

# **Barrierestörung der nasalen Mukosa bei Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Janet Wohlers**

Kiel 2012

Referent: Prof. Dr. H. Fickenscher

Korreferent/in: Prof. Dr. M. Dittmar

Tag der mündlichen Prüfung: 21. August 2012

Zum Druck genehmigt: 21. August 2012

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

*Erfahrung ist nicht das, was einem zustößt,*

*Erfahrung ist das, was man aus dem macht,*

*was einem zustößt.*

Aldous Huxley

---

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
<b>I Einleitung</b> .....	1
1 Das nasale respiratorische Epithel.....	1
2 Aspekte bekannter Grenzflächenerkrankungen .....	4
3 Die Entzündungsantwort.....	6
4 Die GPA - eine Grenzflächenerkrankung? .....	8
4.1 Pathophysiologische Vorstellungen zur Krankheitsentstehung .....	9
4.2 Genetische und epigenetische Einflussfaktoren .....	12
4.3 Mechanische Barriere.....	13
4.4 Immunologische Barriere.....	14
4.5 Exogene Faktoren .....	15
5 Hypothese und Zielsetzung.....	17
<b>II Materialien, Methoden und Patienten</b> .....	19
1 Materialien und Geräte.....	19
2 Patienten und Methoden .....	26
2.1 Studiendesign und Patienten .....	26
2.2 Zellbiologische Methoden .....	29
2.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....	36
2.4 Molekularbiologische Methoden .....	46
2.5 Mikrobiologische Methoden .....	52
2.6 Statistische Auswertung .....	53
<b>III Ergebnisse</b> .....	54
1 Entzündungsassoziierte Genexpression in nasalen Biopsien .....	54
2 Cytokinexpression nasaler Epithelzellen.....	55
2.1 Basale Cytokinexpression nasaler Epithelzellen.....	55
2.2 IL-8-Expression nach Stimulation mit <i>S. aureus</i> -Komponenten.....	57
3 Expression antimikrobieller Peptide .....	62
3.1 LL-37, hBD3 und RNase 7 im Nasensekret.....	62
3.2 LL-37- und hBD3-Lokalisation in nasalem Gewebe.....	64
3.3 Stimulation nasaler Epithelzellen mit <i>S. aureus</i> .....	66
4 Intraepitheliale Lokalisation von <i>S. aureus</i> in nasalen Biopsien.....	69
5 Generierung transformierter nasaler Epithelzelllinien.....	71

---

<b>IV Diskussion</b> .....	75
1 Spezifisches Genexpressionsmuster der nasalen Mukosa von GPA-Patienten.....	75
2 Verändertes Cytokinprofil nasaler Epithelzellen bei GPA-Patienten .....	77
3 Reaktion nasaler Epithelzellen von GPA-Patienten auf bakterielle Stimulation .....	80
4 AMP-Konzentrationen in Nasensekreten bei GPA-Patienten.....	84
5 Intraepithelialer <i>Staphylococcus aureus</i> in der nasalen Mukosa von GPA-Patienten .....	86
6 Transformierte nasale GPA-Epithelzellen .....	87
<b>V Zusammenfassung</b> .....	90
<b>VI Summary</b> .....	92
<b>VII Literatur</b> .....	94
<b>VIII Danksagung</b> .....	108
<b>IX Lebenslauf und Veröffentlichungen</b> .....	110
<b>X Erklärung</b> .....	112
<b>XI Anhang</b> .....	113
1 Details zu den in diese Studie eingeschlossenen Patienten .....	113
2 Statistik-Überblick .....	117
3 Gemessene IL-8-Konzentrationen nach Stimulation.....	119

## Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
AD	atopische Dermatitis
A. dest.	destilliertes Wasser
AMP	antimikrobielle(s) Peptid(e)
ANCA	anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor der TNF-Familie
BAL	bronchoalveoläre Lavage
bmi-1	<i>B-lymphoma MMLV insertion region 1 homolog</i>
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BVAS	<i>Birmingham Vasculitis Activity Score</i>
<i>CARD15</i>	Gen für NOD2
cDNA	komplementäre DNA
CpG	DNA-Motiv aus Cytosin und Guanin
cPR3	Leserahmen, der komplementär zum Gen für Proteinase 3 liegt
CRS	chronische Rhinosinusitis
CXCL8	Chemokin IL-8
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol
<i>DEFB1</i>	hBD1 kodierendes Gen
<i>DEFB4</i>	hBD2 kodierendes Gen
DEI	<i>Disease Extent Index</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ELK	<i>ear-, nose- and throat, lung- and kidney</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FA	Formaldehyd-Agarose
FCS	fötales Kälberserum
FimH	Adhäsion der Fimbrien gram-negativer Bakterien
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
<i>FLG</i>	Gen für Filaggrin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener)
hBD	humanes $\beta$ -Defensin
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HNO	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
HNP	humanes Neutrophilen-Peptid

---

<i>hTERT</i>	Gen für die reverse Transkriptase der humanen Telomerase
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
ICC	Immuncytochemie
IF	Immunfluoreszenz-Färbung
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMH	Immunhistochemie
IZ	Immortalisierte, bzw. transformierte Zelllinie
IQA	Interquartilsabstand
JNK	<i>JUN N-terminal protein kinase</i>
<i>JUN</i>	Gen für das Proto-Onkogen jun
<i>LacZ</i>	Gen für die $\beta$ -Galaktosidase
LAMP-2	lysosomales Membranprotein 2
LRR	Leuzin-reiche Repetitionen
LTA	Lipoteichonsäure
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Max	größter gemessener Wert
M. Crohn	Morbus Crohn
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein-1 (CCL-2)
Min	kleinster gemessener Wert
MIP-1 $\beta$	<i>macrophage inflammatory protein-1<math>\beta</math></i> (CCL-4)
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NaPP	Natriumphosphat-Puffer
nB	nicht zu berechnen
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Normalkontrolle/n
NLR	NOD-like-Rezeptor
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerisation domains</i>
Pam3Cys	Tris-Palmitoyl-Cystein
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PAR	<i>protease-activated receptor</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PR3	Proteinase 3
prim. Z	Primärzellkulturen
PRR	Mustererkennungs-Rezeptor ( <i>pattern recognition receptor</i> )
<i>PTPN22</i>	Gen für eine bestimmte Tyrosinphosphatase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA

---

---

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RUNX3	<i>Runt-related transcription factor 3</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
slgA	sekretorisches Immunglobulin A
SLPI	sekretorischer Leukozytenproteinaseinhibitor
SSC	SDS-Natrium-Citrat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	mit Tween-versetzter TBS-Puffer
T <sub>EM</sub>	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle/n
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung
TNF	Tumornekrosefaktor
TSB	<i>Tryptic Soy Bouillon</i>
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
TSST-1	Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1
uN	unter der Nachweisgrenze
VDI	<i>Vasculitis Damage Index</i>
VH	variable Region der schweren Kette ( <i>variable heavy chain</i> )
v/v	<i>volume per volume</i>
WB	Westernblot
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
1:5 Ü	<i>S. aureus</i> -Überstand in der Verdünnung 1:5
1:50 Ü	<i>S. aureus</i> -Überstand in der Verdünnung 1:50
1:500 Ü	<i>S. aureus</i> -Überstand in der Verdünnung 1:500
3B	Lysat aus $1 \times 10^3$ Bakterien/ml
5B	Lysat aus $1 \times 10^5$ Bakterien/ml
7B	Lysat aus $1 \times 10^7$ Bakterien/ml



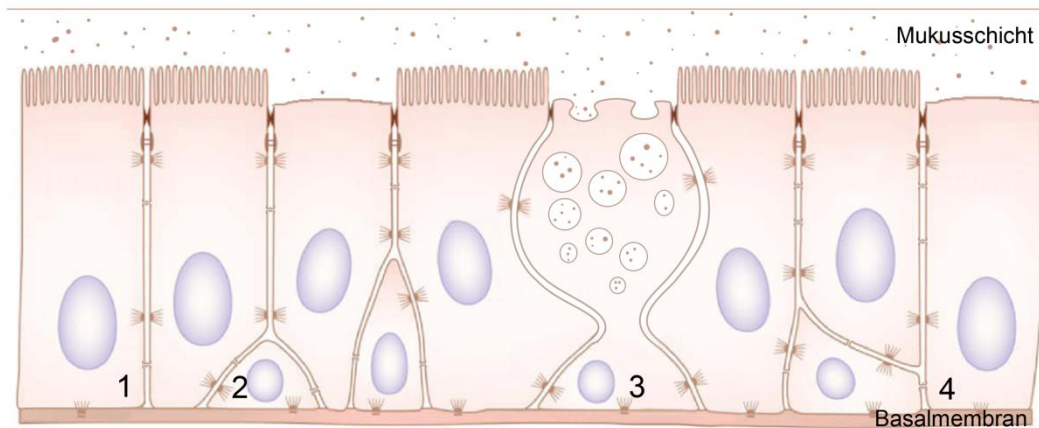
# I Einleitung

## 1 Das nasale respiratorische Epithel

Die nasale Schleimhaut stellt eine Grenzfläche zwischen der Umwelt und dem Inneren des Körpers dar. Sie ist die erste Barriere gegen kontinuierlich eingeatmete Substanzen wie beispielsweise Pathogene und Allergene und begrenzt den Grad antigenen Stimulation der sich im Körper befindlichen Immunzellen. Die Barrierefunktion wird über mechanische und immunologische inklusive chemischer Mechanismen vermittelt.

Das nasale Epithel (Abb. 1) ist als mehrreihiges Flimmerepithel aufgebaut und besteht aus einer dem Lumen am weitesten entfernt liegenden Basalmembran, der Basalzellen aufsitzen, die keinen Kontakt zur Epitheloberfläche haben. Die darüber liegende Epithelschicht selbst besteht vorwiegend (bis 70 %) aus zilienlosen und zu 20 - 50 % zilientragenden Epithelzellen sowie zu 5 - 15 % aus Becherzellen [1]. Eine 10 - 15 µm dicke Mukusschicht bedeckt die zilientragenden Zellen und füllt auch die Zwischenräume zwischen den Zilien aus [2;3]. Die zilientragenden Zellen sind für die mukoziliäre *Clearance* verantwortlich und die Becherzellen produzieren zusammen mit den submukösen Drüsen die Mukusschicht.

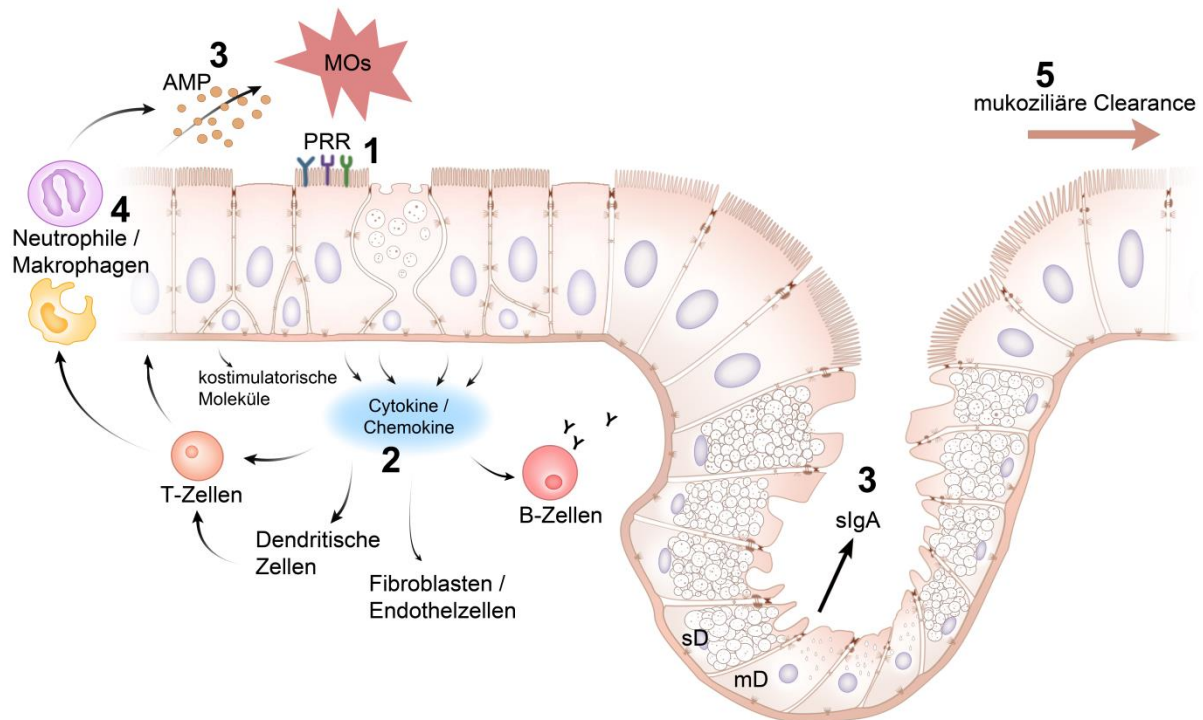
Unter der mukoziliären *Clearance* wird die Reinigung der oberen und unteren Atemwege durch das Zusammenspiel von Mukus und dem Zilienschlag des Flimmerepithels verstanden [1]. Die Anzahl, Struktur und die koordinierte Bewegung der Zilien spielen dabei eine ebenso große Rolle wie die Menge, Viskosität und Eigenschaften des Mukus [1;4]. Die inhalierten Partikel adhärieren an den Mukus und werden über den gerichteten Zilienschlag rachenwärts transportiert, von wo sie verschluckt werden [5]. Das Sekret besteht zu 90 % aus Wasser sowie Elektrolyten, Glykoproteinen und antimikrobiellen Substanzen wie z.B. Lysozym, Lactoferrin, antimikrobiellen Peptiden (AMP) und sekretorischem Immunglobulin A (sIgA) [1;6].



**Abb. 1: Der Aufbau des nasalen Epithels.** Zilientragende Epithelzellen (1), Basalzellen (2), Becherzellen (3) und zilienlose Epithelzellen (4) bilden die Epithelschicht. Sie sind durch *tight junctions*, Desmosomen und *gap junctions* miteinander verknüpft.

Die mechanische Barriere von Epithelien entsteht durch die Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen (Desmosomen, Adhäsionsverbindungen, *tight junctions* und *gap junctions*). Diese Zell-Zell-Verbindungen konnten auch für das nasale Epithel nachgewiesen werden [7-9]. Desmosomen und Adhäsionsverbindungen halten das Epithel durch mechanische Verknüpfung zusammen und bestehen aus Transmembranproteinen der Cadherinfamilie, welche extrazellulär die benachbarten Zellen miteinander verbinden und intrazellulär über Adapterproteine mit dem Cytoskelett interagieren [10]. *Tight junctions* trennen die apikale von der basolateralen Oberfläche und etablieren dadurch die Zellpolarität [7]. Zudem verschließen *tight junctions* den Zellzwischenraum und regulieren damit den parazellulären Fluss an Wasser, Ionen und gelösten Stoffen [11]. *Gap junctions* hingegen dienen der Kommunikation von Zellen miteinander. Sie bestehen aus Connexinen und vermitteln den Austausch von Ionen und Molekülen kleiner als 1 kDa zwischen benachbarten Zellen [12].

Lange wurde das Epithel nur als passive mechanische Barriere angesehen, aber neuere Studien belegen, dass es ein erstaunlich aktiver Teilnehmer der angeborenen Immunität der Atemwege ist [13]. Als Bestandteil der angeborenen Immunabwehr umfasst die Epithelschicht Mustererkennungs-Rezeptoren für die Erkennung pathogener Strukturen von Mikroorganismen, Pilzen und Viren [14] sowie chemische Komponenten wie antimikrobielle Peptide [15] und zelluläre Komponenten wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (Abb. 2).



**Abb. 2: Angeborene Immunabwehr der nasalen Schleimhaut.** Über Mustererkennungs-Rezeptoren (PRR) werden Mikroorganismen (MOs) vom Epithel erkannt (1). Als Reaktion werden Cyto- und Chemokine ausgeschüttet (2), welche auch die Zellen der adaptiven Immunantwort in das Geschehen einbinden. Zudem findet eine Kommunikation mittels kostimulatorischer Moleküle statt. Zur Eindämmung und Abtötung der Mikroorganismen werden antimikrobiell wirksame Substanzen (AMP und sekretorisches IgA) von den Epithelzellen, den serösen (sD) und mukösen (mD) Drüsenzellen und den Effektorzellen wie Makrophagen und Neutrophilen sezerniert (3). Makrophagen und Neutrophile eliminieren zudem mittels Phagozytose die Mikroorganismen (4). Zusätzlich werden inhalierte Partikel und Mikroorganismen mittels mukoziliärer Clearance entfernt (5). Abb. in Anlehnung an [22;23].

Mustererkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRR) sind evolutionär sehr alte Rezeptoren, die hoch konservierte mikrobielle Strukturen [*pathogen associated molecular patterns* (PAMPs)] erkennen [16]. Beispiele für PAMPs sind Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäure (LTA), Peptidoglykan, bakterielle Desoxyribonukleinsäure (DNA) sowie doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA) [16]. Die am besten charakterisierte Klasse der Mustererkennungs-Rezeptoren ist die Familie der *Toll-like*-Rezeptoren (TLR). Alle zehn bekannten humanen TLRs werden von nasalen Epithelzellen exprimiert [17;18]. Die *nucleotide-binding oligomerisation domain* (NOD)-Proteine NOD1 und NOD2, welche Peptidoglykan-Derivate erkennen, kommen intrazellulär im Cytoplasma nasaler Epithelzellen vor [19]. Die Aktivierung von Mustererkennungs-Rezeptoren durch PAMPs induziert über eine Signalkaskade

die Synthese von Cytokinen und antimikrobiellen Substanzen zur Abwehr der Pathogene [16].

Den Übergang zum adaptiven Immunsystem bildet schließlich die Kommunikation der Epithelzellen mit den Zellen der adaptiven Immunantwort über die Ausschüttung von Cytokinen und die Interaktion mittels Rezeptoren [20;21]. Epithelzellen können über Oberflächenmoleküle wie B7, welche als kostimulatorische Moleküle die Aktivierung von T-Zellen regulieren, mit dem adaptiven Immunsystem kommunizieren. Mit Cytokinen wie dem B-Zell-aktivierendem Faktor der TNF-Familie (BAFF), *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) und Interferon (IFN)- $\gamma$  aktivieren und regulieren sie dendritische Zellen, B- und T-Zellen. Die Sekretion von Chemokinen lockt die Zellen des adaptiven Immunsystems an und ermöglicht deren Migration. Bei Versagen der Komponenten dieses Abwehrsystems oder der Fähigkeit, die Homöostase aufrecht zu erhalten, resultiert ein chronisch entzündlicher Prozess [15]. Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, die sich an Grenzflächen manifestieren, wie chronischer Rhinosinusitis (CRS), atopischer Dermatitis (AD) und Morbus Crohn (M. Crohn) hat dies zur Hypothese einer Barriestörung geführt.

## **2 Aspekte bekannter Grenzflächenerkrankungen**

Bei den sogenannten Grenzflächenerkrankungen handelt es sich um multifaktorielle Krankheiten, die sich an verschiedenen Grenzflächen wie z.B. der Darmschleimhaut bei M. Crohn, der Haut bei AD oder dem respiratorischen Epithel bei CRS manifestieren [22;24;25]. Defekte der mechanischen oder immunologischen Barriere werden als Ursache postuliert, die sich auf das antimikrobielle Abwehrsystem auswirken [26]. Diese Defekte können auf genetischer Ebene in Form von Mutationen oder Verwendung besonderer Allele oder auf transkriptioneller und / oder regulatorischer Ebene bei der Genexpression mittels epigenetischer Modifikation [27] oder auf Proteinebene z.B. durch falsche Faltung oder unzureichende Glykosylierung auftreten. Sie können als genetische Defekte von Geburt an vorliegen oder erst im Verlauf des Lebens erworben werden [28;29]. Sie wirken als endogene Faktoren prädisponierend und initiieren im Zusammenspiel mit exogenen Faktoren auf noch ungeklärte Weise die Ausbildung der Krankheit [22;24;25]. Dosis und Kombination der zu Grunde liegen-

den Faktoren scheinen dabei den Schweregrad sowie die Wahrscheinlichkeit zu bestimmen, die Erkrankung zu entwickeln [24;29].

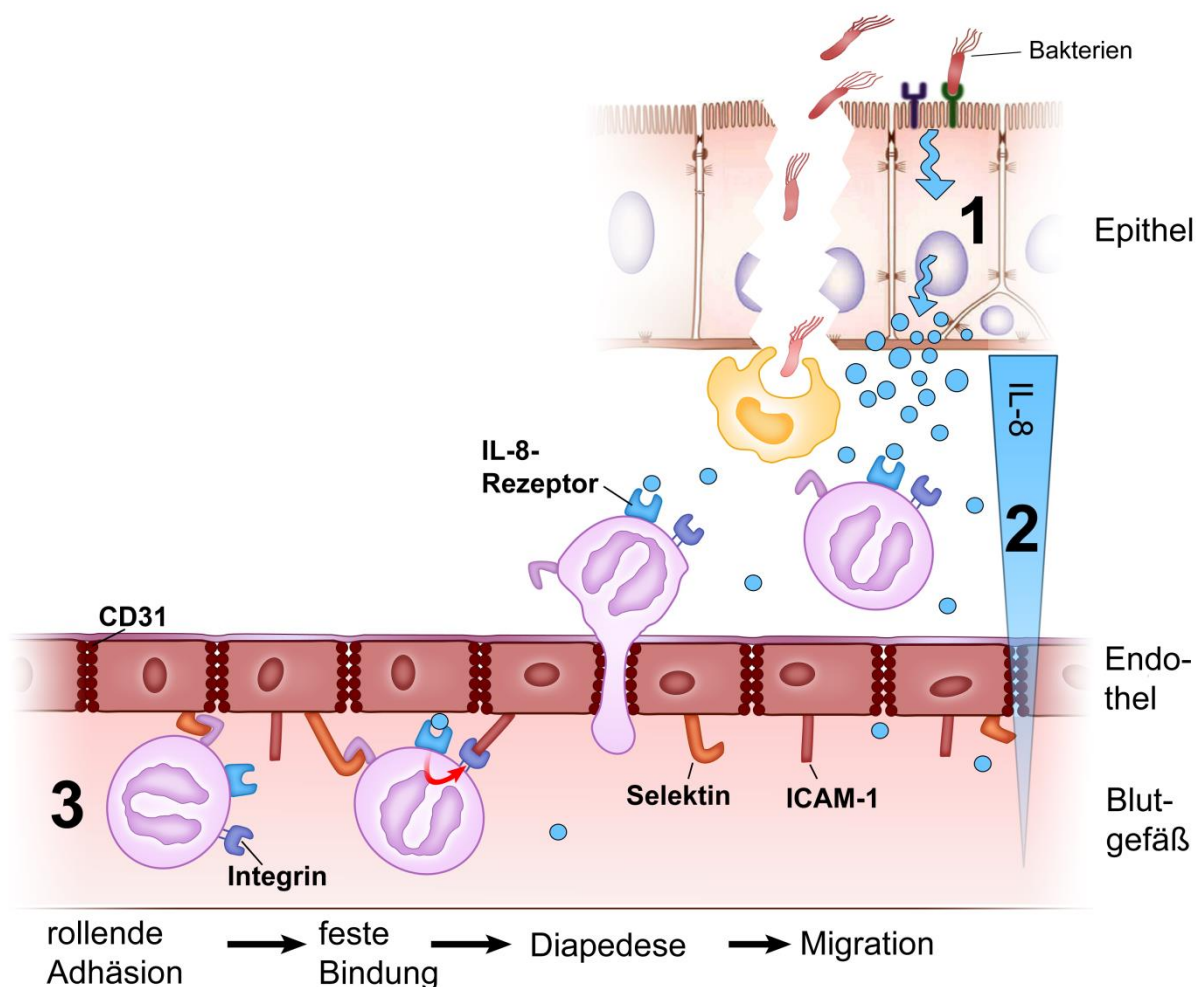
Insbesondere gilt die AD als Modellerkrankung einer durch veränderte Expression epidermaler Strukturproteine beeinträchtigten mechanischen Barriere. Eindrucksvoll ist dies durch den Nachweis der *loss of function*-Mutationen im *FLG*-Gen gezeigt worden, welches Profilaggrin (einen Precursor von Filaggrin) kodiert [30]. Eine reduzierte Filaggrin-Menge bei AD-Patienten führt zu einer reduzierten Fähigkeit der Keratinozyten, Wasser halten zu können, was die Elastizität und mechanische Resistenz der Haut beeinträchtigt [31;32]. Dies erhöht das Risiko des Eindringens von Allergenen, wahrscheinlich durch die Entstehung von Lücken zwischen den geschrumpften Keratinozyten [24].

Eine Beeinträchtigung der immunologischen Barriere liegt bei M. Crohn mit Polymorphismen im *CARD15*-Gen vor, welches den NOD2 Rezeptor kodiert [33;34]. Eine Vielzahl der Mutationen sind im Bereich der *leucine-rich-repeat* (LRR)-Domäne gefunden worden, wodurch die Erkennung des Liganden verhindert sowie die Fähigkeit reduziert ist, den Transkriptionsfaktor *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NFκB) als Antwort auf Stimulation mit beispielsweise dem Liganden Muramyl-dipeptid zu aktivieren [35]. Diese Beeinträchtigung von NOD2 könnte somit zu einem komplexen Defekt führen, der ein erleichtertes Eindringen von Mikroorganismen durch eine beeinträchtigte Bakterienerkennung und reduzierte epitheliale Immunantwort ermöglicht.

Als exogene Faktoren sind z.B. bestimmte Mikroorganismen, Veränderungen der Normalflora oder Allergene anzusehen. Sie modulieren zusammen mit endogenen Faktoren die Ausprägung und den Verlauf der Krankheit, sind aber nicht als primäre ätiologische Agenzien anzusehen [29;36]. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) wird eine mögliche Rolle bei der Pathogenese von CRS und AD zugesprochen [37;38]. Adhärenz-invasive *Escherichia coli* und eine Veränderung der Normalflora bzw. eine geringere Diversität werden als exogene Faktoren bei M. Crohn diskutiert [25;36].

### 3 Die Entzündungsantwort

Der Ablauf einer Entzündung kann in vier Phasen eingeteilt werden: Erkennung des infektiösen Agens, Rekrutierung von Immunzellen zum Entzündungsherd (Abb. 3), Beseitigung des auslösenden Agens und schließlich Auflösung der Entzündung und Übergang zur Homöostase [39].



**Abb. 3: Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zur Entzündung.** 1. Auf die Erkennung der Bakterien werden von den Epithelzellen und Makrophagen Entzündungsmediatoren wie IL-8 ausgeschüttet. 2. Ein Konzentrationsgradient an IL-8 lockt neutrophile Granulozyten an. 3. Im Blutgefäß kommt es durch eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen zu einer rollenden Adhäsion der neutrophilen Granulozyten. Die Bindung von IL-8 an seinen Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung von Integrinen und erlaubt die feste Bindung an ICAM-1. Die Bindung an CD31 ermöglicht den Durchtritt durch das Endothel und schließlich die Migration an den Entzündungsort. Abb. in Anlehnung an [42] und unter Berücksichtigung von [43].

Die Entzündung wird durch Induktoren wie z.B. Signale beschädigter Gewebe, Mikroorganismen, Allergene oder Fremdkörper ausgelöst [40]. Mikroorganismen werden von den Zellen der angeborenen Immunabwehr, in erster Linie gewebsresidente

Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen aber auch Epithelzellen, über Mustererkennungs-Rezeptoren erkannt. Dadurch werden Phagozyten aktiviert und eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Produktion einer Vielzahl verschiedener Entzündungsmediatoren, wie z.B. Cyto- und Chemokinen, vasoaktiven Aminen und Lipidmediatoren führt [40]. Viele dieser Entzündungsmediatoren üben Effekte auf die Gefäße aus (z.B. Gefäßerweiterung und erhöhte Permeabilität) oder dienen der Rekrutierung von Leukozyten [40]. So hat das für diese Arbeit relevante Chemokin Interleukin-8 (IL-8, CXCL8) u.a. chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten [41].

Die Aktivierung des Endothels der Blutgefäße durch proinflammatorische Cytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und IL-1 führt zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen wie Selektinen und Mitgliedern der Immunglobulinsuperfamilie (z.B. *intracellular adhesion molecule 1* - ICAM-1) auf den Endothelzellen [42]. Die im Blutstrom zirkulierenden Leukozyten erkennen den chemotaktischen Reiz über ihre Rezeptoren, werden von den Selektinen reversibel gebunden und rollen so am Endothel entlang. Diese zunächst lockeren Bindungen werden in feste Bindungen überführt, wenn die Leukozyten mit den auf ihrer Zelloberfläche befindlichen, durch die Cytokine aktivierten Integrinen an die ICAM-1-Moleküle des Endothels binden [42]. Weitere Bindungen an Adhäsionsmoleküle in den Zwischenräumen der Endothelzellen (wie CD31) ermöglichen den Leukozyten den Austritt aus der Blutbahn (Diapedese) [42].

Von einem chemotaktischen Konzentrationsgradienten (z.B. IL-8) geleitet, migrieren sie in geordneter Reihenfolge (primär neutrophile Granulozyten, sekundär Monozyten) durch das Gewebe zum Entzündungsherd [39]. Hier werden die neutrophilen Granulozyten durch den direkten Kontakt mit den Mikroorganismen oder durch Cytokine wie TNF- $\alpha$  aktiviert. Sie phagozytieren alle erreichbaren Mikroorganismen oder setzen den Inhalt ihrer Granula frei, um die Mikroorganismen abzutöten [41]. Die Granula enthalten u.a. reaktive Sauerstoff-Spezies und verschiedene Enzyme, die nicht nur auf Mikroorganismen wirken, sondern auch Schäden im Gewebe verursachen [39].

An eine erfolgreiche Entzündungsantwort mit der Eliminierung des auslösenden Agens schließt sich die Phase der Auflösung der Entzündung und der Reparatur an, welche hauptsächlich von gewebsresidenten und neu rekrutierten Makrophagen vermittelt wird [44]. Hier findet ein Wechsel in der Ausschüttung der Lipidmediatoren von proinflammatorischen Prostaglandinen zu anti-inflammatorischen Lipoxinen statt [40]. Lipoxine stoppen den Influx neutrophiler Granulozyten und fördern die Aufnahme apoptotischer neutrophiler Granulozyten durch Makrophagen [39]. Zusätzlich sind weitere Lipidmediatoren wie Resolvine und Protektine sowie Wachstumsfaktoren wie *transforming growth factor-β* (TGF-β) an der Auflösung der Entzündung beteiligt und initiieren die Gewebsneubildung [44;45].

Bei Versagen des geregelten Ablaufs der akuten Entzündungsantwort bis zur Terminierung persistiert der entzündliche Prozess und erwirbt neue Charakteristika. Das Infiltrat aus neutrophilen Granulozyten wird durch Makrophagen ersetzt und im Falle von Infektionen auch durch T-Zellen [40]. Wenn die kombinierten Effekte dieser Zellen weiterhin unzureichend sind, das auslösende Agens zu entfernen, entsteht ein chronisches Stadium mit der Bildung von Granulomen und tertiären lymphoiden Geweben [46;47]. Die Granulombildung ist dabei der Versuch, das auslösende Agens einzuhüllen und somit den Wirt zu schützen [47].

Bei der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, Wegener) besteht das Granulom u.a. aus T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und Makrophagen sowie mehrkernigen Riesenzellen (entstanden aus der Fusion von Makrophagen [47]) und neutrophilen Granulozyten [48].

#### **4 Die GPA - eine Grenzflächenerkrankung?**

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ist eine seltene, komplexe Autoimmunerkrankung, die zur Gruppe der primären Kleingefäß-Vaskulitiden gehört. Erstmals wurde im Jahre 1931 von H. Klinger über einen Patienten mit destruierender Sinusitis, Nephritis und Vaskulitis berichtet [49]. Im Jahre 1939 wurde die Erkrankung von Friedrich Wegener als „eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren“ von der Panarteriitis nodosa abgegrenzt und als eigenständige Entität beschrieben [50]. Kürzlich wurde die zuvor als „Wege-



ner'sche Granulomatose“ [51] bekannte Krankheit in Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener) umbenannt [52].

Die jährliche Inzidenz der GPA wird mit 8-20 Erkrankten pro 1 Million Einwohner angegeben [53-55]. Sie kann in jedem Alter auftreten. Die Erstdiagnose erfolgt jedoch häufig bei 40- bis 60-jährigen Patienten, wobei Männer und Frauen etwa gleich häufig betroffen sind [56;57].

Charakteristisch für die GPA ist eine chronische nekrotisierende, granulomatöse Entzündung des oberen und unteren Respirationstraktes mit nekrotisierender Vaskulitis der kleinen und mittleren Blutgefäße und das Auftreten spezifischer, gegen Proteinase 3 (PR3) gerichteter anti-Neutrophiler cytoplasmatischer Antikörper (ANCA) [58]. ANCA stellen eine Gruppe von Auto-Antikörpern mit verschiedenen Antigen-Spezifitäten dar. Sie sind vorwiegend gegen Enzyme gerichtet, die in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten lokalisiert sind. Durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung lassen sich in diesen Zellen C-ANCA mit einem diffusen cytoplasmatischen [59] von P-ANCA mit einem perinukleären Fluoreszenzmuster [60] unterscheiden. Als Zielantigene wurden überwiegend PR3 für die C-ANCA [61] und vornehmlich die Myeloperoxidase für die P-ANCA identifiziert [60]. Hohe oder steigende ANCA-Titer sind häufig mit Rezidiven assoziiert [62;63].

Die GPA existiert als auf den oberen Respirationstrakt beschränkte, lokalisierte Erkrankung (5 % aller GPA-Patienten [64]), geht aber in den meisten Fällen nach einer variablen Zeitspanne in ein generalisiertes Stadium (oft mit Lungen- und Nierenbeteiligung) über. Bei bis zu 80 % aller GPA-Patienten ist die nasale Mukosa im Verlauf der Erkrankung involviert, oft als bevorzugter Ort der Erstmanifestation [65;66].

