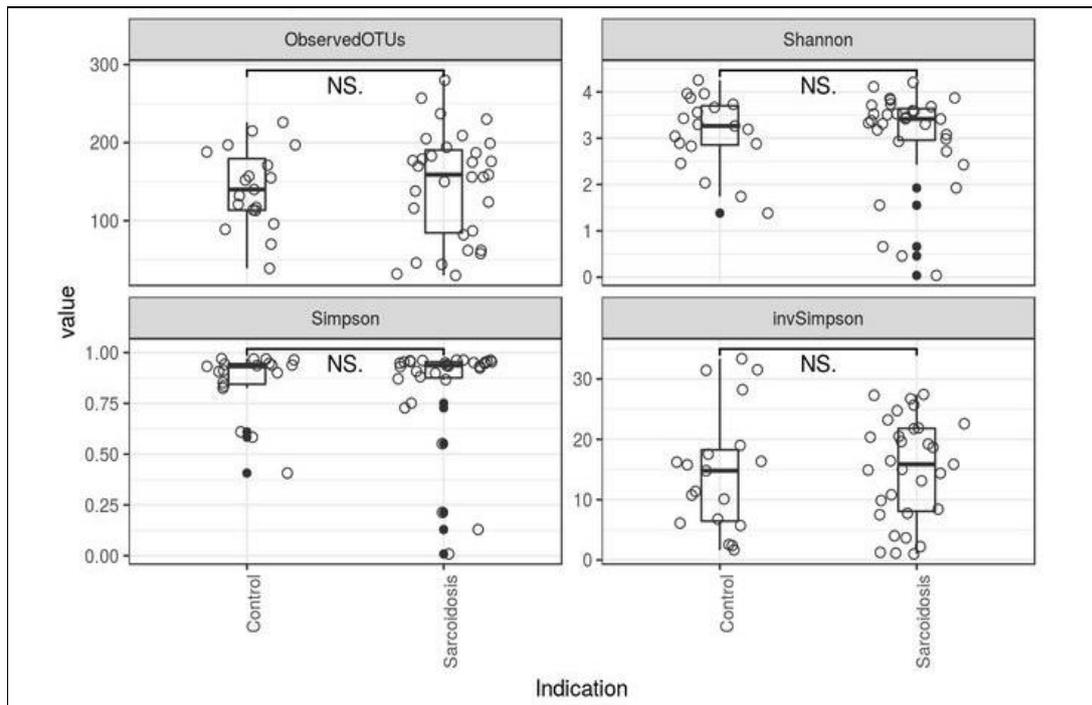


Abbildung 8: Alpha-Diversität der Region V1V2

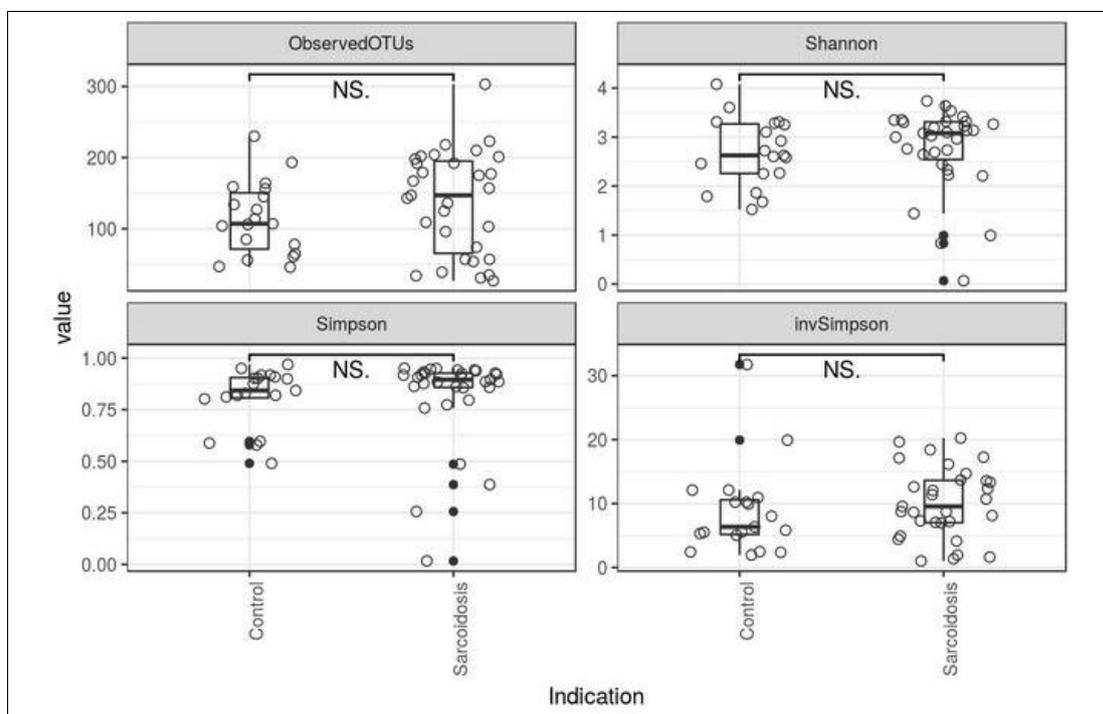


Abbildung 9: Alpha-Diversität der Region V3V4

Abbildung 8 und 9 zeigt, von links oben nach rechts unten, zuerst die Gesamtanzahl der registrierten OTUs im Vergleich der beiden Untersuchungsgruppen. Dabei zeigen sich im Median 155 verschiedene OTUs in der Sarkoidosegruppe im Vergleich zu 145 OTUs der Kontrollgruppe (V1V2) und 150 OTUs in der Sarkoidosegruppe im Vergleich zu 105 OTUs der Kontrollgruppe (V3V4). Die nächsten Grafiken stellen die Alpha-Diversität dar. Hierbei ist zwischen der Sarkoidosegruppe und der Kontrollgruppe kein wesentlicher Unterschied zu sehen. Beide Gruppen weisen eine ähnlich hohe Diversität bezüglich der mikrobiellen Zusammensetzung auf. Der Shannon Index ist 3.5 (Sarkoidose, V1V2) vs. 3.25 (Kontrolle, V1V2) und 3.05 (Sarkoidose, V3V4) vs. 2.5 (Kontrolle, V3V4). Ebenso kein Unterschied des Simpson Index. Dieser ist 0.93 (Sarkoidose, V1V2) vs. 0.93 (Kontrolle, V1V2) und 0.88 (Sarkoidose, V3V4) vs. 0.85 (Kontrolle, V3V4). Der reziproke Simpson-Index (hier invSimpson) ist 15.5 (Sarkoidose, V1V2) vs. 15 (Kontrolle, V1V2) und 9.5 (Sarkoidose, V3V4) vs. 6 (Kontrolle, V3V4).

