

Aus der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

Direktorin: Prof. Dr. med. Petra Ambrosch

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian – Albrechts – Universität zu Kiel

Veränderungen der Zusammensetzung des nasalen Mikrobioms bei Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian – Albrechts – Universität zu Kiel

vorgelegt von

Ida Rolfs

aus Göttingen

Kiel 2020

1. Berichterstatter/in: Priv.-Doz.Dr. med. Martin Laudien, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Thomas Schwarz, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

Tag der mündlichen Prüfung: 14 April 2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:

(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	II
1. EINLEITUNG	1
1.2. GRANULOMATOSE MIT POLYANGIITIS	2
1.3. EPIDEMIOLOGIE	3
1.4. ÄTIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE.....	3
1.5. MIKROBIOM IM ZUSAMMENHANG MIT DEM KRANKHEITSPROZESS	4
2. MATERIAL UND METHODEN	5
2.1. STUDIENPOPULATION UND STUDIENDESIGN.....	5
2.2. DNA/RNA EXTRAKTION	8
2.3. ILLUMINA-LIBRARY, HOCHDURCHSATZ- SEQUENZIERUNG UND TAXONOMISCHE KLASSIFIKATION.....	8
2.4. ECHTZEIT- POLYMERASEKETTENREAKTION (RT-PCR)	10
2.5. 16S rRNA AMPLIKON VORBEREITUNG, MiSEQ SEQUENZIERUNG UND DATENANALYSE	10
3. ERGEBNISSE.....	12
3.1. DIVERSITÄT DES NASALEN MIKROBIOMS	12
3.2. BAKTERIELLE ZUSAMMENSETZUNG.....	16
3.3. DETEKTION VON <i>S. AUREUS</i> UND <i>H. INFLUENZAE</i>	24
3.4. UMERS VON GPA UND NK.....	25
4. DISKUSSION.....	27
5. ZUSAMMENFASSUNG	34
6. LITERATURVERZEICHNIS	35
7. ANHANG.....	V
7.1. ERGÄNZENDE TABELLEN	V
7.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	XII
7.3. TABELLENVERZEICHNIS	XII
7.4. DANKSAGUNG	XIII

Abkürzungsverzeichnis

A

AAV.....Anti- Neutrophilen- zytoplasmatische- Antikörper- assoziierten- Vaskulitis
Abb..... Abbildung
ANCA Anti- Neutrophilen- Zytoplasmatische- Antikörper
ANOSIM..... analysis of similarities, Ähnlichkeitsanalyse

B

BLAST..... Basic Local Alignment Search Tool
bp..... Basenpaare
BVAS..... Birmingham Vasculitis Activity Score

C

c- ANCA zytoplasmatische Anti-Neutrophilen zytoplasmatische Antikörper
CD28..... Cluster of differentiation 28
CD4..... Cluster of differentiation 4
cDNA..... komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED Chronisch Entzündliche Darmerkrankung
cPR3..... komplementäre Proteinase 3
CRS chronische Rhinosinusitis

D

DAS28.....Disease Activity Score 28
DNA Desoxyribonukleinsäure

E

ENTAS..... Ear Nose Throat Activity Score

F

FAM..... 6-Carboxy-Fluoreszein

G

GPA..... Granulomatose mit Polyangiitis

H

H. influenzae..... Haemophilus influenzae

hBD3.....Humanes Beta-Defensin-3

HNO..... Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

I

ITS1.....Internal Transcribed Spacer 1

M

MPOMyeloperoxidase

N

NCBI.....National Center for Biotechnology Information

NKNormalkontrollen

nM.....Nanomolar

O

OAW Obere Atemwege

OTU Operational Taxonomic Unit

P

p- ANCAperinukleäre Anti- Neutrophilen- Zytoplasmatische- Antikörper

PBSphosphatgepufferte Salzlösung

PCA prinicple component Analyse, Hauptkomponentenanalyse

PEpaired ends

PR3Proteinase 3

PRR Pattern Recognition Receptor

Q

qPCR quantitative Polymerase-Kettenreaktion

R

RARheumatoide Arthritis

RNA Ribonukleinsäure

rRNA ribosomale Ribonukleinsäure

RT-PCR Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

S

SSvedberg

S. aureus Staphylococcus aureus

SAg..... Superantigen

T

TLR-4.....Toll-like Receptor 4

U

UKE..... Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

V

VIC..... 2'-Chloro-7'Phenyl-1,4-Dichloro-6-Carboxy-Fluoreszein

1. Einleitung

1.1. Fragestellung

Chronisch entzündliche sowie autoimmun-assoziierte Erkrankungen stehen meist im Zusammenhang mit einer Dysbiose des ortsständigen Mikrobioms und somit einer Imbalance der natürlichen mikrobiellen Zusammensetzung an mukosalen Grenzflächen.

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ist definiert als eine systemische Autoimmunerkrankung, deren Ätiologie multifaktoriell ist. Sowohl prädisponierend genetische als auch umweltbedingte Faktoren werden in verschiedenen Studien als Einflussgröße auf die Krankheitsentstehung sowie den Krankheitsverlauf identifiziert (1-4). Beispielsweise konnte *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) als Teil des Mikrobioms in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten mit einer verstärkten entzündlichen endonasalen Aktivität und einem höheren Rezidivrisiko in Zusammenhang gebracht werden (5-9). In früheren Arbeiten basierte die Untersuchung des Mikrobioms häufig auf Kultur-abhängigen Analysen bakterieller Kulturen. Da bekannt ist, dass weniger als 1 % der in der Umwelt vorkommenden Mikroorganismen mittels Kultur angezüchtet werden können, konnten diese Studien keine repräsentativen Ergebnisse in Hinblick auf das vollständige mikrobielle Spektrum liefern.

Auch für die Genese der Autoimmunerkrankung Rheumatoide Arthritis (RA) wurde ein Einfluss der Zusammensetzung des mukosalen Mikrobioms beobachtet (10-12).

Die RA teilt mit der GPA im Hinblick auf die Krankheitsentität unter anderem genetische Aberrationen sowie immunologische Eigenschaften. Beispielsweise werden beide Erkrankungen mit spezifischen Veränderungen der adaptiven Immunreaktion oder dem PTPN22 R620W Polymorphismus in Verbindung gebracht (2, 13). Darüber hinaus gibt es im klinischen Bereich auch Ähnlichkeiten in der medikamentösen Therapie von RA und GPA (5).

Ziel der vorliegenden Studie war es, mithilfe von Kultur-unabhängigen Methoden mögliche Veränderungen der Zusammensetzung des gesamten nasalen Mikrobioms bei Patienten mit GPA im Vergleich zu Patienten mit RA sowie gesunden Normalkontrollen (NK) zu ermitteln. Des Weiteren wurde die Diversität des Mikrobioms zwischen und innerhalb der drei einzelnen Gruppen analysiert.

Zudem wurde geprüft, ob eine Korrelation zwischen dem vorliegenden mikrobiellen Spektrum, immunsuppressiver Therapie und der Krankheitsaktivität des jeweiligen Krankheitsbildes besteht. Spezielles Augenmerk wurde auf das Vorkommen von *S. aureus* gerichtet, wegen seiner in vielen Arbeiten beschriebenen Funktion als zusätzlicher Trigger für die Krankheitsentwicklung.

1.2. Granulomatose mit Polyangiitis

Heinz Klinger berichtete 1931 erstmals von der sogenannten „Periarteriitis nodosa“ (14), welche 1936 in einer ersten und 1939 in einer zweiten Veröffentlichung durch Friederich Wegener als Morbus Wegener (M. Wegener) weiter beschrieben wurde (15, 16) und seit 2010 als Granulomatose mit Polyangiitis bezeichnet wird (17, 18).

Die GPA ist eine seltene, systemisch – entzündliche, nekrotisierende Autoimmunerkrankung und gemäß den Klassifikationskriterien des „American College of Rheumatology“ von 1990 und den im Jahr 2012 überarbeiteten Definitionen der „Chapel Hill Consensus Conference“ zugehörig zu dem Formenkreis der Anti-Neutrophilen zytoplasmatische Antikörper (ANCA) – assoziierten Vaskulitiden (AAV) (19, 20). Zur zusätzlichen Sicherung der Diagnose erfolgt mittels hochqualitativer Immunoassays ein primäres Screening auf das Vorhandensein von ANCAs (21, 22). Dabei wird zwischen perinukleären (p-ANCA) und zytoplasmatischen Autoantikörpern (c-ANCA) differenziert. Hierbei zeigen sich bei circa 80 - 90% der GPA- Patienten Autoantikörper vom c-ANCA Typ, welche sich insbesondere gegen die Proteinase 3 (PR3), eine Proteinase der neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten, richten (23-29). In selteneren Fällen werden Autoantikörper vom p-ANCA Typ detektiert, wobei sich diese Antikörper dann häufig gegen das Zielantigen der Myeloperoxidase (MPO) richten (30-33). In circa 10% der Fälle kann auch eine ANCA- Negativität bestehen, was jedoch eine AAV per se nicht ausschließt (34). Die GPA betrifft vor allem die kleinen und mittelgroßen Gefäße der Lunge sowie der Niere und verursacht extravaskuläre, nekrotisierende, neutrophil – granulomatöse Entzündungen des oberen und/oder unteren Respirationstraktes. Aufgrund der systemischen Genese, kann jedoch prinzipiell jedes Organ betroffen sein (1, 2, 20). Initial manifestiert sich die GPA insbesondere im Hals-, Nasen-, und Ohrenbereich (35, 36). In einer aktuellen Studie berichteten *Kühn et al.* von einer 95%igen Beteiligung des oberen Respirationstraktes (37). Auch in

früheren Arbeiten lag bereits ein Hauptaugenmerk auf dem lokalen nasalen Mikrobiom und dessen Auswirkung auf die Manifestation der Erkrankung in der Annahme, dass dieses mit der Krankheitsentwicklung in Verbindung steht (5, 8, 9).

1.3. Epidemiologie

Die Inzidenz der Erkrankung beläuft sich in Europa auf jährlich etwa zehn Neuerkrankungen pro eine Million Menschen (38, 39). In mehreren Studien wurde dabei ein Nord-Südgefälle beschrieben (39-41). Der Häufigkeitsgipfel der Erstdiagnosen der GPA liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr, wobei sowohl Männer als auch Frauen in etwa gleich häufig betroffen sind (39).

1.4. Ätiologie und Pathophysiologie

Die Ätiologie der GPA ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Es wird von einer multifaktoriellen Genese mit genetischer sowie epigenetischer Prädisposition ausgegangen (4, 42-46). Laut aktuellen Studien entwickelt sich die GPA bei genetischer Veranlagung sowie einer mangelhaften Toleranz gegenüber ANCA-Autoantigenen bei gleichzeitiger Einwirkung von bestimmten äußeren Stimulanzen. Hierzu zählt die Einnahme von bestimmten Medikamenten wie etwa dem Antibiotikum Cefotaxim, dem Thyreostatikum Carbimazol oder auch dem anti-Tumor-Nekrose-Faktor- alpha (TNF-alpha) - Blocker Adalimumab (47). Ebenso sind bakterielle, virale und fungale Infektionen für die Genese der Erkrankung von Bedeutung (47, 48). So wird unter anderem das Vorkommen von *S. aureus* als Triggerfaktor postuliert (5, 7, 8). Auch Umweltfaktoren wie etwa Luftverschmutzung, Rauchen oder auch die Inhalation von Quarzstäuben scheinen einen Einfluss auf die Krankheitsentwicklung zu haben (47, 48).

1.5. Mikrobiom im Zusammenhang mit dem Krankheitsprozess

Die Kenntnis des Zusammenhangs von intestinalem Mikrobiom mit der Entwicklung von Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen (CEDs), wie Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn, und die damit einhergehende systemische, aber auch lokale, mukosale Immunreaktion (49) haben dazu beigetragen, dass auch für andere Erkrankungen im Hals-, Nasen-, Ohrenbereich die Untersuchung des Mikrobioms in den Fokus gerückt ist. So konnte etwa die Chronische Rhinosinusitis (CRS) mit einer veränderten Zusammensetzung des nasalen Mikrobioms in Verbindung gebracht werden (50, 51). Auch für die GPA konnte bereits in Kultur-abhängigen Studien ein Zusammenhang von Krankheitsaktivität und Rezidivrisiko mit dem Vorhandensein von *S. aureus* festgestellt werden (5, 8, 52). Die Tatsache, dass der Einsatz des Antibiotikums Trimethoprim-Sulfamethoxazol in klinischen Studien vor Rezidiven schützen konnte, unterstreicht den Einfluss von Bakterien auf den Krankheitsprozess (53, 54). Auch weitere Einflussfaktoren wie etwa das Vorhandensein von *S. aureus*-produzierten Superantigenen (SAg) oder von *S. aureus*-induzierter Proteinbiosynthese von komplementärer PR3 (cPR3) und der damit einhergehenden Bildung von PR3-Autoantigenen scheint zur Pathogenese der GPA beizutragen. Ebenso ist eine reduzierte Sekretion von humanem- Beta-Defensin-3 (hBD3) mit der Krankheitsentwicklung assoziiert (55-58). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von *Rhee et al.* sind erstmals Kultur-unabhängige Methoden zur Analyse des Mikrobioms bei Patienten mit GPA und gesunden Normalkontrollen zum Einsatz gekommen (59). Hier konnte sowohl eine Dysbiose des nasalen Mikrobioms bei Patienten mit GPA als auch eine Normalisierung der mikrobiellen Zusammensetzung beim Einsatz von Immunsuppressiva gezeigt werden (59).

2. Material und Methoden

2.1. Studienpopulation und Studiendesign

Die vorliegende Fragestellung wurde im Rahmen einer prospektiven, klinischen Arbeit an der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in Zusammenarbeit mit der Klinik für Rheumatologie und der klinischen Immunologie der Universität Lübeck untersucht.

Die Studiengruppe umfasste 77 Individuen. Das Kollektiv setzte sich dabei aus 29 Patienten mit GPA, 21 Patienten mit RA und 27 Personen der Kontrollgruppe (NK) zusammen. Alle GPA-Patienten erfüllten die für die GPA formulierten Definitionen der Chapel Hill Consensus Conference und die Kriterien des American College of Rheumatology (19, 20).

Die Tabelle 1 charakterisiert die beiden Patientengruppen und die Normalkontrollen. Ausschlusskriterium für die Rekrutierung des Kollektivs war eine laufende antibiotische Behandlung. Bei allen Probanden lag die letzte antibiotische Behandlung mindestens drei Wochen zurück. Auch eine aktive maligne Erkrankung der Probanden wurde ausgeschlossen.

Die Krankheitsaktivität, in Form aktiver Krankheitsmanifestationen als Folge der AAV wurde für GPA-Patienten mithilfe des „Birmingham Vasculitis Activity Scores V3.0“ (BVAS V3.0) evaluiert. Für die RA-Patienten konnte hierfür der modifizierte „Disease Activity Score 28“ (DAS28) verwendet werden (60, 61). Zusätzlich erfolgte bei Patienten mit GPA eine Einschätzung der Aktivität am oberen Respirationstrakt mithilfe des „Ear Nose Throat Activity Scores“ (ENTAS) (62).

Da bei der GPA initial insbesondere die Nase beteiligt ist und diese als Teil des Immunsystems fungiert (63), wurden von allen Probanden nasale Abstriche entnommen. Von den insgesamt 77 Individuen wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen bilateral Nasenabstriche gesammelt, in sterile Plastikröhrchen überführt und bei -73°C gelagert.

In Kooperation mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf (UKE) wurden die Abstriche zur weiteren Analyse aufbereitet. Um die mikrobielle Vielfalt mittels einer Kultur-unabhängigen Methodik zu bestimmen, wurde die nasale bakterielle Zusammensetzung mithilfe einer V3-V4 Region 16S ribosomale RNA (rRNA) Amplikon Sequenzierung in den Proben der Patienten mit GPA, RA und der NK erhoben.

Darüber hinaus wurde eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) speziell für *S. aureus* und *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) sowie Entero- und Rhinoviren durchgeführt. Als weitere Messgröße der mikrobiellen Diversität diente das Verfahren der „Unbiased nontargeted Metagenomic Sequencing of RNA“ (UMERS).

Bei 13 Probanden (GPA: n=9, NK: n=4) erfolgte somit mithilfe von UMERS eine detailliertere Aufnahme des Mikrobioms unter Einfluss viraler, bakterieller und fungaler Komponenten.

Die ergänzenden Tabellen 1 – 5 fassen individuelle Patienteninformationen zusammen und zeigen Ergebnisse der klassifizierenden Analysemethoden (id est V3-V4 Region 16S rRNA Amplikon Sequenzierung, qPCR und UMERS) und „next-generation“ Sequenzierungsdaten durch UMERS.