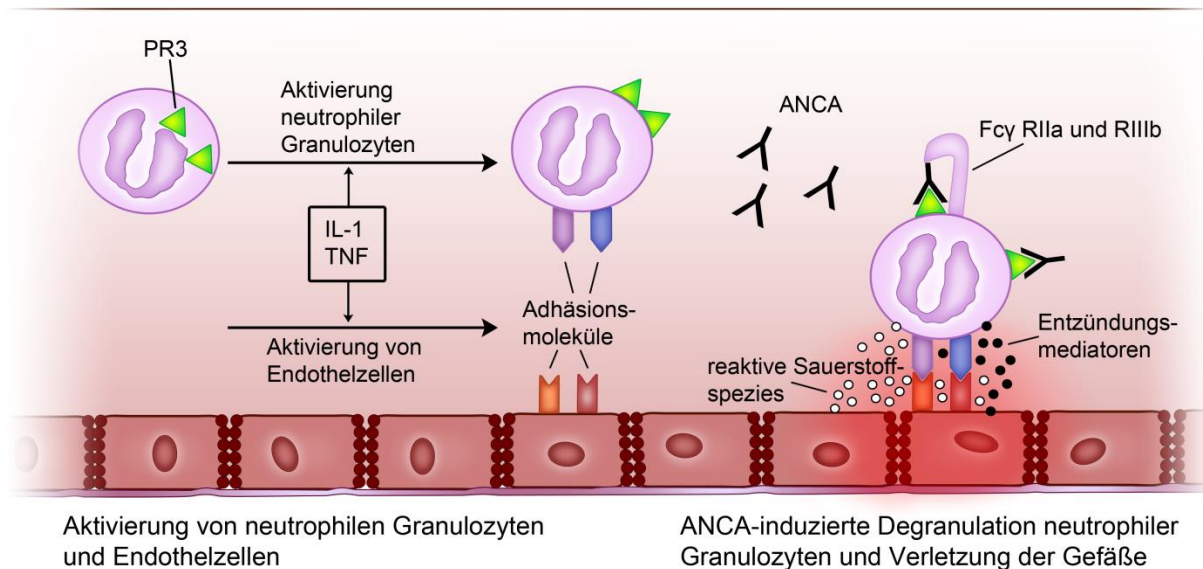
#### **4.1 Pathophysiologische Vorstellungen zur Krankheitsentstehung**

Zur Frühpathogenese der GPA existieren verschiedene Hypothesen. Nach der ANCA-Cytokin-Sequenztheorie ist die Interaktion zwischen den ANCA, den neutrophilen Granulozyten und dem Endothel zentraler Bestandteil der Krankheitsentstehung und induziert die Vaskulitis (Abb. 4, [67;68]). Demgegenüber steht die Hypothese, dass die Krankheitsentstehung nicht primär über die Vaskulitis verläuft, sondern

im Respirationstrakt über eine fehlgeleitete zelluläre Immunantwort auf ein endo- oder exogenes Antigen beginnt (Abb. 5, [68;69]). Beide Hypothesen werden im Folgenden eingehend erläutert.

#### 4.1.1 ANCA-Cytokin-Sequenztheorie

Das Zielantigen PR3 befindet sich innerhalb der azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten sowie in den monozytären Lysosomen [70] und ist somit für im Blutstrom zirkulierende Autoantikörper unter physiologischen Bedingungen nicht zugänglich. Folglich kann eine Interaktion der ANCA mit ihrem Zielantigen nur dann zustande kommen, wenn die Antigene vom Zellinneren auf die Zelloberfläche transloziert werden. *In vitro* erfolgt eine solche Antigen-Translokation nach Stimulation neutrophiler Granulozyten mit geringen Mengen proinflammatorischer Cytokine [71]. Dieser Vorgang wird als *Priming* bezeichnet. Neben dieser durch Cytokine induzierten PR3-Membranexpression existiert jedoch auch eine geringe basale PR3-Expression auf der Zellmembran neutrophiler Granulozyten. Bei Patienten mit aktiver GPA ist diese erhöht und korreliert mit der Rezidivrate [72;73].



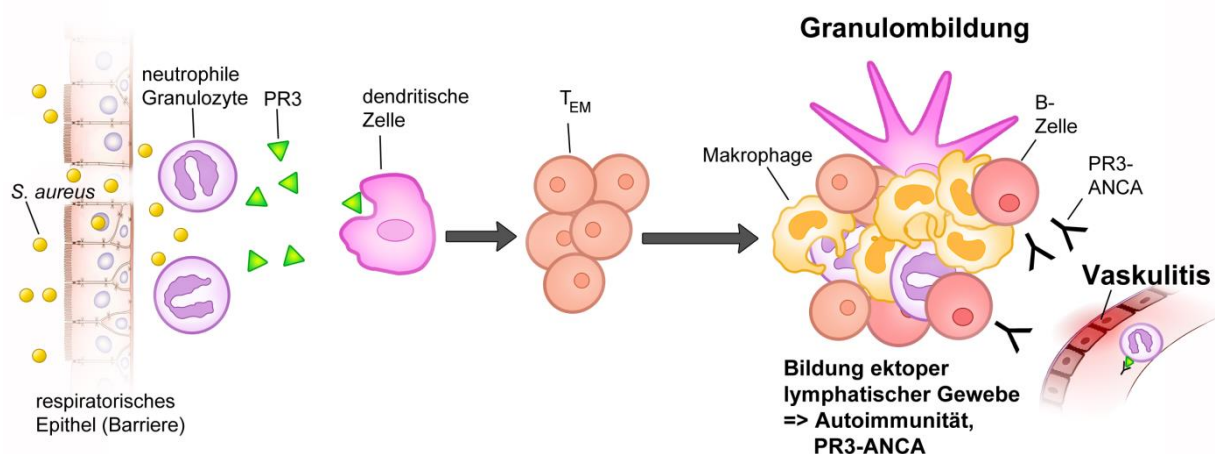
**Abb. 4: Modell der ANCA-Cytokin-Sequenztheorie.** Darstellung der potentiellen Rolle der ANCA bei der Pathogenese der systemischen Vaskulitis (in Anlehnung an Sarraf und Sneller, 2005 [68]).

Im Rahmen einer Antwort auf einen lokalen Entzündungsreiz kommt es ebenfalls durch proinflammatorische Cytokine zu einem *Priming* neutrophiler Granulozyten.

Während diese unter physiologischen Umständen (also in Abwesenheit von ANCA) jedoch aus den Gefäßen auswandern und erst am Entzündungsort ihre volle Aktivität mit der Freisetzung toxischer Substanzen aus den Granula erreichen, erfolgt in Anwesenheit von ANCA ihre Aktivierung schon während der Diapedese, da die ANCA an das auf der Oberfläche der geprierten neutrophilen Granulozyten befindliche PR3 binden [74-76]. Die dabei freigesetzten Substanzen führen zur Schädigung der Endothelzellen [76] und lösen die Entstehung fibrinoider Gefäßwandnekrosen [77;78] aus.

#### 4.1.2 Fehlgeleitete zelluläre Immunantwort im Respirationstrakt

Eine Barrierestörung des respiratorischen Epithels führt u.a. zu einer Besiedlung mit *S. aureus* und zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. Aus diesen freigesetzte PR3 aktiviert dendritische Zellen mit konsekutiver Expansion von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{EM}$ ) und Granulombildung.  $T_{EM}$  erhalten die chronisch granulomatöse Entzündung aufrecht und fördern die Ausbildung ektooper lymphatischer Gewebe in den granulomatösen Läsionen. Hieraus resultiert die Bildung von PR3-ANCA durch autoreaktive Plasma-Zellen, welche die autoimmune Vaskulitis induzieren [69]. Zu den prädisponierenden Elementen gehören u.a. endogene genetische oder epigenetische und exogene Faktoren, wie in den nachfolgenden Abschnitten ausgeführt.



**Abb. 5:  $T_{EM}$  als treibende Kraft der Granulomentstehung.** Endogene und exogene Faktoren bedingen eine Barrierestörung des respiratorischen Epithels mit konsekutiver chronisch-granulomatöser Entzündung und Ausbildung tertiärer lymphatischer Strukturen sowie Reifung von B-Zellen (in Anlehnung an Lamprecht et al., 2006 [69]).

## 4.2 Genetische und epigenetische Einflussfaktoren

Bei der Entwicklung der GPA wird davon ausgegangen, dass genetische Aspekte zur Pathogenese beitragen. Als multifaktorielle Krankheit ist dieser Einfluss polygen und jeder Anteil trägt zum Krankheitsrisiko bei [79]. Eine Vielzahl an Kandidaten-Gen-Ansätzen wurde bislang angewendet, um die relevanten Gene zu identifizieren und eine erste genomweite Assoziationsstudie befindet sich derzeit in der Auswertung [80].

Assoziationen von Allelen bzw. Haplotypen der humanen Leukozyten-Antigen (HLA)-Region wurden für viele Autoimmunerkrankungen beschrieben [81]. Bei der GPA existiert eine starke Assoziation mit dem HLA-Allel *DPB1\*0401* auf Chromosom 6p21.3 [82]. Dieses Allel ist bei der GPA deutlich überrepräsentiert und mit einem positiven Autoantikörperstatus assoziiert [83;84]. Bestimmte HLA-Allele führen offenbar zu einer Konfiguration der Peptide des Haupthistokompatibilitätskomplexes, welche die Präsentation distinkter (Auto-) Antigene erleichtern [80]. Neben den nachfolgend erläuterten genetischen Assoziationen bei der GPA ist HLA-DPB1 der am stärksten mit der Krankheit assoziierte Genloкус [79;81].

Das *PTPN22\*620 W*-Allel wurde auch für andere Autoimmunerkrankungen als Risikofaktor identifiziert und kommt vorwiegend bei ANCA-positiven GPA-Patienten in erhöhter Frequenz vor [85;86]. Das Gen *PTPN22* kodiert eine Tyrosinphosphatase, die u.a. in T-Zellen exprimiert wird und die Signaltransduktion über den T-Zellrezeptor inhibiert [85]. Der Austausch von Arginin zu Tryptophan an der Position 620 (*PTPN22\*620 W*) bewirkt eine verminderte T-Zell-Signaltransduktion, wobei bisher nicht genau verstanden ist, wie diese Mutation zur Autoimmunität beiträgt [85].

Bei der GPA wurde ein erhöhtes Auftreten des Defizienzallels *Pi\*Z* des  $\alpha$ -1-Antitrypsin-Gens beobachtet [87-90].  $\alpha$ -1-Antitrypsin wird von einem polymorphen Gen mit über 75 Allelen kodiert, welche zur Ausbildung eines stark, mittel oder nicht beeinträchtigten Proteaseinhibitor-Phänotyps beitragen. Die beiden elterlichen Allele werden kodominant exprimiert, der Grad einer Defizienz wird durch verschiedene Kombinationen der Defizienzallele bestimmt. Dabei trägt das Z-Allel zu dem stark beeinträchtigten Phänotyp bei [89]. Da  $\alpha$ -1-Antitrypsin das Autoantigen der GPA, die Proteinase 3, inhibieren kann [91], könnte sich eine eingeschränkte Funktion dieses

Inhibitors negativ auswirken, indem es die „Verfügbarkeit“ von PR3 erhöht, was mit einer erhöhten Rezidivrate in Verbindung gebracht wurde [92]. Eine weitere Studie mit homozygoten *Pi\*ZZ*-Trägern bei verschiedenen Krankheiten zeigte jedoch, dass die meisten von ihnen nicht an einer Vaskulitis erkrankt sind [93]. Dementsprechend ist eine  $\alpha$ -1-Antitrypsin-Defizienz nicht ausreichend, eine ANCA-positive Vaskulitis zu induzieren, sondern stellt nur einen weiteren Amplifikationsfaktor dar. Weitere Studien zu Leukozyten-Adhäsionsmolekülen, Cytokinen, Fc $\gamma$ -Rezeptoren und anderen entzündungsrelevanten Proteinen wurden durchgeführt, konnten aber nur widersprüchliche Ergebnisse oder keine Assoziationen zeigen [79;81;94].

Unter Epigenetik werden Mechanismen verstanden, die stabile Veränderungen der Genexpression verursachen, ohne jedoch die Nukleotidsequenz zu beeinflussen [95]. Gegenwärtig sind drei verschiedene Mechanismen epigenetischer Modifikation bekannt: DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und RNA-Interferenz [96]. In einer Studie von Ciavatta *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Histon-Modifikation und die DNA-Methylierung in die erhöhte Expression von PR3 und MPO bei ANCA-assoziierten Vaskulitis-Patienten involviert sind [97]. Die Trimethylierung des Histons H3 am Lysin 27 (H3K27me3) supprimiert die Gentranskription [98]. In neutrophilen Granulozyten ANCA-assoziiierter Vaskulitis-Patienten ist die Menge von H3K27me3 an den PR3- und MPO-Genen verringert. Der Transkriptionsfaktor RUNX3 (*Runt-related transcription factor 3*) reprimiert die Expression von PR3 und MPO. In neutrophilen Granulozyten ANCA-assoziiierter Vaskulitis-Patienten liegt jedoch eine DNA-Hypermethylierung der Promotorregion dieses Transkriptionsfaktors vor, die dessen Expression supprimiert. Diese beiden Mechanismen sorgen dafür, dass die Gene im Vergleich zu gesunden Kontrollen, bei welchen die Transkription „ausgeschaltet“ (*silenced state*) ist, abnorm transkribiert werden. Eine mögliche Folge eines solchen fehlerhaften *gene silencing* kann die Transkription des Autoantigen-Gens von beiden DNA-Strängen sein, wodurch auch Anti-Sense-Transkripte und entsprechend komplementäre Autoantigene entstehen können [99] (siehe auch Abschnitt I 4.5).

### **4.3 Mechanische Barriere**

Bei der GPA gibt das Vorliegen einer Verdickung der Mukosa der Nasenhaupthöhle und -nebenhöhlen [100;101] einen Hinweis auf eine Beeinträchtigung der strukturel-

---

len Integrität des nasalen Epithels. Eine erhöhte Permeabilität des nasalen Epithels oder Veränderungen von Protease-Konzentrationen und ihrer Inhibitoren sind aus der Literatur für die GPA nicht bekannt. Ebenso wenig existieren Studien zu Zell-Zell-Verbindungen des nasalen Epithels. Ein bedeutender Aspekt der mechanischen Barriere ist die mukoziliäre *Clearance*. Bei GPA-Patienten ist die Schlagfrequenz der Zilien nasaler Epithelzellen im Gegensatz zu gesunden Kontrollpatienten und an anderen Autoimmunerkrankungen leidenden Patienten signifikant erniedrigt und somit die ziliäre Funktion stark beeinträchtigt. Dies könnte zu einem prolongierten Kontakt potenziell schädigender inhalierter Agenzien mit dem Epithel führen [4].

#### **4.4 Immunologische Barriere**

Erste Hinweise auf Veränderungen der angeborenen Immunität bei GPA-Patienten geben Studien, die sich mit TLRs befassen [102]. *In vitro* können periphere mononukleäre Zellen des Blutes von GPA-Patienten mit CpG-reicher DNA und IL-2 zur Synthese von PR3-ANCA stimuliert werden [103]. Da CpG ein TLR9-Ligand ist, wird von den Autoren eine TLR9-assoziierte ANCA-Produktion vorgeschlagen. Des Weiteren konnte eine erhöhte Expression von TLR 2, 4 und 9 auf zirkulierenden Leukozyten von ANCA-assoziierten Vaskulitis-Patienten beobachtet werden, zu denen auch die GPA-Patienten gehören [104]. Da keine Erkenntnisse zu TLRs des nasalen Epithels vorliegen, geben die Studien nur indirekte Hinweise auf mögliche Veränderungen und legen die Hypothese nahe, mögliche Veränderungen der TLR-Expression des nasalen Epithels zu untersuchen. Zu den NOD-*like*-Rezeptoren (NLR) liegen keine Studien vor, die eine Beeinträchtigung bei der GPA aufzeigen. Die bei Morbus Crohn bekannten Polymorphismen im NOD2-Gen sind nicht mit der GPA assoziiert [105].

In Hinblick auf antimikrobiell wirksame Substanzen konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen von Defensinen (humanes  $\beta$ -Defensin hBD-2 und humane Peptide aus Neutrophilen HNP1-3) im Serum sowie in bronchoalveolärer Lavage bei GPA-Patienten erhöht sind, was eine Rolle von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensinen bei der Pathogenese der GPA nahelegt [106;107]. Bezogen auf das nasale Epithel liegen zurzeit keine Studien zu antimikrobiell wirksamen Substanzen vor.

Epithelzellen können über Rezeptoren und kostimulatorische Moleküle sowie Cyto- und Chemokine mit den Zellen der adaptiven Immunantwort kommunizieren. Studien zu Veränderungen von Rezeptoren oder kostimulatorischen Molekülen des nasalen Epithels von GPA-Patienten liegen nicht vor. Die Konzentration an BAFF, der auch von nasalen Epithelzellen gebildet werden kann [108], ist im Serum von GPA-Patienten erhöht [109;110]. Dieser Faktor ist ein wichtiges Molekül der Kommunikation von Epithelzellen mit B-Zellen [21] und könnte die Produktion von Autoantikörpern durch verlängertes Überleben und Proliferieren von B-Zellen beeinflussen [109] und damit zur Pathogenese der GPA beitragen. In diesen Zusammenhang könnte auch die bei Leukozyten von GPA-Patienten erhöhte Expression des sekretorischen Leukozytenproteinaseinhibitors (SLPI) [111] eingeordnet werden, da BAFF hauptverantwortlich für den Klassenwechsel der Antikörper ist und dieser Vorgang durch SLPI reguliert wird [112]. Fraktalkin vermittelt die Kommunikation von Epithelzellen und dendritischen Zellen und sorgt so dafür, dass die Ausläufer intraepithelialer dendritischer Zellen zwischen den Epithelzellen hindurch ins Lumen hinein reichen, um antigenes Material von der Oberfläche zu sammeln [21]. Fraktalkin konnte in der nasalen Mukosa detektiert werden [113] und ist im Plasma von GPA-Patienten erhöht [114]. Dies könnte einen weiteren Hinweis auf eine eventuell veränderte Kommunikation von Epithelzellen mit anderen Zellen geben, auch wenn direkte Untersuchungen zu nasalen Epithelzellen bislang noch fehlen.

Das Cytokinmuster der nasalen Mukosa ist bislang wenig untersucht. In den nasalen Granulomen scheint es in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium zu variieren. Bei der lokalisierten GPA herrscht das TH1-Profil [48], bei der generalisierten GPA hingegen das TH2-Profil [115] vor. Die grobe Unterscheidung in TH1- und TH2-Profil beruht auf den von unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen freigesetzten Cytokinen (TH1: IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2; TH2: IL-4, IL-5), die den Reaktionstyp und die weitere Immunantwort bestimmen [116].

#### **4.5 Exogene Faktoren**

*S. aureus* scheint ein für die Pathogenese der GPA wichtiger exogener Faktor zu sein. So haben epidemiologische Studien deutlich höhere nasale Besiedlungsraten mit diesem Keim bei GPA-Patienten (60 - 82 %) im Vergleich zu gesunden Kontrollen

(25 %) gezeigt und die chronische nasale Besiedlung mit *S. aureus* stellt einen Risikofaktor für das Auftreten von Rezidiven dar [117-119]. Zudem ist sie mit einer höheren Krankheitsaktivität in der Nase assoziiert [117]. In einer Studie von Richter *et al.* konnte in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von GPA-Patienten im Gegensatz zu gesunden Kontrollen häufiger ein Wachstum von Pathogenen (insbesondere von *S. aureus*) festgestellt werden. Zudem waren die meisten der *S. aureus*-BAL-positiven GPA-Patienten gleichzeitig nasal mit *S. aureus* kolonisiert [120].

Das Auffinden *S. aureus*-spezifischer adaptiver Immunantworten gibt weitere Hinweise auf eine mögliche pathophysiologische Rolle dieses Bakteriums bei der GPA. So üben staphylokokkale Superantigene eine stark stimulierende Wirkung auf Immunzellen aus [z.B. Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1) auf T-Zellen und Protein A auf B-Zellen]. Für GPA-Patienten konnte ein Zusammenhang der nasalen Besiedlung insbesondere mit TSST-1-positiven *S. aureus*-Stämmen und dem Auftreten von Rezidiven gezeigt werden [121]. Voswinkel *et al.* konnten in nasalen Granulomen lymphoide Infiltrate mit über 30 % B-Zellen nachweisen. Zudem wurde in diesen Biopsien das Genrepertoire der variablen Region der schweren Kette (VH, *variable heavy chain*) von Immunglobulinen analysiert, welches eine Prädominanz von B-Zellen der VH3-Familie mit Affinität sowohl zu PR3 als auch zu Protein A von *S. aureus* andeutet. Diese Granulome könnten somit lymphoide Strukturen darstellen, in denen die Produktion von Autoantikörpern durch mikrobielles Einwirken lokal hervorgerufen wird [122;123]. Zudem wurde eine *S. aureus*-Spezifität bei T-Zell-Klonen aus peripheren Blutlymphozyten von GPA-Patienten aufgefunden [124].

Weitere Mikroorganismen könnten ebenfalls in die Pathogenese der GPA involviert sein. Eine mögliche pathologisch relevante Rolle gram-negativer Bakterien bei der Entstehung der für die GPA bedeutsamen ANCA wird durch den kürzlich entdeckten Autoantikörper gegen das lysosomale Membranprotein 2 (LAMP-2) deutlich. Eines der erkannten Epitope zeigt eine 100 %-ige Homologie zu FimH, einem Adhäsins der Fimbrien gram-negativer Bakterien wie *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Proteus mirabilis*. Zudem konnte sowohl eine Interaktion beider Strukturen als auch eine der Antikörperbildung vorausgehende Infektion mit fimbrientragenden Mikroorganismen bei den betroffenen Patienten nachgewiesen werden. Daraufhin wurde die



Hypothese einer FimH-bedingten Synthese von Autoantikörpern gegen LAMP-2 über molekulares Mimikry vorgeschlagen [125;126].

Pendergraft *et al.* liefern einen weiteren Hinweis auf mikrobielle Auslöser der GPA, indem sie zeigen konnten, dass bei PR3-ANCA-positiven Patienten komplementäres PR3 (cPR3, ein Peptid, welches vom antisense-orientierten DNA-Strang von PR3 translatiert wird) sowohl zur Synthese von anti-cPR3- als auch von anti-PR3-Autoantikörpern führt. Genetische Sequenzen für cPR3-Peptide konnten bei verschiedenen Mikroorganismen wie z.B. *S. aureus*, *Entamoeba histolytica* und Ross-River-Virus identifiziert werden und könnten über molekulares Mimikry zur ANCA-Synthese beitragen [127].

Die Beteiligung des Respirationstraktes als charakteristisches Merkmal der GPA legt eine pathogenetische Rolle inhalierter Agenzien nahe. Allerdings konnten weder für verschiedene Arten inhalierter Agenzien noch für saisonale Einflüsse Unterschiede zwischen GPA-Patienten und Kontrollen identifiziert werden [128;129].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Gegensatz zu den im Abschnitt 2 erörterten Grenzflächenerkrankungen bei der GPA die Bedeutung endogener und exogener Faktoren für die granulomatöse Entzündung im Respirationstrakt bisher weitestgehend ungeklärt ist und somit die Frage noch nicht beantwortet werden kann, ob die GPA ebenfalls als Grenzflächenerkrankung angesehen werden kann. Daher bildet dies den thematischen Hintergrund zu dieser Arbeit.

## **5 Hypothese und Zielsetzung**

Über die pathophysiologischen Vorgänge einer möglicherweise gestörten nasalen Grenzfläche bei der GPA war bislang wenig bekannt. Diese Arbeit verfolgt die Hypothese, dass exogene Faktoren aufgrund eines Defektes im Abwehrsystem der nasalen Mukosa auf eine Prädisposition (z.B. genetischer oder epigenetischer Ursache) treffen und durch bisher unverstandene Mechanismen zur Ausbildung der Erkrankung führen. Damit würden ähnliche pathophysiologische Voraussetzungen wie bei anderen Grenzflächenerkrankungen vorliegen. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle endogener und exogener Faktoren im Hinblick auf eine eventuell gestörte nasale

Grenzfläche bei der GPA zu definieren. Daraus ergeben sich die folgenden Fragestellungen:

- a) Unterscheidet sich das Genexpressionsmuster der nasalen Mukosa von GPA-Patienten von demjenigen der Kontrollgruppen?
- b) Unterscheiden sich die Cytokinprofile nasaler Epithelzellen von GPA-Patienten von Normalkontrollen?
- c) Reagieren nasale Epithelzellen von GPA-Patienten auf Stimulation mit *S. aureus* anders als Epithelzellen von Kontrollpatienten bezüglich ihrer IL-8- und AMP-Sekretion?
- d) Lassen sich Unterschiede bei den Konzentrationen antimikrobieller Peptide in Nasensekreten von GPA-Patienten im Vergleich zu den Kontrollgruppen feststellen?
- e) Gibt es einen Einfluss endonasaler Besiedlung mit *S. aureus* auf die AMP-Konzentrationen der Nasensekrete?
- f) Lässt sich eine intrazelluläre Akkumulation von *S. aureus* in der nasalen Mukosa von GPA-Patienten nachweisen?
- g) Inwiefern erweist sich die Etablierung transformierter GPA-Zelllinien für funktionelle Analysen gegenüber primären Zellkulturen als nützlich?

## II Materialien, Methoden und Patienten

### 1 Materialien und Geräte

#### 1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Acrylamid	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Agarose	Life Technologies, Karlsruhe
Albumin-Fraktion V, BSA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure, ABTS	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid, DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Diethylpyrocarbonat, DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N,N-Dimethylformamid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
dNTP-Mix	Bioline GmbH, Luckenwalde
ECL-Substrat, Pierce ECL Westerblot-Substrat	Thermo Scientific, Karlsruhe
Essigsäure, 100 %, wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol, 96 %, vergällt	Büfa Chemikalien GmbH & Co.KG; Hude/Altmoorhausen
Ethanol, absolut	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid, UltraPure™, 10 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat, EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Eukitt® schnell aushärtendes Eindeckmedium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FBS Superior, standardisiert, auf Mykoplasmen und Endotoxin getestet	Biochrom AG, Berlin
Fluoreszenzeindeckmittel, ProLong Gold antifade reagent	Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Darmstadt
Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
4 %-ige Formaldehydlösung, gepuffert	Walter-CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Formaldehydlösung min. 35 %	Merck KGaA, Darmstadt
FuGENE® HD Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Gelladepuffer, 6x	New England Biolabs, Frankfurt
Gentamycin	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Glutaraldehyd, 25 %-ige wässrige Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin, wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Hämalaunlösung, Mayers	Merck KGaA, Darmstadt
Hexadimethrinbromid, Polybren	Sigma-Aldrich, Steinheim
Igepal CA 630, Nonidet P 40	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat III	Walter GmbH & Co. KG, Kiel
Kaliumhexacyanoferrat (II)-Trihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Klebstoff, ablösbar	Herma GmbH, Filderstadt
Kupfer(II)-sulfat, wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt
Liquid Fast-Red Substratsystem	Thermo Fisher Scientific Inc., Fremont, USA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	E. Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-propanschwefelsäure, MOPS	Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat, wasserfrei	E. Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat	E. Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat	E. Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge	Merck KGaA, Darmstadt
Normalserum von Schwein, Kaninchen, Ziege	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Kupfer(II)-Sulfat, wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt
Paraffin, Paraplast Plus, Gewebe-Einbettmedium	McCormick Scientific LLC., St. Louis, USA
Paraformaldehyd	E. Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin, 10.000 u; 10.000 $\mu$ g/ml	Biochrom AG, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
ortho-Phosphorsäure, 85 %	E. Merck, Darmstadt
Primer (bmi-1, GAPDH)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Roti <sup>®</sup> -ImmunoBlock	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck KGaA, Darmstadt
SDS, ultra pure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung, BD-OptEIA <sup>™</sup> TMB-Substrat-Reagenz-Set	BD Biosciences, San Diego USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, TEMED	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, ULTROL <sup>®</sup>	EMD Chemicals Inc., San Diego, USA

Bezeichnung	Hersteller
Triton X 100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-Hydrochlorid, Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau, 0,5%	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/EDTA-Lsg. (10x); 0,5 %/0,2 % (w/v), in (10x) PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasser für die Molekularbiologie, DNase-, RNase- und Protease-frei	5-Prime, Hamburg
Wasserstoffperoxid 30 %	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
X-Gal	BioTech Trade & Service GmbH, St.Leon-Rot
Xylolersatz XEM-200	National diagnostics; Vogel GmbH KG, Giessen

## 1.2 Enzyme, Proteine und Peptide

Bezeichnung	Hersteller
Dispase aus Bacillus polymyxa	Invitrogen GmbH, Darmstadt
LL-37-Peptid	Innovagen, Lund, Schweden
DNase Set, RNase-Free	Qiagen GmbH, Hilden
HotGoldStar DNA-Polymerase	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
Precision Plus, zweifarbige Proteinstandards	Bio-Rad Laboratories, München
Rekombinantes humanes BD-3	PeproTech GmbH, Hamburg
RNase 7, nativ	Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität zu Kiel [152]
Streptavidin-HRP	R&D Systems, Minneapolis, USA
Streptavidin-POD	Roche Diagnostics, Mannheim

## 1.3 Primärantikörper

Humanes Zielprotein	Bezeichnung (Klon)	Spezies, Anwendung*, Verdünnung	Hersteller
Bmi-1	anti-Bmi-1 (F6)	Maus, WB, 1 µg/ml	Millipore GmbH, Schwalbach
Cytokeratin 7	anti-Cytokeratin 7 (OV-TL 12/30)	Maus, IMH 1:50, ICC 1:100	Dako, Glostrup, Dänemark
Cytokeratin 18	anti-Cytokeratin 18 (DC 10)	Maus, IMH 1:50, ICC 1:100	Dako, Glostrup, Dänemark
Cytokeratin 19	anti-Cytokeratin 19 (BA17)	Maus, IMH und ICC, 1:50	Dako, Glostrup, Dänemark
E-Cadherin	anti-E-Cadherin (polyklonal, H-108)	Kaninchen, IF, 1 µg/ml	Santa Cruz Inc., Heidelberg
hBD3	anti-hBD3/DEFB103 (polyklonal)	Kaninchen, ELISA, 0,6 µg/ml	Acris Antibodies GmbH, Herford
hBD3	anti-hBD3/DEFB103, biotinyliert (polyklonal)	Kaninchen, ELISA 0,25 µg/ml, IMH 5 µg/ml	Acris Antibodies GmbH, Herford

Humanes Zielprotein	Bezeichnung (Klon)	Spezies, Anwendung*, Verdünnung	Hersteller
LL-37	anti-LL-37 (polyklonal)	Kaninchen, ELISA 0,5 µg/ml	Innovagen, Lund, Schweden
LL-37	anti-LL-37, biotinyliert (polyklonal)	Kaninchen, ELISA 0,25 µg/ml, IMH 6 µg/ml	Innovagen, Lund, Schweden
Protein A	anti-Protein A (polyklonal)	Maus, IF; 20,75 µg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNase 7	anti-RNase 7/R7 (polyklonal)	Ziege, ELISA, 1 µg/ml; biotinyliert: 1,3 µg/ml (ELISA), 26 µg/ml (IMH)	Dermatologie, Kiel [152]
S100A7	anti-S100A7 (HL15-4)	Maus, IMH, 1,25 µg/ml	Dermatologie, Kiel [257]
TLR4	anti-TLR4 (H-80, polyklonal)	Kaninchen, IMH, 3 µg/ml	Santa Cruz Inc., Heidelberg

\* ICC: Immuncytochemie, IF: Immunfluoreszenz-Färbung, IMH: Immunhistochemie, WB: Westernblot

## 1.4 Sekundärantikörper und Fab-Fragmente

Bezeichnung	Anwendung*, Verdünnung	Hersteller
AlexaFluor® 488 F(ab') <sub>2</sub> -Fragment aus Ziege, anti-Maus-IgG (H+L)	IF, 2 µg/ml	Invitrogen, Karlsruhe
AlexaFluor® 546 F(ab') <sub>2</sub> -Fragment aus Ziege, anti-Kaninchen-IgG (H+L)	IF, 2 µg/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Affinitätsgereinigtes F(ab') <sub>2</sub> -Fragment aus Kaninchen, anti-Ziege-IgG (H+L), biotinyliert	IMH, 1,4 µg/ml	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA
Affinitätsgereinigtes Ziegen-IgG, anti-Maus-IgG + IgM (H+L), Peroxidase-konjugiert	WB, 100 ng/ml	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK
Kaninchen-Immunglobulin, anti-Maus, biotinyliert	IMH 6,5 µg/ml; ICC 13 µg/ml	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Schwein-Immunglobulin, anti-Kaninchen, biotinyliert	IMH, 4,4 µg/ml	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

\* ICC: Immuncytochemie, IF: Immunfluoreszenz-Färbung, IMH: Immunhistochemie, WB: Westernblot

## 1.5 Gebrauchsfertige Kits

Bezeichnung	Hersteller
AccuKine hG-CSF-ELISA	Symansis Pty Ltd., Auckland, Neuseeland
Advantage® RT-for-PCR Kit	Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, USA
Bio-Plex Kalibrier-Kit	Bio-Rad Laboratories, München
Bio-Plex Cytokin Reagenzien-Kit	Bio-Rad Laboratories, München
Bio-Plex <i>Human Cytokine Broad Range Panel</i> , 17-Plex	Bio-Rad Laboratories, München
Bio-Plex hIL-1α-Assay	Bio-Rad Laboratories, München

Bezeichnung	Hersteller
Bio-Plex hTNF- $\beta$ -Assay	Bio-Rad Laboratories, München
BD OptEIA™ hIL-8-ELISA	BD Biosciences, San Diego USA
EnVision™ G 2 Doppelfärbesystem Kaninchen/Maus (DAB+/Permanent-Rot)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
RNeasy Mini-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
<i>S. aureus</i> PNA FISH™, Alexa488-markierte Sonde	AdvanDX, Vedbæk, Dänemark
UltraVision LP-Detektionssystem, AP-Polymer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Vectastain Elite ABC-Kit (Standard)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vector NovaRed™ Substratkit für Peroxidase	Vector Laboratories, Burlingame, USA