4.4 Ordination mittels Hauptkomponentenanalyse und Korrespondenzanalyse

Um zusätzlich beide Untersuchungsgruppen zu vergleichen sind beide Untersuchungsgruppen mittels Hauptkomponentenanalyse und Korrespondenzanalyse verglichen worden. Bei der Hauptkomponentenanalyse werden jeweils die registrierten OTUs des Mikrobiom aus der Sarkoidosegruppe und der Kontrollgruppe als lineare Kombination zusammengefasst. Die Varianz der Daten wird dann als principal components (PC) beschrieben. Dabei werden in der Grafik jeweils die maximale Varianz und die zweite maximale Varianz dargestellt. Diese beschreiben in unserem Fall zwischen 39 % - 41,1 % der Varianz. Bei der Korrespondenzanalyse werden im Gegensatz zu Hauptkomponentenanalyse die OTUs nicht als lineare Kombination zusammengefasst, sondern kategorial ausgewertet. In einer Grafik beschreiben dann die beiden Achsen jeweils die maximale und die zweite maximale Varianz, in unserem Fall 21,3 % der Varianz.

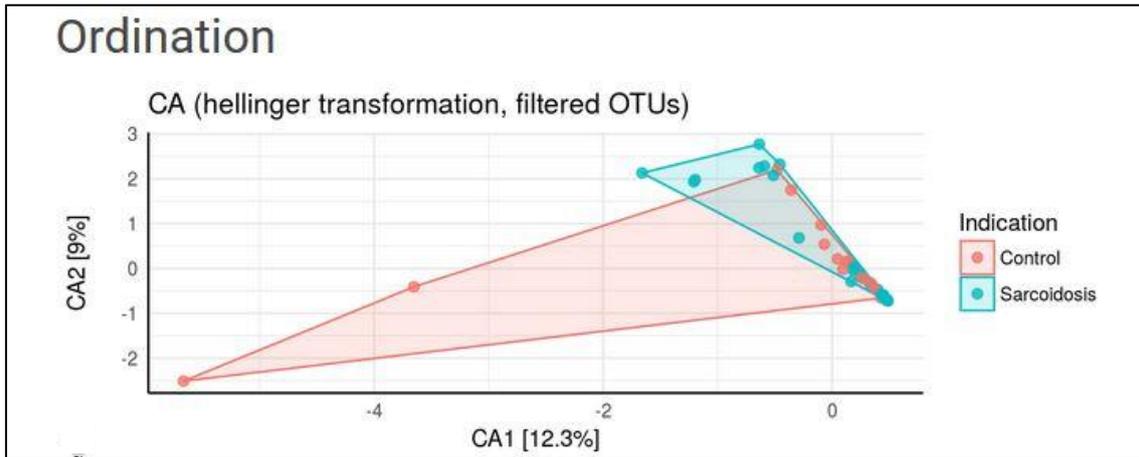


Abbildung 10: Korrespondenzanalyse der Region V1V2

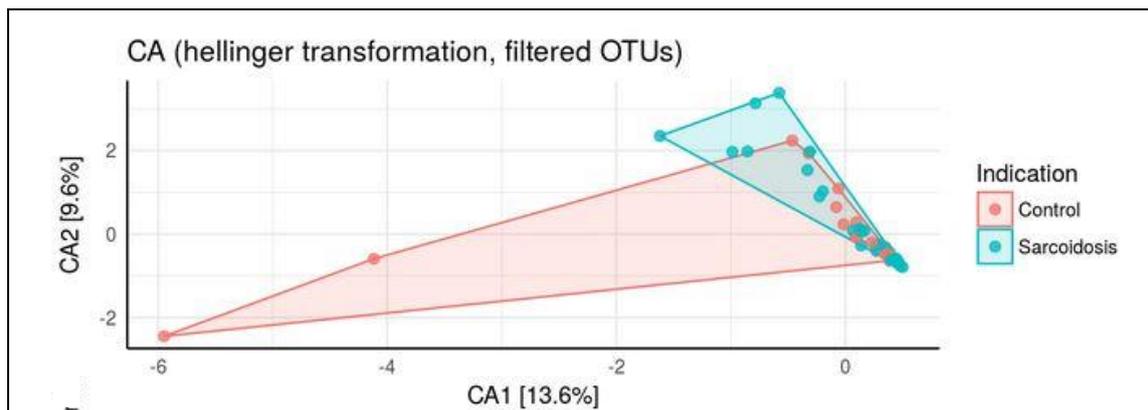


Abbildung 11: Korrespondenzanalyse der Region V3V4

Abbildung 10 und 11 zeigt die Korrespondenzanalyse der Regionen V1V2 und V3V4. Dabei zeigt sich, dass die beiden Vergleichsgruppen in Ihrer Ähnlichkeit des Mikrobioms weitestgehend übereinstimmen. Die bläuliche Fläche (Sarkoidose) überschneidet alle roten Punkte (Kontrolle). Lediglich 2 Proben aus der Kontrollgruppe zeigen sich als Ausreißer und weisen somit ein unähnliches Mik-

robiom auf. Ebenso stellen sich drei Sarkoidoseproben (blau) außerhalb der roten Fläche (Kontrolle) dar. Diese haben somit ebenfalls ein unähnliches Mikrobiom. Der signifikante Großteil der Proben zeigt jedoch eine Ähnlichkeit.