Die Sequenzierungsdaten wurden an das BioProject database/project ID PRJNA494384 übermittelt.

Alle Probanden gaben ihre schriftliche Einwilligung. Die Studie wurde nach positivem Votum der Ethikkommission der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel (Az A101/07) und der Universitätsklinik Lübeck (Az 16-199) durchgeführt.

Tabelle 1: Studienkollektiv

Gruppe 1: Normalkontrollen, n = 27	
Alter in Jahren (Median, Verteilung)	55, 18–81
Geschlecht (w/m)	14/13
Gruppe 2: GPA, n = 29	
Alter in Jahren (Median, Verteilung)	49, 21–83
Geschlecht (w/m)	20/9
Dauer der Erkrankung in Monaten (Median, Verteilung)	64, 18–216
Lokalisierte/Generalisierte GPA (n/n)	3/26
C-ANCA/P-ANCA positiv (n/n)	23/2

PR3-ANCA/MPO-ANCA positiv (n/n)	24/1
Aktive Erkrankung, BVAS V3.0 \geq 1 (n; Median, Verteilung)	6; 7.5; 1–12
Remission, BVAS V3.0 = 0 (n)	23
ENTAS (n des Grades: none, mild, moderate, mild-moderate, und high)	19, 6, 1, 3, 0
Positive Histologie (n)	17
Organbeteiligung (n von HNO/Lunge/Niere) ^a	29/17/11
Prednisolon Dosis, mg (n; Median, Verteilung)	28; 5, 2–30
CYC/RTX/AZA/MTX/LEF/MMF/CTR (n)	0/10/5/13/3/1/0; (32)
Gruppe 3: RA, n = 21	
Alter in Jahre (Median, Verteilung)	60, 29–73
Geschlecht (w/m)	12/9
Dauer der Erkrankung in Monaten (Median, Verteilung)	84, 16–714
RF/Anti-CCP positiv (n/n)	11/11
Aktive Erkrankung, DAS 28 \geq 2.6 (n; Median, Verteilung)	12; 3.55; 2.93–7.78
Remission, DAS 28 < 2.6 (n; Median, Verteilung)	9; 1.65; 0.91–2.17
Organbeteiligung (n von Lunge)	1
Prednisolon Dosis, mg (n; Median, Verteilung)	17; 4, 2–10
RTX/MTX/LEF/aTNF/TOZ/ABC (n)	0/11/3/6/4/1; (25)

Abkürzungen : ABC= Abatacept; Anti-CCP= Anti-cyclic citrullinated peptide antibody; aTNF= Anti- Tumor Nekrose Faktor; AZA= Azathioprin; BVAS= Birmingham vasculitis activity score, version V3.0 (61); CT= Cotrimoxazol; CYC= cyclophosphamid; DAS 28= Disease Activity Score 28 (60); ENTAS= ENT activity score (62); LEF= Leflunomid; MMF= Mycophenolate Mofetil; MTX= Methotrexat; RF= Rheumafaktor; RTX= Rituximab; TOZ= Tocilizumab.

Eine detaillierte Beschreibung der Organbeteiligung der GPA Patienten ist in der Ergänzenden Tabelle 1 hinterlegt.

2.2. DNA/RNA Extraktion

Alle Nasenabstriche wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur in 500 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) getränkt. Aus je 200 µl der einzelnen Proben wurden die Nukleinsäuren Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA) extrahiert. Dies geschah mit dem automatisierten Extraktionssystem QIA Symphony (Quiagen, Hilden) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Da ausgewählte Proben zusätzlich für die Analyse mittels UMERS verwendet werden sollten, wurde hier eine Modifikation in der Weise vorgenommen, dass RNA nicht mit in den Extraktionspool aufgenommen wurde. Die Proben wurden daraufhin in 60 µl Volumen eluiert.

2.3. Illumina-library, Hochdurchsatz- Sequenzierung und taxonomische Klassifikation

Von der RNA wurde eine „Illumina-library“ unter Zuhilfenahme einer modifizierten Version des SCRIPT SEQ™ v2 RNA Seq Kit (Illumina, San Diego) Protokolls erstellt. Dieses Vorgehen ist in von *Fischer et al.* veröffentlichten Arbeiten beschrieben (64, 65). Die gesamte RNA Konzentration wurde anhand von Qubit (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad) gemessen. Hiervon wurden 15 ng für die Größenfragmentierung, komplementäre DNA (cDNA)-Synthese und das Anfügen eines terminal-markierten Oligonukleotids verwendet. Zweifach markierte cDNA wurde mittels Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Indianapolis) gereinigt und für 12 Zyklen amplifiziert.

Mittels des sogenannten BioAnalyzer High Sensitivity LabChip (Agilent, Santa Clara) konnte die Größe der „library“ visualisiert werden. Die verdünnten libraries (2nM) wurden auf einem HiSeq 2500 Instrument multiplex-sequenziert [2x150 Basenpaare (bp) mit gepaarter End-Sequenzierung (paired-end run), circa 50 Millionen DNA-Abschnitte (reads)/Probe] (Illumina, San Diego).

Um DNA-Abschnitte des humanen Genoms auszuschließen, wurden die jeweiligen Abschnitte zunächst mit Bowtie2 (v2.1.0) an einem humanen Referenzbausatz abgeglichen (NCBI 37.2).

Die trinity version r2013-02-25 wurde genutzt, um überlappende DNA-Abschnitte gleichen genetischen Ursprungs (Contigs) mit DNA-Abschnitten zusammenzufügen, die keine signifikant humane Ausrichtung hatten. Auf diese Weise wird mithilfe der Contigs die Original-DNA-Sequenz dieser Quelle entschlüsselt.

Contigs kürzer als 400 bp oder mit erkennbar mammalen Ursprungs, wurden von allen weiteren Analysen ausgeschlossen. Um die Abundanz der Mikroorganismen festzustellen, wurden alle filtrierte DNA-Abschnitte durch Bowtie2 mit den filtrierte Contigs gleichgerichtet.

DNA-Abschnitte, die zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Ausrichtungen anzeigten, wurden mit Sequenzen von bekannten Plasmiden und Viren gleichgerichtet. In beiden Fällen wurden vermeintliche PCR Duplikate von der Beurteilung der Häufigkeiten ausgenommen.

Für die taxonomische Klassifikation wurde BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) + package (v2.2.30) verwendet und daraufhin die Ergebnisse für die Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) eingefügt. Der erste Durchgang des „Alignments“ wurde mithilfe von megaBLAST fertiggestellt. Unter Alignment versteht man die methodische Gegenüberstellung von zwei oder mehreren Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen in ihrer Abfolge. Das Verfahren megaBLAST dient der Identifizierung einer Sequenzhomologie der jeweiligen Contigs, die dann den taxonomischen Einheiten bekannter Erreger zugeordnet werden. Alle Sequenzen, die keine signifikanten megaBLAST Hits, id est Treffer, aufwiesen (E-Wert Cut-off 0.01) wurden in einer zweiten BLAST-Runde zum Alignment miteingeschlossen. Contigs, die auch hiernach kein Alignment mit einem E-Wert von $<0,01$ erreichten, wurden als „unbekannte Sequenzen“ definiert.

Für jedes der übriggebliebenen Contigs wurden alle BLAST Hits mit einem Maximum bitscore Unterschied von 7 (korrespondierend zu einem Maximum Unterschied des p-Wertes $<0,01$) relativ zum Hit mit dem am häufigsten beobachteten Bitscore, beibehalten.

Damit die taxonomische Doppeldeutigkeit für jede Sequenz bestimmt werden konnte, wurde die kleinste gemeinsame taxonomische Einheit festgelegt, indem der taxonomische Baum konsequent nach oben hin durchgeprüft wurde, bis alle übriggebliebenen BLAST Hits eine eindeutige Zuordnung hatten. Für die Downstream-Analyse einer gegebenen taxonomischen Ebene wurden nur Contigs mit einer klaren Zuordnung auf oder unter der jeweiligen taxonomischen Ebene verwendet.

Um zweifelhafte Signifikanzen von taxonomischen Zuordnungen, beispielsweise durch Sequenzen, die eine Nukleotid-Homologie über eine kleinere Fraktion der gesamten Contigs-

Länge hatten, zu verhindern, wurden Contigs als prinzipiell klassifizierbar eingestuft, wenn diese mindestens einen BLAST Hit hatten, der mindestens 80% der Gesamt-Contigs-Länge sowie eine mindestens 80%ige Nukleotid-Übereinstimmung beinhaltete. Diese Contigs wurden für die Downstream-Analyse beibehalten.

2.4. Echtzeit- Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

DNA und RNA der Proben wurden unter Zuhilfenahme des molekularen Diagnostikums, QIASymphony (QIAGEN, Hilden) extrahiert. Die Kalibrierung fand mit einem niedrigkonzentrierten DNA Signal (spike) statt (QIAGEN, Hilden), das als interne Kontrolle fungierte, um mögliche PCR Inhibitionen zu detektieren und somit zuverlässige Ergebnisse zu erhalten.

Um das Eluat (5 µl) jeweils auf RNA-Viren zu untersuchen, wurde das Kit QuantiFast pathogen RT-PCR Kit + IC (QIAGEN, Hilden) verwendet. Entsprechend wurde für DNA Viren und Bakterien das QuantiFast pathogen CR Kit + IC (QIAGEN, Hilden) genutzt, was Primer und Sonden mit 400 nM und 200 nM Konzentrationen beinhaltet (66, 67). Eine Echtzeit PCR (RT-PCR) wurde mit dem LightCycler 480 II (Roche Mannheim Germany) durchgeführt. Und zwar mit einem 10 Minuten Zyklus bei 95°C, weiteren 45 Zyklen bei 95 °C für jeweils 15 Sekunden und einem 30 Sekunden Zyklus bei 60°C. Die Datenerhebung auf den beiden Detektionskanälen 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) und 2'-Chloro-7'Phenyl-1,4-Dichloro-6-Carboxy-Fluoreszein (VIC) erfolgte während des 60° C Zyklus. Die Sequenzen von Enteroviren und Rhinoviren wurden mittels eines kürzlich veröffentlichten Protokolls nach *Dierssen et al.* sowie *Schiebler et al.* ermittelt (68, 69).

Für die Detektion von *S. aureus* und *H. influenzae* wurde ein RT- PCR TaqMan Assay eingesetzt, welches entsprechend auf das Glutamat Synthase Gen (67) und das Omp P6 Gen (66) ausgerichtet war.

2.5. 16S rRNA Amplikon Vorbereitung, MiSeq Sequenzierung und Datenanalyse

Die 70S- Ribosomen von Prokaryoten, zu denen auch Bakterien zählen, bestehen jeweils aus einer kleinen und einer großen Untereinheit mit einer Masse von je 30 beziehungsweise 50

Svedberg (S). Die 16S rRNA ist wiederum ein Teil der kleinen 30S Untereinheit und eignet sich für phylogenetische Analysen (70). Das 16S Gen setzt sich aus neun hypervariablen Regionen V1-V9 zusammen, wobei in dieser Studie die hypervariablen Regionen V3 und V4 verwendet wurden. V4 lässt sich besonders gut zur Identifizierung des Stamms sowie des ganzen 16S Gens einsetzen, während V3 sich insbesondere zur Genus-Identifizierung der Pathogene eignet (71). Die V3-V4 Region 16S rRNA Amplikone wurden mithilfe der von *Klindworth et al.* publizierten degenerierten Primer mit der Illumina Adapter Konsensus Sequenz F : (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGG- GNGGCWGCAG-3') und R: (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACVG- GGTATCTAATCC-3') hergestellt (72). Eine genaue Beschreibung des Protokolls wurde durch Illumina herausgegeben (73).

Zur Vervielfältigung und Vorbereitung der libraries aus den Proben wurde das Illumina Nextera XT Index Kit verwendet. Die Analyse erfolgte mittels 2 x 500 bp paired-ends (PE) Sequenzierung auf der Illumina MiSeq Plattform. Die durchschnittlichen Qualitäts-Zielwerte vor und nach den gepaarten DNA-Abschnitten einer jeden Probe wurden mit FastQC (Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, UK) bestimmt. Die gepaarten Enden wurden in jeder Probe zusammengefügt und alle Sequenzen unter 250 bp verworfen. Zudem wurden Sequenzen, die einen Qualitätswert der Nukleobasenidentifikation (Phred) von 33 unterschritten, ebenfalls verworfen. Im Rahmen des verwendeten Tools QIIME 2 war der Qualitätsfilter bei Phred \geq Q20 gesetzt. Mithilfe von QIIME Version 1.7 wurden zugleich die „Operational Taxonomic Units“ (OTU) geclustert, was es ermöglichte, Gruppen von eng verwandten Individuen zu klassifizieren.

Zusätzlich wurden die Alpha-Diversität (Komplexität des Mikrobioms innerhalb der Patientengruppe, Anzahl der OTUs) sowie die Beta-Diversität (Komplexität des Mikrobioms zwischen den Patientengruppen) unter Zuhilfenahme von QIIME Version 1.7 ermittelt. Um Sequenzen mit zwei oder mehreren Anteilen unterschiedlicher biologischer Herkunft auszusortieren, wurde der USEARCH 8.1 Filter eingesetzt. Nur Sequenzen mit mindestens 97%iger Übereinstimmung zur Referenzsequenz wurden zusammengefasst. Die DNA-Abschnitte, die keine 97%ige Übereinstimmung aufwiesen, wurden unabhängig neu geclustert. Basierend auf der SILVA Datenbank wurden die taxonomischen Level der repräsentativen Sequenzen bei 95%iger Übereinstimmung in der OTU Tabelle eingeordnet.

Zur Mustererkennung bezüglich der Unterschiede des nasalen Mikrobioms zwischen den Patientengruppen wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt.

Die Alpha-Diversität wurde basierend auf dem Shannon Index berechnet. Die Statistiken der Beta-Diversität wurden mithilfe eines parameterfreien statistischen Tests, der Ähnlichkeitsanalyse (ANOSIM, analysis of similarities“) ermittelt und innerhalb der Hauptkomponentenanalyse graphisch dargestellt, um zu klären, ob die Unterschiede zwischen den Verteilungen der mikrobiellen Profile der drei Datensets signifikant waren.

3. Ergebnisse

3.1. Diversität des nasalen Mikrobioms

Die Hauptkomponentenanalyse (principle component analysis, PCA), welche die Unterschiede in der bakteriellen Taxonomie zwischen den verschiedenen Probanden-Gruppen (Beta-Diversität) und die inter-individuellen Unterschiede innerhalb einer Gruppe (Alpha-Diversität) vergleicht, zeigte keine klare Häufung bei einzelnen Gruppen. Dies reflektiert eine große Diversität in Bezug auf die Alpha- und Beta-Diversität zwischen und innerhalb der einzelnen Gruppen (Abb. 1A).

Zur Beurteilung der verschiedenen Aspekte der Alpha-Diversität wurden Indices für die qualitative und quantitative, taxonomische Verteilung (Shannon Index, OTU) berechnet. Der absolute Artenreichtum unter Berücksichtigung seltener Arten wurde mit dem Chao1 Index beurteilt.

Basierend auf dem Shannon Index wurde ein statistisch nicht signifikanter Trend in Richtung geringerer Vielfalt des nasalen Mikrobioms bei Patienten mit GPA im Vergleich zu NK beobachtet. Darüber hinaus zeigten Proben von GPA Patienten im Vergleich der OTUs sowie bei dem Chao1-Index eine signifikant reduzierte mikrobielle Vielfalt im Vergleich zu den Proben der RA Patienten (Abb. 1B).