## 1.6 Vektoren

Vektor	Antibiotikaresistenz	Hersteller, Bezugsquelle
pCL-10A1, Retrovirus-Verpackungs-Vektor	Ampicillin	Imgenex, San Diego, USA
pCL-Ampho, Retrovirus-Verpackungs-Vektor	Ampicillin	Imgenex, San Diego, USA
pCL-MFG-LacZ Retrovirus-Reporter-Vektor	Ampicillin	Imgenex, San Diego, USA
pCLXSH-hTERT, pCLXSN-bmi-1	Ampicillin, Neomycin	AG Tohru Kiyono, Division of Virology, National Cancer Center Research Institute, Tokio, Japan

## 1.7 Bakterien und Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller, Bezugsquelle
HEK 293	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
Hela	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
RPMI-2650	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>S. aureus</i> T190-2 (nasales Isolat eines gesunden Blutspenders)	Prof. Dr. Barbara M. Bröker, Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität Greifswald

## 1.8 Laborgeräte, Laborzubehör und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage, Typ ABJ 220-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Autoklav, Typ 2540	Tuttnauer; Breda, Niederlande
Bio-Plex 100-Multiplex-Suspension-Array-Reader	Bio-Rad Laboratories, München
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
CO <sub>2</sub> -Inkubator, Model MCO-18AIC	Sanyo Electric Co., Ltd., Moriguchi, Japan

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Cryo-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Deckgläschen, rund, 12 mm Durchmesser	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg
Durchlichtmikroskop Axioplan	Zeiss, Göttingen
Einwegskalpelle Nr. 10	Feather Safety Razor Ltd., Osaka, Japan
Elektroblotter, Biometra Fastblot B43	Biometra GmbH, Göttingen
Elektrophoresekammer, Horizon® 11x14	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
ELISA-Platten, Nunc-Immuno™ 96 MicroWell™ Plates, Maxisorp	Nunc, Roskilde, Dänemark
ELISA-Washer, OpsysMW Microplate Washer	Dynex Technologies, Inc., Chantilly, USA
ELISA-Reader, Dynatech MR5000 Microplate Reader	Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, USA
Eppendorf Multipette® 4780	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Filterpapier 3, qualitativ	Whatman International Ltd., Maidstone, Großbritannien
Fluoreszenzmikroskop, motorisiert, invers IX81	Olympus, Tokyo, Japan
Fluoreszenz- und Chemilumineszenz-System FUSION-FX7	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen
Gelelektrophoreseapparatur, Biometra Minigel System, Multigel	Biometra GmbH, Göttingen
Gewebehomogenisator, MagNA Lyser Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Gewebekulturschale mit Cell <sup>+</sup> -Wachstums-oberfläche (6 und 20 cm Durchmesser)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Glaskügelchen, Precellys-Glas-Kit 0,5 mm	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Hybridisierungsöfen, DUO Therm Hybridisation Oven OV5	Biometra GmbH, Göttingen
Inkubationsschüttelschrank, Certomat © BS-1	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Inversmikroskop IMT-2	Olympus Microscopy, Hamburg
sterile Kanülen, BD Microlance™ 3, 20G, 21G	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Labor-Tiefkälte-Lagertruhe, Typ KLT4785-2	Kryotec-Kryosafe GmbH, Hamburg
Laborwaage, Typ BA 2100 S-OD2	Satorius AG, Göttingen
Membran-Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Mikroprozessor pH-mV-Meter, Modell pH 538	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Mikrozentrifuge, Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop, ND-1000 UV-Vis-Spektralphotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Netzgerät, Electrophoresis Power Supply EPS 3500XL	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Nitrozellulosemembran, Protan BA83, 0,2 µm	Whatman GmbH, Dassel
Objektträger, Menzel-Gläser Superfrost® Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Pipettenspitzen, Biosphere® Filter Tips, farblos, gelb, blau	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PCR-Röhrchen, Multiply®-Pro Gefäße, 0,2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 0,5; 1,0; 2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht



<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Ritips® professional, 2,5 ml	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Schlittenmikrotom, Model 2050 Supercut	Reichert-Jung/Cambridge, Instruments, Nussloch
Schüttelwasserbad, julabo SW-20C	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Serologische Pipetten, steril; 1, 5, 10, 25 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spektralphotometer, UVIKON 931	Kontron Instruments, Mailand, Italien
sterile Spritzen, 1, 5 und 20 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Sterilfilter, Filtrapur S 0,2 µm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Stickstoffbehälter, 35VHC, 30 l Liquid Nitrogen Dewar	Taylor-Wharton, Indianapolis, USA
Thermocycler, Typ 480	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Thermocycler, Typ T3	Biometra GmbH, Göttingen
Thomakammer	Fortuna W.G. Co., Wertheim
Tischzentrifuge, Centrifuge 5804R	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallprozessor, UP200H	Dr. Hielscher GmbH, Teltow
UV-Spektrometer, BioDoc II™	Biometra GmbH, Göttingen
Vakuum-Filtrationsgerät, Aurum Vacuum Mainfold	Bio-Rad Laboratories, München
Vortexer, Maxi Mix+	Barnstead/Thermolyne, Dubuque, USA
Wasserbad, Typ F25-MP	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Wattetupfer, Sterile plain swabs in labeled tubes	Copan innovation Italia S.p.A., Brescia, Italien
Werkbank, Typ 8511	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Zellkulturflaschen, 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturplatten, 6-well, 24-well, 96-well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen, steril, 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

## 1.9 Puffer, Lösungen und Medien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung, Hersteller</b>
Zellkulturmedium für Atemwegsepithelzellen, Airway Epithelial Cell Growth Medium	PromoCell GmbH, Heidelberg
Blotpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris Base, 20 % (w/v) Methanol
Citratpuffer	10 mM Citronensäure-Monohydrat, pH 6,0
Columbia-Blutagar-Platten	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
DMEM mit hoher Glucose-Konzentration (4,5 g/l), L-Glutamin und Natriumpyruvat	PAA Laboratories, Paching, Österreich
Elektrophoresepuffer, 1x	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3
ELISA-Beschichtungspuffer	50 mM Natriumcarbonatpuffer, pH 9,6
ELISA-Blockierungslösung	PBS + 1% (w/v) BSA
ELISA-Waschpuffer	PBS + 0,05 % (v/v) Tween 20
Formaldehyd-Laufpuffer, 1x	20 mM 3-(N-Morpholino)-Propanschwefelsäure (MOPS); 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; 246 mM Formaldehyd; pH 7,0 in DEPC-Wasser

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung, Hersteller</b>
Homogenatpuffer	20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % (v/v) Igepal CA 630, 0,5 % (w/v) SDS, 1 mM PMSF, pH 7,4
MEM Earle's, 1x	gebrauchsfertig, Biochrom AG, Berlin
NaPP-Puffer	10 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,2-7,3; autoklavieren, nach Abkühlung Zugabe von steril filtrierter BSA-Lösung, Endkonzentration 0,1 % (w/v)
Dulbecco's PBS, (1x)	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2
Proteinbestimmungslösung A	100 mM NaOH, 2 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1 % (w/v) SDS, 0,17 % (w/v) Kaliumnatriumtartrat
Proteinbestimmungslösung B	4 % (w/v) Kupfersulfat
Proteinbestimmungslösung C, Biuret-Lösung	100 Teile „Lösung A“ + 1 Teil „Lösung B“
Proteinbestimmungslösung D, Folin-Reagenz	50 % (v/v) wässrige Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenzlösung
RNA-Ladepuffer, 5x	4 mM EDTA, pH 8,0; 0,16 % (v/v) gesättigte Bromphenolblaulösung; 886 mM Formaldehyd; 20 % (v/v) Glycerin; 30,84 % (v/v) Formamid; 80 mM MOPS; 20 mM Natriumacetat
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories, Paching, Österreich
SDS-Probenpuffer, 1x	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau
SSC-Puffer	300 mM NaCl, 30 mM Trinatrium-Citrat-Dihydrat, 0,1 % (w/v) SDS
TAE-Puffer, 0,5x	20 mM Tris Base, 10 mM Essigsäure, 0,5 mM EDTA-Natriumsalz, pH 8,0
TBS	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
TBS-T	150 mM NaCl, 20 mM Tris-Base, 0,05 % (v/v) Tween 20, pH 7,5
Tryptic Soy Boullion	Sigma-Aldrich, Steinheim
X-Gal-Färbelösung	1 mg/ml X-Gal, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> , 5 mM K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> in PBS, pH 7,2
X-Gal-Fixierlösung	2 % (v/v) Formaldehyd, 0,1 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS, pH 7,2

## 2 Patienten und Methoden

### 2.1 Studiendesign und Patienten

In diese Studie wurden zwischen Februar 2008 und November 2010 282 Patienten, und zwar 83 Normalkontrollen (NK), 63 Patienten mit chronischer Rhinosinusitis mit Polyposis nasi et sinuum (CRS) und 138 GPA-Patienten, in der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel eingeschlossen. Die Verwendung humaner Biopsien und Proben für wissenschaftliche Experimente setzt das schriftliche Einverständnis der Patienten nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Information über die Studie und die geplanten Untersuchungen im Rahmen einer Patientenaufklärung voraus. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel begleitet (AZ A101/07). Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft, Minderjährigkeit und Gerinnungsstörungen.

Die Granulomatose mit Polyangiitis wurde nach den *American College of Rheumatology*-Klassifikationskriterien und den Chapel Hill Consensus Konferenz-Definitionen für GPA entsprechend den Empfehlungen der *European League Against Rheumatism* (EULAR) klassifiziert [130]. Eine Subklassifizierung der GPA (lokal, früh-systemisch, generalisiert, refraktär) erfolgte nach den *European Vasculitis Study Group*-Definitionen und den aktuellen EULAR-Empfehlungen [130]. Die Krankheitsaktivität wurde mit dem *Birmingham Vasculitis Activity Score* (BVAS) [131] sowie dem *Disease Extent Index* (DEI) [132] und der Organschaden als Konsequenz der granulomatösen Entzündung und der Vaskulitis mittels des *Vasculitis Damage Index* (VDI) [133] erfasst. Die jeweilige Organbeteiligung wurde entsprechend den *ear-, nose-and throat, lung- and kidney* (ELK)-Klassifikationskriterien [134] dokumentiert. Zur Bestimmung der Krankheitsaktivität der nasalen Mukosa wurden alle Patienten einer standardisierten Beurteilung [57] unterzogen und endoskopisch von einem Hals-Nasen-Ohren (HNO)-Arzt untersucht, wie von Paulsen und Rudert empfohlen [66]. Meist konnte die Diagnose histologisch gesichert werden.

Die Diagnose einer CRS wurde entsprechend den Kriterien der *American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, der *American Academy of otolaryngic Allergy*, der *American Rhinologic Society* und des *Sinus and Allergy Health Partnership* [135] gestellt und histologisch bestätigt. Die CRS-Patienten dienten in dieser Studie als Krankheitskontrollgruppe, da es sich hierbei ebenfalls um eine chronisch-entzündliche Erkrankung handelt, die sich an den nasalen Schleimhäuten manifestiert.

Nach Einwilligung der Patienten zur Teilnahme an der Studie wurden alle Studienteilnehmer anhand eines ausführlichen schriftlichen Fragebogens u.a. zu Erstmanife-

station, anderen Erkrankungen, Allergien, Asthma, Acetylsalicylsäure-Intoleranz, eingenommenen Medikamenten charakterisiert und von einem HNO-Arzt hinsichtlich der spezifischen HNO-Beschwerden und der individuellen pathologischen Befunde im HNO-Bereich untersucht. Außerdem wurden in Laboruntersuchungen die Anzahl der Leukozyten, die Konzentration von C-reaktivem Protein und die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit bestimmt, um mögliche systemische Entzündungskomponenten zu erfassen. Bei den GPA-Patienten wurden zusätzlich vom Labor des Klinikums Bad Bramstedt die serologischen Titer von C-ANCA und P-ANCA bestimmt. Die Normalkontrollen hatten anamnestisch, inspektorisch und serologisch keine Anzeichen einer akuten, chronischen oder autoimmunen Erkrankung der nasalen Mukosa.

Während der Untersuchungen wurden Nasensekrete aus beiden Nasenhaupthöhlen unter Beachtung einer hausinternen sogenannten Standardarbeitsanweisung mit Hilfe eines sterilen Wattetupfers sowie Blutproben gewonnen. Die nasalen Schleimhautbiopsien wurden bei den Normalkontrollen im Rahmen von funktionellen Operationen zur Verbesserung der Nasenatmung und bei den CRS-Patienten im Rahmen der *functional endoscopic sinus surgery* aus den unteren Nasenmuscheln entnommen. Bei den GPA-Patienten wurden die Biopsien in Lokalanästhesie aus der gleichen Lokalisation gewonnen, welche inspektorisch frei von Krankheitsaktivität und möglichen Veränderungen wie Granulomen, Ödemen, Unterblutungen, eitrigen Sekreten oder Krusten waren. Die genannten Proben stellten die Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen dar und wurden sofort nach Entnahme im Labor weiter verarbeitet.

Details zu Einzelkohorten und dem Gesamtkollektiv dieser Studie sowie speziell zu den GPA-Patienten sind den Tabellen im Anhang (XI 1) zu entnehmen. Die für die jeweiligen Untersuchungen ausgewählten Einzelkohorten stellen repräsentative Untergruppen des Gesamtkollektivs dar. Die augenscheinlich erhöhte Konzentration des C-reaktiven Proteins der CRS-Patienten der AMP-Stimulations-Untergruppe und der erhöhte C-ANCA-Titer der GPA-Patienten der IL-8-Stimulations-Untergruppe unterschieden sich statistisch nicht vom entsprechenden Gesamtkollektiv. Die Patientendaten wurden von den Ärzten der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde,

Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und der Abteilung Rheumatologie der Universität Lübeck, dem Vaskulitiszentrum des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, der Klinik für Rheumatologie und Immunologie des Klinikums Bad Bramstedt sowie den dazugehörigen klinischen Laboren erhoben.

### **2.1.1 Prozessierung der Nasensekrete**

Unter sterilen Bedingungen wurde das abgeschnittene obere Ende des Wattetupfers für 45 min mit 500 µl Natriumphosphat (NaPP)-Puffer bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde der Tupfer in ein kleines 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 470 x g für 1 min zentrifugiert. Das resultierende Eluat wurde dem NaPP-Sekret zugesetzt. Für die Bestimmung der endonasalen Besiedlung mit *S. aureus* (2.5.1) wurden 100 µl beiseite gestellt und das verbliebene Sekret wurde portioniert bei -80°C eingefroren. Dem Tupfer wurde in dem 0,5 ml-Reaktionsgefäß 200 µl *Tryptic Soy Bouillon* (TSB) zugefügt und dieser wurde anschließend ebenfalls zur Bestimmung der nasalen Besiedlung weiter verwendet.

### **2.1.2 Prozessierung der Nasenschleimhautbiopsien**

Die Biopsie-Materialien wurden sofort nach ihrer Entnahme in *Airway Epithelial Cell Growth* Medium ins Labor transportiert und dort unter sterilen Bedingungen weiter prozessiert. Die Biopsien wurden in acht unterschiedlich große Stücke geteilt, zum Anlegen der Zellkultur (2.2.1) in Dispase gelegt und bei 4°C über Nacht im Kühlschrank gelagert, sowie für die immunhistochemischen Untersuchungen (2.3.1) mit 4 %-iger Formalinlösung versetzt oder sofort in Cryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

## **2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen**

Alle nachfolgend beschriebenen Zellkulturarbeiten fanden an einer Werkbank unter sterilen Bedingungen unter ausschließlicher Verwendung steriler Einwegplastikmaterialien statt. Die verwendeten Puffer, Medien und Lösungen wurden stets vor

Gebrauch auf 37°C angewärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Wasserdampf-gesättigter, 5 % CO<sub>2</sub>-haltiger Atmosphäre bei 37°C.

**Isolierung und Kultivierung adhärent wachsender primärer nasaler Epithelzellen:** Als Primärzellkultur wird eine Zellkultur bezeichnet, bei welcher die Zellen direkt aus dem Gewebe eines lebenden Organismus isoliert und angelegt werden. Sie weist unter Kulturbedingungen nur eine eingeschränkte Vermehrungsfähigkeit auf und stellt daher nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen das Wachstum ein. Die Isolierung humaner Epithelzellen erfolgte aus nasalen Biopsien, welche direkt nach Entnahme bearbeitet wurden. Die Dissoziation des Epithels von der Basalmembran erfolgte zunächst enzymatisch durch eine Inkubation über Nacht in Dispase-Lösung (2 U/ml) bei 4°C. Anschließend wurden die Epithelzellen mit Hilfe von Skalpell abgeschabt, resuspendiert und bei 88 x g für 5 min zentrifugiert. Die in *Airway Epithelial Cell Growth* Medium resuspendierten Zellen wurden bis zum ersten Mediumwechsel unter Zusatz von 20 U/ml Penicillin und 20 µg/ml Streptomycin in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert. Das *Airway Epithelial Cell Growth* Medium ermöglicht relativ selektiv das Wachstum von Epithelzellen, da aufgrund der speziellen Rezeptur das Wachstum von Fibroblasten stark reduziert ist und diese selbst bei anfänglichem Wachstum rasch absterben.

Bei Erreichen von Subkonfluenz (ca. 80 - 90 %) wurden die Zellen passagiert bzw. für die Stimulation (2.2.3) vorbereitet. Dafür wurden die zuvor mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschenen Zellen, um sie vom Flaschenboden zu lösen, für ca. 50 min mit Dispase-Lösung (0,66 U/ml) inkubiert. Nach Abstoppen der Dispase-Behandlung durch Zugabe von Zellkulturmedium und Sedimentierung der Zellen bei 88 x g für 5 min wurden die resuspendierten Zellen in angemessener Konzentration in 96-well-Platten überführt und weiter kultiviert. Zwei- bis dreimal pro Woche wurden die Zellen mittels eines inversen Phasenkontrastmikroskops visuell auf ihre epitheliale Morphologie, regelrechtes Wachstum und mögliche Kontamination überprüft und alle 3 - 4 Tage wurde ein Austausch des Zellkulturmediums vorgenommen. Die für die Transformation vorgesehenen Epithelzellen wurden in Zellkulturschalen (Ø 6 cm) ausgesät und nach erfolgter Transformation fortlaufend kultiviert.

**Kultivierung etablierter Zelllinien:** Die humanen Zelllinien RPMI-2650, HEK 293 und Hela wurden in kleinen bis mittelgroßen Zellkulturflaschen mit dem entsprechenden Medium (Tab. 1) kultiviert und in den erforderlichen Abständen passagiert. Das jeweilige Medium enthielt zusätzlich für optimales Zellwachstum fötales Kälberserum (FCS) in einer Endkonzentration von 10 % (v/v). Bei der Passage der Zelllinien wurde zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden statt der Dispase-Lösung eine verdünnte Trypsinlösung mit 0,05 % Trypsin verwendet und die Inkubation betrug je nach Zelllinie 1 - 15 min. Die Aussaat in eine neue Flasche erfolgte nach Bestimmung der Zellzahl (2.2.2) entsprechend den Herstellerangaben. Im Allgemeinen wurden die Zellen nur bis zur 15. Passage verwendet, dann verworfen und gegebenenfalls unter Verwendung einer Reserve-Portion neu ausgesät.

**Tab. 1: Zellkulturbedingungen der Zelllinien**

Zelllinie	Ursprung	Medium und Zusätze	Subkultivierungszeiten	Aussaatkonzentration, Teilungsfaktor
RPMI-2650	Humanes Nasenscheidewandkarzinom	MEM-Earle + 10 % FCS	alle 4 - 5 Tage	$0,5 - 1 \times 10^6/25 \text{ cm}^2$ , 1:4 bis 1:8
HEK 293	Humane embryonale Niere	DMEM + 10 % FCS	alle 2 - 3 Tage, wenn die Zellzahl bei $6 - 7 \times 10^4/\text{cm}^2$ liegt	$2 - 3 \times 10^6/25 \text{ cm}^2$ , 1:5 bis 1:6
Hela	Humanes Zervixkarzinom	RPMI 1640 + 10 % FCS	alle 3 - 5 Tage	$1 - 2 \times 10^6/80 \text{ cm}^2$ , 1:4 bis 1:6

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Bei der Passagierung sowie bei der RNA-Isolierung war es erforderlich, die Zellzahl zu bestimmen. Dies erfolgte mit Hilfe einer Thoma-Kammer. Diese Zählkammer hat ein eingraviertes Raster, welches aus 16 Großquadraten besteht, die wiederum in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Jedes Kleinquadrat weist dabei eine Fläche von  $0,0025 \text{ mm}^2$  auf. Mit einer Tiefe von 0,1 mm ergibt sich damit ein Kammervolumen von  $0,004 \text{ mm}^3$  ( $\mu\text{l}$ ) pro Kleinquadrat, also  $0,064 \mu\text{l}$  pro Gesamtfläche und somit ein Faktor von 15.625 zur Umrechnung in ml. Zur Auszählung wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben abgelöst, zentrifugiert und resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde pro Seite ca. ein Tropfen in die Zählkammer eingebracht, also gerade so viel, dass die gesamte Fläche gut bedeckt war, aber nicht zu viel, was

daran ersichtlich wäre, dass etwas Flüssigkeit in den Mittelsteg laufen würde. Dies gewährleistet die Einhaltung des definierten Kammervolumens. Nachdem mindestens acht Großquadrate unter einem Lichtmikroskop ausgezählt wurden, wurde die Zellzahl pro Milliliter wie folgt berechnet: Hochrechnung der ausgezählten Zellen auf 16 Großquadrate  $\times 15.625 =$  Zellen/ml.

### **2.2.3 Stimulation nasaler Epithelzellen mit *S. aureus***

Für die Stimulationsexperimente wurde der *S. aureus*-Stamm T190-2 eingesetzt, der freundlicherweise von Prof. Dr. Barbara M. Bröker, Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Stamm wurde ausgewählt, da er zur klonalen Linie der am häufigsten vorkommenden Stämme nasaler Isolate in Westeuropa gehört [136]. Dazu wurde eine Übernachtskultur in TSB bei 37°C angelegt und bis zum Erreichen einer Konzentration von  $5 \times 10^8$ /ml inkubiert. Nach Zentrifugation bei  $4.000 \times g$  für 15 min wurde der Überstand steril filtriert und das Bakteriensediment in Zellkulturmedium resuspendiert. Zur Abtötung wurden die Bakterien mit Hilfe von Glaskügelchen mechanisch unter Verwendung eines Gewebehomogenisators lysiert. Chemische oder thermische Inaktivierungsmethoden wurden nicht angewendet, so dass die Proteine der Bakterien (insbesondere die der Zellmembran) nicht denaturiert wurden.

Die Stimulation der nasalen Epithelzellen erfolgte in 96 well-Platten bei einer Konfluenz von ca. 90 %. Zuvor waren die primären Epithelzellen im Durchschnitt 13 Tage kultiviert worden. Nach Austausch des Zellkulturmediums wurden die Bakterien in Endkonzentrationen von  $1 \times 10^3$ /ml,  $1 \times 10^5$ /ml und  $1 \times 10^7$ /ml und die steril filtrierten TSB-Überstände 1:500, 1:50 und 1:5 zugesetzt. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle, als weitere Kontrolle wurde TSB in einer Konzentration von 1:5 eingesetzt, um einen möglichen Einfluss des Bakterienmediums erkennen zu können. Die Zellen wurden, sofern möglich, für 16 und 24 h mit den Stimulantien inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen, zur Entfernung möglicher toter Zellen bei  $88 \times g$  für 5 min zentrifugiert und zur Lagerung bei -80°C eingefroren. Zur Überprüfung bakterieller Kontaminationen wurde Schafblutagar mit 10  $\mu$ l des Überstandes bei 37°C über Nacht inkubiert. Außerdem wurde die Viabilität der Zellen mittels Trypanblau-Färbung überprüft (2.2.4).



### 2.2.4 Trypanblau-Ausschlusstest zur Bestimmung der Zellviabilität

Nachdem nach Beendigung eines Stimulationszeitraumes (2.2.3) der Zellkulturüberstand entfernt worden war, wurde die Viabilität der Zellen bestimmt. Damit wurde überprüft, dass die Zellen unter den gewählten Stimulationsbedingungen nicht absterben. Die Zellen wurden mit 0,25 %-iger (w/v) Trypanblaulösung versetzt und sofort lichtmikroskopisch beurteilt. Trypanblau ist ein polyanionischer Azofarbstoff, der aufgrund seiner Ladung für lebende Zellen impermeabel ist. Tote Zellen hingegen weisen eine veränderte Membrandurchlässigkeit auf, so dass der Farbstoff eindringen kann und durch Bindung an Proteine selektiv die toten Zellen anfärbt. Basierend auf der Auszählung von mindestens fünf Sichtfeldern wurde die Viabilität als Anteil der vitalen Zellen in Prozent errechnet. Alle Stimulationsversuche wurden ausgeschlossen, bei denen die Viabilität nicht mindestens 95 % betrug.

### 2.2.5 Der Gentamycin-Überlebensassay

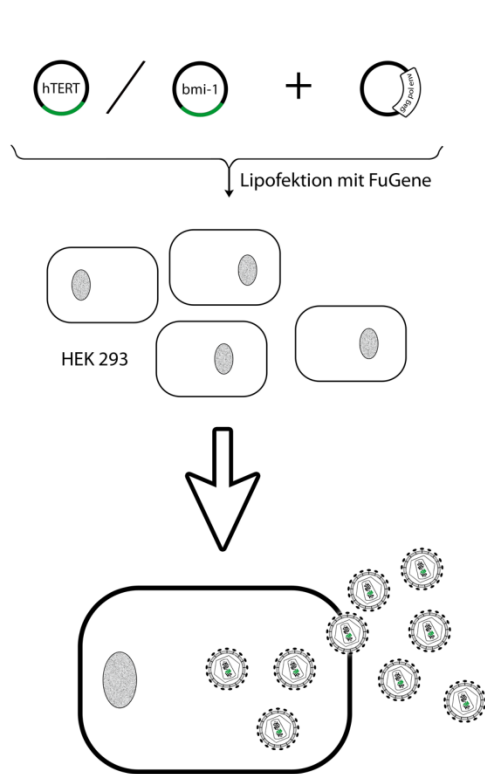
Der Gentamycin-Überlebensassay ist die häufigste Methode zur Bestimmung internalisierter Mikroorganismen in eukaryontischen Zellen. Die Spezifität des Nachweises intrazellulärer Bakterien beruht darauf, dass das Antibiotikum Gentamycin nahezu nicht zellgängig ist [137], also bei einer Gentamycin-Behandlung nur extrazelluläre Bakterien abgetötet werden, während intrazelluläre Bakterien geschützt sind und überleben. In Vorversuchen wurde von Andrea Hölzgen (Institut für Infektionsmedizin, Universität zu Kiel) die minimale Hemmkonzentration von Gentamycin bei einer Vielzahl an *S. aureus*-Stämmen und unter anderem bei dem in dieser Arbeit verwendeten *S. aureus*-Stamm T-190-2 ermittelt.

Primäre nasale Epithelzellen wurden als präkonfluenten Monolayer auf Deckgläschen (Ø 12 mm) in 24-well-Platten mit  $7 \times 10^4$ /ml *S. aureus* T-190-2 für 3 h bei Standardkultivierungsbedingungen im Brutschrank inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS erfolgte für 2 h die Inkubation mit 100 µg/ml Gentamycin. Anschließend wurde erneut 3-mal mit PBS gewaschen, die Zellen mit 2,5 %-iger Paraformaldehydlösung fixiert und bis zur Immunfluoreszenz-Färbung (2.3.3) bei 4°C in PBS mit 0,01 % Natriumazid gelagert.

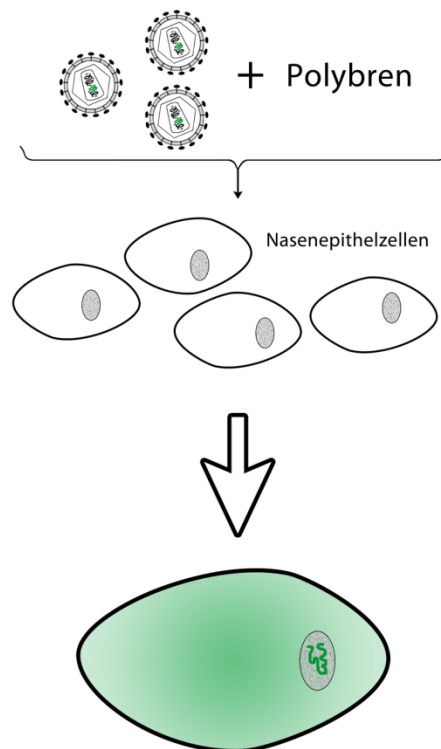
## 2.2.6 Transfektion und Transduktion eukaryontischer Zellen

Die Methodik der Lipofektion wurde zur transienten Transfektion eingesetzt, die Transduktion hingegen zum stabilen Gentransfer, so dass die eingebrachte DNA permanent im Genom der Zielzelle verbleibt. Beide Techniken wurden nacheinander angewendet, um nasale Epithelzellen zu transformieren (Abb. 6).

### Herstellung der Retroviren



### Immortalisierung der Zielzellen



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Generierung transformierter nasaler Epithelzellen.** Nähere Beschreibung im Text.

Bei der Lipofektion erfolgt die Einbringung der DNA mit Hilfe von Liposomen. Liposomen sind Komplexe der anionischen DNA mit kationischen Lipiden. Sie ermöglichen die Fusion mit der Zellmembran und dadurch den Transfer der DNA in die Zelle. Diese Methodik wurde in Form von Kotransfektionen dazu angewendet, die HEK 293-Zellen mit den Verpackungskonstrukten pCL-10A1 und pCL-Ampho und den retroviralen Vektoren pCLXSH-hTERT, pCLXSN-bmi-1 oder pMFG-LacZ zu transfizieren, damit sie als Produzenten für replikationsinkompetente Retroviren fungieren. Für die Kotransfektionen der Plasmid-DNAs wurde das lipidbasierte Reagenz FuGENE HD

verwendet. Zunächst wurden HEK 293 Zellen mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$ /ml einen Tag vor der Transfektion in 6-well-Platten ausgesät, so dass sie am Folgetag eine Konfluenz von ca. 70 % aufwiesen. Zur Herstellung der Liposomen wurden 2 µg DNA (je zur Hälfte Verpackungskonstrukt und zur anderen Hälfte retroviraler Vektor) in Serum- und Antibiotikum-freiem Medium vorgelegt und mit 3 µl FuGENE Reagenz vermischt, welches ebenfalls zuvor in Serum- und Antibiotikum-freiem Medium vorgelegt wurde. Der 100-µl-Transfektionsansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tröpfchenweise zu den Zellen gegeben, bei welchen in der Zwischenzeit das Medium gewechselt wurde. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank, anschließend wurde der virushaltige Überstand abgenommen, steril filtriert und portioniert bei -80°C eingefroren.

Die Transduktion wurde angewendet, um durch die Einschleusung der Gene für hTERT bzw. bmi-1 nasale Epithelzellen zu transformieren. Diese Gene wurden ausgewählt, da *hTERT* die reverse Transkriptase der humanen Telomerase kodiert und somit der altersbedingten Verkürzung der Telomere entgegenwirkt [138] und bmi-1 (*B-lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*) ein *polycomb ring finger* Protein ist, welches als Transkriptionsfaktor u.a. für die Aufrechterhaltung des proliferativen Potentials von Stammzellen verantwortlich ist [139;140]. Beide Gene sowie die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide pCLXSH-hTERT und pCLXSN-bmi-1 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Tohru Kiyono, Division of Virology, National Cancer Center Research Institute, Tokio, Japan, zur Verfügung gestellt und wurden bereits erfolgreich zur Transformation anderer Zelltypen eingesetzt [140-144].

Primäre nasale Epithelzellen wurden in 6-cm-Kulturschalen ausgesät (2.2.1) und bei einer Konfluenz von 70 - 80 % mit den generierten Retroviren transduziert. Zur Etablierung und Optimierung der Transduktionsbedingungen wurde das Verhältnis des Virus-haltigen Überstandes zum Zellkulturmedium variiert, dem Polybren in einer Endkonzentration von 4 µg/ml zugesetzt war. Dafür wurden die Reporter-gen-Retroviren im Verhältnis 1:2, 1:3 und 1:5 eingesetzt. Sie übertragen *LacZ*, das Gen für die β-Galaktosidase, deren Aktivität durch eine β-Galaktosidase-Färbung (2.3.9) nachgewiesen werden kann. Alle weiteren Transduktionen wurden bei einem Verhältnis von 1:5 durchgeführt, da bei diesem Verhältnis die beste Transduktions-

effizienz beobachtet werden konnte. Die Inkubation mit dem Virus-haltigen Überstand erfolgte für 3 h bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank. Anschließend wurde etwas Zellkulturmedium zugefügt. Nach maximal 48 h fand ein Wechsel des Mediums statt und die Zellen wurden danach fortlaufend kultiviert. Eine Selektion in Einzelklone wurde nicht durchgeführt, da polyklonale Zelllinien generiert werden sollten und somit Selektionsartefakte vermieden werden.

### **2.2.7 Herstellung von Zelllysaten**

Für den Westernblot auf bmi-1 wurden 10 %-ige (w/v) Zelllysate hergestellt. Zunächst wurden die Zellen (transformierte Zellkulturen, HEK-Zellen als Positivkontrollen und primäre nasale Epithelzellen als Negativkontrollen) wie unter 2.2.1 beschrieben kultiviert. Nach Erreichen einer ausreichenden Zellmenge wurden die Zellen mittels Dispase bzw. Trypsin abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend mit PBS gewaschen und nach dessen vollständiger Entfernung gewogen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Zur Herstellung 10 %-iger (w/v) Lysate wurden je 10 mg Zellsediment mit 90 µl Homogenatpuffer versetzt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall (20 Stöße auf Eis bei 0,5 Zyklen, einer Amplitude von 50 % und einer Frequenz von 24 kHz) erfolgte nach vorheriger 20-minütiger Inkubation auf Eis. Abschließend wurden die aufgeschlossenen Zellsuspensionen bei 4°C mit 10.000 x g für 10 min zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert und die Überstände als Zelllysate portioniert eingefroren bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentrationen dieser Lysate wurden wie unter 2.3.6 bestimmt.

## **2.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden**

### **2.3.1 Immunhistochemie**

Immunhistochemie ist eine immunologische Nachweismethodik, welche die Lokalisation von Proteinen in Gewebeschnitten ermöglicht. Dabei wird das nachzuweisende Protein mit Hilfe eines Enzym-konjugierten Antikörpers detektiert und durch die durch das Enzym katalysierte Farbreaktion visualisiert.