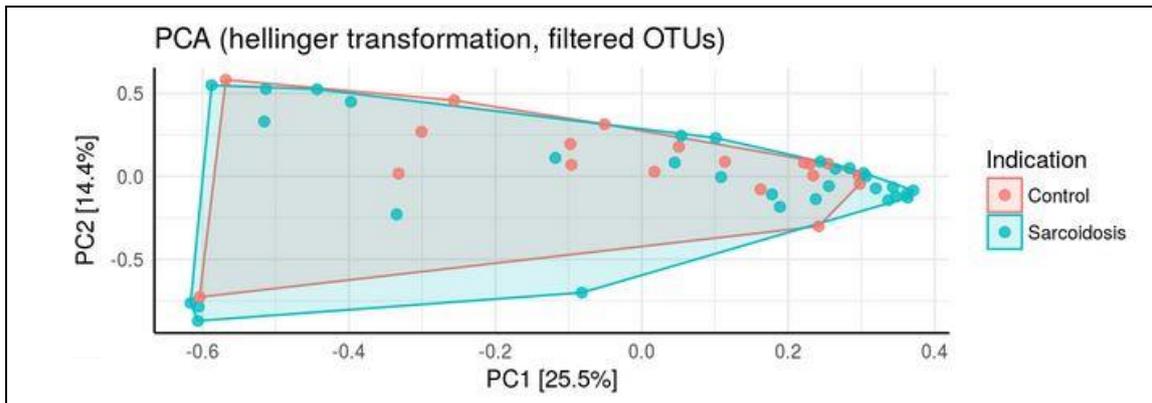


Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse der Region V1V2

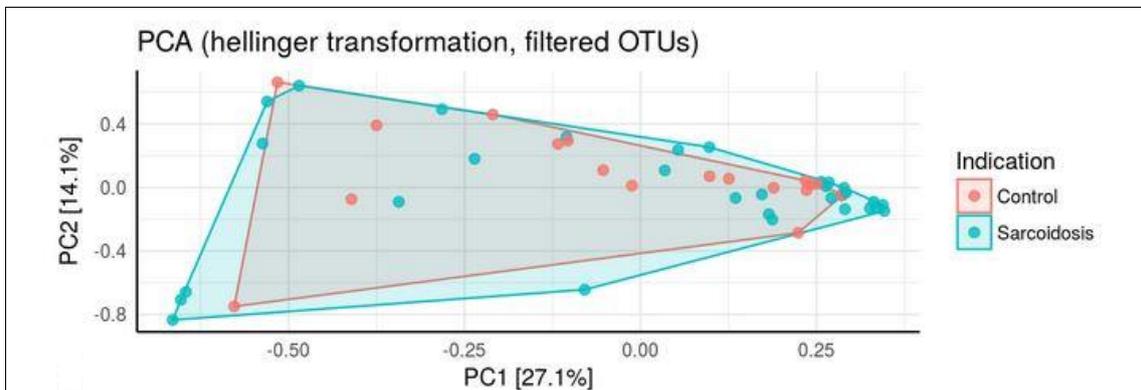


Abbildung 13: Hauptkomponentenanalyse der Region V3V4

Abbildung 12 und 13 zeigt die Hauptkomponentenanalyse der Regionen V1V2 und V3V4. Weiterhin stellt sich auch hier eine Übereinstimmung beider Untersu-

chungsgruppen dar, wobei die Proben unabhängig von der Untersuchungsgruppe eine breite Variabilität aufweisen, d.h. sie sind nicht so ähnlich gruppiert, wie in Abbildung 10 und 11.

4.5 Darstellung einer hierarchischen Clusterung mittels Heatmap

Alle registrierten OTUs wurden im Folgenden mittels einer Heatmap dargestellt. Sie sind dabei jeweils nach Phylum gruppiert und können in ihrer Häufigkeit mittels Farbcodierung unterschieden werden. Diese Darstellung zeigt sehr gut die Ähnlichkeit der beiden Untersuchungsgruppen.

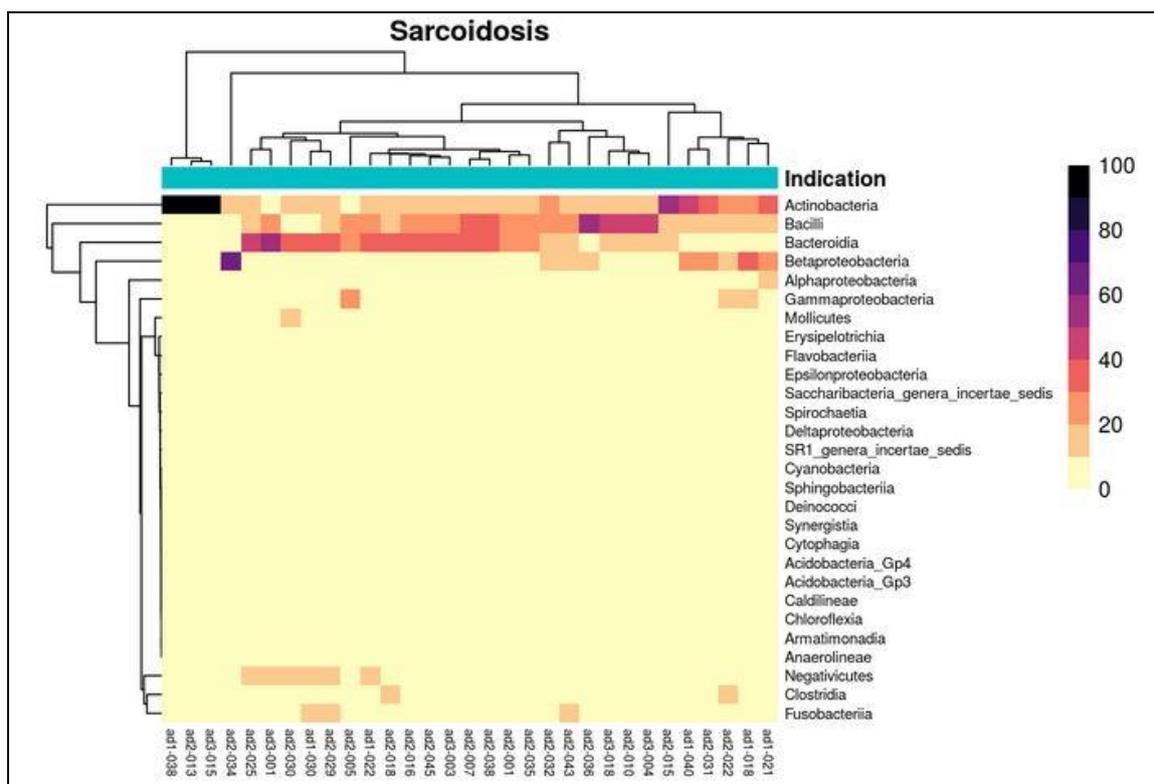


Abbildung 14: Darstellung einer Clusterung nach Klasse mittels Heatmap, V1V2 Sarkoidose

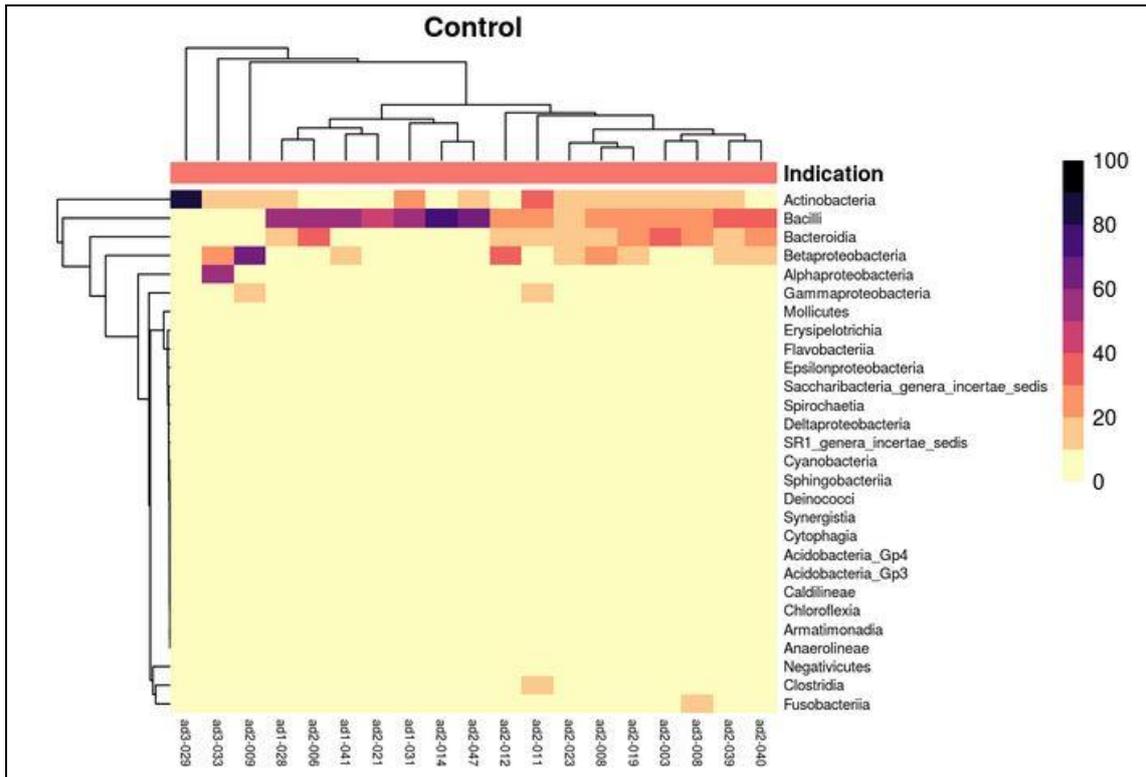


Abbildung 15: Darstellung einer Clusterung nach Klasse mittels Heatmap, V1V2 Kontrolle