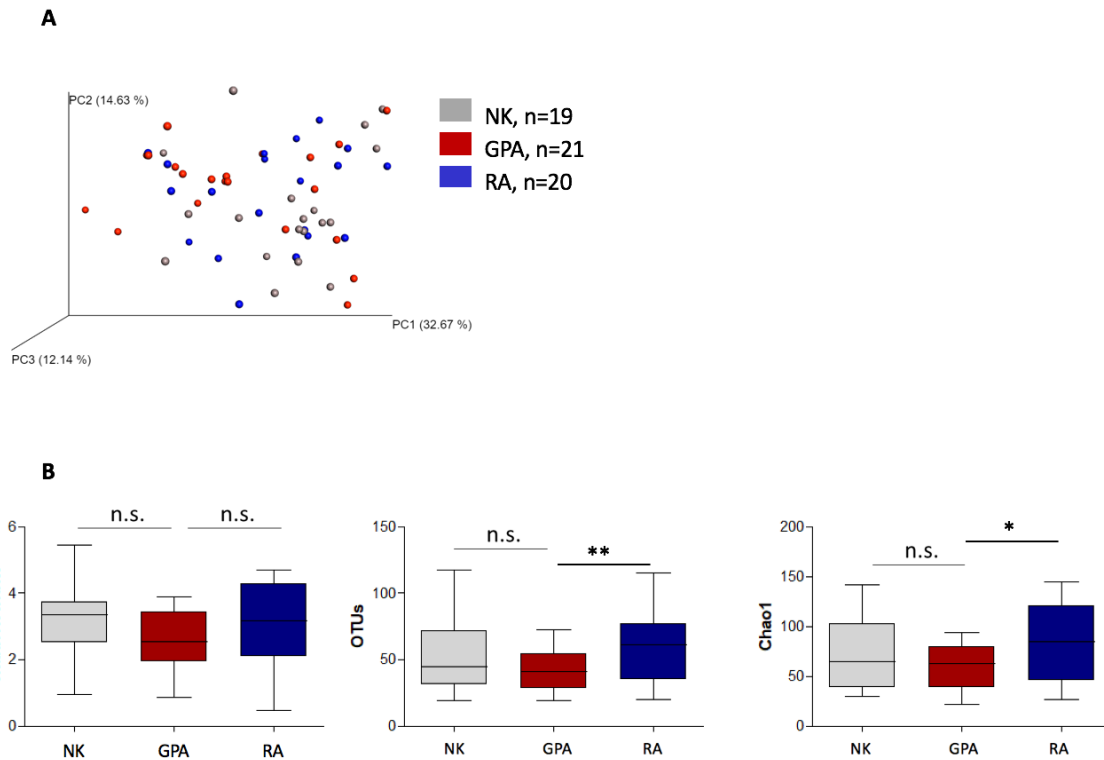
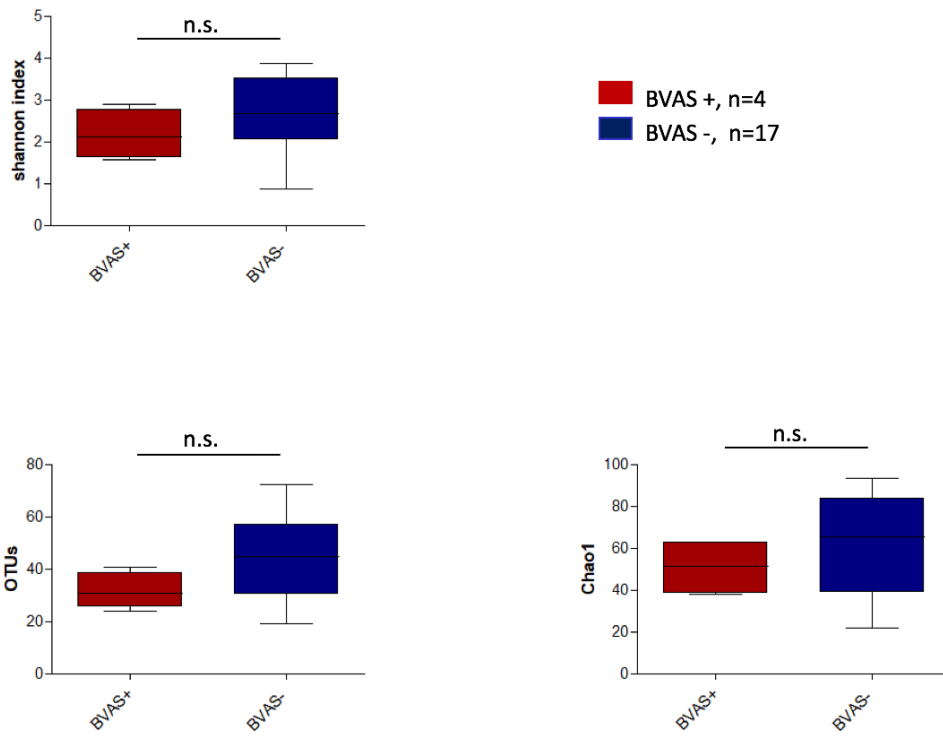


Abbildung 1: Alpha- und Beta-Diversität bei nasalen Proben von Patienten mit GPA, RA und NK.

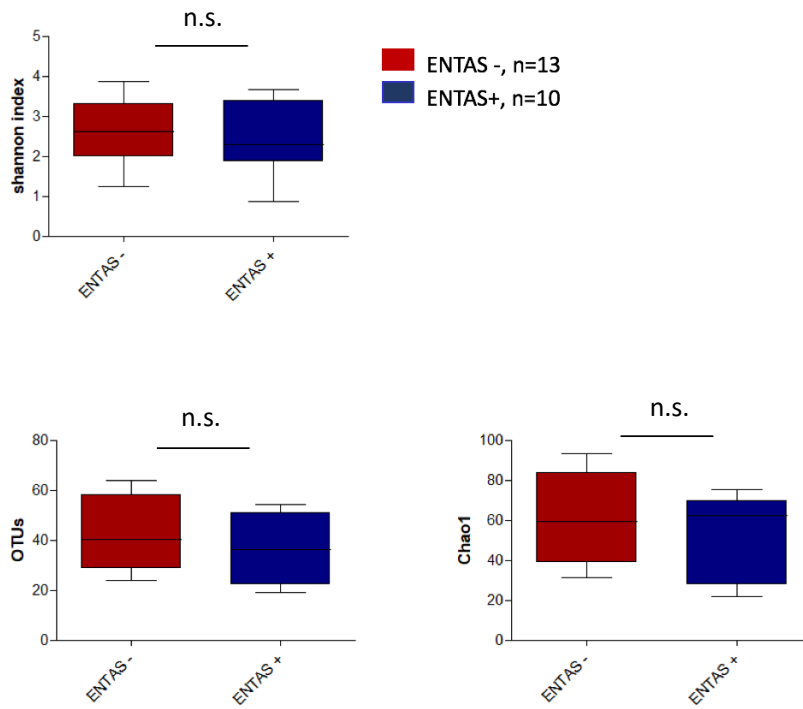
(A) Hauptkomponentenanalyse für Proben des nasalen, bakteriellen Mikrobioms der Patientengruppen GPA und RA sowie der Kontrollgruppe (NK). **(B)** Alpha-Diversität im Vergleich verschiedener Diversitäts-Maße für die Patientengruppen GPA und RA sowie die NK. Biodiversität dargestellt mit Shannon Index, Anzahl der standardisierten OTUs und mikrobieller Artenreichtum dargestellt mit Chao1 Metrik, basierend auf der Anzahl seltener OTUs.

Die Alpha-Diversität zeigte sich leicht, allerdings statistisch nicht signifikant, gemindert bei GPA-Patienten mit einer bestehenden aktiven Erkrankung (BVAS +, i.e., BVAS V3.0 \geq 1) im Vergleich zu in Remission befindlichen GPA- Patienten (BVAS -, i.e., BVAS V3.0 = 0) (Abb. 2A). Unabhängig von der Krankheitsaktivität konnte kein wesentlicher Unterschied in der Alpha-Diversität bei GPA- Patienten mit aktiver Hals-, Nasen-, Ohrenbeteiligung (ENTAS +) gegenüber solchen ohne Aktivität im Hals-, Nasen-, Ohrenbereich (ENTAS -) gefunden werden (Abb. 2B). Die Alpha-Diversität zwischen RA-Patienten mit aktiver Erkrankung (DAS 28 \geq 2.6) und solchen, welche sich in Remission befanden (DAS 28 < 2.6) unterschied sich nicht (Abb. 2C).

A



B



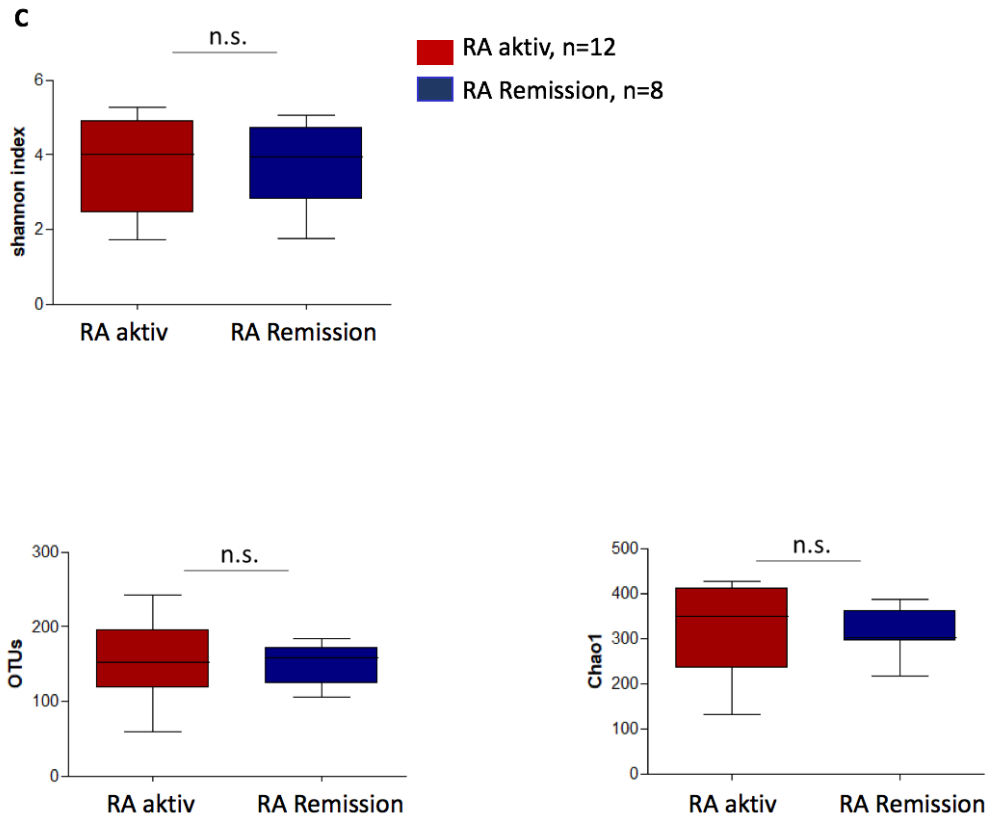


Abbildung 2A-C: Alpha-Diversität des nasalen Mikrobioms von Patienten mit GPA und RA im Vergleich verschiedener Diversitäts-Maße.

(A) für die Patientengruppe der GPA mit aktiver Erkrankung (BVAS +, i.e., BVAS V3.0 ≥ 1) im Vergleich zu denen in Remission (BVAS -, i.e., BVAS V3.0 = 0) **(B)** für GPA Patienten mit aktiver HNO-Beteiligung (ENTAS +, i.e., ENTAS mild bis moderate) im Vergleich zu denen ohne HNO- Aktivität (ENTAS -, i.e., ENTAS none) **(C)** für RA Patienten mit aktiver Erkrankung (DAS 28 > 2.6) im Vergleich zu denen in Remission (DAS 28 ≤ 2.6).

3.2. Bakterielle Zusammensetzung

In allen Proben wurde das nasale Mikrobiom von den drei Bakterienstämmen: *Proteobacteria*, *Firmicutes* (mit den Klassen *Clostridia* und *Bacilli*) und *Actinobacteria* dominiert. In der Sequenzanalyse konnten nur wenige Sequenzen (<1,5%) den Phyla *Bacteroides* und *Tenericutes* zugeordnet werden. Auf Stamm-Ebene gab es keine Unterschiede zwischen den Proben von NK, GPA- und RA-Patienten (Abb. 3A und 3B). Jedoch konnten signifikante Differenzen der bakteriellen Zusammensetzung auf Klassen-Ebene beobachtet werden. *Bacilli* waren bei den Proben von GPA-Patienten im Vergleich zu den NK-Proben signifikant erhöht (Abb. 3C und 3D). Insbesondere konnten gravierende Unterschiede auf Familien-Ebene erfasst werden (Abb. 3E und Abb. 4). Die relative Häufigkeit der bakteriellen Familie *Planococcaceae* war im Vergleich zu NK vermehrt in den Proben von GPA- und RA-Patienten vorzufinden. Ferner konnte innerhalb der Gruppe der GPA-Patienten eine Zunahme von Bakterien der Familien *Streptococcaceae*, *Pasteurellaceae* und *Prevotellaceae* beobachtet werden. Während gleichzeitig ein Rückgang bei den Familien: *Corynebacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Tissierellaceae*, *Staphylococcaceae* und *Propionibacteriaceae* festgestellt wurde.

In den Proben der RA-Patienten fanden sich weniger Bakterien der Familien: *Moraxellaceae*, *Tissierellaceae*, *Staphylococcaceae* und *Propionibacteriaceae*. Gegenüber den GPA-Patienten und NK kamen *Neisseriaceae* und *Aerococcaceae* bei RA-Patienten häufiger vor (Abb. 3E). *Porphyromonas* konnte in den Proben von RA-Patienten und NK nur zu einem minimalen Anteil gefunden werden, während sie bei GPA-Patienten überhaupt nicht vorkamen (Daten nicht gezeigt).

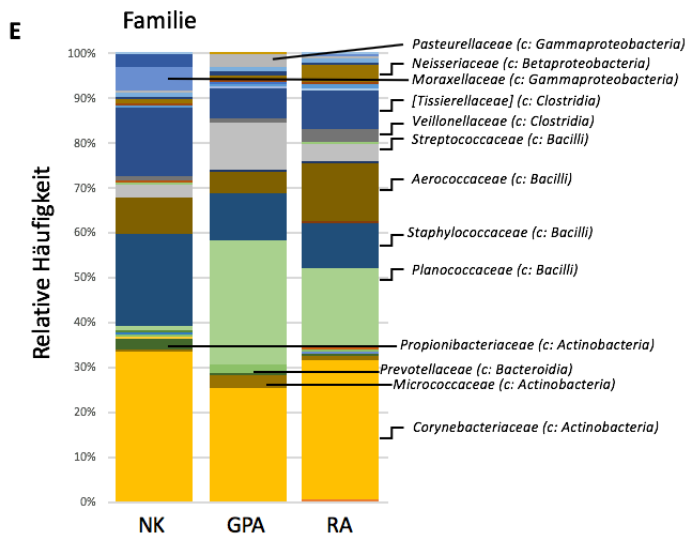
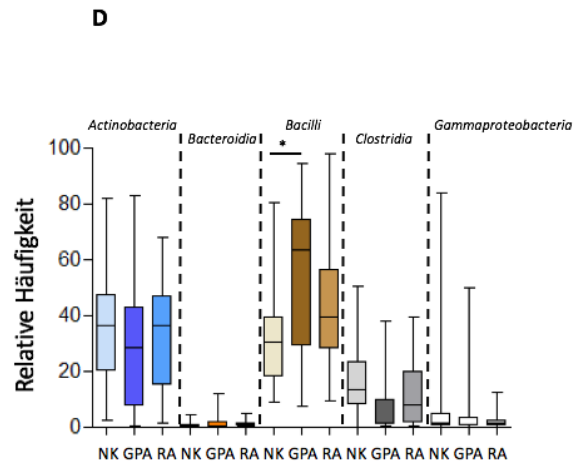
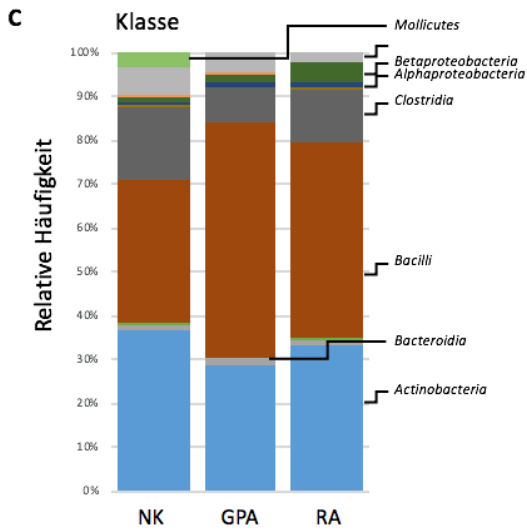
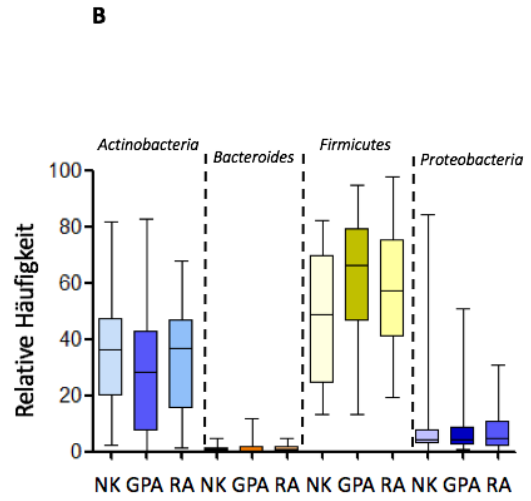
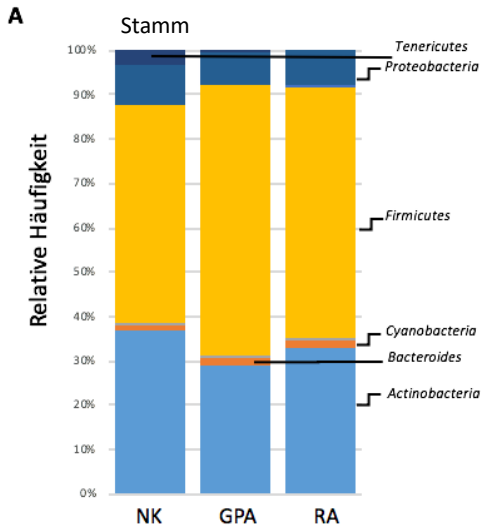


Abbildung 3A-E: Überblick der bakteriellen Zusammensetzung der oberen Atemwege (OAW) bei Patienten mit GPA, RA und NK.