Die Biopsien wurden zunächst für mindestens 24 h in 4 %-iger, gepufferter Formaldehydlösung fixiert. Mittels aufsteigender Alkoholreihe (jeweils 30-minütige Inkubation in 70 %, 80 %, 2 x 96 %, 2 x 100 % Ethanol und 2 x Aceton) wurden die Biopsien dehydratisiert und anschließend in flüssigem Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung wurden von den Paraffinblöcken mit einem Schlittenmikrotom 4 µm dicke Schnitte (freundlicherweise von A. Rösen, Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Die so gewonnenen Schnitte wurden für mindestens 48 h bei 37°C getrocknet und bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Die Paraffinschnitte wurden durch 2-malige 10-minütige Inkubation in Xylol entparaffiniert, mittels absteigender Alkoholreihe rehydatisiert und anschließend wurden die Antigene durch 15-minütige Inkubation in 10 mM Citratpuffer in der Mikrowelle bei 450 W demaskiert. Bei diesem sogenannten *Antigen-Retrieval* werden durch die Hitzeeinwirkung die durch die Formalin-Fixierung bedingten Methylenbrücken gespalten [145]. Nach Abkühlung erfolgte die Inhibierung intrazellulärer Peroxidasen durch 10-minütige Inkubation in 0,3 %-iger Wasserstoffperoxidlösung in Methanol. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte mit 3 % Normalserum in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in einer feuchten Kammer für 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Der Primärantikörper wurde durch mehrmaliges Spülen mit TBS entfernt und die Schnitte wurden für 30 min mit einem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach einem erneuten TBS-Spülschritt erfolgte die Ausbildung der Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Komplexe durch 30-minütige Inkubation mit dem Vectastain Elite ABC-Kit. Die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase wurde mittels Vector NovaRed Substrat Kit detektiert. Zur Gegenfärbung wurde 1:3 verdünnte Hämalaunlösung verwendet. Nach Dehydratisierung mittels aufsteigender Alkoholreihe wurden die Schnitte mittels Eukitt eingedeckelt. Als Negativkontrollen fungierten Schnitte, die statt des Primärantikörpers nur mit TBS inkubiert wurden. Die Analyse und Dokumentation der Schnitte erfolgte an einem Lichtmikroskop Axioplan der Fa. Carl Zeiss mit Hilfe einer Digitalkamera (Canon Power Shot A80).

Abweichend von obiger Beschreibung wurde bei LL-37 die Inkubation mit dem Primärantikörper nur für 60 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Genauere Details zu Durchführung der in dieser Arbeit eingesetzten Färbungen sind in der Tab. 2 aufgeführt. Als Positivkontrollen wurden für LL-37, hBD3, TLR4 und Psoriasin Biopsien der Tonsilla palatina und für RNase 7 Biopsien der Cutis verwendet [146-150]. Zudem erfolgte eine Doppelfärbung auf die antimikrobiellen Peptide (LL-37 und hBD3) und Cytokeratin 18 mittels *EnVision Gl2 Doublestain System* nach Herstellerangaben, der dabei verwendete Cytokeratin-18-Antikörper wurde 1:50 verdünnt eingesetzt.

**Tab. 2: Durchführungsdetails der immunhistochemischen Färbungen**

Antigen	Blockierungslösung	Konzentration und Verdünnung von Primär- und Sekundärantikörper	Substrat-Inkubationszeit
LL-37	normales Schweineserum	6 µg/ml in TBS, 4,4 µg/ml in TBS	5 min
hBD3	normales Schweineserum, 1:5 verdünnt, 20 min	5 µg/ml in TBS, 4,4 µg/ml in TBS	2 - 3 min
RNase 7	30 min mit 12 %-iger BSA-Lösung + 20 min 1:10 verdünnte Roti- Immunoblock-Lösung	26 µg/ml in TBS-1 % BSA*, 1,4 µg/ml in TBS-1 % BSA	12 - 15 min
Psoriasin	normales Kaninchenserum, 1:5 verdünnt, 20 min	1,25 µg/ml in TBS-1 % BSA, 6,5 µg/ml in TBS-1 % BSA	5 - 7 min
TLR4	normales Schweineserum	3 µg/ml in TBS, 4,4 µg/ml in TBS	2 - 5 min

\* BSA = bovines Serumalbumin.

### 2.3.2 Immuncytochemie auf Cytokeratine

Für die Immuncytochemie wurden die zu untersuchenden Zellen auf runden Deckgläschen (Ø 12 mm) in 24-well-Platten ausgesät und bis zum Erreichen eines präkonfluenten Monolayers kultiviert. Nach einer 15-minütigen Fixierung mit 4 %-iger Paraformaldehydlösung wurden die Zellen zunächst durch eine 10-minütige Inkubation mit eiskaltem 100 %-igen Ethanol, gefolgt von einer 6-minütigen Inkubation mit 0,1 %-iger Triton X 100-Lösung permeabilisiert, mit TBS gewaschen und für 15 min mit 3 %-iger Serumlösung überschichtet, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu reduzieren. Nach Entfernung der Blockierungslösung erfolgte die Inkubation mit dem 1:100 verdünnten Primärantikörper (CK 7: 2,43 µg/ml in TBS; CK 8&18:

0,78 µg/ml in PBS) bei 4°C über Nacht. Am nächsten Morgen erfolgte nach 2-maligem 3-minütigen Spülen mit TBS die Inkubation mit dem polyklonalen biotinylierten Kaninchen anti-Maus Sekundärantikörper (13 µg/ml) für 30 min. Nach einem erneuten 2-maligen 3-minütigen TBS-Spülschritt erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Vectastain Elite ABC-Kit zur Ausbildung der Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Komplexe. Alternativ wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. K. Holl-Ulrich (Institut für Pathologie, Universität zu Lübeck) das *UltraVision LP Detection System AP Polymer* statt des Sekundärantikörpers eingesetzt. Die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase wurde mittels *Vector NovaRed Substrat Kit*, die der alkalischen Peroxidase aus dem UltraVision System mittels FastRed detektiert. Zur Gegenfärbung wurde 1:3 verdünnte Hämalaunlösung verwendet. Nach Dehydatisierung mittels aufsteigender Alkoholreihe wurden die Deckgläschen mittels Eukitt auf den Objektträgern fixiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Lichtmikroskop Axioplan der Fa. Carl Zeiss.

### **2.3.3 Immunfluoreszenz-Färbung**

Eine Immunfluoreszenz-Färbung wurde den Invasionsexperimenten (2.2.5) nachgeschaltet. Die auf runden Deckgläschen befindlichen Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem 100 %-igen Methanol für 10 min fixiert. Nach einem Waschschrift mit TBS folgten Blockierungsschritte mit 3 %-igem Ziegen-Serum für 15 min, mit 0,1 % BSA und 0,2 % Glycin für 60 min und 1:10 verdünnter Roti-Immunoblocklösung für 30 min. Dies hatte den Zweck, unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und vor allem bei der *S. aureus*-E-Cadherin-Doppelfärbung die Bindung der E-Cadherin-Antikörper an das Protein A von *S. aureus* zu reduzieren. Anschließend erfolgte bei 4°C über Nacht die Inkubation mit dem in PBS verdünnten Primärantikörper (Protein A: 20,75 µg/ml, E-Cadherin: 1 µg/ml), der entweder als Gemisch für die Doppelfärbung oder einzeln [als E-Cadherinfärbung nach der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)] aufgetragen wurde. Am nächsten Morgen wurde nach 2-maligem 5-minütigen Spülen mit Tween-versetztem TBS-Puffer (TBS-T) und 3-maligem 5-minütigen Spülen mit TBS für 60 min bei 37°C mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (-gemisch; je 2 µg/ml) inkubiert. Diesem wurde zur Anfärbung der DNA der Farbstoff 4',6-Diamidin-2'-phenylindol (DAPI) in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt. Anschließend wurde 3-mal für je 10 min mit TBS

gespült, mit destilliertem Wasser (A. dest.) entsalzt und mit dem Fluoreszenzeindeckmittel eingedeckelt. Für eine längere Lagerung, welche bei 4°C erfolgte, wurden die Deckgläschen mit Nagellack eingefasst. Die Auswertung erfolgte bei den Invasionsversuchen mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop „LSM 510 Meta“ von Zeiss und bei der FISH mit einem motorisierten inversen Fluoreszenzmikroskop IX81 von Olympus. Für die E-Cadherinfärbung nach der FISH erfolgten alle Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer.

### **2.3.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assays**

Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) erlaubt die Quantifizierung löslicher Proteine. In Form eines Sandwich-ELISAs wird das zu quantifizierende Protein von einem an eine Mikrotiterplatte fixierten Antikörper gebunden und mit Hilfe eines zweiten Antikörpers nachgewiesen, der mit einem Enzym konjugiert ist. Die Detektion erfolgt dabei über die von dem Enzym katalysierte Farbreaktion, welche photometrisch vermessen wird. Zur Quantifizierung der Probe wird gleichzeitig eine Verdünnungsreihe des rekombinanten Standards aufgetragen, was die anschließende Berechnung der Konzentration der Probe ermöglicht. Für die statistischen Berechnungen wurden die Werte unterhalb der Nachweisgrenze auf 0 gesetzt.

Bei den hBD3- und LL-37-ELISAs erfolgten alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur. Zunächst wurden hochbindende 96-well-Mikrotiterplatten mit dem sogenannten *capture*-Antikörper beschichtet, indem in jede Vertiefung 100 µl des in Beschichtungspuffer gelösten Antikörpers (hBD3: 0,6 µg/ml, LL-37: 0,5 µg/ml) gegeben und über Nacht inkubiert wurde. Nach Entfernung der Antikörperlösung wurden die Vertiefungen 3-mal mit 200 µl/Vertiefung Waschpuffer gewaschen. Für alle Waschschrte kam ein ELISA-Washer zum Einsatz. Alle Waschschrte erfolgten 3-mal und wurden nach allen Inkubationszeiten (mit Ausnahme vor Zugabe der Stopp-Lösung) durchgeführt. Anschließend wurde die Platte zur Vermeidung unspezifischer Bindungsreaktionen mit 250 µl Blockierungslösung für 1 h inkubiert. Danach wurden je 50 µl der Proben bzw. des Standards aufgetragen und für 2 h inkubiert. Als Standard für die spätere Auswertung diente eine in PBS mit 0,1 % BSA verdünnte Konzentrationsreihe des jeweiligen rekombinant hergestellten Proteins (hBD3: 1,6 - 100 ng/ml, LL-37: 1,9 - 80 ng/ml). Im Anschluss daran erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit je



100 µl biotinyliertem Antikörper (jeweils 0,25 µg/ml in PBS mit 0,1 % BSA verdünnt). Nach einer 30-minütigen Inkubation mit 100 µl/Vertiefung Streptavidin-konjugierter Peroxidase (welche nach Herstellerangaben 1:200 in PBS mit 0,1 % BSA verdünnt wurde), wurde die gebundene Peroxidase durch Zugabe von je 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung (TMB) als Substrat detektiert. Dabei oxidiert das Enzym das farblose Chromogen mit Wasserstoffperoxid zu einem blauen Komplex, bestehend aus dem elterlichen Diamin und dem um zwei Elektronen oxidierten Diimin [151]. Nach festgelegter Zeit (hBD3: 25 min, LL-37: 45 min) wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt, wobei der Komplex terminal zu dem gelben Diimin oxidiert wird, welches in sauren Lösungen stabil ist und einen höheren molaren Extinktionskoeffizienten aufweist als das blaue Radikal [151]. Die Absorption des entstandenen gelben Farbsignals wurde in einem ELISA-Messgerät bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Referenzwellenlänge 550 nm vermessen. Zur Auswertung wurden die Konzentrationen der Proben mit Hilfe der mitgeführten Standardreihe berechnet.

Der RNase-7-ELISA wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Gläser und Prof. Dr. J. Harder (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universität zu Kiel) in Anlehnung an Köten *et al.* [152] durchgeführt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 37°C mit Ausnahme des Substrats. Die verwendeten polyklonalen Ziegen-Antikörper wurden von der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität zu Kiel hergestellt und für die Verwendung als Sekundärantikörper biotinyliert. Als Standard fungierte native, aus Proben der Cutis aufgereinigte RNase 7.

Die Beschichtung der Platte erfolgte mit 50 µl/Vertiefung und einer Antikörper-Konzentration von 1 µg/ml für 1 h. Nach einer 30-minütigen Blockierung und einem Waschschrift wurden die Proben sowie der Standard (0,31 - 40 ng/ml) aufgetragen und für 30 min inkubiert. Der biotinylierte Detektionsantikörper wurde in einer Konzentration von 1,3 µg/ml eingesetzt und für 30 min inkubiert. Ebenfalls für 30 min erfolgte die Inkubation mit der 1:10000 mit Waschpuffer verdünnten Streptavidin-konjugierten Peroxidase. Als Substrat wurde 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) verwendet und die Messung bei 405 nm mit Referenzwellenlänge

492 nm erfolgte nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunklen.

Die Bestimmung der Konzentration des humanen Chemokins IL-8 erfolgte mit dem BD OptEIA™ Human IL-8 ELISA Kit und die des Cytokins Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) mit dem AccuKine Human G-CSF ELISA Kit von Symanis. Beide ELISA wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Der IL-8-Standard wies einen linearen Messbereich von 3,1 - 200 pg/ml, der G-CSF-Standard von 31,5 - 1000 pg/ml auf.

### **2.3.5 Bio-Plex™ Human Cytokine Assay**

Die Methodik basiert auf einer Kombination von ELISA und Durchflusszytometrie und gleicht im Prinzip einem Sandwich-ELISA. Als *capture*-Antikörper kommen monoklonale, Cytokin-spezifische Antikörper zum Einsatz, die kovalent an unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Polystyren-Partikel (Beads) gekoppelt sind. Diese sind nicht wie bei einem konventionellen ELISA auf der Mikrotiterplatte immobilisiert, sondern verbleiben in einer 96-well-Filterplatte in Suspension. Jeder für ein spezielles Cytokin spezifische Bead trägt eine charakteristische Fluoreszenzmarkierung, da er in einem bestimmten Mischungsverhältnis mit zwei Fluorochromen bestückt wurde. Dies ermöglicht eine fluoreszenzcytometrische Unterscheidung der Beads und ihrer Cytokin-Spezifität. Durch Inkubation der Beads mit den Proben bzw. einer Standardreihe der Cytokine entstehen Antigen-Antikörper-Komplexe, welche nach mehreren Waschschritten von biotinylierten Cytokin-spezifischen Sekundäntikörpern gebunden werden. Die Detektion und Quantifizierung erfolgt nach Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin, welches an die Sekundäntikörper bindet, mit einem Luminex Plattenleser. Dieses spezielle Durchflusszytometer ermöglicht durch Anregung der Beads bei 635 nm die Klassifizierung der Cytokine und durch Anregung der Phycoerythrin-Moleküle bei 532 nm deren Quantifizierung. Pro Messung werden 100 Beads einer Sorte ausgewertet. Die Cytokinkonzentrationen der Proben werden durch den Vergleich mit den zusätzlich vermessenen Standardkurven mit Hilfe der Bio-Plex™ Manager-Software 4.1.1 berechnet. Dieses Verfahren ermöglicht die simultane Messung vieler Cytokine und Chemokine in einer einzigen Probe bei geringem Volumen.

Die Bestimmung folgender 19 Cytokine IL-1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF), G-CSF, IFN- $\gamma$ , Monozyten-chemotaktisches Protein-1 (MCP-1, CCL-2), *macrophage inflammatory protein-1* $\beta$  (MIP-1 $\beta$ , CCL-4), TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  erfolgte mit dem Bio-Plex™ Human Cytokine Assay nach Herstellerangaben. Als Proben wurden 50  $\mu$ l der unbeimpften Leerkontrollen (2.2.3) unverdünnt eingesetzt. Dabei wies der Standard je nach Cytokin einen durchschnittlichen Messbereich von 2,05 pg/ml bis 33.598,37 pg/ml (Min 5.164 pg/ml; Max 105.197 pg/ml) auf, die untere Nachweisgrenze ist in der nachfolgenden Tab. 3 gezeigt.

**Tab. 3: Untere Nachweisgrenzen des Bioplex-Assays**

Cytokin	Nachweisgrenze (pg/ml)	Cytokin	Nachweisgrenze (pg/ml)	Cytokin	Nachweisgrenze (pg/ml)
IL-1 $\alpha$	1,51	IL-1 $\beta$	2,67	IL-2	1,42
IL-4	0,32	IL-5	2,51	IL-6	2,01
IL-7	2,43	IL-8	1,77	IL-10	1,78
IL-12p	2,55	IL-13	2,68	IL-17	1,87
G-CSF	1,31	GM-CSF	0,74	IFN- $\gamma$	1,61
MCP-1	1,81	MIP-1 $\beta$	1,41	TNF- $\alpha$	6,42
TNF- $\beta$	2,14				

### 2.3.6 Bestimmung der Protein-Konzentration

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde die Methode nach Markwell *et al.* [153] angewendet. Als Modifikation des Lowry-Assays [154] ermöglicht sie eine Proteinbestimmung, die kompatibel mit Detergenzien, Saccharose und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ist. Parallel zu jeder Messung wurde eine Standardreihe mit BSA in Konzentrationen von 5 - 80 mg/ml erstellt. Die zu messenden Proben wurden so verdünnt, dass sie bei einem Ausgangsvolumen von 300  $\mu$ l innerhalb dieses Konzentrationsbereiches lagen. Zu 300  $\mu$ l verdünnter Probe bzw. Standard wurde 1 ml Lösung C (II 1.9) hinzu gegeben, mit Hilfe eines Vortexers kräftig vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l Lösung D (II 1.9) und weiterer Inkubation für 45 min wurde die Absorption bei 650 nm vermessen und

anhand der zuvor aufgenommenen Kalibrierungskurve die Proteinkonzentration bestimmt.

### 2.3.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende, diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde eingesetzt, um Proteine elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Bei dieser von Lämmli [155] entwickelten Methodik erfolgt mit  $\beta$ -Mercaptoethanol ein Aufbrechen der Disulfidbrücken der Proteine und durch Natriumdodecylsulfat (SDS) deren Denaturierung. Das negativ geladene SDS lagert sich zudem an die Proteine an und überdeckt dadurch ihre Eigenladung, wodurch deren Auftrennung im Acrylamidgel aufgrund ihres konstanten Ladung/Masse-Verhältnisses ausschließlich entsprechend ihrer Größe erfolgt. Die wie in Abschnitt 2.2.7 isolierten und gemäß Abschnitt 2.3.6 quantifizierten Proteine der Zellysate wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Polyacrylamidgel mit 1/5 Endvolumen an 5x reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend kurz kalt anzentrifugiert. Danach wurden gleiche Proteinmengen (55  $\mu$ g) der Proben sowie ein Molekulargewichts-Standard in separate Taschen eines zuvor vorbereiteten Gels (Tab. 4) geladen. Die Auftrennung erfolgte in einer auf 10°C gekühlten vertikalen Gelelektrophoreseapparatur bei 10 W unter Verwendung von Elektrophoresepuffer für 65 min. Im Anschluss daran erfolgte der Westernblot (2.3.8).

**Tab. 4: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamid-Gels**

	<b>Trenngel 12,5 %</b>	<b>Sammelgel 5 %</b>
A. dest.	1,28 ml	1,7 ml
1,89 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,4 ml	-
0,63 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	0,8 ml
0,5 % (w/v) SDS-Lösung	1,4 ml	0,8 ml
30 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30:0,8)	2,9 ml	0,66 ml
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	5,8 $\mu$ l	4 $\mu$ l
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung	35 $\mu$ l	20 $\mu$ l

### 2.3.8 Westernblot

Bei einem Westernblot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf eine Trägermembran übertragen und immobilisiert (Proteintransfer). Dies ermöglicht den anschließenden Nachweis der zu untersuchenden Proteine mit spezifischen Antikörpern (Immundetektion).

Der Transfer separierter Proteine (2.3.7) auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte in dieser Arbeit als Semidry-Blot. Dabei wandern die durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld aus der Gelmatrix zur Anode und werden auf einer chemisch inerten Membran fixiert. Zur Vorbereitung des Transfers wurde eine Nitrozellulose-Membran sowie spezielles Filterpapier auf die Größe des SDS-PAGE-Gels zugeschnitten. Anschließend wurde der Elektrobloetter in folgender Reihenfolge von der Anode zur Kathode beschichtet: vier Filterpapiere, Nitrocellulose-Membran, Trenngel, vier Filterpapiere. Die Filterpapiere, die Membran und das vom Sammelgel abgetrennte Trenngel wurden vor der Aufschichtung einzeln in Blotpuffer äquilibriert. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen verbleiben. Nach Aufsetzen der Kathode erfolgte der Transfer gekühlt bei 10°C für 45 min mit konstanter Stromstärke von 2,0 mA/cm<sup>2</sup>.

Nach erfolgtem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die geblockte Membran nach einem Waschschrift (3 x 5 min, TBS-T) mit dem in 1 % (w/v) BSA in TBS-T verdünnten Primärantikörper (bmi-1: 1 µg/ml) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen folgte auf einen Waschschrift (2 x 5 min, 2 x 10 min, TBS-T) die 2-stündige Inkubation mit dem in 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T verdünnten Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (100 ng/ml) bei Raumtemperatur. Die Detektion erfolgte nach einem erneuten Waschschrift mit TBS-T (2 x 5 min, 2 x 10 min) über die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase unter Verwendung eines *Enhanced Chemiluminescence*-Substrates, bei welcher die Peroxidase die Oxidation von Lumi-nol mit Wasserstoffperoxid unter Emission von Licht (Chemilumineszenz) katalysiert. Zu diesem Zweck wurde die Membran mit einer 1:1-Mischung des Zwei-Komponenten-Systems nach Herstellerangaben inkubiert und die Lichtreaktion mit Hilfe einer

Geldokumentationsanlage in Form von Banden dokumentiert. Der mitgeführte Proteinstandard ermöglicht die Größenordnung der detektierten Banden.

### **2.3.9 $\beta$ -Galaktosidase-Färbung**

Die Färbung dient dem Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in transfizierten Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie zur Analyse der Transfektionseffizienz und somit zur Ermittlung der optimalen Einsatzkonzentration der Retroviren durchgeführt. Hierfür wurde der Vektor pCL-MFG-LacZ verwendet, der das Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Die Durchführung erfolgte nach Sanes *et al.* [156]. Nach Waschen mit PBS erfolgte die Fixierung mit frisch hergestellter Fixierlösung für 2 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen erneut 3-malig mit PBS gewaschen und zur Anfärbung der Zellen über Nacht mit Färbelösung bei 37°C inkubiert. Die Färbelösung enthielt als Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal), welches von der  $\beta$ -Galaktosidase zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol hydrolysiert wird. Durch die Oxidation von 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol mit Sauerstoff entsteht der tiefblaue Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo [157]. Am nächsten Tag wurde die Färbung durch wiederholtes 5-minütiges Waschen mit PBS gestoppt und mit Hilfe eines Lichtmikroskops dokumentiert.

## **2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1 RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung inklusive eines doppelten DNase-Verdau aus primären sowie transformierten nasalen Epithelzellen und Hela-Zellen erfolgte mit dem RNeasy Mini-Kit nach Herstellerangaben und eigenen Optimierungen. Zunächst wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben abgelöst und sedimentiert. Nach Bestimmung der Zellzahl nach Abschnitt 2.2.2 wurden Zelllysate hergestellt. Dafür wurde RLT-Puffer zugegeben, das Zellsediment vollständig resuspendiert und durch wiederholtes Pressen durch eine 20 G-Kanüle homogenisiert. Um Kontaminationen durch genomische DNA zu vermeiden, wurde im Anschluss an den ersten Waschschrift mit RW1-Puffer eine erste DNase-I-Hydrolyse durchgeführt. Dafür wurde die Membran für 20 min mit 27 U DNase I bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde

weiter nach Herstellerprotokoll verfahren. Das erhaltene Eluat wurde einer zweiten DNase-I-Hydrolyse unterzogen und über eine neue RNeasy-Säule (diesmal ohne DNase-I-Verdau) aufgereingt. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurden gemäß Abschnitt 2.4.2 bestimmt und die RNA anschließend bei -80 °C gelagert.

#### **2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Biophotometer oder dem NanoDrop ND-1000 UV Vis Spektralphotometer und der dazugehörigen NanoDrop Software Version 3.2.1. Am NanoDrop war es möglich, die Konzentration der Nukleinsäuren direkt in 1 µl Lösung zu erfassen, bei Benutzung des Biophotometers wurden die Nukleinsäuren zuvor mit RNase-freiem 10 mM Tris-Puffer (pH 7,5) verdünnt. Eine Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) von 1 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml einzelsträngiger RNA [158]. Zusätzlich wurde bei 280 nm die Absorption von Proteinen gemessen, so dass der Reinheitsgrad aus dem Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  ermittelt werden konnte. Nur Proben mit einem Wert zwischen 1,7 und 2,0 wurden verwendet.

#### **2.4.3 Qualitätskontrolle der RNA**

Zur Überprüfung der Qualität der RNA wurden zwei Methoden angewendet. Die Integrität der RNA wurde mit einer denaturierenden Formaldehyd-Agarose-(FA)-Gelelektrophorese kontrolliert und, um Kontaminationen der RNA-Proben mit genomischer DNA auszuschließen, wurde eine Test-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Für die FA-Gelelektrophorese wurde ein 1,2 %-iges FA-Gel [1,2 % (w/v) Agarose, 20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 221 mM Formaldehyd, pH 7,0] zubereitet, Ethidiumbromid in einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben und die Lösung in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die zu untersuchenden RNA-Proben (je mindestens 1 µg) wurden mit 1/5 Volumen 5x RNA-Ladepuffer versetzt, für 5 min bei 65°C erhitzt und für 2 min auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V mit 1x FA-Laufpuffer für 2,5 h. Die optische Auswertung erfolgte mit Hilfe einer UV-Geldokumentationsanlage. Während bei intakten RNA-Proben die ribosomale RNA (rRNA) als zwei klare Banden (18S und 28S) zu erkennen ist, deuten zusätz-

liche Banden oder ein Verschmieren der rRNA-Banden auf Kontamination oder Degradation der RNA hin.

Als Test-PCR wurde eine PCR auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt, bei der anstelle der komplementären DNA (cDNA) die isolierte RNA als Matrize eingesetzt wurde. Es wurde analog der in Abschnitt 2.4.5 beschriebenen Durchführung verfahren, doch zunächst wurde die RNA mit dem entsprechenden Anteil an A. dest. bei 65°C für 15 min erhitzt, um mögliche Spuren von DNase I zu inaktivieren. Nur RNA-Proben, die kein positives PCR-Produkt zeigten, wurden anschließend für die reverse Transkription verwendet.

#### **2.4.4 Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)**

Für den Nachweis der Expression von Genen wurde die aus den Zellen isolierte RNA in einzelsträngige komplementäre DNA umgeschrieben. Dieser Prozess wird als reverse Transkription bezeichnet. Bei dieser Methode macht man sich die Eigenschaften des Enzyms reverse Transkriptase zu Nutze, welches ausgehend von einer RNA-Matrize die dazu komplementäre DNA synthetisiert. Dafür werden an die RNA-bindende Primer benötigt. Oft dienen Oligo-dT-Abschnitte mit 10-15 Basen als solche Primer, da sie komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA sind.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte cDNA-Synthese wurde das Advantage RT-for-PCR Kit verwendet, welches neben der retroviralen *moloney murine leukemia virus (MMLV)*-Transkriptase alle weiteren benötigten Komponenten enthielt. Vor der Umschreibung der RNA in cDNA mussten jedoch zunächst mögliche Spuren der DNase I inaktiviert werden. Dafür wurden von den unterschiedlichen RNA-Isolaten Portionen genommen, die einer Menge von 1 µg entsprachen, mit RNase-freiem Wasser auf ein einheitliches Volumen von 12,5 µl gebracht und für 15 min bei 65°C inkubiert. Nach sofortiger Abkühlung auf Eis erfolgte die Zugabe von 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer und eine 2-minütige Erhitzung auf 70°C, um für die Bindung der Primer die Sekundärstruktur der RNA aufzuheben. Nachfolgend wurde der Ansatz erneut sofort auf Eis abgekühlt und die weiteren Komponenten hinzugefügt: 4,0 µl 5x Reaktionspuffer, 1,0 µl Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)-Mix, 0,5 µl rekombinanter RNase-Inhibitor, 1,0 µl MMLV reverse Transkriptase. Anschließend erfolgte die re-



verse Transkription für 60 min bei 42°C. Nach der 5-minütigen Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 95°C und der Zugabe von 80 µl RNase-freiem Wasser wurde die so gewonnene cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.4.5 RT-PCR

Die Kombination aus reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ermöglicht die Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene. Dabei stellt die PCR eine leistungsfähige Technik zur Amplifizierung definierter DNA-Abschnitte dar. Sie besteht aus drei grundlegenden Schritten und beginnt mit einer thermischen Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Anschließend binden synthetische Oligonukleotide (Primer) an komplementäre Zielsequenzen, welche den interessierenden DNA-Abschnitt einrahmen (Annealing). Dabei ist die optimale Annealing-Temperatur abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und damit von ihrer Länge und Basenzusammensetzung. Zuletzt folgt die Verlängerungsphase (Elongation), bei der eine hitzestabile DNA-Polymerase die Primer als Startmoleküle verwendet und einen neuen DNA-Strang komplementär zur Matrize synthetisiert. Die Elongationszeit ist dabei von der Länge des DNA-Fragments und der Prozessivität der verwendeten Polymerase abhängig. Durch zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt. Die aus der reversen Transkription gewonnene cDNA wurde in der PCR mit zwei genspezifischen Oligonukleotidprimern (Tab. 5) amplifiziert.

**Tab. 5: Verwendete Primer**

Primer	Sequenz	Referenz	Größe des PCR-Produktes
Bmi-1	F: 5'-ATGCATCGAACAACGAGAATCAAGATCACT-3' R: 5'-TCAACCAGAAGAAGTTGCTGATGACCC-3'	[140]	1101 bp
GAPDH	F: 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAAC-3' R: 5'-CTTCTCCATGGTGGTGAAGA-3'	[159]	219 bp

Parallel wurde unter gleichen Bedingungen die Expression von GAPDH untersucht, da GAPDH von Epithelzellen als sogenanntes *house keeping gene* konstant exprimiert wird. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tab. 6 angegeben.

Die Durchführung der PCR erfolgte unter Verwendung eines Thermocyclers entsprechend den in Tab. 7 dargestellten Programmen. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (2.4.6) visualisiert.

**Tab. 6: Reaktionsansatz der PCR**

Komponenten	eingesetzte Menge	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	2 µl	1x
10 mM dNTPs	0,4 µl	je 200 µM
Forward- und Reverse-Primer (je 10 µM)	je 1 µl	Je 0,5 µM
cDNA*	2,5 µl	
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	1,6 µl	2 mM
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	1 U/20 µl
A. dest.	ad 20 µl	

\* Als Positivkontrolle wurde cDNA aus Hela-Zellen eingesetzt, für die Negativkontrolle wurde anstatt der cDNA A. dest. verwendet.

**Tab. 7: PCR-Programme für bmi-1 und GAPDH**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	94°C	1 min	} 35
Annealing	57,3°C (GAPDH), 63°C (bmi-1)	1 min	
Elongation	72°C	1 min (GAPDH), 2 min (bm-1)	
Extension	72°C	7 min	
Aufbewahrung	4°C	∞	1

### 2.4.6 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht, da sich in einer Agarose-Matrix DNA-Moleküle im elektrischen Feld mit einer Geschwindigkeit bewegen, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Für die Auftrennung der in dieser Arbeit eingesetzten Nukleinsäuren wurden horizontale 1 %-ige-Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wurde in 0,5x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Wenn nach leichtem Schwenken keine Schlierenbildung mehr sichtbar war, wurde die Lösung unter kaltem Wasser auf Handwärme abgekühlt, Ethidi-

umbromid in einer Konzentration von 1 µg/ml zur späteren Detektion der DNA zugegeben und die Lösung in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurden die Proben mit 1/6 Volumen 6x Ladepuffer versetzt, gegebenenfalls die 1 kb DNA-Leiter als Molekulargewichtsstandard aufgetragen und die Elektrophorese mit einer konstanten Spannung von 80 V für 120 min durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer diente 0,5x TAE. Im Anschluss wurden die Banden durch die Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids auf einem UV-Tisch detektiert und mit der dazugehörigen BioDoc-Fotodokumentationsanlage digital dokumentiert.

#### **2.4.7 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung**

Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik zum DNA- oder RNA-Nachweis (z.B. in Geweben), bei welcher eine spezifische, Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonde an die nachzuweisende Nukleinsäure bindet und diese dadurch sichtbar macht. Die Kombination des präzisen genetischen Nachweises mit Mikroskopie ermöglicht die Identifikation, Visualisierung und Lokalisation von z.B. Mikroorganismen innerhalb ihres natürlichen Habitates oder in infiziertem Gewebe.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der FISH mit der Immunfluoreszenzfärbung auf E-Cadherin kombiniert, um eine mögliche intrazelluläre Lokalisation von *S. aureus* bestimmen zu können. Für die FISH wurden wie unter Abschnitt 2.3.1 beschriebene Paraffinschnitte verwendet. Die Schnitte wurden zunächst zur besseren Entparaffinierung für 20 min bei 60°C angewärmt, wie im Abschnitt 2.3.1 beschrieben entparaffiniert, rehydratisiert und anschließend luftgetrocknet. Für die Hybridisierung wurde das *S. aureus* PNA FISH™ Kit verwendet und die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben sowie eigenen Optimierungen. Statt der im Kit mitgelieferten Fluorescein-Isothiocyanat-markierten Sonde wurde eine Alexa488-markierte Sonde verwendet, da sich der Alexa488-Farbstoff gegenüber Fluoresceinisothiocyanat durch eine stärkere Leuchtintensität auszeichnet. Nach Angaben der Literatur [160] und des Herstellers hat die Sonde die Sequenz 5'-GCTTCTCGTCCGTTC-3' und erkennt damit einen Bereich der *S. aureus* 16S rRNA.