Abbildung 14 und 15 zeigt die gemessenen Bakterien sortiert nach Klasse mittels Heatmap. Dabei ist eine Legende hinzugefügt, welche eine Farbskalierung zeigt. Diese zeigt an, zu wie viel Prozent eine Klasse von Bakterien in einer Probe vorhanden war. Zum Beispiel zeigt sich für die ersten beiden Proben in beiden Untersuchungsgruppen (ad3-029; ad1-038), dass diese Proben mit nahezu 100 Prozent durch die Klasse „Actinobacteria“ besiedelt waren. Insgesamt zeigt die Heatmap, dass zwischen beiden Untersuchungsgruppe kein wesentlicher Unterschied besteht. Vereinzelt zeigen sich Klassen, welche nur in der Sarkoidosegruppe vertreten sind (z.B. Negativicutes). Diese sind allerdings nur in 6 von 31 Proben vorhanden. Die Klassen „Bacilli“, „Actinobacteria“ und „Bacteroidia“ sind in fast allen Proben vertreten.

Abbildung 16 und 17 zeigt die registrierten Bakterien nach 16s rRNA Region V3V4 in den beiden Untersuchungsgruppen, sortiert nach Klasse mittels Heatmap visualisiert. Analog zu Abbildung 12 und 13 zeigt sich kein wesentlicher Unterschied der beiden Untersuchungsgruppen.

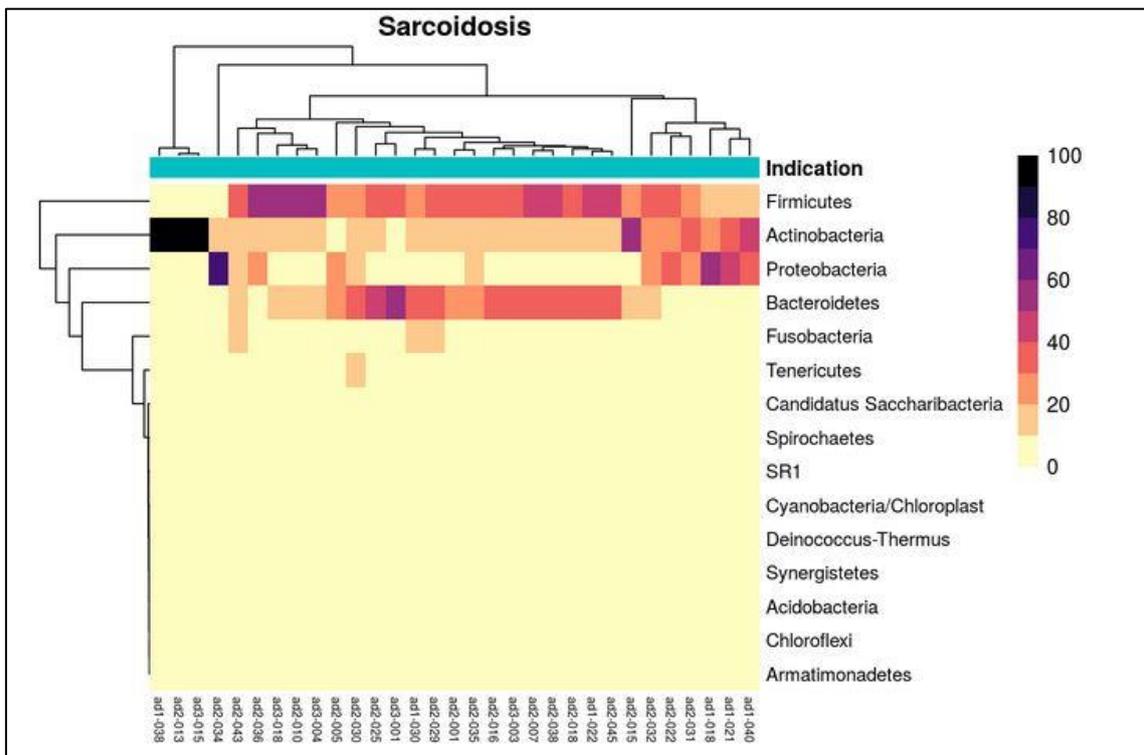


Abbildung 18: Darstellung einer Clusterung nach Phylum mittels Heatmap, V1V2 Sarkoidose

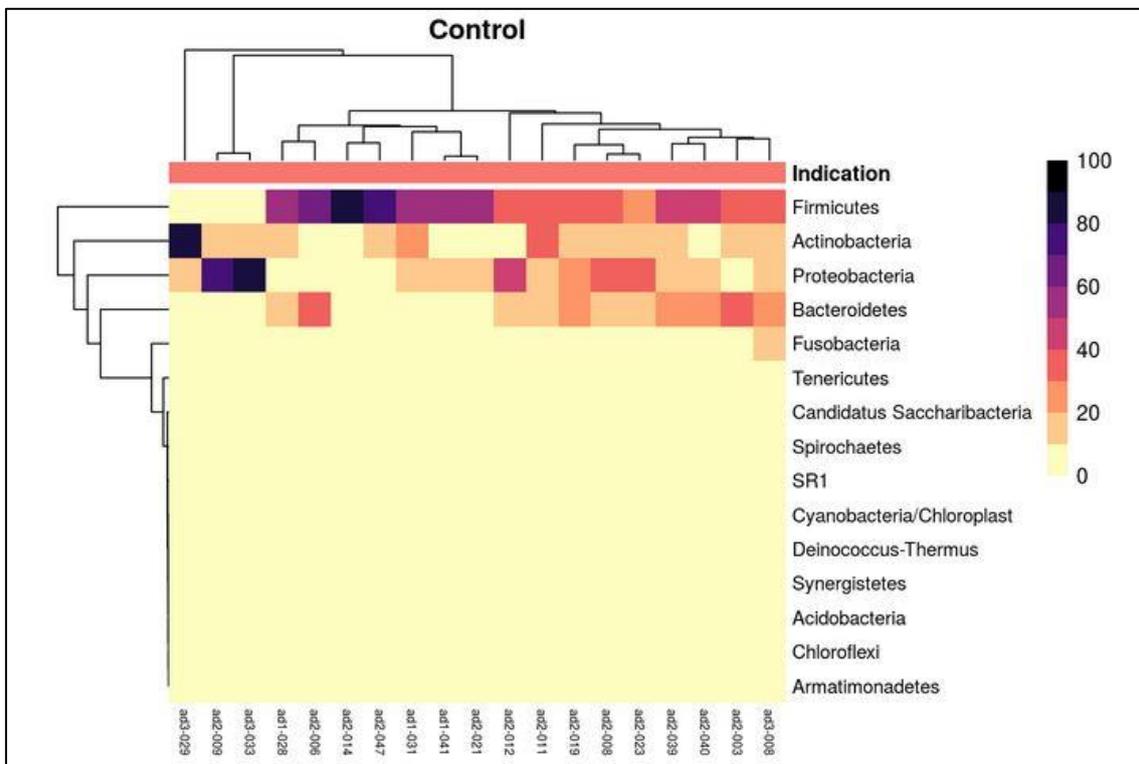


Abbildung 19: Darstellung einer Clusterung nach Phylum mittels Heatmap, V1V2 Kontrolle