Relative Häufigkeiten von Bakterien bei Patienten mit GPA ($n = 21$) und RA ($n = 20$) sowie NK ($n = 19$) auf den taxonomischen Ebenen Stamm A (= kumulative Auftragung, B= Boxplots mit Median und Schwankungsbreite), Klasse (C=kumulative Auftragung, D= Boxplots mit Median und Schwankungsbreite) und Familie (E= kumulative Auftragung).

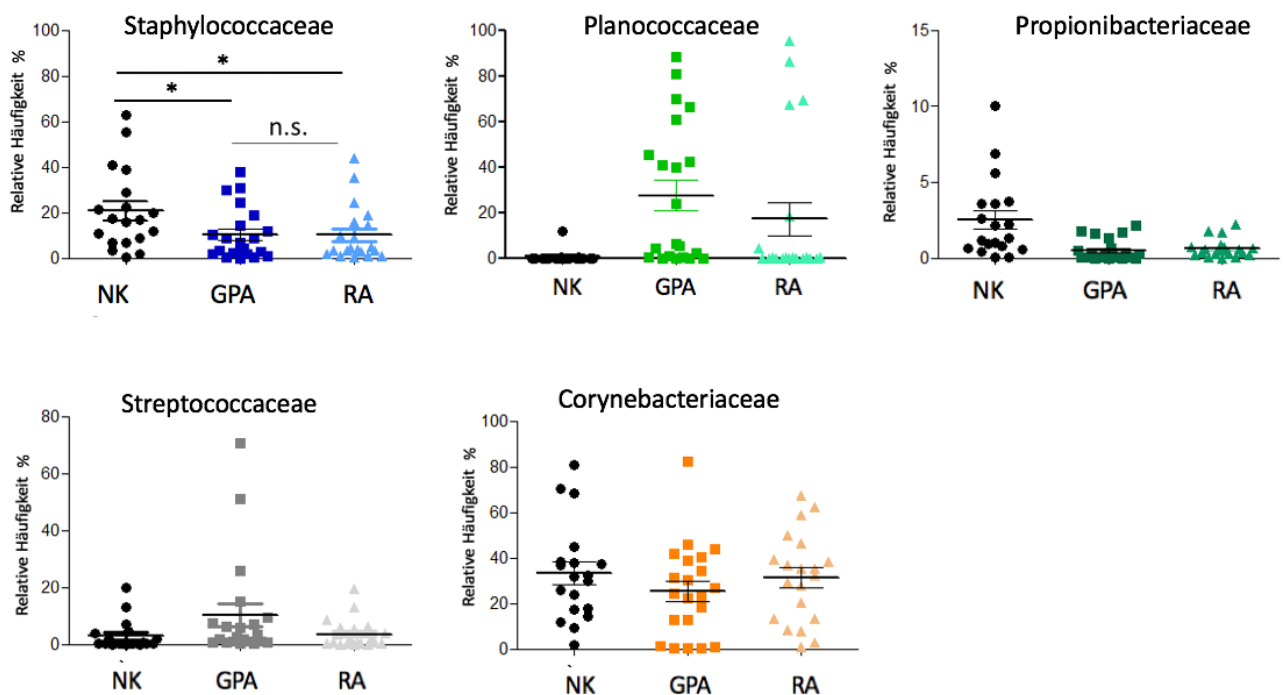


Abbildung 4: Zusammensetzung des bakterielles Mikrobiom der OAW bei Patienten mit GPA, RA und NK.

Verteilung der relativen Häufigkeiten einzelner Bakterienfamilien bei Patienten mit GPA ($n = 21$) und RA ($n = 20$) sowie NK ($n = 19$).

Die bakterielle Zusammensetzung in den Proben von GPA- Patienten war auf den untersuchten taxonomischen Ebenen Stamm, Klasse, Familie ähnlich, unabhängig davon, ob GPA- Patienten aktiv erkrankt waren (BVAS +, i.e., BVAS V3.0 ≥ 1) oder sich in Remission befanden (BVAS -, i.e., BVAS V3.0 = 0). Ausnahmen waren die Familien *Staphylococcaceae* und *Aerococcaceae*.

So konnten *Staphylococcaceae* gehäuft bei GPA- Patienten in Remission identifiziert werden, wohingegen *Aerococcaceae* vermehrt bei GPA- Patienten mit aktiver Erkrankung gefunden wurden (Abb. 5A, Abb. 6C). Beide Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Im Hinblick auf die HNO- Aktivität (ENTAS) wurden Differenzen im Mikrobiom beobachtet. Hier zeigte sich, dass die Familien *Streptococcaceae* und *Planococcaceae* häufiger bei GPA- Patienten vorkamen, die eine HNO- Aktivität zeigten als bei Patienten ohne HNO- Aktivität. Dagegen wurden *Corynebacteriaceae* bei Patienten mit HNO-Aktivität in geringerer Häufigkeit beobachtet (Abb. 5B, Abb. 6F).

Bei den RA- Patienten mit aktiver Erkrankung (DAS 28 \geq 2.6) ergaben sich gegenüber Patienten in Remission (DAS 28 < 2.6) keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der bakteriellen Zusammensetzung im nasalen Mikrobiom (Abb. 5C, Abb. 6I).

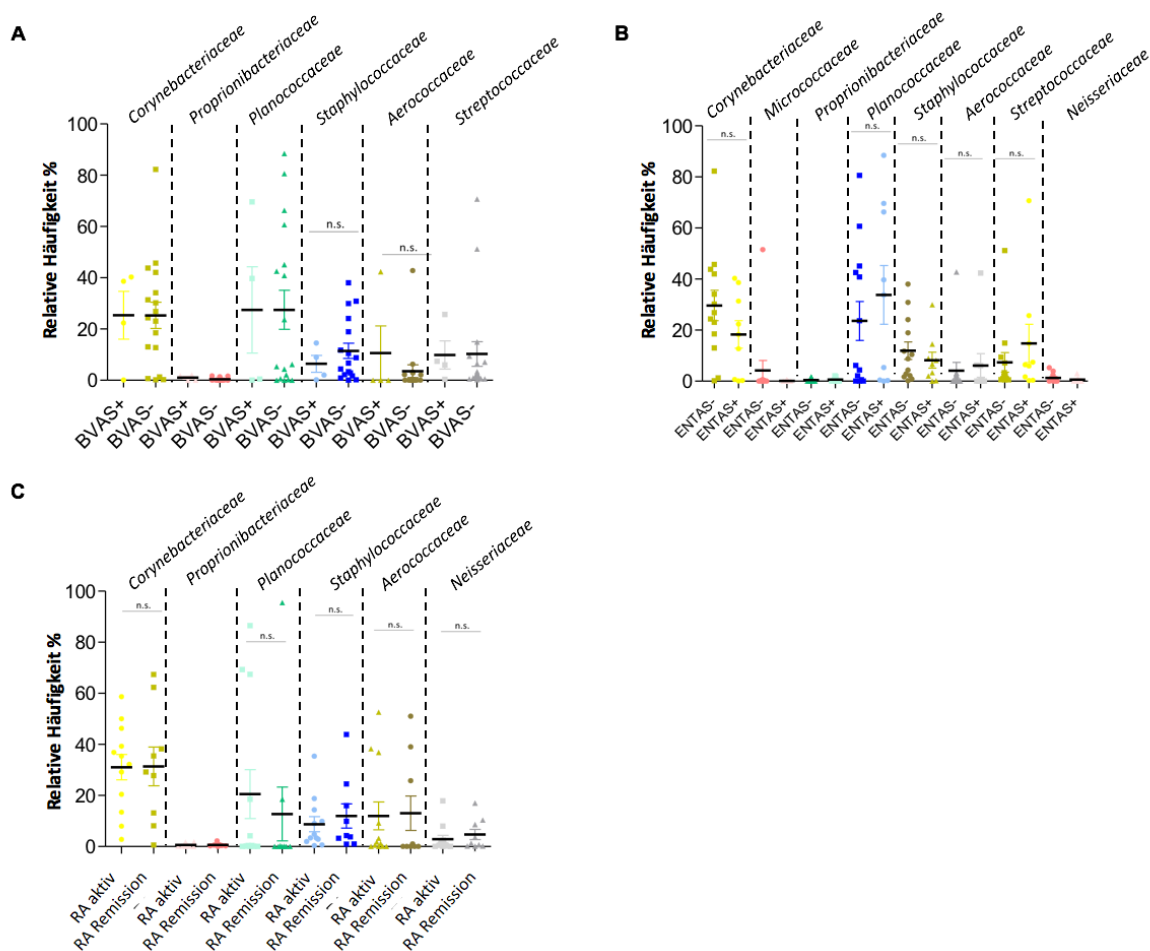
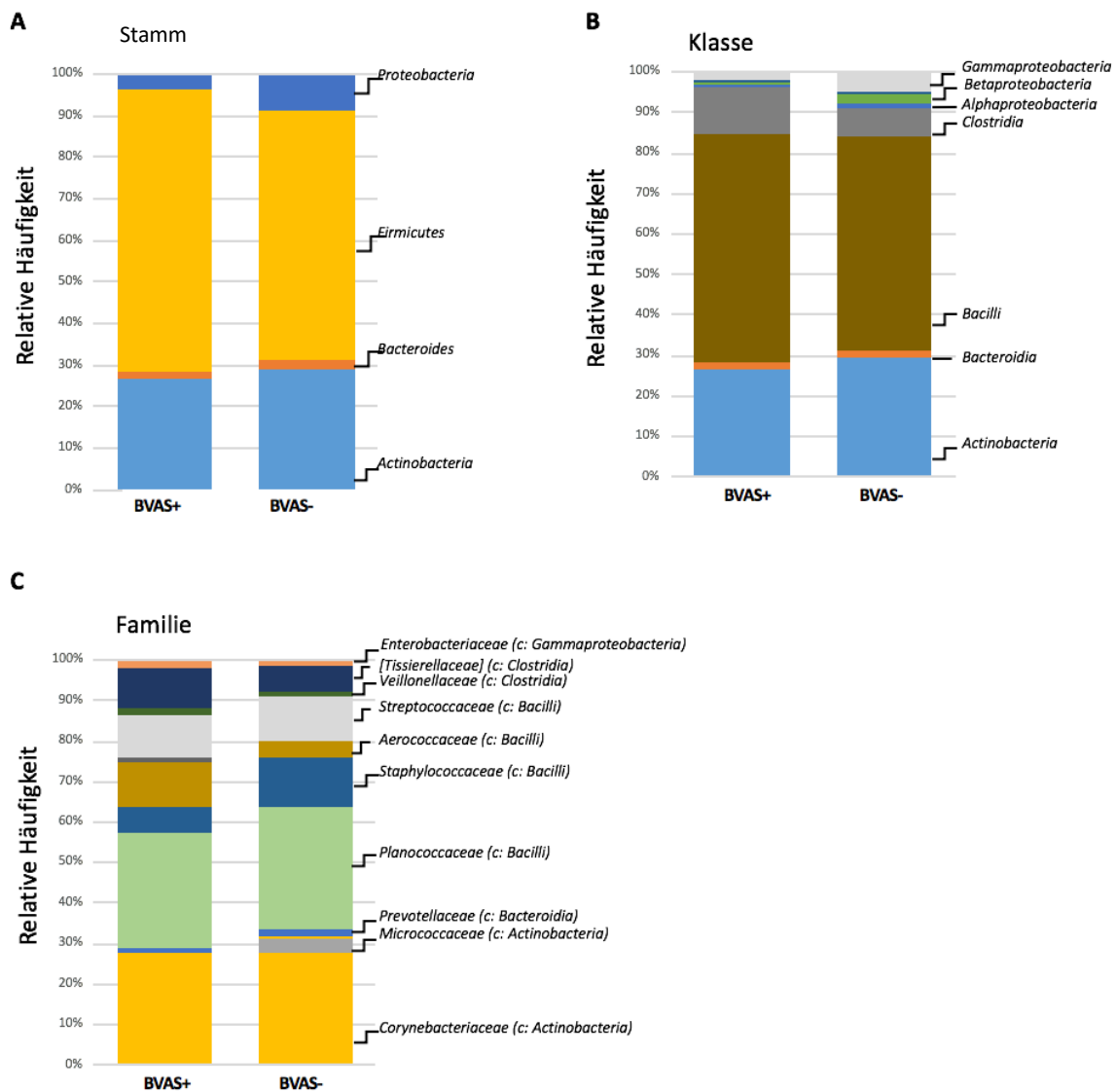
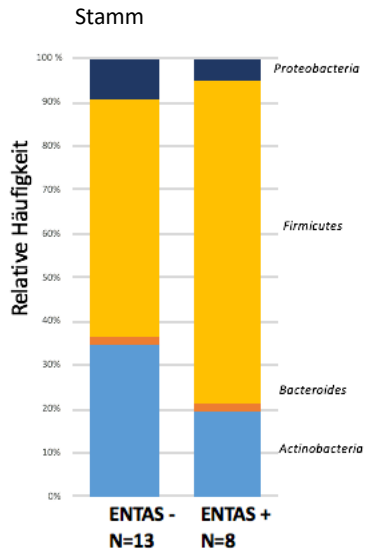


Abbildung 5A-C: Relative Häufigkeiten ausgewählter Bakterienfamilien in den OAW bei Patienten mit GPA (n = 21) und RA (n = 20).

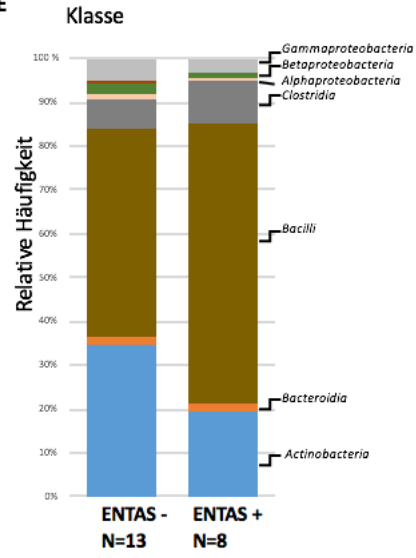
(A) Dargestellt sind die Ergebnisse von GPA Patienten mit aktiver Erkrankung (BVAS +, i.e., BVAS V3.0 ≥ 1) im Vergleich zu denen in Remission (BVAS -, i.e., BVAS V3.0 = 0). **(B)** Dargestellt sind Ergebnisse für GPA Patienten mit aktiver HNO- Beteiligung (ENTAS +, i.e., ENTAS mild bis moderate) im Vergleich zu denen ohne HNO- Aktivität (ENTAS -, i.e., ENTAS none). **(C)** Dargestellt sind Ergebnisse für RA Patienten mit aktiver Erkrankung (DAS 28 >2.6) im Vergleich zu denen in Remission (DAS 28 ≤ 2.6).