Pro zu untersuchendem Schnitt wurden 10 µl der Sonde aufgetragen, diese luftblasenfrei mit einem Deckgläschen abdeckt und mit Fotokleber abgedichtet. Nach Aus-

härtung des Fotoklebers im Dunklen (ca. 10 min) erfolgte die Hybridisierung bei 55°C für 90 min in einem vorgeheizten Hybridisierungssofen. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Deckgläschen nach Ablösen des Fotoklebers vorsichtig abgenommen und die Proben in dem im Kit enthaltenen, zuvor angewärmten Waschpuffer bei 55°C für 30 min gewaschen. Als Positivkontrollen wurden hitzefixierte Ausstriche *S. aureus*-positiver Blutkulturen verwendet und als Negativkontrollen wurden die Schnitte statt mit der Sonde mit SDS-Sodium-Citrat-(SSC)-Puffer inkubiert. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenz-Färbung auf E-Cadherin (ab den Blockierungsschritten, wie unter Abschnitt 2.3.3 beschrieben) bzw. bei den Positivkontrollen nur eine DNA-Färbung mit DAPI. Alle Schritte erfolgten im unter abgedunkelten Bedingungen. Für die DNA-Färbung wurden die Schnitte nach stringentem Waschen zunächst in TBS abgekühlt und anschließend mit 0,1 µg/ml DAPI in TBS bei 37°C für 60 min inkubiert. Nach einem Waschschrift in A. dest. zur Entfernung von Salzen erfolgte das Eindeckeln mit dem Fluoreszenzeindeckmittel. Bis zur Auswertung wurden die Schnitte bei 4°C gelagert, wobei die Deckgläschen für eine längere Lagerung mit Nagellack eingefasst wurden. Die Auswertung erfolgte mit einem motorisierten inversen Fluoreszenzmikroskop IX81 von Olympus.

## **2.5 Mikrobiologische Methoden**

### **2.5.1 Bestimmung der *S. aureus*-Keimzahl aus Nasensekreten**

Von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Podschun (Institut für Infektionsmedizin, Universität zu Kiel) wurde die nasale Kolonisierung mit *S. aureus* in den wie unter Abschnitt 2.1.1 beschrieben hergestellten Nasensekreten bestimmt. Zur Quantifizierung der Keimzahl wurden 100 µl Nasensekret auf Chapman-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde der Tupfer in 200 µl TSB als Anreicherungskultur ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese wurde anschließend sowohl auf Chapman-Agar als auch auf Schafblutagar fraktioniert ausgestrichen. Als Reinkulturen erhaltene Isolate wurden als *S. aureus* identifiziert, wenn die Kolonien das typische Aussehen aufwiesen, Hämolyse-positiv waren, *Clumping factor* und Protein A exprimierten und die Fähigkeit zur Koagulation von Citratplasma sowie zur Säureproduktion nach Fermentation von Mannitol hatten.

## 2.6 Statistische Auswertung

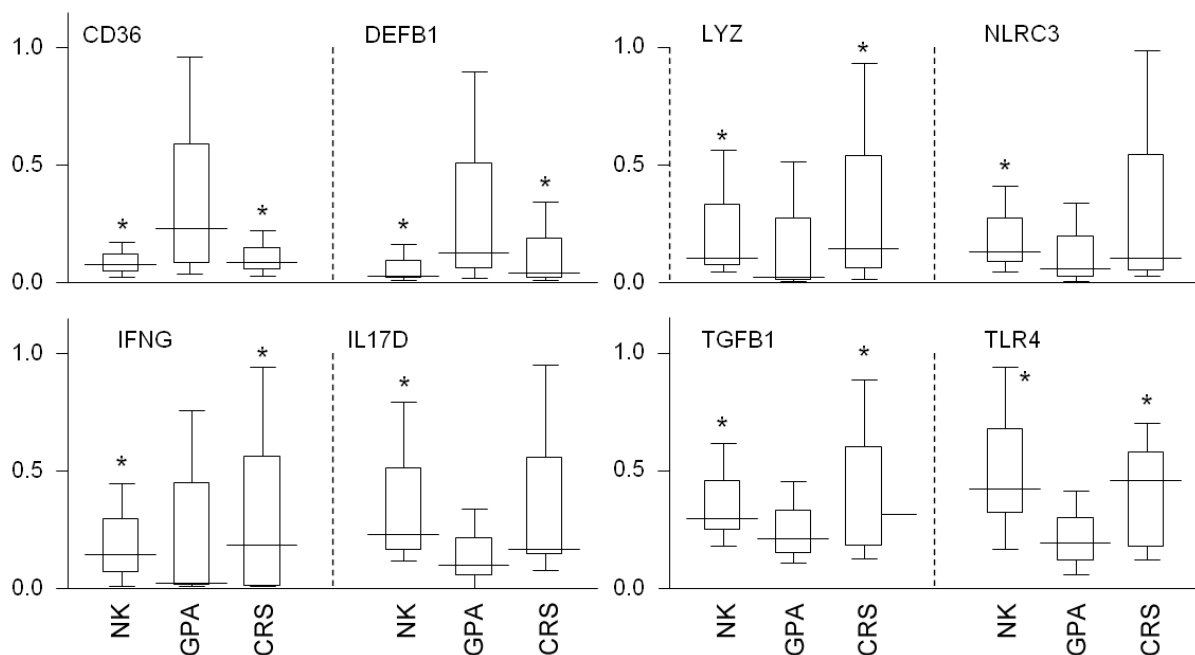
Die statistische Auswertung der Daten und die Berechnung der p-Werte erfolgte mit der Statistiksoftware SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Ergebnisse sind bei nicht normalverteilten Daten als Mediane mit Interquartilsabstand (IQR) sowie mit kleinstem (Min) und größtem (Max) Wert und bei homogenen Verteilungen als arithmetische Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) unter Angabe der Stichprobengröße (n) dargestellt.

Dichotome Daten wurden mit dem exakten Test nach Fisher ausgewertet. Hierbei wurde aufgrund der gegebenen Fragestellung einseitig getestet. Skalierte Daten wurden bei sehr kleiner Stichprobengröße und homogener Verteilung mit einem t-Test analysiert, ansonsten wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich zweier Stichproben angewendet. Bei diesen Daten wurde zweiseitig getestet. Ergebnisse mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Eine Berechnung der Statistik fand erst ab einer Stichprobengröße von  $n \geq 5$  statt. Ein ausführlicher Überblick über die durchgeführten statistischen Testverfahren befindet sich im Anhang unter XI 2. Zur grafischen Aufbereitung der Daten wurden die Programme SPSS 17.0 sowie GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) verwendet.

## III Ergebnisse

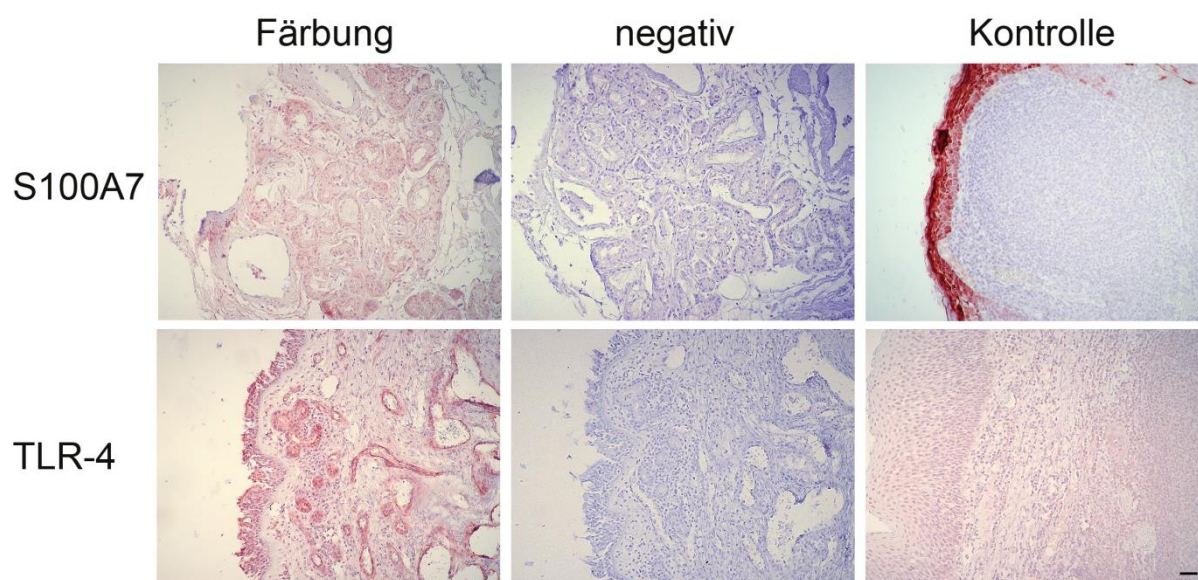
### 1 Entzündungsassoziierte Genexpression in nasalen Biopsien

In einer dieser Arbeit zugrundeliegenden Vorarbeit war der Hypothese nachgegangen worden, dass sich pathophysiologische Aspekte des Zusammenspiels exogener und endogener Faktoren in der Genexpression der nasalen Mukosa von GPA-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen widerspiegeln. Dafür wurden 49 Gene ausgewählt, deren Genprodukte entweder in die epitheliale Barrierefunktion oder in die angeborene Immunabwehr involviert sind oder denen eine Rolle bei der GPA-Pathogenese zugesprochen wird (wie z.B. PR3 und *protease-activated receptor* (PAR) 2 [54]). Die abgeleiteten Proteine gehören den folgenden funktionellen Gruppen an: Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr wie Toll-*like*-Rezeptoren, NOD-*like*-Rezeptoren, Peptidoglykan-Rezeptor und CD36, Adaptoren der TLR- oder NLR-Signalkaskaden, antimikrobielle Peptide (AMP), Cytokine der epithelialen Immunantwort und extrazelluläre Matrixproteine.



**Abb. 7: Differenziell exprimierte Transkripte bei GPA.** Relative Expression von acht signifikant unterschiedlich (\*) regulierten Transkripten, detektiert in nasalen Biopsien von NK-, GPA- und CRS-Patienten. Die Auswertung wurde von Robert Häsler zur Verfügung gestellt [161].

Mit quantitativer Echtzeit-PCR konnte nachgewiesen werden, dass nasale Schleimhaut von 31 NK, 29 GPA-Patienten und 31 CRS-Patienten als Krankheitskontrollen signifikante Unterschiede in ihrem mRNA-Expressionsprofil bezüglich folgender Gene aufwiesen: *CD36* und *DEFB1* (kodiert hBD1) zeigten bei GPA eine höhere, *TLR4*, *NLRC3*, *IFN- $\gamma$* , *TGF- $\beta$ 1*, *IL-17D* sowie *Lysozym* eine geringere Expression im Gegensatz zu NK (Abb. 7). Außerdem konnte beobachtet werden, dass *DEFB4* (kodiert hBD2) und *S100A7* (Synonym Psoriasin) ausschließlich von GPA-Patienten exprimiert werden [161]. Zur Bestätigung der mRNA-Ergebnisse auf Proteinebene wurden exemplarisch die Proteine S100A7 und TLR4 mittels Immunhistochemie in Paraffinschnitten nasaler Biopsien (8 NK, 11 GPA, 5 CRS) detektiert (Abb. 8).



**Abb. 8: Immunhistochemischer Nachweis von S100A7 und TLR4 in nasalen Biopsien.** Für die Negativkontrolle wurde der erste Antikörper durch PBS ersetzt (negativ). Als Positivkontrolle wurden Biopsien der Tonsilla palatina eingesetzt (Kontrolle). Vergrößerung: 200 x, Balken = 50  $\mu$ m. Abb. aus [161].

## 2 Cytokinexpression nasaler Epithelzellen

### 2.1 Basale Cytokinexpression nasaler Epithelzellen

Zur Analyse, ob der GPA eine veränderte Cytokinexpression zu Grunde liegt, wurde zunächst die basale Cytokinexpression nasaler Epithelzellen sowie anschließend diese nach Stimulation mit verschiedenen *S. aureus*-Komponenten (II 2.2.3) unter-

sucht. Für die Analyse der basalen Cytokinexpression wurden zunächst nasale Epithelzellen (unbehandelte Kontrollen aus II 2.2.3) von 19 NK- und 20 GPA-Patienten kultiviert.

**Tab. 8: Basale Cytokinexpression nasaler Epithelzellen**

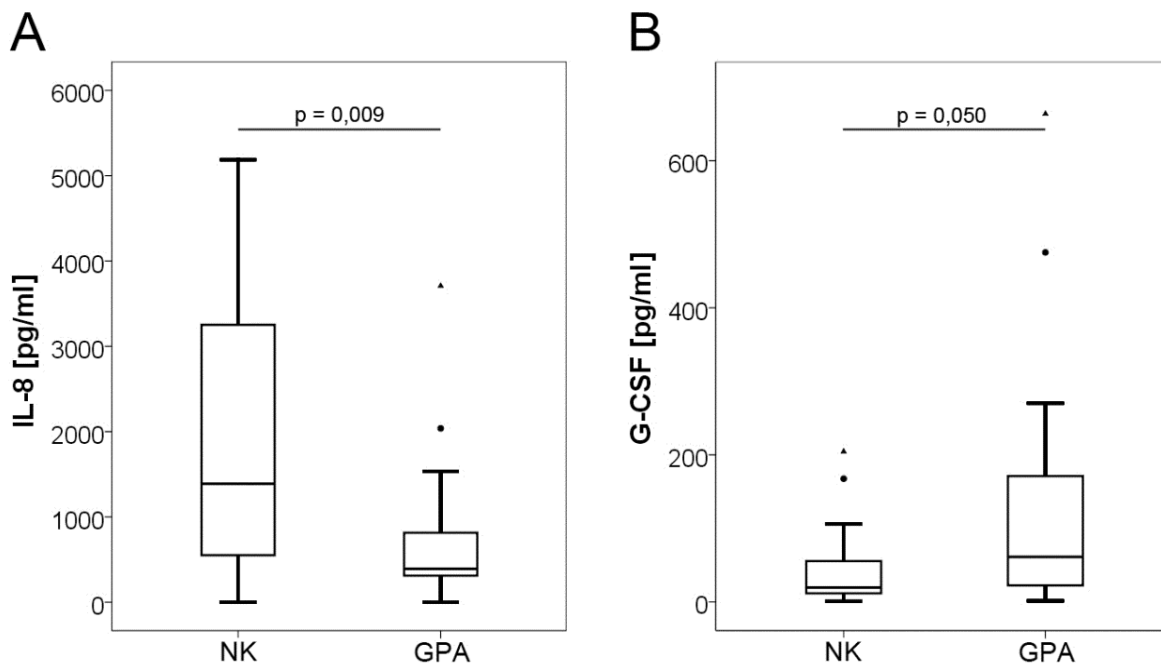
Cytokin	NK				GPA				NK vs. GPA
	Median (pg/ml)	IQA (pg/ml)	Min (pg/ml)	Max (pg/ml)	Median (pg/ml)	IQA (pg/ml)	Min (pg/ml)	Max (pg/ml)	p-Wert
IL-1 $\alpha$	71,74	120,3	uN	319,2	92,38	100,2	7,90	477,1	0,322
IL-1 $\beta$	<2,67	1,68	uN	8,67	2,70	1,73	uN	12,74	0,224
IL-2	<1,42	1,87	uN	6,46	3,60	3,25	uN	6,00	0,070
IL-4	<0,32	0,22	uN	0,80	<0,32	0,31	uN	0,72	0,283
IL-5	unterhalb der Nachweisgrenze (< 2,51)								
IL-6	26,22	37,29	2,81	788,3	29,61	44,40	3,70	139,5	0,607
IL-7	unterhalb der Nachweisgrenze (< 2,43)								
IL-8	<b>1388</b>	3360	uN	5188	<b>319,2</b>	571,5	uN	3709	<b>0,009</b>
IL-10	unterhalb der Nachweisgrenze (< 1,78)								
IL-12	<2,55	0,00	uN	3,75	<2,55	1,31	uN	4,03	0,283
IL-13	unterhalb der Nachweisgrenze (< 2,68)								
IL-17	2,77	2,68	uN	6,41	3,54	2,72	uN	6,01	0,101
G-CSF	<b>19,60</b>	57,66	uN	204,4	<b>61,30</b>	171,8	1,53	663,6	<b>0,050</b>
GM-CSF	10,50	4,62	uN	28,70	12,50	3,41	7,74	21,58	0,084
IFN- $\gamma$	4,61	3,92	uN	21,41	5,90	4,68	2,27	18,18	0,089
MCP-1	3,66	1,83	uN	8,21	4,12	1,48	uN	7,90	0,667
MIP-1 $\beta$	<1,41	0,48	uN	2,37	1,43	0,96	uN	2,79	0,141
TNF- $\alpha$	<6,42	0,00	uN	13,46	<6,42	1,48	uN	11,00	0,296
TNF- $\beta$	9,44	8,85	uN	24,46	14,20	8,69	3,35	23,40	0,054

IQA = Interquartilsabstand, Min = kleinster gemessener Wert, Max = größter gemessener Wert. uN = unter der Nachweisgrenze (Details siehe II 2.3.5).

Um ein umfangreiches Cytokin-Spektrum abzudecken, wurden Überstände dieser Zellkulturen mit einem Multiplex-Cytokinassay (II 2.3.5) auf 19 entzündungsrelevante Cytokine untersucht. Diese 19 Cytokine umfassten proinflammatorische (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-17, TNF- $\alpha$ ), antiinflammatorische (IL-4, IL-10, IL-13), chemotaktisch wirksame (IL-8, MCP-1, MIP-1), hauptsächlich der adaptiven Immunantwort zugeordnete (IL-2, IL-4, IL-12p70, IL-13, IFN- $\gamma$ ) sowie für entzündungsassoziierte Proliferations- (G-CSF, GM-CSF) und Apoptosemechanismen (TNF- $\beta$ ) relevante Mediatoren. Für 17 der untersuchten Cytokine konnte bei der gewählten Patientenzahl und bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  kein statistisch signifikanter Unter-



schied hinsichtlich der gemessenen Konzentrationen zwischen primären nasalen Epithelzellkulturen von GPA- und NK-Patienten festgestellt werden (Tab. 8, Mann-Whitney-U-Test). Signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch für G-CSF und IL-8: G-CSF wird von nasalen Epithelzellen der GPA-Patienten vermehrt (GPA: Median 61,3 pg/ml vs. NK: Median 19,6 pg/ml,  $p = 0,050$ ) und IL-8 geringer exprimiert (GPA: Median 319 pg/ml vs. NK: Median 1388 pg/ml,  $p = 0,009$ , Abb. 9).



**Abb. 9: Signifikant unterschiedliche Cytokinkonzentrationen im Überstand nasaler Epithelzellkulturen von Patienten mit GPA und Normalkontrollen (NK).** Basalexpression von IL-8 (A) und G-CSF (B),  $n = 19$  (NK) bzw.  $20$  (GPA). Die Daten sind als Box-Plots dargestellt, der Median ist als gerade Linie in der Box gezeigt, die untere und obere Linie der Box repräsentieren das 1. bzw. 3. Quartil und die Whisker zeigen die Lage des Minimums und Maximums der Stichprobe an. Die runden Punkte sind Ausreißer (größer als der 1,5-fache Interquartilsabstand) und die Dreiecke Extremwerte (größer als der dreifache Interquartilsabstand). Die p-Wert-Bestimmung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

## 2.2 IL-8-Expression nach Stimulation mit *S. aureus*-Komponenten

Da sich bei der Analyse der Basalexpression zeigte, dass IL-8 bei GPA-Patienten signifikant reduziert sezerniert wird, erfolgte im Anschluss die Analyse der IL-8-Sekretion nasaler Epithelzellen als Reaktion auf eine Stimulation mit *S. aureus*. Dafür wurden Stimulationen nasaler Epithelzellen von 130 Patienten (40 NK, 46 GPA, 44 CRS) mit verschiedenen *S. aureus*-Komponenten durchgeführt (Bakterienlysate in

den Konzentrationen  $1 \times 10^3/\text{ml}$ ,  $1 \times 10^5/\text{ml}$ ,  $1 \times 10^7/\text{ml}$  und *S. aureus*-Überstände in den Verdünnungen 1:5, 1:50 und 1:500 ausgehend von einer Bakterienkonzentration von  $5 \times 10^8/\text{ml}$ , mit Zellkulturmedium verdünnt; II 2.2.3). Die IL-8-Konzentrationen in je 10 Zellkulturüberständen der drei Gruppen (NK, GPA, CRS) wurden mit ELISA quantifiziert und die Ergebnisse wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet. Die Messwerte sind übersichtshalber als Mediane in der Tab. 9 sowie ausführlicher im Anhang (XI 3) gezeigt und dienen dem Überblick über die im Folgenden analysierten Effekte der einzelnen Stimuli auf die nasalen Epithelzellen und die Gruppenvergleiche.

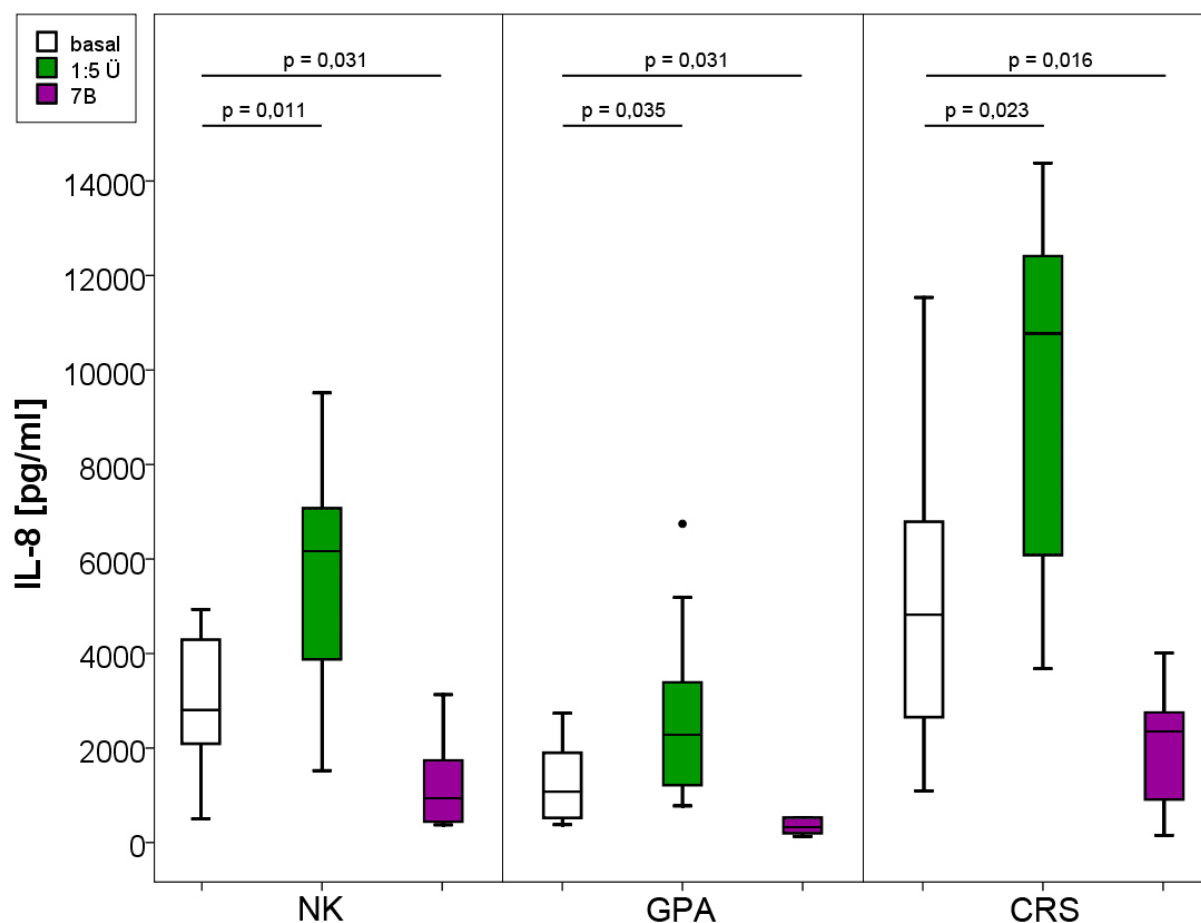
**Tab. 9: IL-8-Konzentrationen im Überstand nasaler Epithelzellkulturen ohne und mit Stimulation\*.#**

	NK		GPA		CRS	
	16 h	24 h	16 h	24 h	16 h	24 h
<b>unstimuliert</b>	1859	2805	532	1077	2283	4823
<b>TSB</b>	2131	2968	709	1268	3231	5767
<b>1:500 Ü</b>	3708	3037	700	1099	3260	6502
<b>1:50 Ü</b>	2584	4177	1145	1618	5786	7862
<b>1:5 Ü</b>	3878	6161	1040	2287	7418	10773
<b>3B</b>	1810	2558	711	1021	2025	4923
<b>5B</b>	1355	2289	303	700	2310	4620
<b>7B</b>	917	943	210	323	1356	2349

\*Dargestellt sind die Mediane in pg/ml. #Reaktionsansätze: unstimuliert, bakterielles Wachstumsmedium in einer Verdünnung von 1:5 (TSB), Bakterienlysate in den Konzentrationen  $1 \times 10^3/\text{ml}$  (3B),  $1 \times 10^5/\text{ml}$  (5B),  $1 \times 10^7/\text{ml}$  (7B) und *S. aureus*-Überstände in den Verdünnungen 1:5, 1:50 und 1:500 (1:5 Ü, 1:50 Ü, 1:500 Ü). Weitere Erklärungen im Material- und Methodenteil unter II 2.2.3.

Von den in Tab. 9 genannten Stimuli wurde zunächst analysiert, welche einen statistisch signifikanten Effekt auf nasale Epithelzellen in Kultur ausüben. Dafür wurden die IL-8-Konzentrationen der Zellkulturüberstände statistisch mit der unbeimpften Leerkontrolle (im Folgenden als „leer“ abgekürzt) verglichen (Mann-Whitney-U-Test). Der bakterielle Überstand in der Verdünnung von 1:5 (im Folgenden „1:5 Ü“ abgekürzt) übte nach 24 h Stimulation einen stimulierenden Effekt auf alle drei Gruppen aus [Mediane: NK: 6161 pg/ml (1:5 Ü), 2805 pg/ml (leer),  $p = 0,011$ ; GPA: 2287 pg/ml (1:5 Ü), 1077 pg/ml (leer),  $p = 0,035$ ; CRS: 10773 pg/ml (1:5 Ü), 4823 pg/ml (leer),  $p = 0,023$ ; Abb. 10]. Bei der CRS-Gruppe konnte dieser Effekt schon nach 16 h Stimulation beobachtet werden ( $p = 0,015$ ).

Eine Inhibition durch das Lysat der Konzentration von  $1 \times 10^7$  Bakterien/ml (im Folgenden als „7B“ abgekürzt) konnte nach 24 h Stimulation bei allen drei Gruppen festgestellt werden [Mediane: NK: 943 pg/ml (7B), 2805 pg/ml (leer),  $p = 0,031$ ; GPA: 323 pg/ml (7B), 1077 pg/ml (leer),  $p = 0,031$ ; CRS: 2349 pg/ml (7B), 4823 pg/ml (leer),  $p = 0,016$ ; Abb. 10]. Dieser Effekt war bei CRS wiederum schon nach 16 h erkennbar ( $p = 0,012$ ).

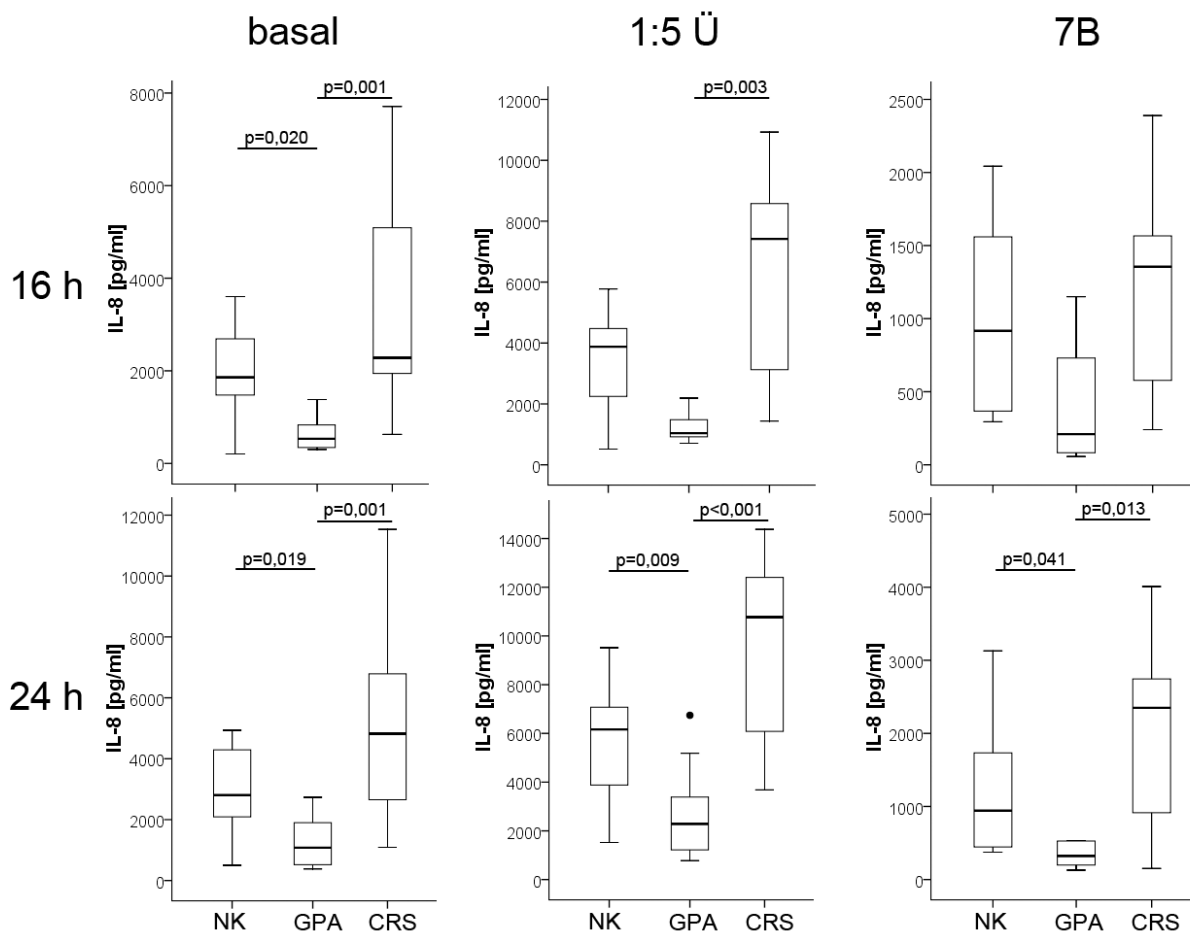


**Abb. 10: IL-8-Konzentrationen in den Überständen nasaler Epithelzellkulturen nach 24 h Stimulation.** Dargestellt sind die Stimuli *S. aureus*-Überstand in der Verdünnung 1:5 (1:5 Ü) sowie *S. aureus*-Lysat einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Bakterien/ml (7B) im Vergleich zur Basalexpression (basal) bei den drei Patientengruppen (NK, GPA, CRS,  $n = 10$ ). Die p-Wert Bestimmung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

Nur mit den höchsten Dosierungen (1:5 Ü und 7B) konnten statistisch signifikante Ergebnisse erzielt werden. Weitere Zeiteffekte mit höheren Werten nach 24 h als nach 16 h konnten zwar bei den ELISA-Messungen einiger Patienten beobachtet, aber statistisch nicht belegt werden. Für 1:5 Ü bei NK (Mediane: 16 h: 3878 pg/ml, 24 h:

6161 pg/ml,  $p = 0,055$ ) und GPA (Mediane: 16 h: 1040 pg/ml, 24 h: 2287 pg/ml,  $p = 0,075$ ) ließen sich mögliche Tendenzen feststellen.

Damit eine Aussage getroffen werden konnte, ob sich die oben genannten Gruppen in ihrer IL-8-Sekretion als Reaktion auf die Stimuli unterscheiden, wurden die gemessenen Konzentrationen hinsichtlich ihrer Basalexpression (unbeimpfte Leerkontrolle) und den beiden beobachteten Effekten (1:5 Ü und 7B) verglichen (Abb. 11). In der Basalexpression war nach 16 und 24 h eine statistisch signifikant niedrigere IL-8-Konzentration bei GPA im Vergleich zu NK [ $p = 0,020$  (16 h) bzw.  $0,019$  (24 h)] wie auch zu CRS [ $p = 0,001$  (16 h) bzw.  $0,001$  (24 h)] zu verzeichnen. Für NK vs. CRS war dagegen kein signifikanter Unterschied zu beobachten.