Abbildung 18 und 19 zeigt das jeweilige registrierte Phylum der Region V1V2, dargestellt mittels Heatmap nach relativer Häufigkeit. Es fällt auf, dass die Phyla „Firmicutes“, „Actinobacteria“, „Proteobacteria“ und „Bacteroidetes“ in der Sarkoidosegruppe, sowie in der Kontrollgruppe vertreten sind. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Beiden Untersuchungsgruppen feststellen.

Abbildung 20 und 21 zeigt analog zu Abbildung 16 und 17 die Phyla mittels Heatmap, jedoch bei Betrachtung der variablen Regionen V3V4 der 16s rRNA. Hierbei stellt sich das Phylum der „Bacteroidetes“ als etwas häufiger in der Sarkoidosegruppe, als in der Kontrollgruppe dar. Insgesamt ist jedoch jedes Phylum der Sarkoidosegruppe auch in der Kontrollgruppe vertreten, sodass sich kein wesentlicher Unterschied der beiden Untersuchungsgruppen in Bezug auf das Phylum zeigt.

4.6. Spezifische Analyse der Taxa „Mycobacterium“ und „Propionibacterium“

Da Mykobakterien, sowie Propionibakterien als mögliche Auslöser einer Sarkoidose diskutiert werden, sind im Folgenden diese beiden Bakteriengruppen aufgeführt. Die beiden Gruppen sind jeweils getrennt in separaten Grafiken dargestellt.

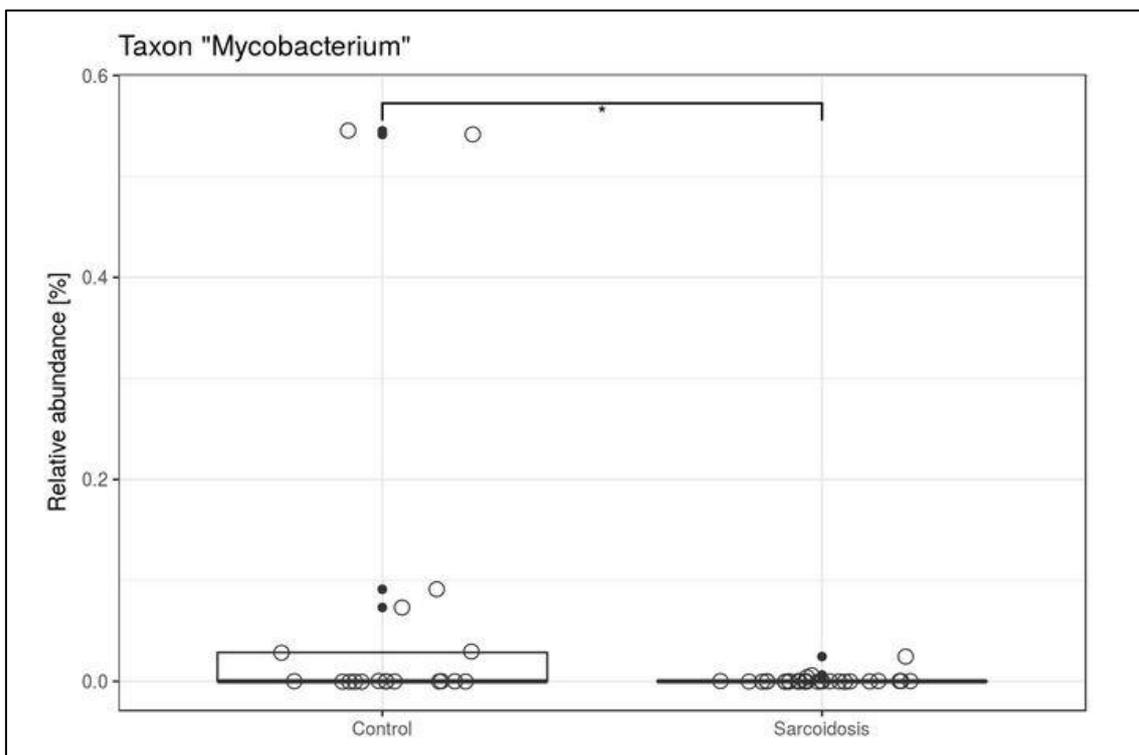


Abbildung 22: Relative Häufigkeit von Mykobakterien in beiden Vergleichsgruppen, V1V2