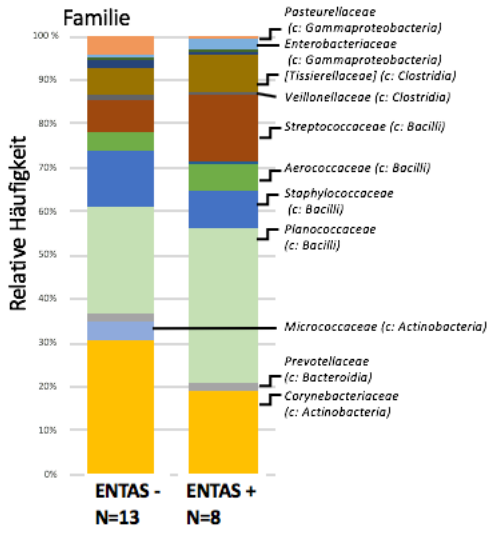
D



E



F



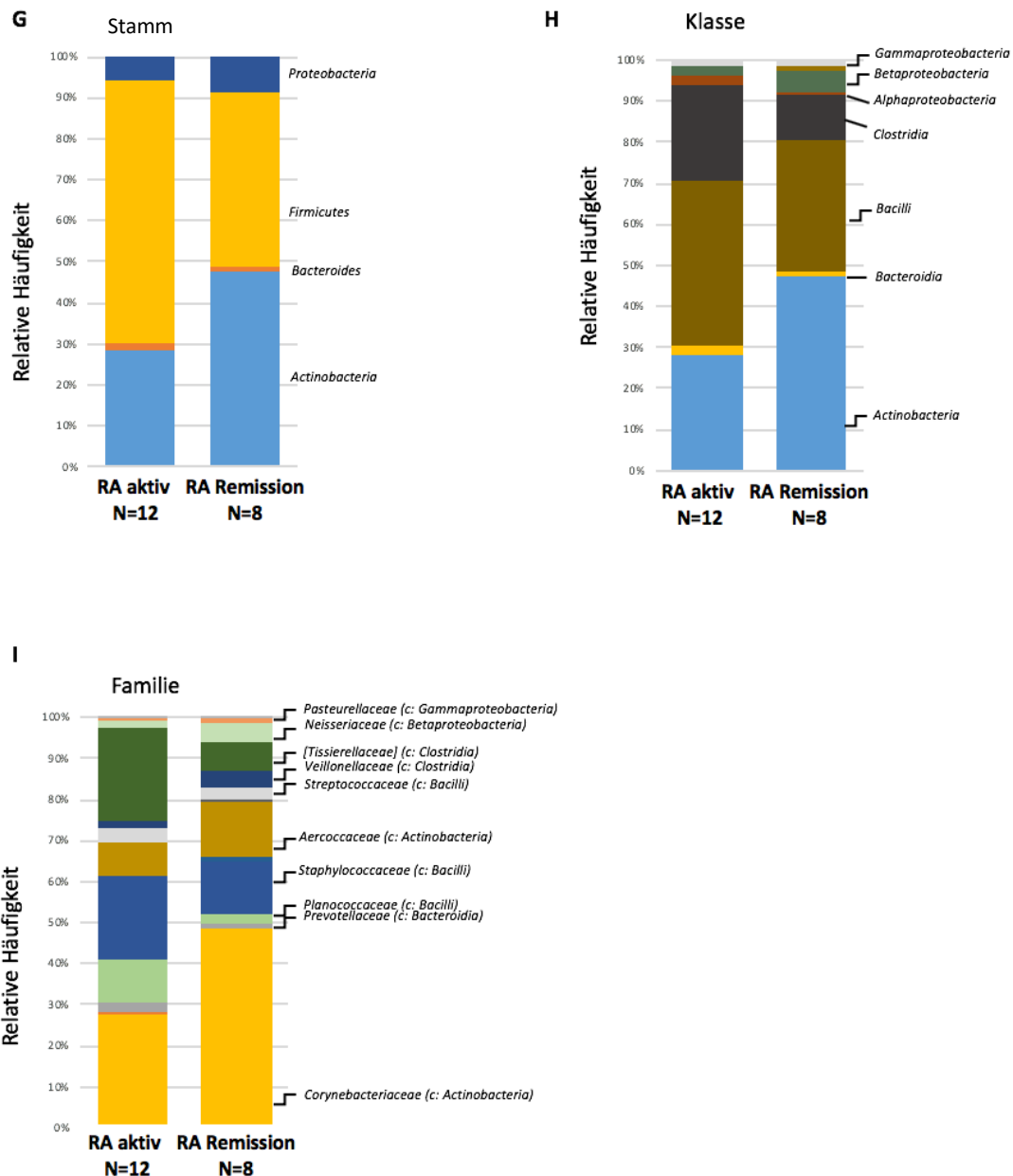


Abbildung 6 A-I: Bakterielle Zusammensetzung des nasalen Mikrobioms der OAW bei Patienten mit GPA und RA.

Dargestellt werden die relativen Häufigkeiten von Bakterien nach den taxonomischen Ebenen Stamm, Klassen und Familien (A-C) Für GPA Patienten mit aktiver Erkrankung (BVAS +, i.e., BVAS V3.0 ≥ 1) im Vergleich zu denen in Remission (BVAS -, i.e., BVAS V3.0 = 0. (D-F) Für GPA Patienten mit aktiver HNO-Beteiligung (ENTAS +, i.e., ENTAS mild bis moderate) im Vergleich zu denen ohne HNO- Aktivität (ENTAS -, i.e., ENTAS none). (G-I) Für RA Patienten mit aktiver Erkrankung (DAS 28 >2.6) im Vergleich zu denen in Remission (DAS 28 ≤ 2.6).

In der Auswertung der V3-V4 Region 16S rRNA Amplikon Sequenzierung zeigten sich Unterschiede in den relativen Häufigkeiten von Bakterien auf Familien-Ebene (Tabelle 2). Für die Gruppe der GPA-Patienten fanden sich im Vergleich zur Gruppe der RA-Patienten und der NK die Familien *Streptococcaceae* und *Pasteurellaceae* gehäuft, die Familie *Aerococcaceae* dagegen seltener. Bakterien der Familie *Planococcaceae* konnten sowohl in der Gruppe der GPA-Patienten als auch der Gruppe der RA-Patienten im Vergleich zu NK vermehrt gefunden werden. *Moraxellaceae*, *Tissierellaceae* und *Staphylococcaceae* waren dagegen in der GPA- und RA-Gruppe weniger häufig als in der Gruppe der NK. Die Familien *Neisseriaceae*, *Aerococcaceae* und *Veillonellaceae* waren häufiger in den Proben des nasalen Mikrobioms von RA-Patienten zu beobachten als in denen von GPA-Patienten und NK (Tabelle 2).

Tabelle 2: Relative Häufigkeiten ausgewählter Bakterienfamilien* im nasalen Mikrobiom von Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) und Rheumatoider Arthritis (RA) bzw. Normalkontrollen (NK).

Zur besseren Lesbarkeit sind Unterschiede von GPA zu RA und NK türkis, Unterschiede von RA zu GPA und NK gelb hinterlegt. Unterschiede von GPA und RA im Vergleich zu NK sind fett gedruckt.

	NK (%)	GPA (%)	RA (%)
<i>Pasteurellaceae</i>	0.32	2.7	0.28
<i>Neisseriaceae</i>	1.1	1.0	3.8
<i>Moraxellaceae</i>	5.6	0.14	0.5
<i>Tissierellaceae</i>	15.0	6.9	8.8
<i>Veillonellaceae</i>	1.1	0.9	2.7
<i>Streptococcaceae</i>	2.9	10.2	3.6
<i>Aerococcaceae</i>	7.9	4.9	13.0
<i>Staphylococcaceae</i>	20.6	10.5	10.1
<i>Planococcaceae</i>	0.7	27.5	17.2

*Die taxonomische Ebene der Familie wurde mittels V3-V4 Region 16S rRNA Amplikon Sequenzierung bestimmt.

3.3. Detektion von *S. aureus* und *H. influenzae*

In Ergänzung der auf 16S rRNA Sequenzierung basierenden Analyse der bakteriellen Zusammensetzung auf Stamm-, Klassen-, und Familien- Ebene, wurden die Proben zusätzlich mit quantitativer PCR (qPCR) auf das Vorkommen von *S. aureus* und *H. influenzae* untersucht. Hierbei wurde *S. aureus* zu einem signifikant höheren Anteil bei Patienten mit GPA im Vergleich zu RA-Patienten oder NK detektiert. *H. influenzae* kam am häufigsten in den Proben der GPA-Patienten vor, der Unterschied zu den Proben von RA-Patienten und NK war allerdings statistisch nicht signifikant (Tabelle 3).

Zudem wurden alle Proben mittels Real- Time PCR (RT-PCR) auf Entero- und Rhinoviren getestet. Allerdings konnten in keiner der Proben Entero- oder Rhinoviren nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3: Ergebnisse der qPCR- Analyse auf das Vorkommen von *S. aureus* und *H. influenzae*.

Dargestellt sind die Anzahl positiver Proben n (%) von Patienten mit GPA, RA und NK. Unterschiede wurden mit dem Chi² Test berechnet. Statistische Signifikanz: p < 0,05. n. s.= nicht signifikant.

	<i>S. aureus</i>	Chi ² Test	<i>H. influenzae</i>	Chi ² Test
NK, n = 23	1/23 (4,35%)	NK vs. GPA p < 0,0005	4/23 (17,39%)	NK vs. GPA n. s.
GPA, n = 19	14/19 (73,68%)	GPA vs. RA p = 0,0046	6/19 (31,58%)	GPA vs. RA n. s.
RA, n = 21	5/21 (23,81%)		4/21 (19,04%)	

3.4. UMERS von GPA und NK

Unbiased nontargeted Metagenomic Sequencing of RNA (UMERS) ist eine moderne Methode, die sowohl bekannte als auch entfernt verwandte oder neuartige Pathogene viralen, bakteriellen, fungalen oder parasitären Ursprungs detektieren kann (64, 65). Die relative Häufigkeit von Contig-RNA-Abschnitten, die jeweils bakteriellen, viralen und fungalen Spezies zugeordnet werden können, werden auf einer sogenannten Heat map grafisch dargestellt, die die erfassten Daten nach Expressionsstärke farbig kodiert abbildet. Die UMERS Methode wurde für eine nicht in die qPCR einbezogene Teilgruppe nasaler Proben von insgesamt neun Patienten mit GPA und vier NK angewandt.

Zwei Proben der Patienten mit GPA beinhalteten RNA-Abschnitte mit signifikanter Sequenzhomologie für *H. influenzae*. Ebenso zeigten zwei GPA Proben RNA-Abschnitte, die korrespondierend mit Rhinovirus A Sequenzen waren, wobei einer von beiden eine Co-Infektion mit beiden Pathogenen aufwies.

Darüber hinaus enthielt eine GPA Probe RNA-Abschnitte mit signifikanter Sequenzhomologie für *S. aureus* und zwei weitere GPA Proben und eine NK Probe jeweils RNA-Abschnitte für *Moraxella catarrhalis*. Keine der RNA-Abschnitte aus den NK Proben hatten Sequenzhomologien für *H. influenzae* oder Rhinoviren.

Erwähnenswert ist, dass in einer einzigen Kontrollprobe (Abb. 6) eine hohe Anzahl an Sequenzhomologien für *Corynebacterium aurimucosum*, einem bekannten Kommensalen des Urogenitaltrakts, vorkam. Dieses Bakterium konnte unter anderem mit Schwangerschaftskomplikationen wie das Einsetzen von Frühwehen, das Vorkommen eines Oligohydramnions oder eines spontanen Aborts assoziiert werden (74-76).

Aber auch Infektionen von Gelenkprothesen stehen im Zusammenhang mit *Corynebacterium aurimucosum* (77, 78).

Für unbekannte oder noch nicht beschriebene Viren wurden keine Sequenzhomologien in den nasalen Abstrichen identifiziert.

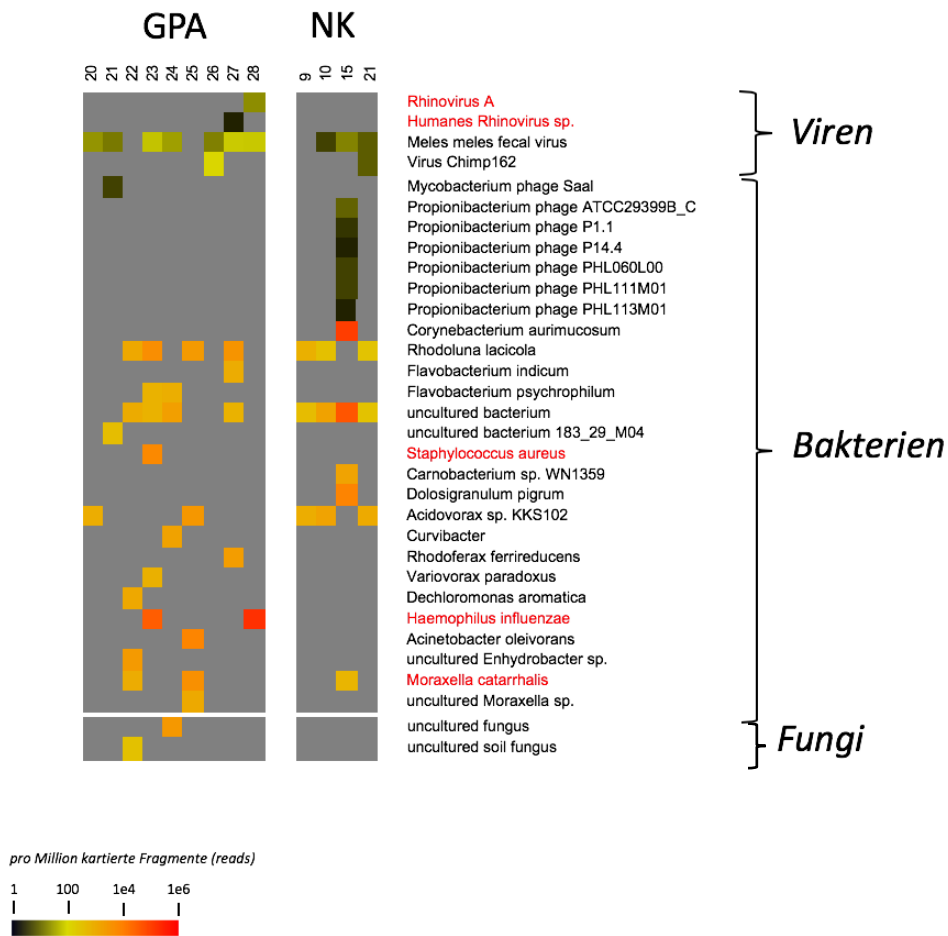


Abbildung 6: Ergebnis der Analyse nasaler Abstrich- Proben von Patienten mit GPA und NK mittels Unbiased metagenomic sequencing of RNA (UMERS).

Dargestellt werden die Daten einer BLAST Analyse von de novo zusammengesetzten Sequenz-Contigs (64, 65). Die relative Häufigkeit von Contig-RNA-Abschnitten, welche bakteriellen, fungalen oder viralen Spezies zugeordnet werden, wird durch die Heat map visualisiert (siehe Legende). Negative Probe, in denen keine RNA-Abschnitte für das jeweilige Pathogen detektiert werden, sind in grau dargestellt. Die Namen viraler oder bakterieller Spezies, die in respiratorischen Erkrankungen involviert sind, werden rot gesetzt.

4. Diskussion

Die Ätiopathogenese der GPA ist bis dato nicht vollständig geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass sie sich aus dem Zusammenspiel von genetischer sowie epigenetischer Veranlagung und äußeren Einflussfaktoren entwickelt. Zu diesen Faktoren zählen etwa die Einnahme bestimmter Medikamente (47) aber auch Umweltfaktoren wie Rauchen, Luftverschmutzung und Quarzstaubinhalation (47, 48). Zudem spielen bakterielle, virale und fungale Infektionen eine zentrale Rolle bei der Krankheitsentwicklung (47, 48), wobei insbesondere *S. aureus* als Teil des Mikrobioms mehrfach in früheren Arbeiten als Triggerfaktor postuliert wurde (5, 7, 8). Bislang lag das Augenmerk vielfach auf einzelnen potenziellen Pathogenen und weniger auf möglichen Dysbiosen der körpereigenen mikrobiellen Gemeinschaft; i.e. der qualitativen oder quantitativen Verschiebung der Besiedlung mukosaler Grenzflächen mit körpereigenen bakteriellen, parasitären, viralen und anderen zellulären Mikroorganismen.

Die vorliegende Arbeit legt den Fokus auf das gesamte Mikrobiom der Nasenschleimhaut, welches anders als in vielen früheren Arbeiten mittels Kultur-unabhängigen Methoden untersucht wurde. Dabei konnte ein Trend zu einer geringeren Alpha-Diversität des nasalen Mikrobioms bei Patienten mit GPA im Vergleich zu solchen mit RA sowie NK gefunden werden. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass das nasale Mikrobiom von Patienten mit GPA nur von einer geringen Zahl bakterieller Spezies dominiert wird (82, 83).

In Hinblick auf die Stamm- und Klassen-Ebenen ergaben sich allerdings keine wesentlichen Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung zwischen den Proben von GPA- und RA-Patienten sowie den NK.