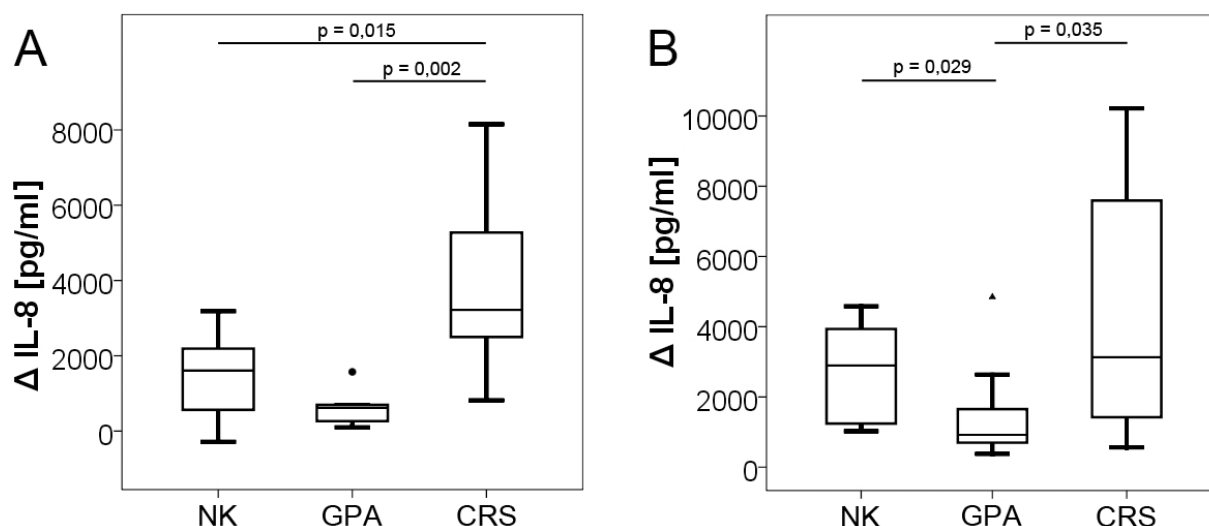


**Abb. 11: IL-8-Konzentrationen in den Überständen nasaler Epithelzellkulturen nach 16 und 24 h Stimulation.** Dargestellt sind die Konzentrationen der Basalexpression (basal) sowie der Stimuli *S. aureus*-Überstand in der Verdünnung 1:5 (1:5 Ü) und *S. aureus*-Lysat einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Bakterien/ml (7B) der drei Patientengruppen (NK, GPA, CRS,  $n = 10$ ). Die p-Wert Bestimmung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

Bei einem Vergleich der IL-8-Expression der Gruppen nach der Stimulation mit dem *S. aureus*-Überstand (1:5 Ü) fiel auf, dass diese bei GPA im Vergleich zu CRS zu beiden Zeitpunkten [ $p = 0,003$  (16 h) bzw.  $p < 0,001$  (24 h)] wie zu NK nach 24 h signifikant geringer ist ( $p = 0,009$ ). Ein Vergleich der IL-8-Konzentrationen bei Stimulation mit Lysaten von  $1 \times 10^7$  Bakterien/ml (7B) ergab, dass sich nach 24 h GPA mit geringerer IL-8-Expression sowohl von NK ( $p = 0,041$ ) als auch von CRS ( $p = 0,013$ ) signifikant unterscheidet. Zwischen CRS und NK ließ sich zu beiden Zeitpunkten kein Unterschied feststellen.

Die Gruppen sollten außerdem hinsichtlich ihrer Antwort auf den Stimulus verglichen werden. Der dynamische Umfang beschreibt bei einer Stimulation die Änderung der IL-8-Konzentration gegenüber der Basalexpression, z.B. also bei einem stimulierenden Effekt die Menge neu sekretierten IL-8. Dafür wurden mit den Differenzwerten der IL-8-Konzentrationen ( $\Delta$  IL-8; 1:5 Ü - leer bzw. 7B - leer) statistische Vergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Nasale Epithelzellen von GPA-Patienten reagierten in geringerem Maße als NK-Patienten auf den Stimulus 1:5 Ü nach 24 h ( $p = 0,029$ ). GPA-Patienten bildeten also nicht nur basal weniger IL-8 als Normalkontrollen, sie waren außerdem in ihrer Fähigkeit eingeschränkt, auf einen Stimulus zu reagieren. Nach 16 h Stimulation war dieser Effekt allerdings noch nicht zu beobachten. Nasale Epithelzellen von CRS-Patienten hingegen bildeten auf den Stimulus 1:5 Ü nach 16 h signifikant mehr IL-8 als diejenigen von NK-Patienten ( $p = 0,015$ ), was jedoch nach 24 h nicht mehr nachweisbar war. Wiederholt war auffällig, dass sich die Reaktionen nasaler Epithelzellen von GPA- und CRS-Patienten zu beiden Zeitpunkten in Form von geringerer IL-8 Expression bei GPA-Patienten signifikant voneinander unterscheiden [ $p = 0,002$  (16h) bzw.  $0,035$  (24h)] (Abb. 12). Hinsichtlich der Reaktion auf 7B zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen zu beiden Zeitpunkten.



**Abb. 12: Signifikante Unterschiede im dynamischen Umfang der IL-8-Sekretion nasaler Epithelzellen nach Stimulation mit *S. aureus*-Überstand.** Nasale Epithelzellen der Patientengruppen NK, GPA und CRS wurden für 16 h (A) bzw. 24 h (B) mit *S. aureus*-Überstand in einer Verdünnung von 1:5 mit Zellkulturmedium stimuliert; n = 10. Dargestellt ist die Differenz mit ELISA quantifizierter IL-8-Konzentrationen der Überstände stimulierter zu unstimulierten Zellen. Die p-Wert-Bestimmung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

Für die Cytokinsekretion lässt sich also zusammenfassend festhalten, dass

1. sich bei unstimulierten nasalen Epithelzellen signifikante Unterschiede zwischen GPA- und NK-Patienten nur für die Cytokine G-CSF und IL-8 zeigten,
2. nasale Epithelzellen von GPA-Patienten in ihrer Fähigkeit eingeschränkt sind, auf einen bakteriellen Stimulus (1:5 Ü) mit adäquater IL-8-Sekretion zu reagieren,
3. nasale Epithelzellen von CRS-Patienten tendenziell höhere IL-8-Mengen sezernieren und auf den Stimulus (1:5 Ü) nach 16 h stärker reagieren als NK.

### 3 Expression antimikrobieller Peptide

#### 3.1 LL-37, hBD3 und RNase 7 im Nasensekret

Eine defekte epitheliale Barrierefunktion der nasalen Mukosa könnte sich auch in Form von veränderter Expression antimikrobieller Peptide äußern. Daher wurden die antimikrobiellen Peptide LL-37, hBD3 und RNase 7 analysiert. Diese AMP wurden ausgewählt, da sie u.a. gegen *S. aureus* wirksam sind [149;150;162] und diesem Bakterium wie in der Einleitung unter Abschnitt I 4.5 dargestellt eine besondere Rolle bei der Pathogenese der GPA zugesprochen wird.

Nasale Sekrete von Patienten der drei Gruppen wurden auf die Konzentrationen der genannten antimikrobiellen Peptide mittels ELISA (II 2.3.4) untersucht (Tab. 10). Bei keinem der drei AMP konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test).

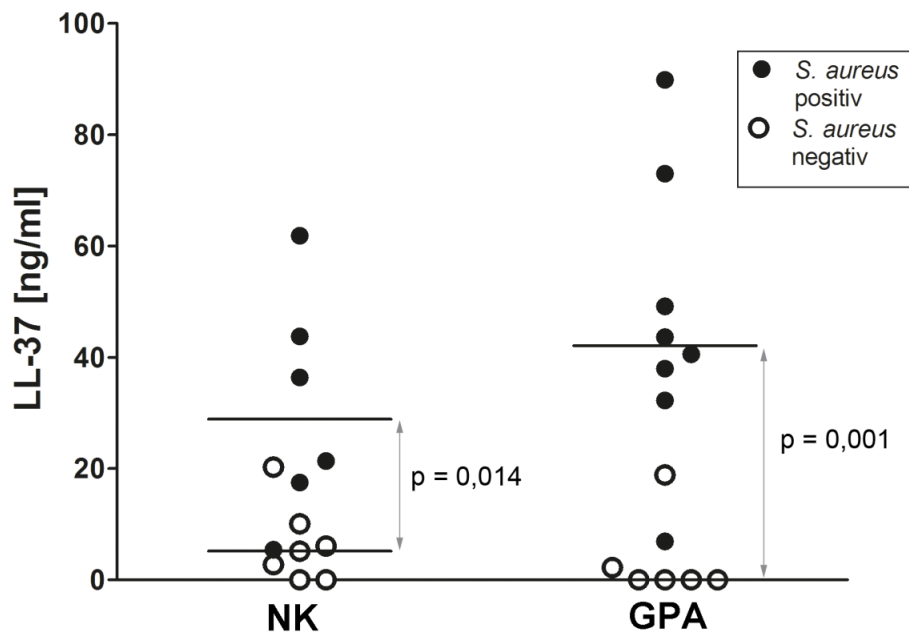
**Tab. 10: Konzentrationen ausgewählter antimikrobieller Peptide im Nasensekret**

	<b>n</b>	<b>Median</b> (ng/ml)	<b>IQA</b> (ng/ml)	<b>Min</b> (ng/ml)	<b>Max</b> (ng/ml)
<b>LL-37, NK</b>	13	10,10	24,94	uN	61,87
<b>LL-37, GPA</b>	14	25,56	45,02	uN	89,89
<b>LL-37, CRS</b>	12	18,95	29,67	uN	42,79
<b>hBD3, NK</b>	13	0,94	3,12	uN	19,77
<b>hBD3, GPA</b>	14	1,42	4,90	uN	9,03
<b>hBD3, CRS</b>	11	0,00	0,88	uN	5,96
<b>RNase 7, NK</b>	14	12,26	13,64	uN	40,00
<b>RNase 7, GPA</b>	15	16,94	21,09	2,34	40,00
<b>RNase 7, CRS</b>	13	9,13	26,28	0,55	40,00

IQA: Interquartilsabstand, Min = kleinster gemessener Wert, Max = größter gemessener Wert.  
uN: unter der Nachweisgrenze (LL-37: 1,9 ng/ml, hBD3: 0,8 ng/ml, RNase 7: 0,31 ng/ml).

### 3.1.1 Einfluss nasaler *S. aureus*-Kolonisation auf die AMP-Sekretion

Zur Analyse eines möglichen Einflusses nasaler Kolonisierung mit *S. aureus* auf die Induktion der AMP-Expression, wurden die AMP-Konzentrationen im Nasensekret von nasal mit *S. aureus* besiedelten und nicht-besiedelten Patienten mit einem Mann-Whitney-U-Test statistisch verglichen. Ein statistisch signifikanter Kolonisationseffekt konnte für LL-37 bei NK- (nicht-besiedelt: Median 5,14 ng/ml vs. besiedelt: Median 28,88 ng/ml;  $p = 0,014$ ) und GPA-Patienten (nicht-besiedelt: Median 0,00 ng/ml vs. besiedelt: Median 42,09 ng/ml;  $p = 0,001$ ) gezeigt werden (Abb. 13). Im Gegensatz dazu war dieser Kolonisationseffekt für LL-37 bei CRS-Patienten nicht zu beobachten und für hBD3 sowie RNase 7 konnte kein Kolonisationseffekt bei den drei Gruppen verzeichnet werden.



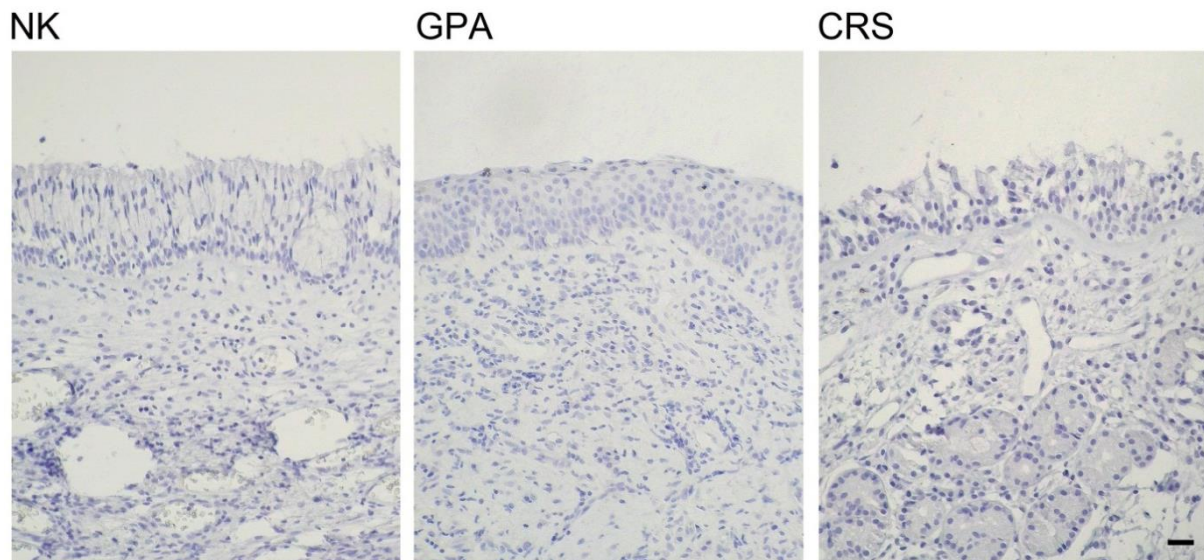
**Abb. 13: Erhöhte LL-37-Konzentration in Nasensekreten *S. aureus* kolonisierter Patienten im Vergleich zu Patienten ohne *S. aureus*-Besiedlung.** Die LL-37-Konzentration nasaler Sekrete von Patienten mit GPA (n = 14) und von Normalkontrollen (NK; n = 13) wurden im ELISA quantifiziert. Von denselben Sekreten erfolgte parallel zur Ermittlung der Kolonisierung eine Bestimmung der *S. aureus*-Keimzahl auf Chapman-Agar (II 2.5.1). Die Mediane sind als horizontale Linien gekennzeichnet. Die p-Wert Bestimmung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Abb. in Anlehnung an [163].

### 3.2 LL-37- und hBD3-Lokalisation in nasalem Gewebe

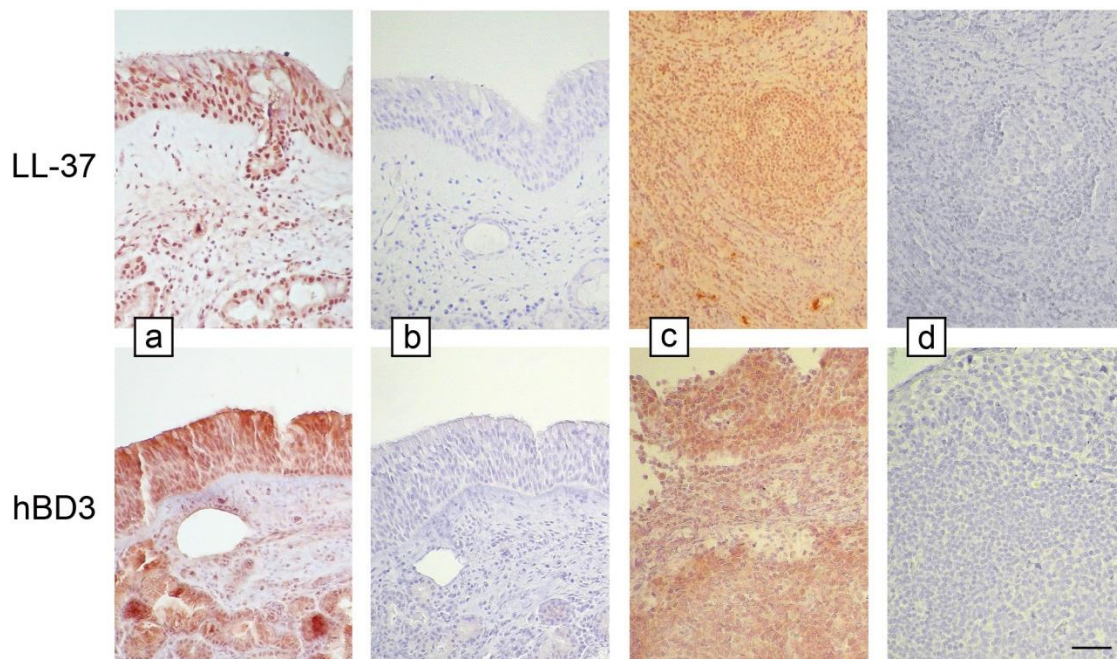
Zur Klärung der Frage, welche Zellen als AMP-Produzenten in der Nase fungieren, wurden Paraffinschnitte nasaler Biopsien immunhistochemisch auf die beschriebenen AMP analysiert. Histologisch zeigte sich eine vergleichbare Gewebearchitektur und zelluläre Zusammensetzung aller drei Gruppen, insbesondere konnten die GPA-spezifischen pathologischen Veränderungen wie Granulome, landkartenartige Nekrosen, Kleingefäßvaskulitis [164;165] oder verstärkte Infiltration von Entzündungszellen nicht festgestellt werden (Abb. 14).

RNase 7 konnte immunhistochemisch bei keiner der Gruppen (NK: 3 Schnitte, GPA: 3 Schnitte, CRS: 1 Schnitt) in der Mukosa von Nasenmuschelbiopsien detektiert werden, obwohl die Färbung an Biopsien der Cutis gesunder Probanden als Positivkontrolle [150] erfolgreich war. LL-37 und hBD3 hingegen konnten in allen Biopsien (n = 2 je Gruppe) immunhistochemisch nachgewiesen werden. LL-37 wurde in der Epithelschicht, in submukösen Drüsen sowie in einzelnen Zellen im Bindegewebe lokalisiert, die morphologisch am ehesten Granulozyten ähnelten (Abb. 15, Abb. 16).





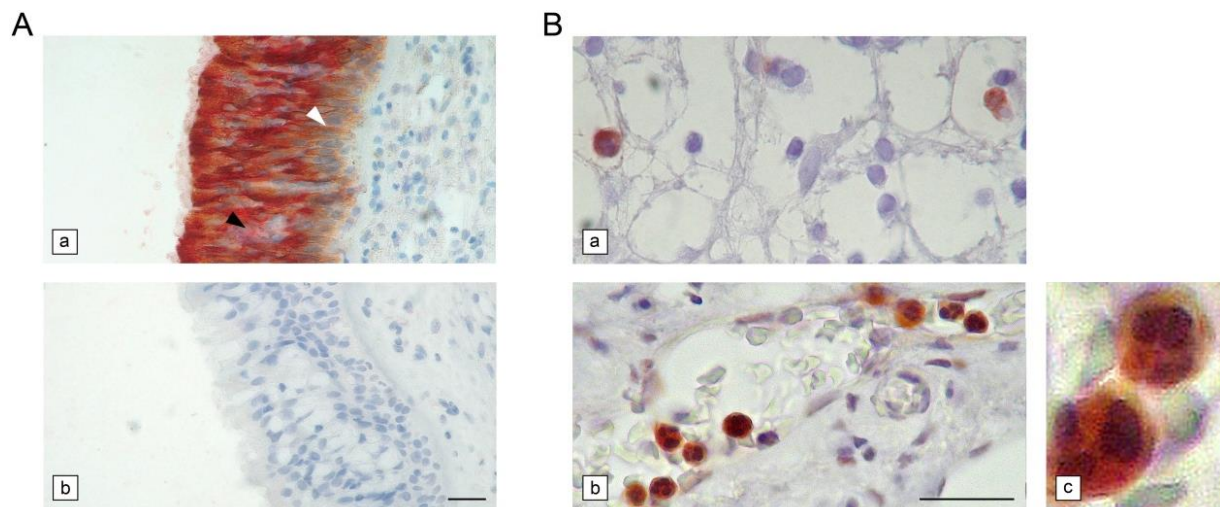
**Abb. 14: Vergleichbare Gewebearchitektur und zelluläre Zusammensetzung nasaler Biopsien.** Hämalaun-Färbung der drei Gruppen. Vergrößerung: 200 x, Balken = 50 µm.



**Abb. 15: LL-37- und hBD3-Expression in nasalem Gewebe.** Immunhistochemische Färbungen (II 2.3.1) nasaler Gewebeschnitte eines GPA-Patienten. Immunreaktive Bereiche sind rot angefärbt. Biopsien der Tonsilla palatina dienen als Positivkontrollen. Obere Reihe: LL-37, untere Reihe: hBD3; a: gefärbte nasale Biopsie; b: nasale Biopsie, Negativkontrolle; c: gefärbte Tonsilla palatina-Biopsie; d: Tonsilla palatina, Negativkontrolle. Vergrößerung: 200 x, Balken = 50 µm.

hBD3 wurde ebenfalls vom Epithel und in submukösen Drüsen exprimiert (Abb. 15). Eine Expression in einzelnen Zellen im Bindegewebe wie bei LL-37 konnte für hBD3 nicht beobachtet werden. Eine zusätzlich durchgeführte Doppelfärbung für AMP und Cytokeratin 18 als spezifischem Marker für Epithelzellen [166] bestätigte die Beob-

achtung, dass nasale Epithelzellen hauptverantwortlich für die Expression von LL-37 und hBD3 im nasalen Gewebe sind (in Abb. 16-A exemplarisch für LL-37 dargestellt).



**Abb. 16: Immunhistochemische Färbung der LL-37-Expression im Epithel (A) und in Granulozyten (B) nasalen Gewebes.** A: Doppelfärbung auf LL-37 (pink, schwarzer Pfeil) und Cytokeratin 18 (braun, weißer Pfeil), Färbung (a), Negativkontrolle (b), 400 x-Vergrößerung. B: LL-37 exprimierende Zellen im Bindegewebe (a), in Gefäßen (b) in 1000 x-Vergrößerung und (c) ein Ausschnitt aus b, digital vergrößert auf 4000 x; Balken = 50 µm.

### 3.3 Stimulation nasaler Epithelzellen mit *S. aureus*

Nachdem in nasalen Epithelzellen eine starke LL-37- und hBD3-Synthese nachgewiesen werden konnte, wurde der Einfluss von *S. aureus* auf die AMP-Expression untersucht. In einem Vorversuch wurde zunächst der optimale Stimulus für die AMP-Synthese nasaler Epithelzellen ermittelt. Hierfür wurden nasale Epithelzellen von einer Normalkontrolle mit verschiedenen Konzentrationen an *S. aureus*-Lysaten und steril-filtrierte *S. aureus*-Überständen für 8, 16 und 24 h inkubiert (II 2.2.3). Anschließend wurden die Zellkulturüberstände mittels ELISA (II 2.3.4) analysiert (Abb. 17). Der *S. aureus*-Überstand in einer Verdünnung von 1:5 übte nach 16 h die größte stimulierende Wirkung zur Sekretion der beiden AMP aus. Folglich wurden für den Hauptversuch je fünf Patienten aus jeder Gruppe zufällig ausgewählt und die Epithelzellen dieser Patienten für 16 h mit dem 1:5-Überstand stimuliert (Tab. 11).

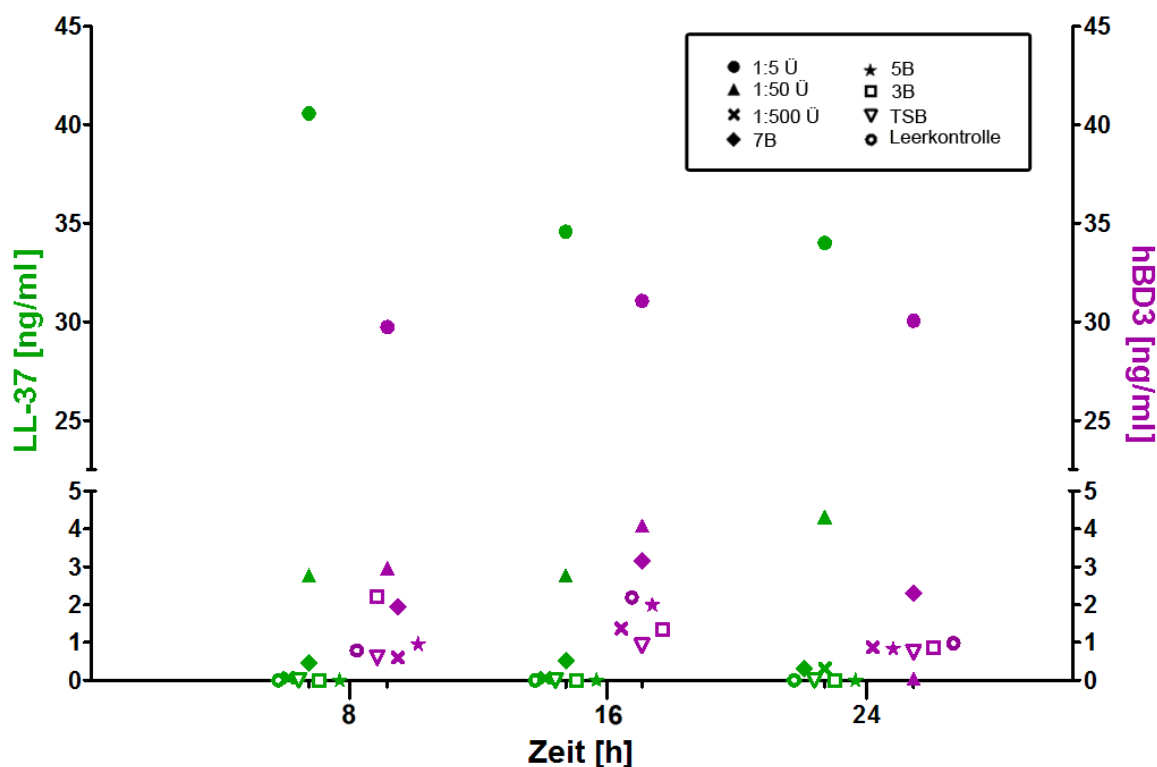
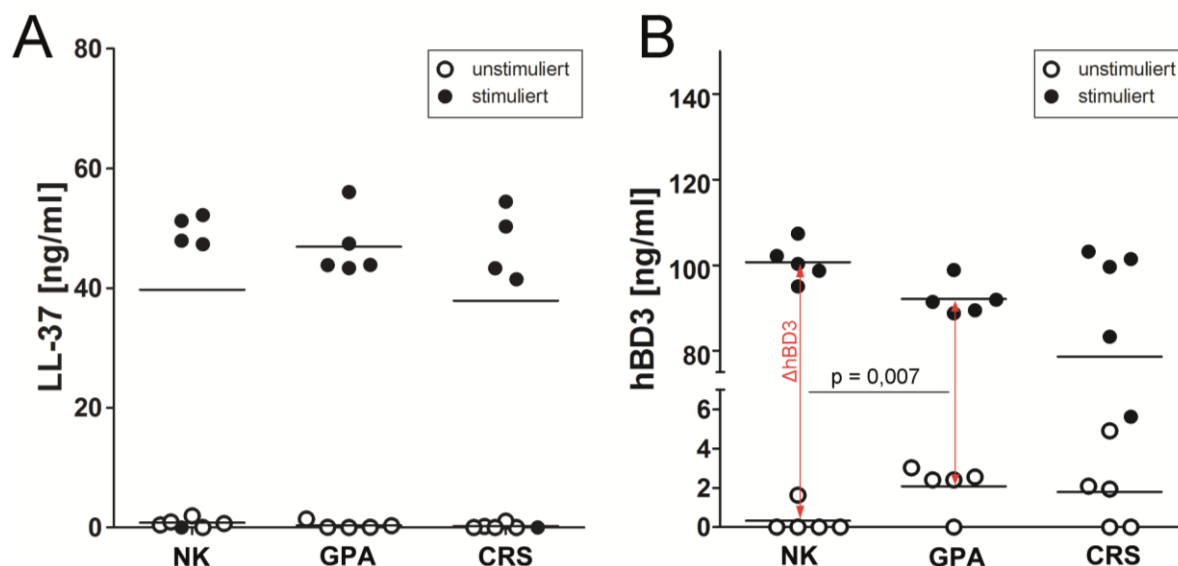


Abb. 17: LL37- (grün) und hBD3- (violett) Konzentrationen in den Überständen nasaler Epithelzellkulturen nach unterschiedlicher Stimulationsdauer mit verschiedenen *S. aureus*-Komponenten. *S. aureus*-Überstände wurden in den Verdünnungen 1:5 (1:5 Ü), 1:50 (1:50 Ü) und 1:500 (1:500 Ü), sowie *S. aureus*-Lysate von  $1 \times 10^3/\text{ml}$ -,  $1 \times 10^5/\text{ml}$ - und  $1 \times 10^7/\text{ml}$  Bakterien (3B; 5B; 7B) eingesetzt. Als Kontrollen fungierten TSB und eine unbeimpfte Leerkontrolle. Die Quantifizierung der antimikrobiellen Peptide erfolgte im ELISA (II 2.2.3).

Tab. 11: AMP-Konzentrationen in den Überständen nasaler Epithelzellkulturen, basal und nach *S. aureus*-Stimulation

		MW (ng/ml)	SD (ng/ml)	Min (ng/ml)	Max (ng/ml)
LL-37	NK, basal	uN	-	uN	1,95
	NK, stimuliert	39,74	22,31	uN	52,19
	GPA, basal	uN	-	uN	uN
	GPA, stimuliert	46,92	5,36	43,37	56,06
	CRS, basal	uN	-	uN	uN
	CRS, stimuliert	37,91	21,83	uN	54,45
hBD3	NK, basal	uN	-	uN	1,63
	NK, stimuliert	100,73	4,56	95,04	107,38
	GPA, basal	2,08	1,19	uN	3,03
	GPA, stimuliert	92,11	4,01	88,79	98,88
	CRS, basal	1,79	-*	uN	4,91
	CRS, stimuliert	78,64	41,58	5,63	103,21

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Min = kleinster gemessener Wert, Max = größter gemessener Wert. uN: unter der Nachweisgrenze (LL-37: 1,9 ng/ml, hBD3: 1,6 ng/ml). \*keine Angabe möglich, da einige Werte unter der Nachweisgrenze lagen.



**Abb. 18: Konzentrationen sezernierter AMP stimulierter und unstimulierter nasaler Epithelzellen nach 16 h.** Dargestellt sind die mit ELISA bestimmten LL-37- (A) und hBD3- (B) Konzentrationen von Epithelzellkulturüberständen der unstimulierten Leerkontrolle und der mit *S. aureus*-Überstand in der Verdünnung 1:5 stimulierten Zellen. Die Mittelwerte sind als horizontale Linien gekennzeichnet. In Rot eingezeichnet ist der dynamische Umfang (Differenz der hBD3-Konzentrationen o.g. Überstände). Der Stichprobenumfang betrug je Gruppe 5. Die p-Wert-Bestimmung erfolgte mittels t-Test.

Bei beiden AMP konnte eine statistisch signifikante Reaktion der nasalen Epithelzellen aller drei Gruppen auf den Stimulus (stimuliert vs. basal) beobachtet werden [LL-37:  $p = 0,017$  (NK),  $p < 0,001$  (GPA),  $p = 0,018$  (CRS); hBD3:  $p < 0,001$  (NK),  $p < 0,001$  (GPA),  $p = 0,014$  (CRS); t-Test; Abb. 18]. Ein Vergleich der Gruppen ergab bei LL-37 keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu konnte bei nasalen Epithelzellen von GPA-Patienten im Vergleich zu NK-Patienten eine basal signifikant erhöhte ( $p = 0,023$ ), aber nach Stimulation signifikant erniedrigte ( $p = 0,013$ ; t-Test) hBD3-Konzentration beobachtet werden. Entsprechend ist auch der dynamische Umfang der Antwort ( $\Delta$  hBD3) bei nasalen Epithelzellen von GPA-Patienten signifikant geringer als von NK-Patienten ( $p = 0,007$ , t-Test). Im Gegensatz zu GPA-Patienten unterscheiden sich die Reaktionen nasaler Epithelzellen von CRS-Patienten statistisch nicht von NK-Patienten.

Im Hinblick auf die Expression der AMP LL-37, hBD3 und RNase 7 konnten also die folgenden Aspekte herausgearbeitet werden:

1. Die AMP-Konzentrationen in nasalen Sekreten unterscheiden sich zwischen den Gruppen nicht.



2. Die nasale *S. aureus* Besiedlung korreliert mit erhöhten LL-37-Konzentrationen im Nasensekret bei GPA- und NK-Patienten, jedoch nicht bei CRS-Patienten.
3. Im nasalen Gewebe sind die Epithelzellen die hauptsächlichen Syntheseorte von LL-37 und hBD3. RNase 7 lässt sich in Nasenmuschelbiopsien nicht nachweisen.
4. Auf Stimulation mit *S. aureus* (1:5 Ü) reagieren nasale Epithelzellen mit der Sekretion von LL-37 und hBD3. Dabei ist die hBD3-Antwort von GPA-Patienten geringer ausgeprägt als die von NK-Patienten. Im Gegensatz dazu sind keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Reaktionen nasaler Epithelzellen von CRS-Patienten im Vergleich mit NK-Patienten zu detektieren. Hinsichtlich LL-37 unterscheiden sich die Gruppen nicht.

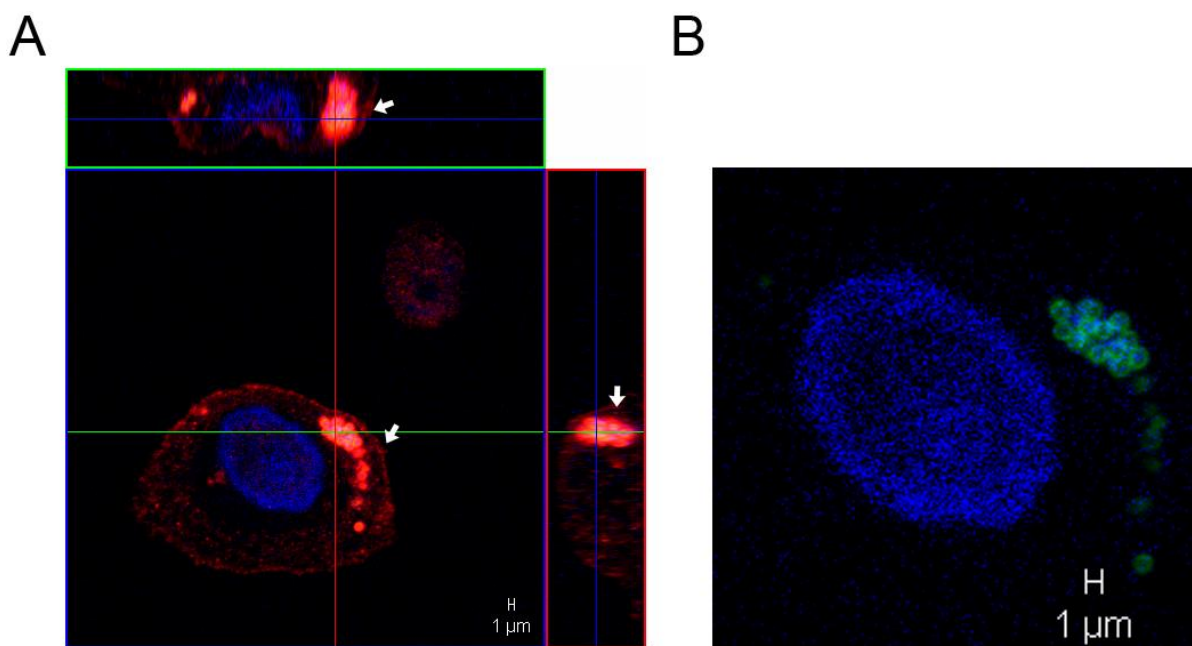
#### 4 Intraepitheliale Lokalisation von *S. aureus* in nasalen Biopsien

Ein Funktionsdefekt der nasalen Epithel-Barriere ist mögliche Ursache der höheren Besiedlungsraten mit *S. aureus* bei GPA und CRS [118;167]. Da eine solche Besiedlung nach klinischer Erfahrung trotz lokaler und systemischer antimikrobieller Medikation oft wiederkehrt, stellt sich die Frage nach der Lokalisation von *S. aureus* im nasalen Gewebe und damit verbundener möglicher *escape*-Mechanismen.