Abbildung 24 und 25 zeigt die relativen Häufigkeiten von Propionibakterien in beiden Vergleichsgruppen. Dabei zeigt eine Häufigkeit der Propionibakterien von unter 5 % (V1V2) bzw. unter 1 % (V3V4). Hierbei also ebenfalls kein gehäuftes Auftreten von Propionibakterien in beiden Gruppen.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Vergleich des Mikrobioms zwischen Patienten mit Sarkoidose und mit anderen interstitiellen Lungenerkrankungen und somit der Identifikation eines eventuellen äthiologischen Agens der Sarkoidose. Die Ergebnisse der Analysen lassen keinen Unterschied bezüglich des Mikrobioms zwischen beiden Untersuchungsgruppen erkennen. Die klinischen Patientencharakteristika unterschieden sich lediglich signifikant hinsichtlich des Alters der Patienten. Sarkoidosepatienten waren etwas jünger, als Patienten mit einer anderen interstitiellen Lungenerkrankung. Ebenfalls konnte ein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung der BAL gesehen werden, wobei sich die Anzahl an Alveolarmakrophagen, Lymphozyten und der CD4/CD8 Quotient unterschieden. Das Mikrobiom wurde mittels Sequenzierung der 16sRNA Gene analysiert. Die Gene, welche für die bakterielle 16sRNA kodieren wurden in ihrer Gesamtheit sequenziert und statistisch mit einer Datenbank verglichen. Anhand dieser Datenbank wurden die Sequenzierungsergebnisse einer bestimmten Bakteriengruppe zugeordnet und gruppiert. In der direkten Darstellung der häufigsten Bakteriengruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Untersuchungsgruppen. Die Untersuchung der Alpha-Diversität errechnet mittels Shannon-Index und Simpson-Index, zeigte keine signifikanten Unterschiede in der mikrobiellen Vielfalt beider Untersuchungsgruppen. Auch ein weiterer Vergleich zwischen beiden Gruppen mittels multivarianter statistischer Analyse zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die Hauptkomponentenanalysen, als auch die Korrespondenzanalysen unterschieden sich nicht in beiden Gruppen. In einer detaillierten Gegenüberstellung mittels „Heatmap“ konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede gesehen werden, die auf ein verändertes Mikrobiom zwischen Sarkoidose und anderen interstitiellen Lungenerkrankungen hinweisen. Schließlich wurden spezielle bakterielle Erreger näher betrachtet. Dabei konnte weder für *Mykobakterien* noch für *Propionibakterien* ein Hinweis auf eine relevante Rolle bei der Sarkoidose festgestellt werden. *Mykobakterien* ließen sich in der Sarkoidosegruppe nicht signifikant nachweisen. *Propionibakterien* waren nicht signifikant seltener in der Sarkoidosegruppe, als in der Kontrollgruppe vorhanden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich mit anderen Studien auf diesem Gebiet in Einklang bringen. Seit dem Einsatz von neuen Sequenzierungsmethoden wurden einige andere Studien zum Thema Mikrobiom und Sarkoidose durchgeführt. In der Mehrzahl der Fälle kommen die Autoren der Studie zu ähnlichen Ergebnissen wie in der vorliegenden Arbeit. Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Sarkoidosepatienten und Patienten mit anderen Lungenerkrankungen oder Gesunden finden. Ein mikrobieller Auslöser ließ sich in den meisten Studien nicht nachweisen[9] [40] [21]. In einer ähnlichen Studie wurde das Mikrobiom von Patienten mit rheumatoider Arthritis, Sarkoidose und einer Gruppe von gesunden Probanden verglichen. Dabei wurden BAL von Patienten gewonnen und mittels 16sRNA Gensequenzierung analysiert. In dieser Studie konnte eine Ähnlichkeit in der Vielfalt zwischen dem Mikrobiom der RA und Sarkoidose festgestellt werden. Im Vergleich dazu war das Mikrobiom von gesunden Probanden weniger divers. Ein mikrobieller Auslöser der Sarkoidose wurde nicht gefunden[40]. Eine weitere Studie vergleicht das Mikrobiom (gewonnen mittels BAL) zwischen Patienten mit Sarkoidose, interstitiellen Lungenerkrankungen, Pneumocystis Pneumonie und einer gesunden Kontrollgruppe. Die Proben wurden ebenfalls mittels 16sRNA Gensequenzierung analysiert. In dieser Studie konnten keine Unterschiede in der Komposition des Mikrobioms zwischen den fünf Gruppen festgestellt werden[21]. Weiterhin wurden in einer Studie verschiedene Proben von Sarkoidosepatienten (unter anderem Lymphknoten und BAL) mit einer Kontrollgruppe verglichen. Dabei zeigten sich nach Korrektur von falsch positiven Untersuchungsbefunden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Untersuchungsgruppen[9]. Lediglich eine Studie konnte einen signifikanten Unterschied im Mikrobiom von Patienten mit Sarkoidose und gesunden Probanden feststellen. Dabei wurden in BAL von Patienten mit Sarkoidose ein häufigeres Vorkommen der Bakterienspezies *Atopobium spp.* und *Fusobacterium spp.* Dabei waren genannte Bakterienspezies insgesamt häufiger in der Sarkoidoseproben, als auch abhängig vom Stadium der Sarkoidose[48].

Weiterhin wurde in der vorliegenden Studie speziell nach der Anwesenheit von *Mykobakterien* und *Propionibakterien* gesucht, sowie deren relative Häufigkeit in den Proben. Weder *Propionibakterien*, noch *Mykobakterien* wurden in der Sarkoidosegruppe gehäuft nachgewiesen. In diversen anderen Studien wurde der

Versuch eines Nachweises von *Mykobakterien*, sowie *Propionibakterien* bei Sarkoidosepatienten unternommen, dabei konnte allerdings kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Es liegen Daten vor, die ein gehäuftes Vorkommen von *Mykobakterien* oder *Propionibakterien* bei Sarkoidosepatienten unterstützen und welche, die dies nicht bestätigen[3] [37] [2]. Eine Ursache könnte darin bestehen, dass weder *Propionibakterien* noch *Mykobakterien* eine direkte Infektion, sondern eher bakterielle Bestandteile eine inadäquate Immunreaktion verursachen. Hinweise darauf gibt es in einigen Studien[9] [7] [34]. Es wurde außerdem eine fehlgesteuerte Immunreaktion des Toll-like Rezeptors 2 mit der Pathogenese einer Sarkoidose in Verbindung gebracht[20]. Welche Rolle die bakteriellen Bestandteile dabei genau in der Pathogenese spielen ist jedoch unklar. Eine Hypothese ist, dass eine nicht vollständige Beseitigung dieser bakteriellen Bestandteile zur persistierenden Bildung von Granulomen und einer Entzündungsreaktion führt.

Die wesentlichen Bakterienspezies, welche in der vorliegenden Studie gefunden wurden waren *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Acinetobacter*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteriales* und *Spirochaetales*. Dabei handelt es sich um die häufigsten Bakteriengruppen bei Patienten mit einer Sarkoidose oder einer interstitiellen Lungenerkrankung. Aber auch bei gesunden Patienten konnten diese Bakteriengruppen in einer Studie nachgewiesen werden, wobei die methodischen Verfahren in der Studie sich wesentlich von den vorliegenden unterscheiden[47].

Da eine Vielzahl an Patienten mit Sarkoidose eine Beteiligung der Lunge vorweisen und eine bronchoalveoläre Lavage ein wichtiger Bestandteil der Diagnosefindung einer Sarkoidose ist[29], stellt die BAL ein probates Mittel für Mikrobiomanalysen dar. Dies konnte ebenfalls mittels einer Studie zum pulmonalen Mikrobiom gezeigt werden, in welcher das Mikrobiom bei Asthma Patienten analysiert wurde[26]. Die Gewinnung von repräsentativem Material aus der Lunge hängt allerdings auch mit dem Verfahren und dem Ort der Erkrankung ab[9]. In vorausgegangenen Studien zum Mikrobiom konnte gezeigt werden, dass sich das Mikrobiom der oberen Atemwege und der unteren Atemwege nicht strikt unterteilen lässt[5]. Es wurde außerdem gezeigt, dass ein nicht unerheblicher Anteil an Bakterien via Bronchoskop in die unteren Atemwege eingebracht wird[6]. Daher ist

es wohl denkbar, dass das Mikrobiom der Lunge in der vorliegenden Studie durch das Mikrobiom der oberen Atemwege verunreinigt wurde.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich bei bestimmten Erkrankungen, zum Beispiel bei einer schweren chronisch obstruktiven Lungenerkrankung, das Mikrobiom innerhalb der Lunge divergiert. Verschiedene Areale der Lunge wiesen dabei eine unterschiedliche mikrobielle Zusammensetzung auf[18]. Eine standardisierte Mittellappenlavage könnte daher kein probates Mittel sein, wenn es um die Beurteilung des gesamten Mikrobioms der Lunge geht. Möglicherweise kann in zukünftigen Studien eine Mikrobiomanalyse der gesamten Lunge durchgeführt werden, zum Beispiel an explantierten Lungen nach einer Lungentransplantation.