Indes konnten auf Familien-Ebene zwischen den Proben der GPA-, und RA-Patienten sowohl Ähnlichkeiten, etwa vermehrtes Vorkommen von *Planobacteriaceae*, als auch Unterschiede, etwa gehäuftes Vorkommen von *Prevotellaceae* bei GPA-Patienten, nicht jedoch bei RA-Patienten, in der Zusammensetzung des Mikrobioms festgestellt werden. Dies könnte die Annahme stützen, dass sowohl die immunsuppressive Behandlung der Patienten als auch die Ätiologie der Erkrankung die Zusammensetzung des Mikrobioms der oberen Atemwege (OAW) beeinflusst.

Im Einklang mit dieser Hypothese steht, dass ebenfalls für andere nasale Erkrankungen, wie etwa die Chronische Rhinosinusitis (CRS) Veränderungen des Mikrobioms beschrieben

werden (50, 79). In diesen Fällen wurde ebenfalls eine verminderte bakterielle Diversität und ein vermehrtes Vorkommen von *S.aureus* insbesondere bei Patienten mit CRS mit Polypen detektiert, was die Komplexität der Pathogenese der CRS unterstreicht (79).

In der vorliegenden Untersuchung zeigten sich darüber hinaus bei Patienten mit GPA Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung auf Familien- Ebene in Bezug auf die relativen Häufigkeiten von *Staphylococcaceae* sowie *Aerococcaceae* in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität (BVAS V3.0), obgleich diese statistisch nicht signifikant waren.

Die mithilfe des ENTAS-Scores eingestufte HNO-Aktivität der Krankheit beeinflusste die Zusammensetzung des Mikrobioms der OAWe und führte zu Unterschieden der relativen Häufigkeiten von *Streptococcaceae*, *Planococcaceae* und *Corynebacteriaceae*. Sofern hier weitere Studien den gezeigten Trend der mikrobiellen Veränderungen bestätigten, könnten die spezifischen Veränderungen des nasalen Mikrobioms als nicht-invasiver Surrogat-Biomarker der Krankheitsaktivität dienen.

Im Gegensatz zu den bei GPA-Patienten beobachteten Ergebnissen, konnten bei den Patienten mit RA keine wesentlichen Veränderungen der bakteriellen Zusammensetzung zwischen aktiver RA und RA in Remission gefunden werden.

Erwähnenswerterweise fehlen hier vergleichbare, repräsentative Patienten- Studien zu Veränderungen des Mikrobioms der OAW unter ähnlicher Immunsuppression wie bei Patienten mit GPA, etwa bei Zustand nach Organtransplantation.

Für *Porphyromonas gingivalis* beschreiben *Potempa et al.* (80) bei Patienten mit RA in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Autoantikörpern und Parodontitis.

In der vorliegenden Arbeit dagegen konnte nur eine geringe Menge des Genus *Porphyromonas* bei Patienten mit RA und NK festgestellt werden. Bei Patienten mit GPA konnte diese Spezies überhaupt nicht nachgewiesen werden. Insofern scheinen die OAWe bei beiden Erkrankungen keine relevante Nische für *Porphyromonas* darzustellen.

Für Patienten mit GPA beschrieben *Rhee et al.* Veränderungen in Hinblick auf die nasale bakterielle sowie fungale Zusammensetzung im Vergleich zu NK (59), indem hierfür erstmals Sequenztechnologien angewandt wurden und das nasale Mikrobiom kultur-unabhängig aus Nasenabstrichen von Patienten mit GPA und gesunden Kontrollen analysiert wurde. Die Studie von *Rhee et al.* basierte auf der 16S rRNA-Sequenzierung und Amplikon Sequenzierung der (ITS1) – Regionen von Pilzen, einer Nukleotidsequenz, die als sogenannter spacer zwischen

der 18S und der 5,8S rRNA liegt (81) und zur Taxonomiebestimmung und molekularen Phylogenetik genutzt wird. Der Großteil der von *Rhee et al.* untersuchten Patienten erhielt innerhalb der letzten sechs Monate vor Studienbeginn immunsuppressive Medikamente und zum Zeitpunkt der Datenerhebung wurden noch 25% der GPA-Patienten und 15% der Kontrollpatienten mit Antibiotika behandelt (59).

Antibiotika können das ortsständige Mikrobiom beeinflussen, wie unter anderem in einer Studie von *Merkley et al.* bei Patienten mit CRS beobachtet wurde (82).

In der vorliegenden Studie wurden nur GPA-Patienten berücksichtigt, die keine antibiotische Therapie in der jüngsten Vergangenheit erhalten hatten, um den Einfluss der Medikamente auf die Zusammensetzung des untersuchten Mikrobioms auszuschließen.

Rhee et al. (59) zeigten, dass die Zusammensetzung des nasalen Mikrobioms bei GPA-Patienten mit immunsuppressiver Therapie ähnlich derjenigen von gesunden Normalkontrollen war, wohingegen GPA-Patienten ohne immunsuppressive Therapie eine Dysbiose zeigten. Zur Erklärung des Befundes vermuten die Verfasser als Ursache für die Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung bei den Patienten ohne Immunsuppressiva eine subklinische Krankheitsaktivität. Dies könnte im Umkehrschluss bedeuten, dass immunsuppressive Therapien möglicherweise einen günstigen Effekt auf die Vermeidung einer Dysbiose der OAWe bei Patienten mit GPA haben könnten (59).

In der vorliegenden Studie erhielten allerdings alle Patienten Immunsuppressiva. Insofern konnte kein entsprechender Vergleich vorgenommen werden.

Zudem unterschied sich die Studiengruppe der vorliegenden Studie gegenüber der Studiengruppe von *Rhee et al.* durch den Einbezug einer Vergleichsgruppe von Patienten mit RA, einer Krankheit, die im Hinblick auf Krankheitsbild, genetische Risikofaktoren und immunologische Eigenschaften eine Reihe von Merkmalen mit der GPA teilt.

So etwa die Assoziation mit dem PTPN22 R620W Polymorphismus sowie die Expansion von zirkulierenden und gewebeständigen „Cluster of Differentiation“ (CD)-Molekülen (CD4+ CD28-T-Zellen) mit anomaler Expression des natürlichen Killerzell-Rezeptors, was die Zellproliferation unterstützt und die endotheliale Zytotoxizität vermittelt. Verschiedene Studien und Transkriptom-Analysen, die sich mit dieser Thematik auseinandersetzten, gehen von einer Pathogen- und Entzündungs-getriggerten Veränderung des peripheren T-Zellen-Kompartiments für beide Krankheiten, sowohl die RA als auch die GPA, aus (2, 13).

Zudem werden RA-Patienten und GPA-Patienten mit ähnlichen Immunsuppressiva behandelt (5).

Rhee et al. (59) beobachteten bei Patienten mit GPA im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine geringere Anzahl an *Propionibacterium acnes* und *Staphylococcus epidermidis*, wohingegen kein Unterschied bei der relativen Häufigkeit von *S. aureus* festgestellt wurde.

Im Vergleich hierzu zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass zwar ebenfalls *Propionibacteriaceae* und *Staphylococcaceae* weniger häufig bei GPA-Patienten waren, jedoch zeigten auch RA-Patienten eine ähnliche Minderung der Häufigkeit, sodass diese Beobachtung nicht spezifisch für die GPA zu sein scheint.

Nichtsdestotrotz konnte *S. aureus* mithilfe von qPCR in einer signifikant höheren Anzahl an Proben bei Patienten mit GPA im Vergleich zu RA-Patienten und NK festgestellt werden. Gestützt werden die Daten der vorliegenden Arbeit auch von Ergebnissen vorangegangener, auf Kultur-abhängigen Methoden basierender Studien, die von einer vermehrten Anzahl von nasalen *S. aureus*-Trägern (5-9, 53) berichten. Darüber hinaus wurde auch ein Zusammenhang zwischen *S. aureus*-Besiedelung und endonasaler Aktivität sowie einer gesteigerten Rezidivrate bestätigt (5-9, 53).

Die dominierende Rolle von *S. aureus* in Hinblick auf die Dysbiose der OAWe könnte bei Patienten mit GPA auf eine reduzierte epithelial induzierbare Sekretion von Humanem-Beta-Defensin-3(hBD3) zurückzuführen sein, einem antimikrobiellen Peptid, das eine hohe Aktivität gegen *S. aureus* zeigt (58).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Dysbiose ist für den Forschungsdiskurs zum Thema insofern relevant, das bereits in einer Reihe anderer Arbeiten ein Zusammenhang mit der Pathogenese unterschiedlicher chronisch-inflammatorisch-, und autoimmun-bedingter Erkrankungen erkannt wurde (13). So zählen beispielsweise Diabetes Mellitus Typ 1, Multiple Sklerose oder auch die RA dazu (83-85). Die am häufigsten untersuchten Krankheitsentitäten im Hinblick auf den Einfluss von wirtseigenen, mikrobiellen Interaktionen auf die krankheitsspezifische Immunregulation sind die Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn. In klinischen und experimentellen Studien wurden das intestinale Mikrobiom und dessen Auswirkungen auf den Krankheitsprozess analysiert (13, 86-90). In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass die bei der Colitis Ulcerosa unter anderem eingesetzte Stuhltransplantation therapeutische Erfolge mit vorübergehender Remission der Erkrankung verzeichnen konnte (91).

Aber auch für die in dieser Arbeit mit einer Patientengruppe als Vergleich untersuchte RA konnte bereits in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen dem Bestehen einer Dysbiose des Mikrobioms und der Krankheitsentwicklung gefunden werden (10-12).

Zusätzlich zu den vorgenommenen Tests auf das Vorkommen von *S. aureus*, wurde in der vorliegenden Arbeit die Existenz von *H. influenzae* sowie Entero- und Rhinoviren anhand von qPCR ermittelt. Wenn auch nicht statistisch signifikant, so konnte *H. influenzae* häufiger bei GPA- als bei RA-Patienten und NK festgestellt werden. Entero- sowie Rhinoviren wurden in keiner der Proben entdeckt.

Ergänzend wurde für eine Teilgruppe von Patienten mit GPA und NK mittels der ‚UMERS‘ Methodik die relative Häufigkeit von bakteriellen, viralen und pilzartigen Spezies im Mikrobiom bestimmt (64, 65). Die UMERS Analyse deckte RNA Transkripte von Pathogenen auf, die eine relative Häufigkeit von Contig-DNA-Abschnitten beinhalteten, welche wiederum mit einer akuten respiratorischen Infektion bei drei GPA Patienten in Verbindung stehen könnten. *Rhinovirus A* wurde bei einem Patienten, eine Co-Infektion mit *Rhinovirus A* und *H. influenzae* bei einem weiteren und eine *H. influenzae* Besiedlung bei einem dritten gefunden. Laut UMERS Analyse waren drei weitere GPA Patienten von *S. aureus* und *M. catarrhalis* kolonisiert.

Pathogen-bezogene-Signaturen, die in der Regel dafür sorgen, dass das menschliche Immunsystem den Krankheitserreger als „fremd“ identifiziert, wurden auch anderweitig schon untersucht, wobei etwa eine *S. aureus*-induzierte Signatur in unterschiedlich exprimierten Transkripten von T-Zellen bei Patienten mit GPA entdeckt wurden (92). So waren T-Zellen mit hochregulierten Genen innerhalb der einzel-positiven CD4+ und CD8+ Populationen sowie hochregulierte Gene innerhalb der doppel-positiven CD4+ und CD8+ Zellen unter anderem mit einer *S. aureus*-Infektion assoziiert (92).

Diese Beobachtung deckt sich mit den in der vorliegenden Studie gefundenen Daten, die zeigen, dass multiple bakterielle und virale Taxa einen Einfluss auf Patienten mit GPA haben. In diesem Sinne konnte auch in der oben zitierten Studie zirkulierende T-Zellen spezifisch für Cytomegalovirus, Epstein Barr Virus, Influenza A Virus, Metapneumovirus und Respiratory Syncytial Virus detektiert werden, was wiederum die potenzielle virale Einflusskomponente widerspiegelt (92).

Insgesamt ist jedoch auch zu berücksichtigen, dass bei der Entwicklung der GPA neben den in dieser Arbeit beschriebenen exogenen Faktoren, etwa das Vorhandensein eines veränderten

Mikrobioms, auch andere endogene Faktoren an den mukosalen, nasalen Grenzflächen eine Rolle spielen können.

So steht die Erkrankung im Zusammenhang mit (1) einer reduzierten ziliären Motilität des Epithels, (2) einer geringeren Konzentration des induzierbaren anti-mikrobiellen Peptids: Humanes- Beta-Defensin-3 (hBD3) und (3) einer Modifizierung des transkriptionalen Profils der nasalen Mukosa, welche unter anderem zu einer Runterregulation des Mustererkennungsrezeptors (pattern recognition receptor, PRR) Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) führt (58, 93, 94).

Insbesondere die bei GPA-Patienten vorliegende Barrierestörung am respiratorischen Epithel mit dysregulierter lokaler Immunantwort könnte eine Rolle im Hinblick auf die Entwicklung einer Dysbiose des Mikrobioms an mukosalen Grenzflächen und die chronische Entzündung der OAW bei Patienten mit GPA spielen (2, 95).

In verschiedenen Arbeiten wurde zudem die Bildung von ektopen lymphoiden Strukturen innerhalb von granulomatösen Läsionen der OAW bei Patienten mit GPA beobachtet (96-98). Dies wiederum suggeriert eine Antigen-getriebene Entzündung. So gehen *Voswinkel et al.* davon aus, dass die Reifung hinsichtlich Selektion und Affinität von PR3-ANCA autoreaktiven B-Zellen in granulomatösen Läsionen beginnt und damit die Entwicklung von einer lokalisierten ANCA negativen GPA hin zu einer generalisierten PR3-ANCA positiven GPA fördert (78).

Sowohl die möglichen Folgen der Veränderung der mukoziliären Reinigung als auch die respiratorische Immunantwort sind nicht in Gänze anhand von experimentellen Arbeiten aufgeklärt, u.a. da Tiermodelle die bei GPA-Patienten beobachtete Pathologie der OAW nicht adäquat nachbilden können (99).

Ferner konnte eine abnorme Expression von Zytokinen bei nasalen Epithelzellen beschrieben werden (100). *Wohlbers et al.* beobachteten bei Patienten mit GPA einen deutlich erhöhten Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF)- und eine reduzierte basale Interleukin (IL)-8-Konzentration (100). IL-8 fungiert als chemischer Lockstoff für polymorphonukleare Neutrophile und Monozyten und initiiert deren weitere Aktivität und schafft so die nötige Mikroumgebung der jeweils ablaufenden Entzündungsreaktion (101). Zusätzlich zeigte die in der zitierten Studie vorgenommene Stimulation mittels *S. aureus*-Überständen (StammT190-2), dass bei den GPA-Patienten nicht nur eine signifikant geringere IL-8 Sekretion, sondern auch eine eingeschränkte Folgereaktion auf den Stimulus bestand (100). Es wurde beobachtet, dass sich die IL-8 Sekretion dem Stimulus quantitativ nicht anpasst, was wiederum dazu führen kann, dass sich auf lokaler Ebene die Zusammensetzung des mikrobiellen Besiedlungsspek-

trums der Nasenschleimhaut verändert und ein Ungleichgewicht der inflammatorischen Reaktion auf mikrobielle Reize gefördert werden kann (100).

Dies wiederum unterstützt die These, dass sich die GPA-Erkrankung unter dem Einfluss der oben genannten Faktoren im Zusammenspiel mit einer existierenden Dysbiose entwickeln könnte.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie konnten Anzeichen für Veränderungen der mikrobiellen Zusammensetzung innerhalb der Nasenhöhle bei Patienten mit GPA nachgewiesen werden.

Im Einzelnen wurde bei Patienten mit GPA eine verminderte Alpha-Diversität des nasalen Mikrobioms im Vergleich zu RA-Patienten festgestellt. Zusätzlich zeigte sich ein Trend zu geringerer Vielfalt des nasalen Mikrobioms bei GPA-Patienten im Vergleich zur NK.

Die drei Haupt-Phyla des nasalen Mikrobioms aller Probandengruppen waren: *Proteobacteria*, *Firmicutes* (mit den Klassen *Clostridia* und *Bacilli*) und *Actinobacteria*. Veränderungen der relativen Häufigkeiten von Bakterien konnten auch auf der taxonomischen Ebene der Familien festgestellt werden. Auffällig war das signifikant häufigere Vorkommen der Klasse *Bacilli* bei den Patienten mit GPA im Vergleich zu den Patienten mit RA und NK.

Mithilfe der qPCR wurde *S. aureus* signifikant häufiger in den Proben der GPA-Patienten nachgewiesen als in Proben der anderen beiden Gruppen. *H. influenzae* war zwar quantitativ stärker in den GPA-Proben als bei denen der Kontrollgruppen vertreten, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

Mit der Methodik der UMERS Analyse konnte die Anwesenheit von unbekanntem oder bis vor Kurzem unbeschriebenen Pathogenen der OAWe sowohl bei ausgewählten Patienten mit GPA als auch in der Gruppe der NK ausgeschlossen werden.