Zur Analyse einer möglichen intrazellulären *S. aureus*-Lokalisation wurde ein erstes Pilotexperiment (ein Beobachter, nicht verblindet, unterschiedliche Größen der Biopsien) initiiert. Hierfür wurden an Paraffinschnitten nasaler Biopsien (GK: n = 10, CRS: n = 10, GPA: n = 9) Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen (FISH) auf *S. aureus*, gekoppelt mit einer Immunfluoreszenz-Färbung auf E-Cadherin durchgeführt. Durch die Anfärbung der Epithelzellmembran kann eine mögliche intrazelluläre Lokalisation der Bakterien festgestellt werden. Die Untersuchung fand bei 1000 x-Vergrößerung an einem Fluoreszenzmikroskop statt, welches die dreidimensionale Strukturanalyse durch die Aufnahme von Bilder-Stapeln in der Z-Ebene (*z-stack*) ermöglicht.

Aufgrund der geringen Inzidenz von *S. aureus* in den Biopsien wurde die statistische Auswertung nur auf die intrazelluläre An- bzw. Abwesenheit von *S. aureus* beschränkt. Die Gruppen-spezifischen Häufigkeiten von *S. aureus*-positiven

bzw. -negativen Proben wurden mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. Einseitig wurde getestet, da die Hypothese zu Grunde lag, dass sich eine gestörte Barriere begünstigend auf die Besiedlung auswirkt. Dieses erste Pilotexperiment hat gezeigt, dass *S. aureus* bei den Normalkontrollen ( $n = 10$ ) im nasalen Epithel intrazellulär nicht nachgewiesen werden konnte, im Gegensatz dazu war ein Nachweis bei 4 von 10 CRS- und 2 von 9 GPA-Patienten möglich. Damit war bei CRS-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen das intrazelluläre Vorkommen von *S. aureus* signifikant erhöht ( $p = 0,043$ , Fisher's exakter Test). GPA-Patienten unterschieden sich statistisch nicht von den Normalkontrollen ( $p = 0,211$ ) und auch nicht von den CRS-Patienten ( $p = 0,370$ ). Ein intrazelluläres Vorkommen in nasalen Epithelzellen, wie in den Patientenbiopsien mittels FISH beobachtet, konnte auch durch exemplarische Invasionsexperimente gezeigt werden (Abb. 19).



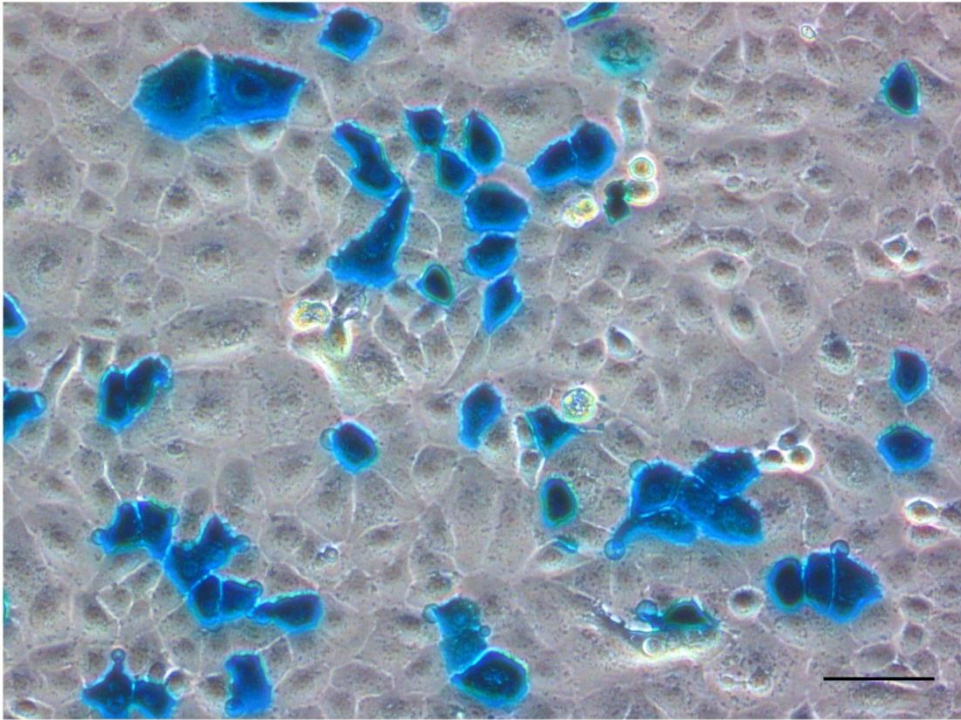
**Abb. 19: Immunfluoreszenz-Färbung von *S. aureus* in nasalen Epithelzellen im konfokalen Fluoreszenzmikroskop.** Nach einem Invasionsversuch (II 2.2.5) wurde mit einem anti-E-Cadherin-Antikörper die Zellmembran der Epithelzelle (sowie Teile des Protein A von *S. aureus*) rot und mit einem anti-Protein-A-Antikörper die Zellwände der *S. aureus*-Bakterien grün angefärbt. Der eukaryote Zellkern erscheint durch die DAPI-Färbung blau. Die Bakterienansammlung erscheint leuchtend orange aufgrund der Überlagerung von rot und grün. Sie ist intrazellulär lokalisiert, da sie auf allen drei Ebenen (umrandete Teilabbildungen) erkennbar von der rot angefärbten Zellmembran (weiße Pfeile) umschlossen ist (A; 3-Ebenen-Darstellung, 1260 x Vergrößerung). Unter Ausblendung des roten Kanals erscheinen die Zellwände der Bakterien als grüne Ringe, digital vergrößert auf 2520 x, gezeigt ist ein Ausschnitt aus A (B).

Eine intrazelluläre Akkumulation von *S. aureus* konnte also nur in der nasalen Mukosa der Patientengruppen GPA und CRS nachgewiesen werden.

## **5 Generierung transformierter nasaler Epithelzelllinien**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Generierung transformierter Zelllinien, mit denen als krankheitsspezifischen Modellzelllinien die Pathomechanismen der GPA unabhängig von zellzahllimitierenden und zeitlich begrenzten Primärzellkulturen vertiefend untersucht werden könnten.

Zur Etablierung und Optimierung der Methodik der retroviralen Transduktion und Transformation wurden zunächst nasale Epithelzellen von drei Normalkontrollen mit Virusvektoren transduziert, die mit dem die  $\beta$ -Galaktosidase-kodierenden Plasmid pCL-MFG-LacZ und einem Verpackungskonstrukt hergestellt wurden. Dabei wurden die Retrovirus-enthaltenden Überstände in verschiedenen Verdünnungen mit Zellkulturmedium (1:2, 1:3 und 1:5) eingesetzt, damit die Transduktionseffizienz ermittelt werden konnte. Außerdem wurden zwei verschiedene Verpackungs-konstrukte pCL-10A1 bzw. pCL-Ampho verwendet. Hiermit sollte geklärt werden, welches das bessere Hüllprotein für nasale Epithelzellrezeptoren kodiert und damit die bessere Aufnahme in die Zelle gewährleistet. Mit einer  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung (II 2.3.9) wurde die durch die Transduktion mit den pCL-MFG-LacZ abgeleiteten Virusvektoren erreichte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen (Abb. 20). Dabei stellte sich das 1:5-Verhältnis als das erfolgreichste heraus. Unterschiede zwischen den Verpackungskonstrukten konnten nicht beobachtet werden.



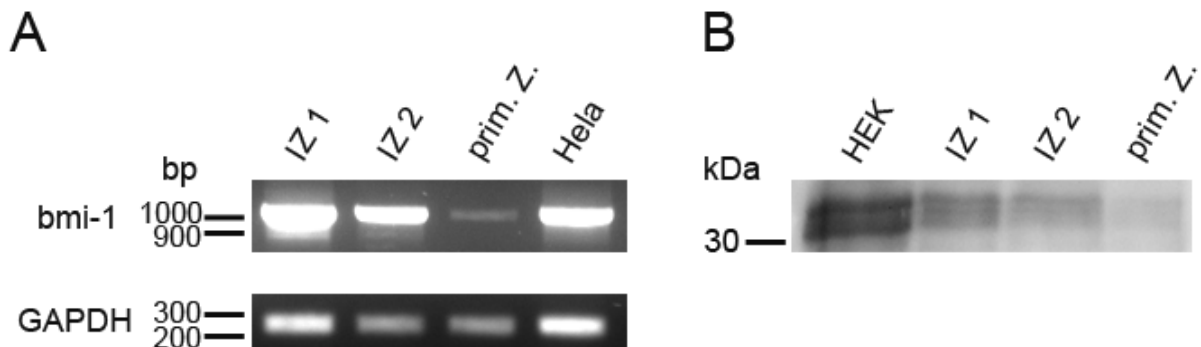
**Abb. 20: X-Gal Färbung zum Nachweis der Transduktion nasaler Epithelzellen durch retrovirale *LacZ*-Vektoren.** Die blaue Färbung charakterisiert transduzierte Zellen, da diese Zellen das übertragene Enzym  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren, welche die Reaktion des bei der Färbung zugegebenen gelben Substrates zu einem blauen Indigo-Farbstoff katalysiert. 400 x-Vergrößerung, Balken = 50  $\mu$ m.

Anschließend wurden nasale Primärzellkulturen von zwei NK-, zwei GPA- und drei CRS-Patienten mit den *bmi-1*- bzw. *hTERT*-übertragenden Retroviren transduziert (II 2.2.6). Ab der vierten Subkultivierung verminderten die *hTERT*-transduzierten Zellen jedoch ihre Mitoseaktivität und stellten ihr Wachstum zunehmend ein. Im Vergleich zu den Primärzellkulturen, welche in der Regel nicht länger als 21 Tage kultiviert werden konnten, wiesen sie jedoch eine deutlich verlängerte Lebensspanne auf.

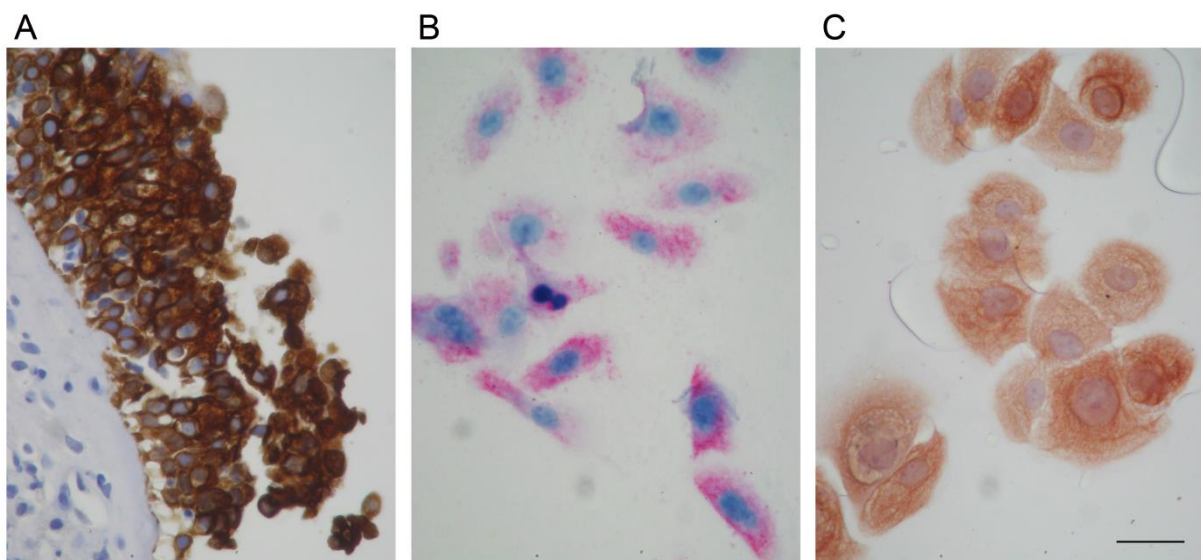
Die mit *bmi-1* generierten Zelllinien konnten weiter kultiviert (durchschnittliche Kultivierungsdauer: 9,2 Wochen, SD: 6,9 Wochen; je nach Zeitpunkt der Generierung bis zu 15 Passagen) und charakterisiert werden. Zunächst wurde mit RT-PCR und Westernblot die Transkription und Proteinexpression des eingeführten Genes *bmi-1* verifiziert (Abb. 21). Zum Nachweis der epithelialen Herkunft wurde in Kooperation mit Dr. K. Holl-Ulrich (Institut für Pathologie, Universität zu Lübeck, Teilprojekt 4 der Klinischen Forschergruppe 170) das Cytokeratinprofil (Cytokeratine 7, 8/18, 10/13, 14, 19) an primären nasalen Epithelzellen sowie an nasalen Biopsien, aus denen sie abgeleitet wurden, mittels Immuncyto- und -histochemie erstellt (je n = 4). Alle diese



Cytokeratinvarianten zeigten Immunreaktivität, wobei sich bei Cytokeratin 7 und 8/18 die stärkste Ausprägung darstellte. Folglich wurden die Cytokeratine 7 und 8/18 zur Bestätigung des epithelialen Ursprungs der transformierten Zelllinien ausgewählt (in Abb. 22 exemplarisch für Cytokeratin 8/18 gezeigt). Die Zelllinien zeigten ein Cytokeratinmuster, das demjenigen primärer Epithelzellkulturen und von Epithelien nasaler Biopsien entspricht und damit deren epitheliale Herkunft bestätigt.



**Abb. 21: Überexpression von *bmi-1* in den transformierten Zelllinien.** RT-PCR-Analyse (A) und Westernblot (B) verifizieren die Überexpression von *bmi-1* exemplarisch in zwei transformierten Zelllinien von NK-Patienten (IZ 1 und IZ 2) im Vergleich zu nasalen nicht-transduzierten Primärzellkulturen (prim. Z.). HeLa- bzw. HEK-Zellen fungierten als Positivkontrollen.



**Abb. 22: Immunfärbungen auf Cytokeratin 8/18.** Immunhistochemische Färbung einer nasalen Biopsie mit DAB als Substrat (A). Immunocytochemische Darstellung einer primären Epithelzellkultur mit FastRed als Substrat (B) sowie einer transformierten Zelllinie mit NovaRed als Substrat (C). Deutliche Anfärbung der Epithelschicht (A) bzw. netzartiger Cytoskelettstrukturen in den Zellen (B, C). Vergrößerung: 640 x, Balken = 50  $\mu$ m.

Nachfolgend wurden wie unter II 2.2.3 beschriebene Stimulationen mit der generierten GPA-Zelllinie durchgeführt und die in den Überstand sekretierten Konzentrationen von IL-8, G-CSF, LL-37 und hBD3 mittels ELISA quantifiziert. Hinsichtlich hBD3 und LL-37 zeigten die transformierten Zellen eine deutliche Reaktion auf den Stimulus (1:5 Ü) und in etwa gleiche Konzentrationen [hBD3: 0,15 pg/ml (basal), 72,43 pg/ml (stimuliert); LL-37: 0,05 pg/ml (basal), 50,93 pg/ml (stimuliert)] wie primäre Zellkulturen von GPA-Patienten (Tab. 11). Auch die basale G-CSF-Konzentration von 89 pg/ml der transformierten Zellen liegt innerhalb der beobachteten Schwankungen der G-CSF-Konzentrationen primärer nasaler Epithelzellen von GPA-Patienten (Median 61,3 pg/ml; 3.Quartil 193,5 pg/ml; Tab. 8). Zusätzlich konnte eine erhöhte G-CSF-Sekretion auf den Stimulus verzeichnet werden (126 pg/ml). Demgegenüber fiel die IL-8-Sekretion der transformierten Zellen deutlich geringer (basal: 171 pg/ml, stimuliert: 89 pg/ml) aus als die primärer nasaler GPA-Epithelzellen (basal: 1248 ± 882 pg/ml, Minimalwert 379 pg/ml; XI 3). Zur Klärung der Frage, ob die beobachtete Abnahme der IL-8-Sekretion ursächlich mit dem Vorgang der Transformation in Verbindung gebracht werden kann, wurden nasale Tumorzellen (RPMI-2650) analog stimuliert. Bei diesen Tumorzellen mit immortalen Eigenschaften konnte überhaupt keine IL-8-Sekretion verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zu den transformierten Zellen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Transduktion des bmi-1-Gens in nasale Epithelzellen ließ sich mittels RT-PCR und Westernblot verifizieren.
2. Die transformierten Zellen zeigen ein Cytokeratinmuster, das demjenigen primärer Epithelzellen entspricht.
3. Die durch das bmi-1-Gen transformierte GPA-Zelllinie scheint nach den ersten Pilotexperimenten zwar nicht als *in vitro*-Modell hinsichtlich der IL-8-Sekretion geeignet zu sein, aber hinsichtlich der Sekretion von LL-37, hBD3 und G-CSF durchaus infrage zu kommen. Ein Vergleich mit einer transformierten NK-Zelllinie steht noch aus.

## IV Diskussion

### 1 Spezifisches Genexpressionsmuster der nasalen Mukosa von GPA-Patienten

Die Hypothese einer spezifischen Veränderung der Genexpression endogener Faktoren der nasalen Mukosa bei der GPA wurde durch unsere Arbeitsgruppe in einer vergleichenden Transkriptanalyse untersucht [161]. Während die Expression einiger Gene (*TLR4*, *NLRC3*, *IFN- $\gamma$* , *TGF- $\beta$ 1*, *IL-17D* sowie Lysozym) bei GPA-Patienten herunterreguliert ist, zeigen die Gene *CD36* und *DEFB1* eine deutliche Überexpression bei GPA- im Vergleich zu NK-Patienten. *DEFB4* und *S100A7* konnten ausschließlich bei GPA-Patienten detektiert werden. Im Rahmen dieser Dissertation konnten zwei der differentiell exprimierten Transkripte (*S100A7* und *TLR4*) auf Proteinebene mittels Immunhistochemie in nasalen Biopsien nachgewiesen werden.

Auffällig ist, dass in den Expressionsanalysen die mRNAs der AMP in nasalen Biopsien von GPA-Patienten mit der hochregulierten Expression von *DEFB1* und der ausschließlichen Expression von *S100A7* und *DEFB4* stark vertreten sind. Interessanterweise ist die verstärkte Expression der AMP-mRNAs nicht mit einer gleichzeitig verstärkten Expression der Mustererkennungs-Rezeptoren verbunden. Insbesondere sind zwei der untersuchten Mustererkennungs-Rezeptoren (*TLR4* und *NLRC3*) sogar hoch signifikant herunterreguliert. So kann die beobachtete erhöhte AMP-Expression auf mRNA-Ebene entweder aus einer lokal erhöhten Konzentration von PAMPs, welche die AMP-Synthese induzieren, oder einer fehlgeleiteten Genregulation unbekannter Ursache resultieren.

Außerdem ist die Beobachtung interessant, dass die Lysozym-mRNA herunterreguliert ist. Zu bedenken ist die antimikrobielle Wirkung von Lysozym gegenüber *S. aureus* [168]. Daher könnte spekuliert werden, dass eine beeinträchtigte Lysozym-Expression bei der GPA die Kolonisierung mit *S. aureus* begünstigt. Die signifikante Hochregulierung der  $\beta$ -Defensine *DEFB1* und *DEFB4*, welche ebenfalls gegen *S. aureus* wirksam sind [169], könnte dabei den Versuch darstellen, die immunologische Barrierefunktion wieder herzustellen. Da das aktuelle Versuchsdesign jedoch

die Unterscheidung zwischen Ursache und Wirkung nicht ermöglicht, sind weitere Studien zur Klärung dieses besonderen Aspektes erforderlich. Hierzu bietet sich die vergleichende mRNA-Analyse vor und nach Stimulation nasaler Epithelzellen von GPA- und NK-Patienten mit *S. aureus* an.

Die beobachtete Überexpression des zellgebundenen *scavenger*-Rezeptors CD36 vermag aufgrund der vielfältigen Funktionen, die CD36 auf unterschiedlichen Zellen ausübt [170], zum chronischen Entzündungsgeschehen beitragen. Der gewählte Versuchsansatz erlaubt allerdings keine Aussagen über die hierfür verantwortlichen Zellsysteme. In der Funktion als Corezeptor zu TLR2 [171] sowie als TLR2-unabhängiger Mustererkennungs-Rezeptor [172] könnte eine Überexpression und hierdurch bedingte fehlerhaft verstärkte Ligandenerkennung durch Sekretion proinflammatorischer Cytokine den Entzündungsprozess unterstützen und aufrechterhalten. Als negativer Regulator der Angiogenese auf mikrovaskulären Endothelzellen [173] wäre durch eine Überexpression auch eine Beeinträchtigung des Wundheilungsprozesses möglich.

Bezüglich der untersuchten Cytokine waren die reduzierten mRNA-Konzentrationen von *TGF-β1* und *IL-17D* auffällig. *IL-17D* ist ein Cytokin, welches von TH17-Zellen sezerniert wird [174] und in nasalen Granulomen nachgewiesen werden konnte [48]. Die Anzahl von TH17-Zellen ist im Blut von GPA-Patienten erhöht und könnte wie bei anderen Autoimmunerkrankungen (z.B. rheumatoider Arthritis, Lupus nephritis und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen [175-177]) in die Pathogenese der GPA involviert sein [178]. Im Gegensatz zu der hier gezeigten herunterregulierten *TGF-β1*-mRNA, ist die Konzentration von TGF-β1 als Protein bei der GPA im Serum erhöht [179]. Sie korreliert mit der Krankheitsaktivität und könnte über die Translokation von PR3 an die Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten zur Pathophysiologie der GPA beitragen [179] (siehe auch Einleitung I 4). Andererseits könnten reduzierte TGF-β1-Konzentrationen, wie sie hier auf mRNA-Ebene gezeigt werden konnten, möglicherweise durch den Verlust der Selbst-Toleranz die Entwicklung von Autoimmunität begünstigen [180;181]. Die Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinkonzentration, welche in vielen anderen komplexen Geweben gefunden wird, könnte einerseits auf bislang noch ungeklärten Regulationsprozessen bei der Cytokinfreisetzung beruhen

[182] und andererseits durch die unterschiedlichen Proben (Biopsie vs. Serum) erklärt werden. Erwähnenswert sind zudem die reduzierte *IFN-γ*- und im Vergleich zu Normalkontrollen unveränderte *IL-8*-mRNA-Konzentration. Im Gegensatz dazu konnte in den Überständen nasaler Epithelzellen von GPA-Patienten eine reduzierte basale *IL-8*- und unveränderte basale *IFN-γ*-Konzentration auf Proteinebene nachgewiesen werden (III 2.1). Dies könnte einerseits auf den oben erwähnten ungeklärten Regulationsmechanismen von mRNA- zu Proteinkonzentration beruhen [182], andererseits könnte spekuliert werden, dass die bei der Cytokinanalyse beobachtete reduzierte basale *IL-8*-Konzentration auf Proteinebene ein ausschließlicher Defekt der nasalen Epithelzellen ist, der *in vivo* durch das Zusammenspiel der verschiedenen Zellen der nasalen Mukosa maskiert wird.

## 2 **Verändertes Cytokinprofil nasaler Epithelzellen bei GPA-Patienten**

Zur Analyse der Fragestellung, ob der GPA als Grenzflächenerkrankung Störungen bei der Cytokinexpression der nasalen Mukosa zu Grunde liegen, wurde das Cytokinprofil unstimulierter nasaler Epithelzellen von GPA-Patienten mit dem von Normalkontrollen verglichen. Für 17 der 19 untersuchten Cytokine konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Jedoch ist die Konzentration von G-CSF in den Überständen nasaler Epithelzellen von GPA-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen signifikant erhöht und die *IL-8*-Konzentration signifikant erniedrigt.

Bei Betrachtung aller 19 gemessener Cytokine ist die im Vergleich zu den Konzentrationen der anderen 18 Cytokine um ein Vielfaches erhöhte *IL-8*-Konzentration bei der Patientengruppen auffällig. Diese Beobachtung wird durch andere Studien unterstützt [183-185], die ebenfalls gezeigt haben, dass *IL-8* im Vergleich zu anderen Cytokinen in der höchsten Konzentration in den Überständen nasaler Epithelzellen vorliegt. Dies legt nahe, dass *IL-8* das wesentliche Cytokin bei der Abwehr bakterieller Infektionen in der nasalen Mukosa ist. Auch die gemessenen Konzentrationen an *IL-6*, *IL-1β* und *IL-1α* stimmen gut mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen überein, insbesondere unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Versuchsan-

sätze und Messmethoden [183-185]. Die Cytokine IL-5 und IL-13 konnten in dieser Arbeit wie auch in der Literatur nicht detektiert werden [186-189]. Des Weiteren konnte IL-10 in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, obwohl es von nasalen Epithelzellen gebildet werden kann [190]. Möglicherweise konnte es in dieser Arbeit nicht detektiert werden, da Epithelzellen in der Zellkultur nur sehr geringe Mengen IL-10 zu synthetisieren scheinen (C.M. van Drunen, persönliche Mitteilung).

Abgesehen von zwei Studien, in der ein TH1- bzw. ein TH2-Cytokinmilieu in nasalen Biopsien von GPA-Patienten beschrieben wird [48;115], wurde bislang keine Analyse zur Cytokinexpression in nasalem Gewebe von GPA-Patienten durchgeführt. Für die Lunge, einer für die GPA typischen weiteren Lokalisation der Krankheitsaktivität, sind bereits Veränderungen der Cytokinkonzentrationen mit u.a. erhöhten Konzentrationen an IFN- $\gamma$  und MIP-1 $\beta$  beschrieben worden [191;192]. Zudem berichten Richter *et al.* von erhöhten Konzentrationen der proinflammatorischen Cytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von GPA-Patienten, welche sie auf den akuten Entzündungsprozess durch *S. aureus*-Kolonisierung und Krankheitsaktivität zurückführten [120]. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Dissertation jedoch durch ein Zellkultursystem und einen durchschnittlichen Kultivierungszeitraum von 13 Tagen vor der Analyse versucht, Einflüsse einer akuten Entzündung zu minimieren. Außerdem können die an Patienten gewonnenen Daten aufgrund unterschiedlicher physiologischer Bedingungen nicht mit denen einer *in vitro*-Untersuchung direkt verglichen werden. Dennoch unterstützen diese Studien die Hypothese einer gestörten Cytokinexpression bei der GPA.

Deutliche Hinweise auf ein verändertes Cytokinprofil bei GPA-Patienten ergeben sich aus Studien, in welchen die Cytokinkonzentrationen im Serum oder Plasma gemessen wurden. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit dargestellten Befunden wurden jedoch signifikant erhöhte Konzentrationen an IL-6 und IL-8 detektiert [193-195]. Diese Diskrepanz lässt sich durch die schlechte Vergleichbarkeit von einem lokalen mit einem systemischen Ansatz erklären und könnte zudem im systemischen Ansatz den medikamentösen Einfluss reflektieren.

IL-8 ist ein proinflammatorisches Cytokin, welches von einer Vielzahl von Zelltypen sezerniert wird [196]. Es hat chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten

und Monozyten und bewirkt zudem ihre Aktivierung [197]. Da neutrophile Granulozyten entscheidend zur Abwehr von Bakterien beitragen, könnte die detektierte verringerte IL-8-Konzentration eine deutliche Beeinträchtigung der effektiven Bekämpfung von Infektionen bewirken. Auch für Monozyten wurde von Lamprecht *et al.* eine verminderte IL-8-Produktion im Verlauf der GPA vorgeschlagen [198]. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Verschiedene Signaltransduktionswege [NFκB, *jun proto-oncogene (JUN) N-terminal protein kinase (JNK)*, *p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)*] sind in die Synthese von IL-8 involviert [199]. Rudack *et al.* konnten zeigen, dass eine durch Serinproteasen von *S. aureus* induzierte Signaltransduktion bei nasalen Epithelzellen über p38 MAPK, Phosphatidylinositol-3-Kinase und wahrscheinlich *extracellular signal-regulated protein kinase 1/2* verläuft [200]. Zudem stellte sich bei ihrer Analyse NFκB als wahrscheinlicher Schlüsseltranskriptionsfaktor für die Freisetzung von IL-8 dar. Da NFκB auch in die Signaltransduktion zur Synthese anderer Cytokine (wie beispielsweise IL-1β, IL-6, und TNF-α [200-202]) involviert ist, bei denen in dieser Arbeit keine veränderten Konzentrationen zwischen GPA- und NK-Patienten festgestellt wurden, ist ein direkter Defekt von NFκB bei der GPA unwahrscheinlich. Hierdurch sind jedoch Mutationen in der NFκB-Bindestelle der IL-8-Promotorregion oder Fehlregulationen in der Signalkaskade oberhalb von NFκB als mögliche Erklärungen für die beobachtete reduzierte IL-8-Konzentration nicht ausgeschlossen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um den Defekt in der Signalkaskade zur IL-8-Synthese aufzudecken. Dies könnte auch zur Entwicklung neuer therapeutischer Agenzien führen könnte.

G-CSF ist als wesentliches Cytokin für die Regulation der Proliferation und des Überlebens neutrophiler Granulozyten [203] bekannt, reguliert über die Beeinflussung dendritischer Zellen die Immunantwort und moduliert den Entzündungsprozess [204]. Sobald dieses Cytokin über einen entzündlichen Stimulus induziert wird, wird die Synthese überall im Gewebe des menschlichen Körpers angeregt [204] und auch bronchiale sowie nasale Epithelzellen sind fähig, G-CSF basal bzw. nach Stimulation zu sezernieren [205;206]. Die im Überstand gemessene G-CSF-Konzentration unstimulierter bronchialer Epithelzellen [205] stimmt gut mit der in dieser Arbeit detektierten G-CSF-Konzentration nasaler Epithelzellen von NK-Patienten überein. Lokal erhöhte G-CSF-Konzentrationen sind in der Mukosa von Patienten mit entzündlichen

Darmerkrankungen sowie CRS-Patienten [207] beobachtet worden und könnten eine Erklärung für die Anhäufung neutrophiler Granulozyten im Gewebe sein [208].

Als Hauptregulator des Überlebens neutrophiler Granulozyten, insbesondere durch die Verzögerung der Apoptose [205;209], könnte G-CSF möglicherweise als Schlüsselmolekül für die Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung fungieren. Die in dieser Arbeit beobachtete G-CSF-Konzentration bei GPA-Patienten liegt dabei in einem Bereich, der nach Saba *et al.* für eine Verzögerung der Apoptose neutrophiler Granulozyten ausreichend ist [205]. Eine verlängerte Lebenszeit neutrophiler Granulozyten könnte die Wahrscheinlichkeit für ein *Priming* verbunden mit der Aktivierung durch ANCA erhöhen. Weiterhin ist für Endothelzellen gezeigt worden, dass G-CSF die Lipopolysaccharid-induzierte IL-8-Expression herunterreguliert [210], was auch für Epithelzellen denkbar und ein möglicher Erklärungsansatz für die beobachteten erniedrigten IL-8-Konzentrationen sein könnte. Um dies zu überprüfen, sind weitere Untersuchungen zur Wechselwirkung von G-CSF und IL-8 mit nasalen Epithelzellen notwendig. Des Weiteren reduziert G-CSF die bakterizide Wirkung neutrophiler Granulozyten gegenüber *S. aureus* [211]. Zusammen mit einer erniedrigten IL-8-Konzentration könnte dies dramatische Effekte auf eine effektive Abwehr von Bakterien haben und würde für eine deutlich beeinträchtigte Barriere bei der GPA sprechen.

### **3 Reaktion nasaler Epithelzellen von GPA-Patienten auf bakterielle Stimulation**

Zur Klärung der Frage, ob sich die Reaktion nasaler Epithelzellen von GPA-Patienten auf bakterielle Stimulation von der von NK- und CRS-Patienten unterscheidet, wurden Stimulationen mit *S. aureus* durchgeführt und zunächst mit einem IL-8-ELISA ausgewertet. *S. aureus* wurde aufgrund seiner besonderen Rolle bei der Pathogenese der GPA und seiner starken Induktion der IL-8-Expression in nasalen Epithelzellen [184;200] ausgewählt und IL-8 als ein Cytokin, das von nasalen Epithelzellen in hoher Konzentration gebildet wird [183], aufgrund seiner chemotaktischen Wirkung auf neutrophile Granulozyten eine Schlüsselstellung im Entzündungsgeschehen einnimmt (Kapitel I 3) und eine verminderte basale IL-8-Konzentration bei GPA-Patienten beobachtet werden konnte (Kapitel III 2.1).



Die Stimulationsversuche haben gezeigt, dass nur die höchsten Dosierungen der gewählten Stimuli Effekte bei den nasalen Epithelzellen hervorriefen, wobei der *S. aureus*-Überstand eine stimulierende und das -Lysat eine möglicherweise hemmende Wirkung auf die IL-8-Synthese ausübte. Eine stimulierende Wirkung von *S. aureus*-Überständen auf die Freisetzung von IL-8 ist für respiratorische Epithelzellen beschrieben worden [200;212-214]. Auch wenn ein Vergleich der Absolutwerte der sekretierten IL-8-Konzentrationen aufgrund starker interindividueller Schwankungen (wie in dieser Arbeit an der Standardabweichung erkennbar) und der von den unterschiedlichen Arbeitsgruppen angewendeten verschiedenen Versuchsansätze schwierig ist, so sind die in dieser Arbeit gemessenen IL-8-Konzentrationen vergleichbar mit den von den anderen Arbeitsgruppen nachgewiesenen Konzentrationen. Es kann spekuliert werden, dass sich die von *S. aureus* in den Überstand sezernierten Proteasen wie z.B. Metalloproteasen und Serinproteasen [200;212] auch in dieser Arbeit die IL-8-Sekretion stimulierten. Die Analyse der stimulierenden Bestandteile des hier verwendeten Überstandes ist gegenwärtiger Untersuchungsgegenstand unserer Arbeitsgruppe.