Verglichen wurde eine Gruppe von Patienten mit der Diagnose Sarkoidose und eine Gruppe von Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen. Die Gruppe der interstitiellen Lungenerkrankungen bestand aus einer sehr heterogenen Gruppe an Krankheitsbildern mit teilweise geringer Fallzahl (Idopathisch pulmonale Fibrose, exogen allergische Alveolitis, Autoimmunerkrankungen mit interstitieller Lungenbeteiligung). Unterschiede in beiden Gruppen könnten dadurch weniger signifikant ausfallen. Somit würde ein Unterschied der beiden Gruppen Sarkoidose und interstitielle Lungenerkrankung nicht auffallen. Des Weiteren wäre eine „gesunde“ Vergleichsgruppe bei der Fragestellung eines spezifischen Agens der Sarkoidose eine Ergänzung gewesen. Dies ließ sich allerdings aufgrund ethischer Aspekte nicht realisieren.

Die Sarkoidosepatienten, welche in der vorliegenden Studie untersucht wurden, zeigten unterschiedliche Stadien und Verlaufsformen ihrer Erkrankung. Ein Teil der Patienten wurde in einem akuten Stadium lavagiert, während ein anderer Teil in einem chronischen Stadium untersucht wurde. Der Großteil an Patienten wurde im akuten Stadium lavagiert, wobei sich in diesem Stadium noch keine strukturelle Veränderung der Lunge im Sinne einer Fibrosierung zeigte. Der weit aus kleinere Teil an Untersuchungsmaterial wurde von Patienten mit einer chronischen Sarkoidose gewonnen. Vorstellbar wäre eine Veränderung des Mikrobioms während unterschiedlichen Stadien der Sarkoidose. Eine zunehmende Fibrosierung könnte somit auch eine zunehmende Immunschwäche und Zunahme von pathogenen Keimen bedeuten. Eine Unterscheidung der zwischen Patienten

mit akuter und chronischer Sarkoidose war allerdings in der vorliegenden Studie nicht möglich aufgrund der geringen Fallzahl an Patienten.

Das Thema Mikrobiom und Änderungen des Mikrobioms bei bestimmten Erkrankungen ist aus aktueller Sicht noch sehr unübersichtlich und komplex. Fragestellungen, wie die Definition eines „gesunden Mikrobioms“, falls dieses in der Form existiert, oder die geeignete Methode zur Untersuchung des Mikrobioms der Lunge sollten die Grundlagen weiterer Studien sein.

Ein weiterer Aspekt sind epidemiologische Unterschiede, da diese bei der Sarkoidose bezüglich der Pathogenese eine prominente Rolle spielen. In Zukunft könnte das Mikrobiom bei Sarkoidose auch auf Unterschiede zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen, aber auch geographischen Differenzen untersucht werden. In der vorliegenden Studie wurden hauptsächlich Patienten mit kaukasischem Ursprung untersucht.

Insgesamt lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen festhalten, dass das sich keine Unterschiede im Mikrobiom zwischen Patienten mit Sarkoidose und interstitiellen Lungenerkrankungen feststellen lassen. Die Methoden zur Untersuchung des Mikrobioms, als auch das grundlegende Verständnis des Mikrobioms in der Pathogenese von Lungenerkrankungen bedürfen weiterer Studien.

6 Anhang

Literaturverzeichnis

1. Behjati S, Tarpey PS (2013) What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 98:236–8
2. Bocart D, Lecossier D, De Lasseigne A, Valeyre D, Batastani J-P, Hance AJ (1992) A Search for Mycobacterial DNA in Granulomatous Tissues from Patients with Sarcoidosis Using the Polymerase Chain Reaction. *Am Rev Respir Dis* 145:1142–1148
3. Brownell I, Ramírez-Valle F, Sanchez M, Prystowsky S (2011) Evidence for mycobacteria in sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:899–905
4. BURKE WMJ, A. KEOGH, MALONEY PJ Transmission of sarcoidosis via cardiac transplantation. *7:953–954*
5. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, Bushman FD, Collman RG (2011) Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 184:957–63
6. Charlson ES, Bittinger K, Chen J, Diamond JM, Li H, Collman RG, Bushman FD (2012) Assessing bacterial populations in the lung by replicate analysis of samples from the upper and lower respiratory tracts. *PLoS One* 7:e42786
7. Chen ES, Wahlström J, Song Z, Willett MH, Wikén M, Yung RC, West EE, McDyer JF, Zhang Y, Eklund A, Grunewald J, Moller DR (2008) T cell responses to mycobacterial catalase-peroxidase profile a pathogenic antigen in systemic sarcoidosis. *J Immunol* 181:8784–96
8. Chen ES, Moller DR (2015) Etiologies of Sarcoidosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 49:6–18
9. Clarke EL, Lauder AP, Hofstaedter CE, Hwang Y, Fitzgerald AS, Imai I, Biernat W, Rękawiecki B, Majewska H, Dubaniewicz A, Litzky LA, Feldman MD, Bittinger K, Rossman MD, Patterson KC, Bushman FD, Collman RG (2018) Microbial Lineages in Sarcoidosis. A Metagenomic Analysis Tailored for Low-Microbial Content Samples. *Am J Respir Crit Care Med* 197:225–234
10. Collins RD, Pei Z, Blaser MJ, Pride DT, Cover TL, Drake WP (2012) Molecular Analysis

- of Sarcoidosis Tissues for Mycobacterium Species DNA . *Emerg Infect Dis* 8:1334–1341
11. Costabel U, Wessendorf TE, Bonella F (2017) Epidemiologie und klinisches Erscheinungsbild der Sarkoidose. *Klin Monbl Augenheilkd* 234:790–795
 12. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB (2013) The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert Rev Respir Med* 7:245–257
 13. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB (2016) The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol* 78:481–504
 14. Drent M, Mansour K, Linssen C (2007) Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 28:486–495
 15. Du Bois RM, Goh N, McGrath D, Cullinan P (2003) Is there a role for microorganisms in the pathogenesis of sarcoidosis? *J Intern Med* 253:4–17
 16. Eishi Y (2013) Etiologic link between sarcoidosis and *Propionibacterium acnes*. *Respir Investig* 51:56–68
 17. El-Zammar OA, Katzenstein ALA (2007) Pathological diagnosis of granulomatous lung disease: A review. *Histopathology* 50:289–310
 18. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, Young VB, Toews GB, Curtis JL, Sundaram B, Martinez FJ, Huffnagle GB (2011) Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PLoS One* 6:e16384
 19. Faner R, Sibila O, Agustí A, Bernasconi E, Chalmers JD, Huffnagle GB, Manichanh C, Molyneaux PL, Paredes R, Brocal VP, Ponomarenko J, Sethi S, Dorca J, Monsó E (2017) The microbiome in respiratory medicine: Current challenges and future perspectives. *Eur Respir J* 49:1–12
 20. Gabilovich MI, Walrath J, van Lunteren J, Nethery D, Seifu M, Kern JA, Harding C V., Tuscano L, Lee H, Williams SD, Mackay W, Tomashefski JF, Silver RF (2013) Disordered Toll-like receptor 2 responses in the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 173:512–22
 21. Garzoni C, Brugger SD, Qi W, Wasmer S, Cusini A, Dumont P, Gorgievski-Hrisoho M, Mühlemann K, Garnier C Von, Hilty M (2013) Microbial communities in the respiratory tract of patients with interstitial lung disease. *Thorax* 68:1150–1156
 22. Groneberg D, Schöffel N, Kirchdörfer M, Bendels M, Bundschuh M, Ohlendorf D, Brüggmann D (2016) Eine deskriptive Betrachtung der globalen Forschungslandschaft und der aktuellen Forschungsentwicklungen zum Thema Sarkoidose. *Pneumologie* 70:28–36
 23. Han MK, Huang YJ, Lipuma JJ, Boushey HA, Boucher RC, Cookson WO, Curtis JL, Erb-