In der Gesamtschau weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass es bei Patienten mit GPA zu Veränderungen der mikrobiellen Zusammensetzung an mukosalen Grenzflächen der OAW kommt, die in der Folge zu einer mikrobiellen Dysbiose führen.

Die vorliegenden Daten verdeutlichen, dass komplexe Veränderungen von Wirt-Mikrobiom-Interaktionen der OAWe, mehr noch als die alleinige *S. aureus* Besiedlung die endonasale Krankheitsaktivität beeinflussen. Dies hat ebenfalls einen Einfluss auf die Immunantwort, die Patienten mit GPA zu einer chronischen Entzündungsreaktion und Autoreaktivität prädisponiert.

6. Literaturverzeichnis

1. Jennette JC, Falk RJ. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014;10(8):463-73.
2. Lamprecht P, Kerstein A, Klapa S, Schinke S, Karsten CM, Yu X, et al. Pathogenetic and Clinical Aspects of Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Associated Vasculitides. *Front. Immunol.* 2018;9:680.
3. Kallenberg CG. Key advances in the clinical approach to ANCA-associated vasculitis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014;10(8):484-93.
4. Lyons PA, Rayner TF, Trivedi S, Holle JU, Watts RA, Jayne DR, et al. Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. *NEJM* 2012;367(3):214-23.
5. Laudien M, Gadola SD, Podschun R, Hedderich J, Paulsen J, Reinhold-Keller E, et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and endonasal activity in Wegener's granulomatosis as compared to rheumatoid arthritis and chronic Rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28(1 Supplement 57):51-5.
6. Glasner C, de Goffau MC, van Timmeren MM, Schulze ML, Jansen B, Tavakol M, et al. Genetic loci of *Staphylococcus aureus* associated with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA)-associated vasculitides. *Sci. Rep.* 2017;7(1):12211.
7. Salmela A, Rasmussen N, Tervaert JWC, Jayne DRW, Ekstrand A. Chronic nasal *Staphylococcus aureus* carriage identifies a subset of newly diagnosed granulomatosis with polyangiitis patients with high relapse rate. *Rheumatol. (Oxford, England).* 2017;56(6):965-72.
8. Stegeman CA, Tervaert JW, Sluiter WJ, Manson WL, de Jong PE, Kallenberg CG. Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. *Ann. Intern. Med.* 1994;120(1):12-7.
9. Zycinska K, Wardyn KA, Zielonka TM, Demkow U, Traburzynski MS. Chronic crusting, nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and relapse rate in pulmonary Wegener's granulomatosis. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008;59 Supplement 6:825-31.
10. Ceccarelli F, Perricone C, Olivieri G, Cipriano E, Spinelli FR, Valesini G, et al. *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage and Autoimmune Diseases: From Pathogenic Mechanisms to Disease Susceptibility and Phenotype. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(22).
11. Brusca SB, Abramson SB, Scher JU. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2014;26(1):101-7.
12. Horta-Baas G, Romero-Figueroa MDS, Montiel-Jarquín AJ, Pizano-Zarate ML, Garcia-Mena J, Ramirez-Duran N. Intestinal Dysbiosis and Rheumatoid Arthritis: A Link between Gut Microbiota and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol. Res.* 2017;2017:4835189.
13. Shamriz O, Mizrahi H, Werbner M, Shoenfeld Y, Avni O, Koren O. Microbiota at the crossroads of autoimmunity. *Autoimmunity reviews.* 2016;15(9):859-69.
14. Klinger HKE. Grenzformen der Periarteritis nodosa. *Frankfurter Zeitschrift für Pathologie.* 1931;42:455-80.
15. Wegener F. Über generalisierte septische Gefäßerkrankungen. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie.* 1936;29:202-10.

16. Wegener F. Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren. *Beiträge Zur Pathologischen Anatomie Und Zur Allgemeinen Pathologie*. 1939;102:36-58.
17. Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, Hoffman GS, Jayne DR, Jennette JC, et al. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): an alternative name for Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, NJ)*. 2011;63(4):863-4.
18. Jennette JC. Nomenclature and classification of vasculitis: lessons learned from granulomatosis with polyangiitis (Wegener's granulomatosis). *Clin. Exp. Allergy*. 011;164 Suppl 1:7-10.
19. Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheumatol*. 1990;33(8):1101-7.
20. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheumatol*. 2013;65(1):1-11.
21. Damoiseaux J, Csernok E, Rasmussen N, Moosig F, van Paassen P, Baslund B, et al. Detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a multicentre European Vasculitis Study Group (EUVAS) evaluation of the value of indirect immunofluorescence (IIF) versus antigen-specific immunoassays. *Ann. Rheum. Dis*. 2017;76(4):647-53.
22. Bossuyt X, Cohen Tervaert JW, Arimura Y, Blockmans D, Flores-Suarez LF, Guillevin L, et al. Position paper: Revised 2017 international consensus on testing of ANCA in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2017;13(11):683-92.
23. Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated diseases: a pathologist's perspective. *Am J Kidney Dis*. 1991;18(2):164-70.
24. Turner A. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a seromarker for Wegener's granulomatosis. *J Otolaryngol*. 1991;20(4):274-5.
25. Braun MG, Csernok E, Gross WL, Muller-Hermelink HK. Proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. Immunolocalization in normal and pathologic tissues. *Am. J. Pathol*. 1991;139(4):831-8.
26. McKinney EF, Willcocks LC, Broecker V, Smith KG. The immunopathology of ANCA-associated vasculitis. *Semin. Immunol*. 2014;36(4):461-78.
27. Hoffman GS. Classification of the systemic vasculitides: antineutrophil cytoplasmic antibodies, consensus and controversy. *Clin. Exp. Rheumatol*. 1998;16(2):111-5.
28. Gross WL, Csernok E, Flesch BK. 'Classic' anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (cANCA), 'Wegener's autoantigen' and their immunopathogenic role in Wegener's granulomatosis. *J Autoimmun*. 1993;6(2):171-84.
29. Lüdemann J, Csernok E, Ulmer M, Lemke H, Utecht B, Rautmann A, et al. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis: immunodiagnostic value, monoclonal antibodies and characterization of the target antigen. *Neth. J. Med*. 1990;36(3-4):157-62.
30. Schonermarck U, Lamprecht P, Csernok E, Gross WL. Prevalence and spectrum of rheumatic diseases associated with proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and myeloperoxidase-ANCA. *Rheumatol. (Oxford, England)*. 2001;40(2):178-84.
31. Schirmer JH, Wright MN, Herrmann K, Laudien M, Nolle B, Reinhold-Keller E, et al. Myeloperoxidase-Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (ANCA)-Positive Granulomatosis With Polyangiitis (Wegener's) Is a Clinically Distinct Subset of ANCA-Associated Vasculitis: A

- Retrospective Analysis of 315 Patients From a German Vasculitis Referral Center. *Arthritis Rheumatol.* (Hoboken, NJ). 2016;68(12):2953-63.
32. Pendergraft WF, 3rd, Nachman PH. Recent pathogenetic advances in ANCA-associated vasculitis. *Presse Med.* 2015;44(6 Pt 2):e223-9.
 33. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet.* 1985;1(8426):425-9.
 34. Csernok E, Mahrhold J, Hellmich B. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA): Recent methodological advances-Lead to new consensus recommendations for ANCA detection. *J. Immunol. Methods* 2018;456:1-6.
 35. Lloyd G, Lund VJ, Beale T, Howard D. Rhinologic changes in Wegener's granulomatosis. *T J Laryngol Otol.* 2002;116(7):565-9.
 36. Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY, Hallahan CW, Lebovics RS, Travis WD, et al. Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Ann. Intern. Med.* 1992;116(6):488-98.
 37. Kühn D, Hospowsky C, Both M, Hey M, Laudien M. Manifestation of granulomatosis with polyangiitis in head and neck. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2018;36 Supplement 111(2):78-84.
 38. Holle JU, Reinhold-Keller E, Gross WL. [Update on granulomatosis with polyangiitis (GPA, Wegener's granulomatosis)]. *Zeitschrift für Rheumatologie.* 2012;71(9):745-53.
 39. Reinhold-Keller E, Herlyn K, Wagner-Bastmeyer R, Gross WL. Stable incidence of primary systemic vasculitides over five years: results from the German vasculitis register. *Arthritis Rheum.* 2005;53(1):93-9.
 40. Fujimoto S, Watts RA, Kobayashi S, Suzuki K, Jayne DR, Scott DG, et al. Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the U.K. *Rheumatol. (Oxford,England).* 2011;50(10):1916-20.
 41. Watts RA, Lane SE, Scott DG, Koldingsnes W, Nossent H, Gonzalez-Gay MA, et al. Epidemiology of vasculitis in Europe. *Ann. Rheum. Dis.* 2001;60(12):1156-7.
 42. Watts RA, Lane SE, Bentham G, Scott DG. Epidemiology of systemic vasculitis: a ten-year study in the United Kingdom. *Arthritis Rheuma.* 2000;43(2):414-9.
 43. Lane SE, Watts R, Scott DG. Epidemiology of systemic vasculitis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2005;7(4):270-5.
 44. Scott DG, Watts RA. Systemic vasculitis: epidemiology, classification and environmental factors. *Ann. Rheum. Dis.* 2000;59(3):161-3.
 45. Watts RA, MacGregor AJ, Mackie SL. HLA allele variation as a potential explanation for the geographical distribution of granulomatosis with polyangiitis. *Rheumatol. (Oxford, England).* 2015;54(2):359-62.
 46. Relle M, Fohr B, Fasola F, Schwarting A. Genetics and pathophysiology of granulomatosis with polyangiitis (GPA) and its main autoantigen proteinase 3. *Mol. Cell. Probes.* 2016;30(6):366-73.
 47. Lutalo PM, D'Cruz DP. Diagnosis and classification of granulomatosis with polyangiitis (aka Wegener's granulomatosis). *J Autoimmun.* 2014;48-49:94-8.
 48. Chen M, Kallenberg CG. The environment, geoepidemiology and ANCA-associated vasculitides. *Autoimmun Rev.* 2010;9(5):A293-8.
 49. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012;13(9):R79.

50. Ramakrishnan VR, Hauser LJ, Feazel LM, Ir D, Robertson CE, Frank DN. Sinus microbiota varies among chronic rhinosinusitis phenotypes and predicts surgical outcome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015;136(2):334-42.e1.
51. Hoggard M, Biswas K, Zoing M, Wagner Mackenzie B, Taylor MW, Douglas RG. Evidence of microbiota dysbiosis in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2017;7(3):230-9.
52. Tadema H, Heeringa P, Kallenberg CG. Bacterial infections in Wegener's granulomatosis: mechanisms potentially involved in autoimmune pathogenesis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2011;23(4):366-71.
53. Stegeman CA, Tervaert JW, de Jong PE, Kallenberg CG. Trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. Dutch Co-Trimoxazole Wegener Study Group. *NEJM.* 1996;335(1):16-20.
54. Zycinska K, Wardyn KA, Zielonka TM, Krupa R, Lukas W. Co-trimoxazole and prevention of relapses of PR3-ANCA positive vasculitis with pulmonary involvement. *Eur. J. Med. Res.* 2009;14 Supplement 4:265-7.
55. Schiffenbauer J, Soos J, Johnson H. The possible role of bacterial superantigens in the pathogenesis of autoimmune disorders. *Immunol. Today.* 1998;19(3):117-20.
56. Popa ER, Stegeman CA, Bos NA, Kallenberg CG, Tervaert JW. Staphylococcal superantigens and T cell expansions in Wegener's granulomatosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2003;132(3):496-504.
57. Pendergraft WF, 3rd, Preston GA, Shah RR, Tropsha A, Carter CW, Jr., Jennette JC, et al. Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat. Med.* 2004;10(1):72-9.
58. Hui Y, Wohlers J, Podschun R, Hedderich J, Lamprecht P, Ambrosch P, et al. Antimicrobial peptides in nasal secretion and mucosa with respect to *S. aureus* colonisation in Wegener's granulomatosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2011;29(1 Supplement 64):S49-56.
59. Rhee RL, Sreih AG, Najem CE, Grayson PC, Zhao C, Bittinger K, et al. Characterisation of the nasal microbiota in granulomatosis with polyangiitis. *Ann. Rheum. Dis.* 2018;77(10):1448-53.
60. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38(1):44-8.
61. Suppiah R, Mukhtyar C, Flossmann O, Alberici F, Baslund B, Batra R, et al. A cross-sectional study of the Birmingham Vasculitis Activity Score version 3 in systemic vasculitis. *Rheumatol. (Oxford, England).* 2011;50(5):899-905.
62. Garske U, Haack A, Beltran O, Flores-Suarez LF, Bremer JP, Lamprecht P, et al. Intra- and inter-rater reliability of endonasal activity estimation in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Clin. Exp. Rheumatol.* 2012;30(1 Supplement 70):S.22-8.
63. Ooi EH, Wormald PJ, Tan LW. Innate immunity in the paranasal sinuses: a review of nasal host defenses. *Am. J. Rhinol. Allergy.* 2008;22(1):13-9.
64. Fischer N, Indenbirken D, Meyer T, Lutgehetmann M, Lellek H, Spohn M, et al. Evaluation of Unbiased Next-Generation Sequencing of RNA (RNA-seq) as a Diagnostic Method in Influenza Virus-Positive Respiratory Samples. *J. Clin. Microbiol.* 2015;53(7):2238-50.
65. Fischer N, Rohde H, Indenbirken D, Günther T, Reumann K, Lütgehetmann M, et al. Rapid metagenomic diagnostics for suspected outbreak of severe pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.* 2014;20(6):1072-5.

66. Abdeldaim GM, Stralin K, Kirsebom LA, Olcen P, Blomberg J, Herrmann B. Detection of Haemophilus influenzae in respiratory secretions from pneumonia patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2009;64(4):366-73.
67. Diaz MH, Waller JL, Napoliello RA, Islam MS, Wolff BJ, Burken DJ, et al. Optimization of Multiple Pathogen Detection Using the TaqMan Array Card: Application for a Population-Based Study of Neonatal Infection. *PLoS One.* 2013;8(6):e66183.
68. Dierssen U, Rehren F, Henke-Gendo C, Harste G, Heim A. Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *J. Clin. Virol.* 2008;42(1):58-64.
69. Schibler M, Yerly S, Vieille G, Docquier M, Turin L, Kaiser L, et al. Critical analysis of rhinovirus RNA load quantification by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(9):2868-72.
70. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 1991;173(2):697-703.
71. Yang B, Wang Y, Qian PY. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics.* 2016;17:135.
72. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids Res.* 2013;41(1):e1.
73. Illumina. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Illumina. 2013.
74. Bernard K. The genus corynebacterium and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(10):3152-8.
75. Shukla SK, Bernard KA, Harney M, Frank DN, Reed KD. *Corynebacterium nigricans* sp. nov.: proposed name for a black-pigmented *Corynebacterium* species recovered from the human female urogenital tract. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(9):4353-8.
76. Shukla SK, Harney M, Jhaveri B, Andrews K, Reed KD. Is a black-pigmented *Corynebacterium* species an opportunistic pathogen during pregnancy? Literature review and report of 3 new cases. *Clin. Infect. Dis.* 2003;37(6):834-7.
77. Roux V, Drancourt M, Stein A, Riegel P, Raoult D, La Scola B. *Corynebacterium* species isolated from bone and joint infections identified by 16S rRNA gene sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(5):2231-3.
78. Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Patel R. *Corynebacterium* prosthetic joint infection. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(5):1518-23.
79. Choi EB, Hong SW, Kim DK, Jeon SG, Kim KR, Cho SH, et al. Decreased diversity of nasal microbiota and their secreted extracellular vesicles in patients with chronic rhinosinusitis based on a metagenomic analysis. *Allergy.* 2014;69(4):517-26.
80. Potempa J, Mydel P, Koziel J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017;13(10):606-20.
81. T.J.White TB, S. Lee, J.Taylor. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* 1990:315-22.
82. Merkley MA, Bice TC, Grier A, Strohl AM, Man LX, Gill SR. The effect of antibiotics on the microbiome in acute exacerbations of chronic rhinosinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 2015;5(10):884-93.
83. Scher JU, Ubeda C, Equinda M, Khanin R, Buischi Y, Viale A, et al. Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheuma.* 2012;64(10):3083-94.

84. Marino E, Richards JL, McLeod KH, Stanley D, Yap YA, Knight J, et al. Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* 2017;18(5):552-62.
85. Chen J, Chia N, Kalari KR, Yao JZ, Novotna M, Paz Soldan MM, et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep.* 2016;6:28484.
86. Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature.* 2011;479(7374):538-41.
87. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu TC, Ng AC, Storer CE, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell.* 2010;141(7):1135-45.
88. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2012;491(7422):119-24.
89. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(43):16731-6.
90. Wu HJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity.* 2010;32(6):815-27.
91. Costello SP, Hughes PA, Waters O, Bryant RV, Vincent AD, Blatchford P, et al. Effect of Fecal Microbiota Transplantation on 8-Week Remission in Patients With Ulcerative Colitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2019;321(2):156-64.
92. Kerstein A, Schuler S, Cabral-Marques O, Fazio J, Hasler R, Muller A, et al. Environmental factor and inflammation-driven alteration of the total peripheral T-cell compartment in granulomatosis with polyangiitis. *J. Autoimmun.* 2017;78:79-91.
93. Ullrich S, Gustke H, Lamprecht P, Gross WL, Schumacher U, Ambrosch P, et al. Severe impaired respiratory ciliary function in Wegener granulomatosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2009;68(6):1067-71.
94. Laudien M, Dressel S, Harder J, Glaser R. Differential expression pattern of antimicrobial peptides in nasal mucosa and secretion. *Rhinology.* 2011;49(1):107-11.
95. Laudien M. Nasal barrier dysfunction in Wegener's granulomatosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2010;28(1 Supplement 57):3-4.
96. Weppner G, Ohlei O, Hammers CM, Holl-Ulrich K, Voswinkel J, Bischof J, et al. In situ detection of PR3-ANCA(+) B cells and alterations in the variable region of immunoglobulin genes support a role of inflamed tissue in the emergence of auto-reactivity in granulomatosis with polyangiitis. *J. Autoimmun.* 2018;93:89-103.
97. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2014;14(7):447-62.
98. Voswinkel J, Mueller A, Kraemer JA, Lamprecht P, Herlyn K, Holl-Ulrich K, et al. B lymphocyte maturation in Wegener's granulomatosis: a comparative analysis of VH genes from endonasal lesions. *Ann. Rheum. Dis.* 2006;65(7):859-64.
99. Kesel N, Kohler D, Herich L, Laudien M, Holl-Ulrich K, Jungel A, et al. Cartilage destruction in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's granulomatosis) is mediated by human fibroblasts after transplantation into immunodeficient mice. *Am. J. Pathol.* 2012;180(5):2144-55.

100. Wohlers J, Breucker K, Podschun R, Hedderich J, Lamprecht P, Ambrosch P, et al. Aberrant cytokine pattern of the nasal mucosa in granulomatosis with polyangiitis. *Arthritis Res. Ther.* 2012;14(5):R203.
101. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 2009;84(3):353-60.
102. Mukhtyar C, Guillevin L, Cid MC, Dasgupta B, de Groot K, Gross W, et al. EULAR recommendations for the management of primary small and medium vessel vasculitis. *Ann. Rheuma. Dis.* 2009;68(3):310-7.
103. Larsen A. Radiological grading of rheumatoid arthritis. An interobserver study. *Scand. J. Rheumatol.* 1973;2(3):136-8.

7. Anhang

7.1. Ergänzende Tabellen

Ergänzende Tabelle 1: Patientencharakteristika der GPA Patienten.

ID	I/g ^a	C- AN- CA ^b	P- AN- CA ^b	PR3- AN- CA ^b	MPO- AN- CA ^b	Histo- logie ^b	Organ be- teiligung ^c	CRP ^d	ESR ^e	LKCs ^f	Kreatinin ^g	Analyse- methoden ^h
1	g	1	0	1	0	1	E, L, K, P	-	+	-	-	16S, qPCR
2	g	1	0	1	0	0	E, A, B	-	-	-	-	16S
3	g	0	0	0	0	fD	E, S, Ey, L	+	-	+	+	16S, qPCR
4	g	1	0	1	0	1	E, L, A, Ey, P	+	-	+	-	16S, qPCR
5	g	1	0	1	0	1	E, L, K, C, B	-	+	+	-	16S, qPCR
6	g	1	0	1	0	1	E, Ey, L, K, B	+	-	+	-	16S, qPCR
7	g	1	0	1	0	0	E, L, K, A, P, B	+	fD	-	+	qPCR
8	g	1	0	1	0	1	E, L, K, A, B, H, Ey	-	-	-	+	16S, qPCR
9	g	0	1	1	0	1	E, L, K, P	-	-	-	+	16S, qPCR
10	g	1	0	1	0	1	E, L, B	-	+	-	-	qPCR
11	g	1	0	1	0	0	E, L, B	-	+	-	-	qPCR
12	g	1	0	1	0	1	E, L, K, Ey, A, C, B	-	-	+	-	16S, qPCR

13	g	1	0	1	0	fD	E, Ey, L, K, C, A, S, B	+	-	-	fD	16S,
14	l	0	1	0	1	1	E, L	-	-	-	-	qPCR
15	g	0	0	0	0	1	E, Ey	-	-	-	+	16S, qPCR
16	g	1	0	1	0	1	E, K, A, Ey	-	-	+	+	qPCR
17	g	1	0	1	0	0	E, S, A, B	-	+	-	-	16S, qPCR
18	g	1	0	1	0	1	E, L, K, A, P	-	-	+	+	16S, qPCR
19	g	1	0	1	0	0	E, K, A, B	-	+	-	+	qPCR
20	g	1	0	1	0	1	E, L, K, P, Ey, S, A	-	+	-	+	16S, UMERS
21	l	1	0	1	0	1	E, L	+	-	-	-	16S, UMERS,
22	l	fD	0	1	0	0	E	+	+	+	-	16S, UMERS
23	g	1	0	1	0	0	E, Ey, S, A, B	-	-	-	-	UMERS
24	g	1	0	1	0	0	E, Ey, L	-	-	-	+	16S, UMERS
25	g	1	0	1	0	0	E, A, B	-	-	-	-	16S, UMERS
26	l	0	0	0	0	1	E	+	-	-	-	16S, UMERS
27	g	1	0	fD	0	fD	E, S, A, B	+	+	+	-	16S, UMERS
28	g	1	0	1	0	1	E, L, K, A, B, S	+	+	-	+	16S, UMERS

Abkürzungen: ANCA= anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody; ESR= erythrocyte sedimentation rate; CRP= C-reactive protein; LKZ= Leukozyten; MPO= Myeloperoxidase; PR3= Proteinase 3;

^a GPA wurde als lokalisiert (l) klassifiziert, i.e., GPA beschränkt auf die oberen und/oder unteren Atemwege ohne andere systemische Beteiligung oder konstitutionelle Symptome oder als generalisierte (g) inklusive frühe systemische Erkrankung, i.e., GPA mit multipler Organbeteiligung und mit oder ohne Organ-bedrohende bzw. Lebensbedrohende Erkrankung definiert durch die „European League Against Rheumatism“ (EULAR) und die „European Vasculitis Study Group“ (EUVAS) (102).

^b 0= negativ; 1= positiv; fD= fehlende Daten.

^c Organbeteiligung: E= Obere Atemwege; L= Lunge; K= Niere; Ey= Auge; H= Herz; S= Haut; P= peripheres Nervensystem; C= zentrales Nervensystem; A= muskuloskeletal; B= B Symptome.

^d CRP Level ≥ 5 mg/L sind positiv; CRP Level < 5 mg/L sind negativ.

^e BSG ≥ 30 mm/h ist positiv; BSG < 30 mm/h ist negativ.

^f Leukozyten ≥ 9 G/L sind positiv; Leukozyten < 9 G/L sind negativ.

^g Kreatinin ≥ 80 $\mu\text{mol/L}$ ist positiv; Kreatinin < 80 $\mu\text{mol/L}$ ist negativ.

^h Analysemethoden: UMERS= unbiased metagenomic RNA sequencing; 16S= V3–V4 Region 16S rRNA Amplikon Sequenzierung; qPCR= quantitative PCR.

Ergänzende Tabelle 2: Patientencharakteristika der RA Patienten.

ID	RF ^a	Anti-CCP ^a	DAS 28 ^b	Larsen score ^c	Methode der Analyse ^d
1	1	1	md	5	16S
2	fD	fD	2	fD	16S, qPCR
3	1	1	0	4	16S, qPCR
4	1	1	0	0	16S, qPCR
5	1	0	4.95	4	16S, qPCR
6	0	0	3.20	1	16S, qPCR
7	0	0	1.67	2	16S, qPCR
8	1	1	3.01	fD	16S, qPCR
9	1	1	fD	4	16S, qPCR
10	0	0	3.48	3	16S, qPCR
11	1	1	2.17	0	16S
12	0	0	2.94	1	16S
13	1	1	5.78	5	16S, qPCR
14	0	1	6.80	3	16S, qPCR
15	0	0	3.99	1	16S, qPCR
16	1	1	0.91	0	16S
17	1	1	1.21	2	qPCR
18	0	0	0	0	16S, qPCR
19	0	0	3.62	0	16S, qPCR
20	1	1	2.17	2	16S, qPCR
21	0	0	3.40	1	16S, qPCR

Abkürzungen: RF= Rheumafaktor; Anti-CCP= anti-citrullinated cyclic protein antibody;

^a 0= negativ; 1= positiv; fD= fehlende Daten.

^b DAS 28= Disease activity score 28; DAS 28 \leq 2.6 ist Remission, DAS 28 >2.6 ist aktive Erkrankung (60).

^c Larsen Score bewegt sich zwischen 0 (keine pathologischen Anzeichen) und 5 (verstümmelnde Veränderungen und Ankylose) (103).

^d Methoden der Analyse: UMERS= unbiased metagenomic RNA sequencing; 16S= V3–V4 Region 16S rRNA Amplikon Sequenzierung; qPCR= quantitative PCR.

Ergänzende Tabelle 3: Immunsuppressive Medikamente von GPA Patienten.

ID	PRD	RTX	MTX	AZA	LEF	MMF
1	1	0	0	1	0	0
2	1	1	0	0	0	0
3	1	1	0	0	0	0
4	1	1	0	0	0	0
5	1	0	1	0	0	0
6	1	1	1	0	0	0
7	1	0	1	0	0	0
8	1	0	1	0	0	0
9	1	0	0	0	0	1
10	0	0	0	1	0	0
11	1	1	0	0	0	0
12	1	0	0	1	0	0
13	1	1	0	0	1	0
14	1	0	1	0	0	0
15	1	0	1	0	0	0
16	1	0	1	0	0	0
17	1	0	0	1	0	0
18	1	0	1	0	0	0
19	1	1	0	1	0	0
20	1	0	0	0	1	0
21	1	0	0	0	1	0
22	1	0	1	0	0	0
23	1	1	0	0	0	0
24	1	0	1	0	0	0
25	1	1	0	0	0	0
26	1	0	1	0	0	0
27	1	0	1	0	0	0
28	1	1	0	0	0	0
29	1	0	1	0	0	0

Abkürzungen: 1= Einnahme der Medikation; 0= keine Einnahme der Medikation; AZA= Azathioprin; LEF= Leflunomid; MTX= Methotrexat; MMF= Mycophenolat Mofetil; PRD= Prednisolon; RTX= Rituximab.

Ergänzende Tabelle 4: Immunsuppressive Medikamente von RA Patienten.

ID	PRD	MTX	AZA	LEF	ABT	ADA	CZB	TZB	ECT
1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	1	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	1	0	0
5	1	0	0	0	0	0	0	1	0
6	1	0	1	0	0	0	0	0	0
7	0	1	0	0	0	1	0	0	0
8	1	1	0	0	0	0	0	0	1
9	1	1	0	0	0	0	0	1	0
10	1	1	0	0	0	0	0	0	0
11	1	1	0	0	0	0	0	0	1
12	1	0	0	1	0	0	0	0	0
13	1	0	0	0	0	0	0	0	0
14	1	0	0	0	0	0	0	1	0
15	1	0	0	0	0	0	0	1	0
16	1	1	0	1	0	0	0	0	0
17	0	1	0	0	0	0	0	0	0
18	0	1	0	0	0	0	0	0	0
19	1	0	0	1	0	0	0	0	0
20	1	1	0	0	0	0	0	0	1
21	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Abkürzungen: 1= Einnahme der Medikation; 0= keine Einnahme der Medikation; ABT= Abatacept; ADA= Adalimumab; AZA= Azathioprin; CZB= Certolizumab; ECT= Etanercept; LEF= Leflunomid; MTX= Methotrexat; MMF= Mycophenolat Mofetil; PRD= Prednisolon; RTX= Rituximab; TZB= Tocilizumab.

Ergänzende Tabelle 5: Zusammenfassung der “next-generation sequencing“- Daten durch UMERS.

ID	Gruppe	Gesamt reads	% humane reads	nicht-humane reads		
				rel. Häufigkeit virale reads	rel. Häufigkeit bakterielle reads	rel. Häufigkeit andere reads*
1	GPA	21,863,733	40.04	0.184	82.9	16.84
3	GPA	22,148,984	57.97	0.26	81.12	18.02
4	GPA	23,339,015	9.02	0.136	79.2	20.5
5	GPA	24,699,696	15.43	0.179	79.56	19.41
6	GPA	19,403,923	26.84	0.193	78.98	19
7	GPA	19,949,905	45.44	0.1	71.45	27.04
12	GPA	21,348,828	23.24	0.16	82.34	16.77
13	GPA	23,020,928	33.54	0.13	76.3	22.78
19	GPA	1,637,609	4.64	0.656	91.3	7.91
9	NK	20,186,843	64.06	0.411	65.945	33.3
10	NK	27,049,163	68.45	0.24	62.253	35.52
15	NK	26,364,789	41.92	0.197	66.012	32.53
21	NK	31,199,660	3.92	0.795	73.56	24.5

**Andere reads beinhalten: (1) parasitäre und fungale reads, (2) reads, die nicht in der NCBI Datenbase gefunden wurden und (3) reads, die von der Umwelt abstammen.*

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Alpha- und Beta- Diversität bei nasalen Proben von Patienten mit GPA, RA und NK.	13
Abbildung 2A-C: Alpha-Diversität des nasalen Mikrobioms im Vergleich verschiedener Diversitäts- Maße von Patienten mit GPA und RA.....	15
Abbildung 3A-E: Überblick der bakteriellen Zusammensetzung der oberen Atemwege (OAW) bei Patienten mit GPA, RA und NK.	18
Abbildung 4: Zusammensetzung des bakteriellen Mikrobiom der OAW bei Patienten mit GPA, RA und NK.	18
Abbildung 5A-C: Relative Häufigkeiten ausgewählter Bakterienfamilien in den OAW bei Patienten mit GPA (n = 21) und RA (n = 20).	20
Abbildung 6A-I: Bakterielle Zusammensetzung des nasalen Mikrobioms der OAW bei Patienten mit GPA und RA.	22

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Studienkollektiv	6
Tabelle 2: Relative Häufigkeiten ausgewählter Bakterienfamilien* im nasalen Mikrobiom von Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) und Rheumatoider Arthritis (RA) bzw. Normalkontrollen (NK).	23
Tabelle 3: Ergebnisse der qPCR- Analyse auf <i>S. aureus</i> und <i>H. influenzae</i>	24

7.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich möchte mich hiermit bei Frau Prof. Dr. med. Petra Ambrosch, Direktorin der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen.

Meinen allerherzlichsten Dank möchte ich PD Dr. med. Martin Laudien aussprechen. Vielen Dank für die großartige Betreuung, die motivierenden und oftmals erhellenden Worte, die permanente Erreichbarkeit und das stets offene Ohr, das diese Zusammenarbeit so angenehm gemacht hat. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Ich möchte mich bei Herrn Cay Neubert bedanken, ohne den ich diverse alte Akten aus dem Archiv sicher nicht gefunden hätte.

Vielen Dank an Frau Sabine Jansche aus Bad Bramstedt, die mir ebenfalls bei der Datenrecherche stete Hilfsbereitschaft zugestand.

Ebenfalls danken möchte ich meinen beiden Schwestern – Kari, die mich dazu brachte letztlich die Dissertation in der HNO bei Martin zu schreiben (goldrichtige Entscheidung) und mich oftmals moralisch unterstützen konnte und – Malin, die es aufgrund von akuter Langeweile in der Schwangerschaft vorzog meine Arbeit zu lesen und zu korrigieren.

Ein extra großes Dankeschön möchte ich auch an Jörn richten, der mich bei der Ausarbeitung dieser Arbeit sehr unterstützt hat und viel Zeit und vor allem Nerven investiert hat (ein paar mehr graue Haare sind es bestimmt geworden).

Ein besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern, die mich auf meinem Lebensweg bis hierhin immer bekräftigt und unterstützt haben. Dafür bin ich sehr dankbar.