- Downward J, Lynch S V., Sethi S, Toews GB, Young VB, Wolfgang MC, Huffnagle GB, Martinez FJ (2012) Significance of the microbiome in obstructive lung disease. *Thorax* 67:456–63
24. Han MK, Zhou Y, Murray S, Tayob N, Noth I, Lama VN, Moore BB, White ES, Flaherty KR, Huffnagle GB, Martinez FJ, COMET Investigators (2014) Lung microbiome and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of the COMET study. *Lancet Respir Med* 2:548–56
25. Hedfors E, Möller E (1973) HLA Antigens in Sarcoidosis. *Tissue Antigens* 3:95–98
26. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WOC (2010) Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* 5:e8578
27. Hofmann S, Franke A, Fischer A, Jacobs G, Nothnagel M, Gaede KI, Schürmann M, Müller-Quernheim J, Krawczak M, Rosenstiel P, Schreiber S (2008) Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis. *Nat Genet* 40:1103–1106
28. Iannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS (2007) Sarcoidosis. *N Engl J Med* 357:2153–2165
29. Kirsten D (2013) Sarkoidose: aktuelle Diagnostik und Therapie. *Dtsch Medizinische Wochenschrift* 138:537–540
30. Man J, Montero A, Salazar A, Manresa F (1996) "fgren" 's Syndrome Revisited : A Study of 186 Patients. 9343:
31. Moller DR, Rybicki BA, Hamzeh NY, Montgomery CG, Chen ES, Drake W, Fontenot AP (2017) Genetic, immunologic, and environmental basis of sarcoidosis. *Ann Am Thorac Soc* 14:S429–S436
32. Müller-Quernheim J, Prasse A, Zissel G (2012) Pathogenesis of sarcoidosis. *Press Medicale* 41:e275–e287
33. Oswald-Richter K, Sato H, Hajizadeh R, Shepherd BE, Sidney J, Sette A, Newman LS, Drake WP (2010) Mycobacterial ESAT-6 and katG are recognized by sarcoidosis CD4+ T cells when presented by the American sarcoidosis susceptibility allele, DRB1*1101. *J Clin Immunol* 30:157–66
34. Oswald-Richter KA, Beachboard DC, Zhan X, Gaskill CF, Abraham S, Jenkins C, Culver DA, Drake W (2010) Multiple mycobacterial antigens are targets of the adaptive immune response in pulmonary sarcoidosis. *Respir Res* 11:161
35. Patterson KC, Streck ME (2013) Pulmonary fibrosis in sarcoidosis clinical features and outcomes. *Ann Am Thorac Soc* 10:362–370

36. Prasse A (2017) Sarkoidose – was ist neu ? Sarcoidosis – Recent Advances Einleitung Epidemiologie Diagnostik Definition und Pathogenese. *DMW - Dtsch Medizinische Wochenschrift* 142:825–828
37. Robinson LA, Smith P, Sengupta DJ, Prentice JL, Sandin RL (2013) Molecular analysis of sarcoidosis lymph nodes for microorganisms: a case-control study with clinical correlates. *BMJ Open* 3:e004065
38. Rossi G, Cavazza A, Colby T V. (2015) Pathology of Sarcoidosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 49:36–44
39. Sato H, Woodhead FA, Ahmad T, Grutters JC, Spagnolo P, van den Bosch JMM, Maier LA, Newman LS, Nagai S, Izumi T, Wells AU, du Bois RM, Welsh KI (2010) Sarcoidosis HLA class II genotyping distinguishes differences of clinical phenotype across ethnic groups. *Hum Mol Genet* 19:4100–4111
40. Scher JU, Joshua V, Artacho A, Abdollahi-Roodsaz S, Öckinger J, Kullberg S, Sköld M, Eklund A, Grunewald J, Clemente JC, Ubeda C, Segal LN, Catrina AI (2016) The lung microbiota in early rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Microbiome* 4:60
41. Schupp JC, Frye BC, Zissel G, Müller-Quernheim J (2016) Neue pathogenetische Konzepte und frühe pharmakologische Studien bei der Sarkoidose. *Pneumologie* 70:231–240
42. Smojver-Ježek S, Kerhin-Brkljačić V, Grubić Z, Alilović M, Tekavec-Trkanjec J, Peroš-Golubičić T, Žunec R, Martinez N (2007) HLA class I and class II frequencies in patients with sarcoidosis from Croatia: role of HLA-B8, *DRB1*0301, and *DQB1*0201 haplotype in clinical variations of the disease. *Tissue Antigens* 70:301–306
43. Valentonyte R, Hampe J, Huse K, Rosenstiel P, Albrecht M, Stenzel A, Nagy M, Gaede KI, Franke A, Haesler R, Koch A, Lengauer T, Seegert D, Reiling N, Ehlers S, Schwinger E, Platzer M, Krawczak M, Müller-Quernheim J, Schürmann M, Schreiber S (2005) Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in *BTNL2*. *Nat Genet* 37:357–364
44. Whitley R (2008) The New Age of Molecular Diagnostics for Microbial Agents. *N Engl J Med* 358:988–989
45. Xie HJ, Wu M, Niu Y, Shen B, Huo Y, Cheng Y (2014) Associations between tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and sarcoidosis: A meta-analysis. *Mol Biol Rep* 41:4475–4480
46. Yang B, Wang Y, Qian P-Y (2016) Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 17:135
47. Zakharkina T, Heinzl E, Koczulla RA, Greulich T, Rentz K, Pauling JK, Baumbach J,

- Herrmann M, Grünewald C, Dienemann H, von Müller L, Bals R (2013) Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing. *PLoS One* 8:e68302
48. Zimmermann A, Knecht H, Häsler R, Zissel G, Gaede KI, Hofmann S, Nebel A, Müller-Quernheim J, Schreiber S, Fischer A (2017) *Atopobium* and *Fusobacterium* as novel candidates for sarcoidosis-associated microbiota. *Eur Respir J* 50:1600746

Publikationen

Becker A, Vella G, Galata V, et al. The composition of the pulmonary microbiota in sarcoidosis - an observational study. *Respir Res.* 2019;20(1):46. doi:10.1186/s12931-019-1013-2