Zeiteffekte konnten zwar als Tendenz erkannt, aber statistisch nicht erfasst werden, da der Stichprobenumfang bei der gegebenen Standardabweichung zu klein ist. Möglicherweise war aber auch der Stimulationszeitraum noch zu kurz, da bei tracheobronchialen Epithelzellen nach 48 Stunden eine stärkere Reaktion auf eine Stimulation mit einem *S. aureus*-Überstand als nach 24 Stunden beobachtet werden konnte [214]. Aufgrund der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Vorversuche, bei denen die IL-8-Konzentration nach 8, 12, 16 und 24 Stunden gemessen wurde (Daten nicht gezeigt), wurden die nachfolgenden Stimulationen für 16 und 24 Stunden durchgeführt. Dies schließt nicht aus, dass nach einer 48-stündigen Stimulation noch höhere IL-8-Konzentrationen sezerniert und damit signifikante Zeiteffekte hätten beobachtet werden können.

Ein statistischer Vergleich der drei Patientengruppen (NK-, GPA- und CRS-Patienten) ergab, dass nasale Epithelzellen von GPA-Patienten sowohl basal weniger IL-8 bilden als nasale Epithelzellen von Normalkontrollen, als auch nach 24 Stunden in geringerem Maße als diese auf den *S. aureus*-Überstand reagieren. Sie sind also in

ihrer Fähigkeit eingeschränkt, auf einen bakteriellen Stimulus adäquat zu antworten. Eine Erklärung könnte wie oben beschrieben eine Störung im IL-8-Syntheseweg eventuell bedingt durch eine fehlerhafte epigenetische Regulation oder andere Ursachen sein. Andererseits könnte dies auch für eine verminderte Erkennung der stimulierenden Komponenten von *S. aureus*, eventuell bedingt durch eine verminderte Expression entsprechender Rezeptoren sprechen. Da jedoch auf diesem Forschungsgebiet noch nicht geklärt ist, welche Bestandteile im Überstand die stimulierende Wirkung ausüben, muss dieser Frage zuerst nachgegangen werden, um anschließend gezielt entsprechende Rezeptoren untersuchen zu können, die möglicherweise an diesem Vorgang beteiligt sind.

Im Gegensatz zu nasalen Epithelzellen von GPA-Patienten reagieren die von CRS-Patienten nach 16 Stunden mit einer stärkeren IL-8-Synthese als Normalkontrollen auf den *S. aureus*-Überstand. Nach 24 Stunden ist dieser Effekt jedoch nicht mehr zu beobachten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen der Signaltransduktionsprozesse zur IL-8-Synthese bei CRS-Patienten anders verlaufen. Weiterhin ist auffällig, dass sich die IL-8-Konzentrationen in den Überständen stimulierter und unbehandelter nasaler Epithelzellen von GPA- und CRS-Patienten zu beiden Zeitpunkten grundsätzlich voneinander unterscheiden: nasale Epithelzellen von GPA-Patienten scheinen nur eingeschränkt zu reagieren, nasale Epithelzellen von CRS-Patienten hingegen zeigen verstärkte Reaktionen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Effekte jeweils krankheitsspezifisch sind und nicht nur allgemein entzündungsbedingt, weil es sich sowohl bei der GPA als auch bei der CRS um chronisch entzündliche Erkrankungen handelt.

Auch die antimikrobiellen Peptide humanes  $\beta$ -Defensin-3 (hBD3) und das humane Cathelicidin LL-37 wurden nach Stimulation mit *S. aureus* im Überstand nasaler Epithelzellen analysiert. Diese multifunktionellen AMP weisen eine antimikrobielle Aktivität gegen ein breites Spektrum an gram-positiven (wie z.B. *S. aureus*) und gram-negativen Bakterien, Hefen (*Candida albicans*) und verschiedene Viren auf [149;162;215-217]. Zusätzlich üben sie immunmodulatorische Funktionen wie z.B. chemotaktische Aktivität, Freisetzung von Cytokinen und Inhibierung der Apoptose neutrophiler Granulozyten aus und sind in die Wundheilung involviert [149;218-222].

In Barrieren wie der intestinalen Mucosa, der Haut und der Atemwege sind hBD3 und LL-37 in den Epithelien nachgewiesen worden [215]. Immunhistochemische und RT-PCR Analysen zeigen Epithelzellen, Entzündungszellen in der subepithelialen Schicht sowie submuköse Drüsen als Quellen für LL-37 und hBD3 in der nasalen Mukosa von CRS-Patienten und gesunden Kontrollen [148;223-225].

Nachdem in dieser Arbeit immunhistochemisch auch für GPA-Patienten nachgewiesen werden konnte, dass die Epithelzellen hauptverantwortlich für die Synthese der antimikrobiellen Peptide LL-37 und hBD3 in der nasalen Mukosa sind, wurden Stimulationsexperimente an nasalen Epithelzellen mit *S. aureus* durchgeführt, um deren Verhalten hinsichtlich der Synthese dieser AMP nach Stimulation bei den drei Gruppen vergleichen zu können. Die AMP-Antwort nasaler Epithelzellen von GPA-Patienten auf *S. aureus*-Stimulation ist signifikant verändert. Der in einem Vorversuch als bester Stimulus identifizierte *S. aureus*-Überstand in der Verdünnung 1:5 konnte eine deutliche Synthese der beiden AMP in den nasalen Epithelzellen bei allen drei Gruppen hervorrufen. Ein die Expression von hBD3 bzw. LL-37 induzierender Effekt von *S. aureus* auf nasale Epithelzellen ist aus der Literatur bekannt [226;227], jedoch ist ein Vergleich der Messwerte aufgrund der sehr unterschiedlichen Versuchsansätze nicht möglich. Interessanterweise zeigen nasale Epithelzellen von GPA-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen eine signifikant geringere hBD3-Reaktion auf den Stimulus (Kapitel III 3.3). Im Gegensatz dazu konnten für LL-37 keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Demzufolge ist die Expression von AMP in nasalen Epithelzellen von GPA-Patienten nicht generell beeinträchtigt, sondern für die einzelnen AMP unterschiedlich ausgeprägt.

Reduzierte AMP-Konzentrationen werden bei Morbus Chron mit einer Prädisposition für eine bakterielle Invasion in Verbindung gebracht [228]. Auch die Infektion der Haut mit *S. aureus* bei Patienten mit atopischer Dermatitis könnte durch ein gestörtes Cytokinmuster und z.T. durch reduzierte AMP-Konzentrationen erklärt werden [222]. Interessanterweise ist bei persistierenden nasalen *S. aureus*-Trägern eine deutlich reduzierte hBD3-Konzentration der Haut nachgewiesen worden [229]. Für Hautkrankheiten und cystische Fibrose wurde beschrieben, dass reduzierte IL-8- und hBD3-Konzentrationen die Kolonisierung mit *S. aureus* begünstigen könnten [230;231].

Dies könnte auch auf die GPA zutreffen und einen ersten Erklärungsansatz für die bei der GPA bekannte erhöhte nasale Besiedlung mit *S. aureus* darstellen. Denkbar wäre auch eine Verschiebung der normalen bakteriellen Flora zugunsten fakultativ pathogener Bakterien, wie dies für Morbus Chron diskutiert wird [36]. Dies könnte eine unbalancierte Entzündungsantwort nach sich ziehen und den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen jedoch auch mögliche neue therapeutische Ansätze auf. Zur Vermeidung von Rezidiven könnten lokal AMP [231] oder rekombinantes IL-8 [232] appliziert werden. Eine Beeinflussung der Zusammensetzung der nasalen Flora durch Probiotika stellt eine weitere mögliche therapeutische Alternative dar [233].

#### **4 AMP-Konzentrationen in Nasensekreten bei GPA-Patienten**

Die Analyse der Konzentrationen antimikrobieller Peptide im Nasensekret unter Beachtung einer *S. aureus*-Kolonisation als exogenem Faktor stellte eine weitere Fragestellung dieser Arbeit dar. Zusätzlich zu LL-37 und hBD3 wurde hierbei RNase 7 untersucht. RNase 7 ist ein antimikrobielles Peptid mit einer breiten Wirksamkeit gegen gram-positive und gram-negative Bakterien und Hefen [150]. Es wird in einer Vielzahl von Geweben wie z.B. der Haut, dem Zahnfleisch und dem Respirationstrakt exprimiert [150;234] und kann in Keratinozyten durch Cytokine, Kontakt mit Bakterien und durch oberflächliche Hautbarrierestörung induziert werden [150;235].

In den nasalen Sekreten konnten für die genannten AMP keine Unterschiede zwischen den Gruppen detektiert werden. Der Nachweis von LL-37 im nasalen Sekret stimmt für die Normalkontrollen überein mit früheren Studien, auch wenn sehr stark unterschiedliche Konzentrationen detektiert wurden [236-238]. Eine aktuelle Studie zeigt in etwa vergleichbare Konzentrationen dieser AMP in nasalen Sekreten gesunder Probanden [161] und bestätigt damit die Ergebnisse dieser Arbeit.

Zusätzlich ist in dieser Arbeit für LL-37 ein Kolonisationseffekt von *S. aureus* (d.h. deutlich höhere LL-37-Konzentrationen nasal besiedelter im Vergleich zu nicht besiedelten Personen, innerhalb einer Patientengruppe) bei GPA-Patienten und Normal-

kontrollen zu beobachten, welcher mit der aus der Literatur bekannten Induktion von LL-37 durch Hefen und gram-positive Bakterien gut übereinstimmt [227;239]. Interessanterweise tritt dieser Kolonisierungseffekt für LL-37 bei CRS-Patienten nicht auf und bedarf weiterer Untersuchungen. Hinsichtlich hBD3 und RNase 7 ist ein Kolonisationseffekt bei den drei Patientengruppen nicht zu verzeichnen. Dies ist für hBD3 auf den ersten Blick überraschend, jedoch konnte in den Stimulationsexperimenten gezeigt werden, dass *S. aureus* bei allen drei Gruppen einen die hBD3-Synthese induzierenden Effekt auf nasale Epithelzellen ausübt (Kapitel III 3.3). Außerdem ist eine Induktion von hBD3 durch Bakterien (u.a. *Pseudomonas aeruginosa* und *S. aureus*), Cytokine und Kalzium beschrieben [149;240]. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen hBD3-Reaktionen auf *S. aureus* in den Stimationsversuchen und in den Nasensekreten könnte sein, dass in der Nase andere und heterogene *S. aureus*-Stämme vorkommen und diese sich in ihrer Fähigkeit unterscheiden, hBD3 im Nasenepithel zu induzieren [226]. Weitere Komponenten des Nasensekrets könnten die hBD3 induzierenden Substanzen von *S. aureus in vivo* inaktivieren bzw. ihre wirksame Konzentration reduzieren. Weiterhin ist ein direkter Vergleich von *in vitro*-Stimulation mit *S. aureus* mit einer nasalen *S. aureus*-Besiedlung *in vivo* nur eingeschränkt möglich, da für die Stimationsversuche Überstände einer *S. aureus*-Konzentration von  $1 \times 10^8/\text{ml}$  (= 1:5 Ü) eingesetzt wurden und *in vivo* eine hohe *S. aureus*-Konzentration von persistent besiedelten Menschen nur bei  $1 \times 10^4$ - $10^5/\text{ml}$  liegt [241]. *S. aureus*-Überstände der niedrigsten, in dieser Arbeit eingesetzten Konzentration von  $1 \times 10^6/\text{ml}$  (= 1:500 Ü) konnten die hBD3-Expression nasaler Epithelzellen nicht induzieren (Abb. 17). Dies könnte eine Erklärung für den fehlenden Kolonisationseffekt für hBD3 bei nasal mit *S. aureus* besiedelten Menschen sein.

Der fehlende Einfluss nasaler *S. aureus*-Kolonisation auf die RNase 7-Konzentration im Nasensekret könnte dadurch erklärt werden, dass die nasalen Epithelzellen immunhistochemisch nicht als Synthesorte für RNase 7 identifiziert werden konnten, was mit aktueller Literatur übereinstimmt [161]. Für die dennoch im nasalen Sekret vorkommende RNase 7 müssen andere Zellen als Produzenten fungieren. Submuköse Drüsen sowie die luminalen Zellschichten des *Stratum corneum* und *Stratum granulosum* konnten in der Nase als Synthesorte für RNase 7 gezeigt werden [161].

Da RNase 7 zudem von den Epithelzellen der Cornea gebildet wird [242], ist es denkbar, dass RNase 7 über die Tränenflüssigkeit in das Nasensekret gelangt.

Die antimikrobielle Aktivität von AMP wird *in vitro* bei Konzentrationen von 1 - 10 µg/ml erreicht [215;243]. Im Vergleich dazu waren die in dieser Arbeit gemessenen Konzentrationen in den nasalen Sekreten deutlich niedriger, aber dennoch höher als in Waschflüssigkeiten gesunder Haut [244]. Unter Berücksichtigung, dass die Abstrichtupfer zur Gewinnung der Nasensekrete in 500 µl Natriumphosphatpuffer eluiert (II 2.1.1) und entsprechend sehr stark verdünnt wurden (bis zu 500fach), könnten die detektierten Konzentrationen physiologisch relevante antimikrobiell wirksame Konzentrationen erreichen. Außerdem könnte direkt auf der mukosalen Oberfläche die AMP-Konzentration höher sein als im gesamten Volumen des Nasensekrets [236] und dieser Konzentrationsgradient könnte zu einer Unterschätzung der in den Nasensekreten gemessenen Konzentrationen beitragen. Zusätzlich können additive und synergistische Effekte der AMP zu einer antimikrobiellen Aktivität bei geringerer Konzentration führen [168].

## **5 Intraepithelialer *Staphylococcus aureus* in der nasalen Mukosa von GPA-Patienten**

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war die Analyse einer intrazellulären Akkumulation von *S. aureus* in der nasalen Mukosa. Die Untersuchung an Paraffinschnitten der drei Patientengruppen mittels FISH und nachgeschalteter Immunfluoreszenzfärbung ergab den intrazellulären Nachweis von *S. aureus* in der Mukosa von GPA- und CRS-Patienten. Ein intrazelluläres Vorkommen von *S. aureus* in nasalen Epithelzellen konnte auch durch Invasionsexperimente gezeigt werden. Das aus der Literatur bekannte [245] erhöhte intrazelluläre Vorkommen von *S. aureus* in nasalen Epithelzellen bei CRS-Patienten konnte in dieser Arbeit im Rahmen eines ersten Pilotexperimentes nachvollzogen werden. Möglicherweise ergibt sich daraus auch ein erster Hinweis, dass intrazellulär vorkommender *S. aureus* ebenfalls eine Rolle bei der GPA spielen könnte, wenngleich sich in diesem Experiment keine statistischen Unterschiede zwischen GPA- und NK-Patienten gezeigt haben. Zu berücksichtigen ist dabei jedoch, dass es sich bei diesem Experiment um ein erstes Pilotexperiment

handelte, mit nur einem nicht verblindeten Beobachter, einer relativ kleinen Stichprobengröße und unterschiedlich großen Biopsien, die eine genaue statistische Aussage schwierig machen. Für eine präzise Aussage sind weitere Untersuchungen mit mehreren unabhängigen Beobachtern, einem größeren Stichprobenumfang und einer festgelegten Anzahl auszuwertender Sichtfelder nötig.

Intrazellulär vorkommender *S. aureus* werden mit chronischen und wiederkehrenden Erkrankungen wie Osteomyelitis, Endokarditis und Tonsillitis in Verbindung gebracht [246;247]. Auch für die chronische Rhinosinusitis (CRS) mit bzw. ohne Polypen verdichten sich die Hinweise auf ein intrazelluläres Vorkommen von *S. aureus*, das zur Pathogenese beitragen könnte [245;248-250], auch wenn der generelle Einfluss von *S. aureus* bei der CRS kontrovers diskutiert wird [245]. Falls sich herausstellen sollte, dass intrazellulärer *S. aureus* ebenfalls in die Pathogenese der GPA involviert ist, so könnten ständige endogene Reinfektionen durch intrazelluläre *S. aureus* eine mögliche Erklärung für das erhöhte Auftreten *S. aureus*-assoziiertes GPA-Rezidive sein. Dann wäre die Therapie mit einem zellgängigen Antibiotikum wie z.B. Rifampicin [251] naheliegend.

Zur Klärung möglicher Ursachen für ein intrazelluläres Vorkommen wäre u.a. eine Analyse der Proteine sinnvoll, welche die Aufnahme von *S. aureus* in die Zelle ermöglichen. Dies könnte z.B. Fibronectin in Verbindung mit dem Fibronectinrezeptor Integrin  $\alpha 5\beta 1$  sein [252]. Des Weiteren wäre ein defekter phagolysosomaler Verdau aufgenommener Bakterien eine weitere Möglichkeit für ein verlängertes intrazelluläres Überleben. Dieser Frage könnte z.B. mit Invasionsexperimenten über mehrere Tage unter Verwendung transformierter Zelllinien nachgegangen werden.

## **6 Transformierte nasale GPA-Epithelzellen**

Die Generierung transformierter krankheitsspezifischer Modelzelllinien bietet gegenüber der Verwendung primärer nasaler Epithelzellen wesentliche Vorteile. Der Arbeitsaufwand für die Gewinnung primärer nasaler Epithelzellen entfällt. Limitationen der Zellzahl und Kultivierungsdauer entfallen, wodurch Experimente ermöglicht werden, die mit Primärkulturen nicht zu realisieren sind, wie beispielsweise proteinchemisch-immunologische Untersuchungen, die eine relativ hohe Zellzahl erfordern.

Zudem bieten Zelllinien homogenes Ausgangsmaterial und sie haben verglichen mit Primärkulturen konstante Eigenschaften, da sie keinen geno- und phänotypischen Schwankungen unterliegen. Dies ermöglicht eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und würde Studien verschiedener Arbeitsgruppen besser vergleichbar machen.

Um der Frage nachzugehen, inwiefern sich die Etablierung transformierter GPA-Zelllinien für funktionelle Analysen gegenüber primären Zellkulturen als sinnvoll erweist, wurden primäre nasale Epithelzellen mit den Genen *bmi-1* bzw. *hTERT* transduziert. Eine Transduktion mit *hTERT* führte nicht zur Transformation nasaler Epithelzellen. Mittels RT-PCR und Westernblot konnte die erfolgreiche Transduktion des *bmi-1*-Gens nachgewiesen und mittels Cytokeratinfärbungen der epitheliale Ursprung der Zellen verifiziert werden. Das Gen für *bmi-1* wurde bereits zur erfolgreichen Transformation humaner nasopharyngealer Epithelzellen [140] und humaner Brustepithelzellen eingesetzt [253]. Von derartigen Experimenten ist nicht unbedingt zu erwarten, dass ein unbegrenztes, voll autonomes Wachstum (Immortalisierung) etabliert werden kann. Im Gegensatz dazu sprechen die bisherigen Erfahrungen eher für eine begrenzte Wachstumstransformation, bei welcher viele Eigenschaften primärer Zellen erhalten bleiben. Für ein Modell primärer Zellen wäre eine sehr hohe Proliferationsrate und eine Tumor-artige Dedifferenzierung nicht wünschenswert.

Zur Überprüfung der GPA-Charakteristika, die sich bei den Primärkulturen abgezeichnet haben, wurden erste Stimulationen mit *S. aureus* durchgeführt. Diese Pilotexperimente haben gezeigt, dass die transformierten nasalen GPA-Epithelzellen ein ähnliches Reaktionsmuster hinsichtlich LL-37, hBD3 und G-CSF aufweisen wie die Primärkulturen. Hinsichtlich der IL-8-Sekretion erwies sich die transformierte GPA-Zelllinie bisher als scheinbar nicht geeignetes *in vitro*-Modell, da keine messbare Reaktion auf den Stimulus zu verzeichnen war, auch wenn der direkte Vergleich mit einer transformierten NK-Zelllinie bislang noch nicht möglich war. Dieses vorläufige Ergebnis ist jedoch übereinstimmend mit einer analog durchgeführten Stimulationen der human nasalen Tumorzelllinie RPMI-2650, bei welcher weder basal noch als Reaktion auf diesen Stimulus eine IL-8-Sekretion beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu waren mit *bmi-1*- und *hTERT*-transformierte bronchiale Epithelzellen



in der Lage, auf Stimulation mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und dem TLR2-Agonisten Tris-Palmitoyl-Cystein (Pam3Cys) IL-8 zu sezernieren [141]. Diese Diskrepanz könnte durch die unterschiedlichen Stimuli sowie die unterschiedlichen Epithelzellarten erklärt werden. Da die Integration ungerichtet ins zelluläre Genom erfolgt, könnte eine Insertion des *bmi-1*-Gens während des Transformationsvorgangs auch in einem die IL-8-Synthese beeinflussenden Genbereich stattfinden. Mit einer Kombination aus Karyotypisierung und FISH könnte dies geprüft werden, allerdings nur für die bereits bekannten Komponenten der Synthesewege für IL-8.

Immortalisierte nasale bzw. nasopharyngeale Zellen wurden bereits sowohl für die Tumorforschung als auch für die Erforschung der Regulation der Claudine im nasalen Epithel etabliert [140;254;255], diese sind jedoch für die Untersuchung der Pathogenese von Krankheiten ungeeignet. Die einzigen krankheitsspezifischen Zelllinien des Respirationstraktes wurden für die Erforschung der cystischen Fibrose entwickelt und es hat sich herausgestellt, dass die Auswahl einer immortalisierten Zelllinie immer davon abhängt, welche biologischen Endpunkte untersucht werden sollen, da im Verlauf der Immortalisierung bzw. Transformation nicht jede Zelllinie für jedes zu untersuchende Protein gleichermaßen geeignet ist [256]. Es ist jedoch zu bedenken, dass durch die Beeinflussung des genetischen Bestandes einer kontinuierlich wachsenden immortalisierten Zelllinie zwar krankheitsspezifische Defekte analysiert werden können, diese aber abschließend exemplarisch mit Primärkulturen verifiziert werden müssen, um die *in vivo* Bedingungen so realistisch wie möglich wiedergeben zu können. Mit der Generierung einer immortalisierten nasalen GPA-Zelllinie sollen funktionelle Analysen der bisherigen Befunde einer gestörten sinunasalen Grenzfläche bei der GPA wie z.B. Untersuchungen der von den nasalen Epithelzellen sekretierten AMP im Hinblick auf ihre antimikrobielle und chemotaktische Aktivität ermöglicht werden. Zudem eröffnet sich die Möglichkeit, das Zusammenspiel der nasalen Epithelzellen mit weiteren an der sinunasalen Barriere beteiligten Zellen (neutrophilen Granulozyten oder dendritischen Zellen) sowie die Zytovasion von *S. aureus* eingehender zu analysieren.

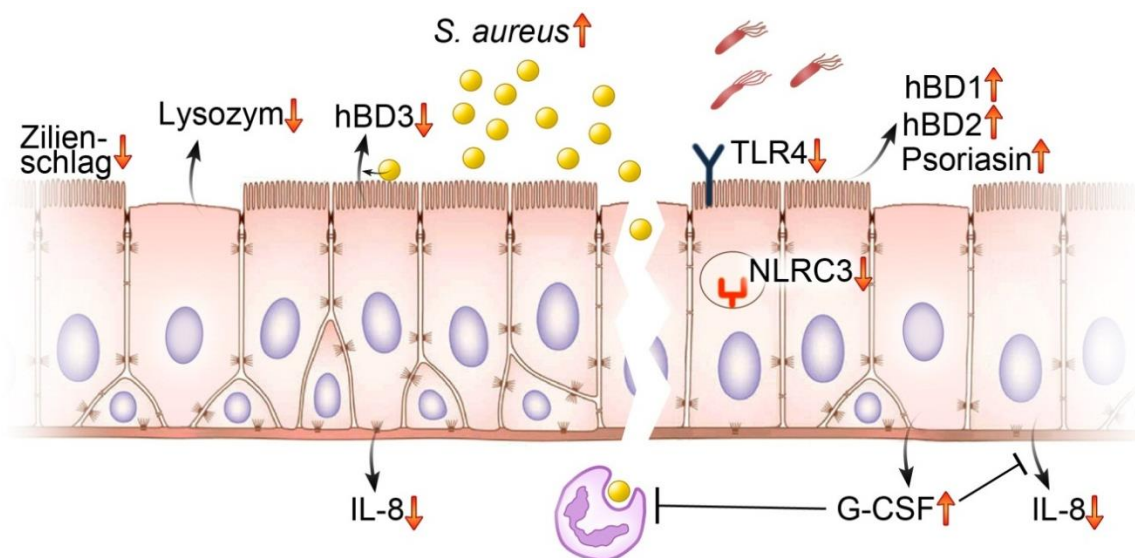
## V Zusammenfassung

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ist eine Autoimmunerkrankung mit einer chronisch granulomatösen Entzündung des oberen Respirationstraktes und nekrotisierender Vaskulitis der kleinen und mittleren Blutgefäße, meist verbunden mit einer nekrotisierenden Glomerulonephritis. Als Ursache wird ein multifaktorielles Geschehen auf der Basis endogener und exogener Faktoren analog zu anderen Grenzflächenerkrankungen angenommen. Eine verminderte Zilienschlagfrequenz und eine erhöhte nasale Besiedlung mit *S. aureus* deuten auf eine Störung der sinunasalen Barriere hin. Das Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, die Rolle endogener und exogener Faktoren im Hinblick auf eine gestörte nasale Grenzfläche bei der GPA zu untersuchen.

In nasalen Mukosabiopsien von GPA-Patienten im Vergleich zu Kontroll-Personen konnte durch unsere Arbeitsgruppe ein spezifisches Genexpressionsmuster mit zehn differentiell exprimierten Transkripten identifiziert werden, die mit der Immunantwort assoziiert sind. Die Transkription dieser Gene ließ sich exemplarisch auch auf Proteinebene durch Immunhistochemie an korrespondierenden Biopsien verifizieren. Die Analyse der Überstände nasaler Epithelzellen auf 19 entzündungsrelevante Cytokine ergab ein verändertes Cytokinprofil bei GPA-Patienten mit einer erhöhten G-CSF- und einer verminderten IL-8-Konzentration im Vergleich zu Normalkontrollen. Weiterhin ließ sich nachweisen, dass die Reaktion nasaler Epithelzellen von GPA-Patienten auf Stimulation mit einem *S. aureus*-Überstand hinsichtlich der Sekretion von IL-8 und hBD3 signifikant eingeschränkt ist. Die Untersuchung der an der Abwehr von *S. aureus* beteiligten antimikrobiellen Peptide LL-37, hBD3 und RNase 7 im nasalen Sekret ergab keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen, ließ aber eine signifikant erhöhte LL-37-Konzentration im nasalen Sekret bei *S. aureus*-besiedelten GPA-Patienten und Kontrollen feststellen. Des Weiteren gelang mit einer Kombination aus Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenz-Färbung der exemplarische intraepitheliale Nachweis von *S. aureus* in der nasalen Mukosa von GPA-Patienten. Auf der Suche nach einer Möglichkeit, besser standardisierte und reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können, wurde mittels Transduktion von

bmi-1 eine transformierte nasale GPA-Zelllinie für funktionelle Analysen als krankheitsspezifisches *in vitro*-Modell generiert.

Zusammengefasst lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen das Bild einer vielschichtig gestörten sinunasalen Grenzfläche bei der GPA ableiten (Abb. 23): Reduzierte Konzentrationen an IL-8 und hBD3 auf Protein- und Lysozym auf mRNA-Ebene sowie die bekannte verminderte Zilienschlagfrequenz könnten zu einer Veränderung der mikrobiellen Flora der nasalen Mukosa führen und möglicherweise eine Besiedlung mit *S. aureus* begünstigen. Zusätzlich könnte die basal erhöhte G-CSF-Konzentration zur reduzierten IL-8-Konzentration beitragen und neutrophile Granulozyten an der Phagozytose von *S. aureus* hindern. Auch die reduzierte Expression von Mustererkennungs-Rezeptoren spricht für eine eingeschränkte Erkennung von Bakterien mit möglicher konsekutiver Veränderung der mikrobiellen Flora. Möglicherweise ist die verstärkte Expression der antimikrobiellen Peptide hBD1, hBD2 und Psoriasin als Reaktion darauf erfolgt. Die *in vitro* und *ex vivo* erzielten Resultate ermöglichen nicht nur ein besseres Verständnis der komplexen Pathomechanismen der GPA, sondern eröffnen auch Perspektiven für neue interventionelle therapeutische Optionen, wie z.B. die adjuvante Probiotikatherapie oder die lokale Antibiotikatherapie.



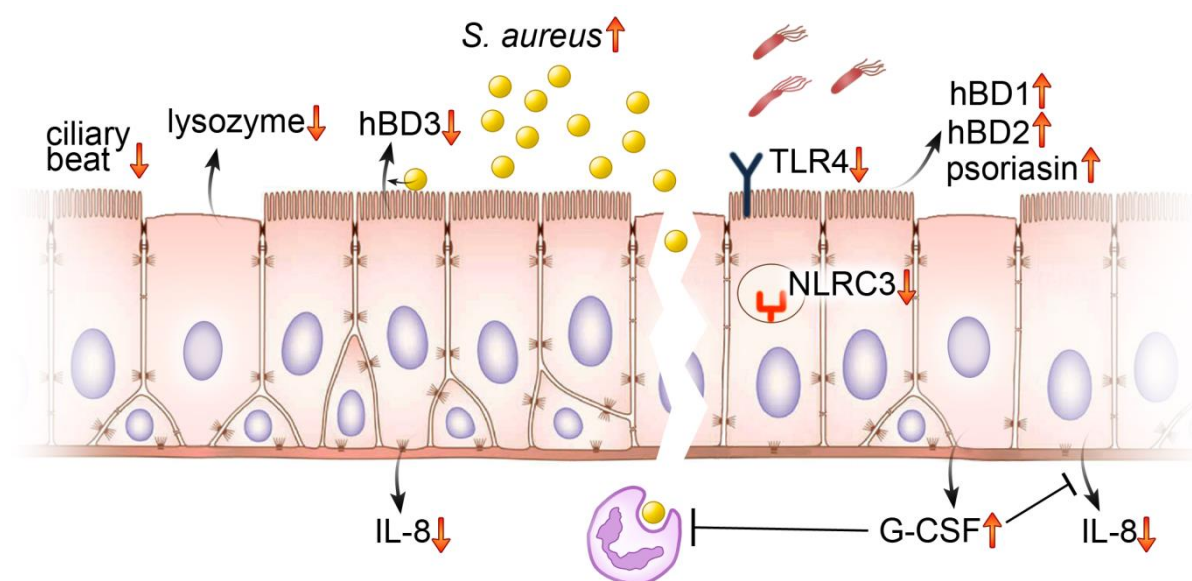
**Abb. 23: Störungen der nasalen Grenzfläche und potenzielle Auswirkungen.** Reduzierte Konzentrationen an Lysozym, hBD3, IL-8, TLR4 und NLRC3 sowie ein verminderter Zilienschlag begünstigen eine Veränderung der mikrobiellen Flora und möglicherweise eine erhöhte Besiedlung mit *S. aureus*. Als Folge werden hBD1, hBD2 und Psoriasin verstärkt exprimiert. Erhöhte G-CSF-Konzentrationen beeinflussen zusätzlich die IL-8-Konzentration und die bakterizide Wirkung neutrophiler Granulozyten.

## VI Summary

Granulomatosis with polyangiitis is an autoimmune disorder with a chronic granulomatous inflammation of the upper respiratory tract and necrotizing vasculitis of small and mid-sized blood vessels, mostly associated with necrotizing glomerulonephritis. A multifactorial process on the basis of endogenous and exogenous factors is assumed to be causative, in analogy to other barrier diseases. The diminished ciliary beat frequency and increased nasal colonization rates with *S. aureus* suggest a disturbance of the sinunasal barrier. The aim of this study is therefore to determine the role of endogenous and exogenous factors with respect of a disturbed nasal interface in patients with GPA.

In nasal mucosa biopsies of GPA patients in comparison to control persons, a specific gene expression pattern with ten differentially expressed transcripts associated with immune responses was identified by our research group. The transcription of these genes was also verified for examples on protein level by immunohistochemistry on biopsies. The analysis of supernatants of nasal epithelial cells for 19 cytokines linked to inflammatory processes revealed an altered pattern of cytokine expression. Compared to healthy controls, G-CSF concentrations were increased, while IL-8 levels were reduced in GPA-patients. Furthermore, the reaction of nasal epithelial cells from GPA patients to stimulation with *S. aureus*-supernatant was shown to be significantly restricted with respect of IL-8 and hBD3 secretion. The analysis of the antimicrobial peptides LL-37, hBD3 and RNase 7, which are involved in the defense against *S. aureus*, from nasal secretions did not show any differences between the patient groups. However, a significantly increased LL-37 concentration from nasal secretions of GPA-patients and healthy controls colonized with *S. aureus* was observed. Furthermore, a combination of fluorescence in situ hybridization and immunofluorescence staining allowed the exemplary intraepithelial detection of *S. aureus* in the nasal mucosa of GPA-patients. Seeking possibilities to permit better standardized and reproducible results, a transformed nasal GPA cell line was generated via transduction of bmi-1. This cell line may be suitable as a disease specific *in vitro* model for functional analysis.

Taken together, the presented results allow to draw a picture of a complex disorder of the sinunasal barrier in GPA can be drawn (Fig. 24): Reduced concentrations of IL-8 and hBD3 on protein- and lysozyme on mRNA-level as well as the known diminished ciliary beat frequency could induce alterations of the microbial flora of the nasal mucosa and possibly favour colonisation with *S. aureus*. Additionally, the increased basal concentration of G-CSF might contribute to the reduced IL-8 concentration and inhibit the capability of neutrophil granulocytes to kill *S. aureus*. Similarly, the reduced expression of pattern recognition receptors argues for an impaired recognition of bacteria, possibly followed by an alteration of the microbial flora. The increased expression of the antimicrobial peptides hBD1, hBD2 and psoriasin might be a reaction on that. The *in vitro* and *ex vivo* results allow not only a better understanding of the complex pathomechanisms of the GPA, but also open up perspectives for novel interventional therapeutic options, such as adjuvant probiotics or local antibiotics.



**Fig. 24: Disturbances of the nasal barrier and possible consequences.** Reduced concentrations of lysozyme, hBD3, IL-8, TLR4, and NLRC3, as well as a reduced ciliary beat favour an alteration of the microbial flora and possibly an increased colonization with *S. aureus*. Consecutively, hBD1, hBD2, and psoriasin are expressed at increased levels. Higher G-CSF concentrations further inhibit IL-8 secretion and the bactericidal effect of neutrophil granulocytes.

## VII Literatur

- 1 Beule AG (2010) Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses. *Laryngorhinootologie* 89 Suppl 1:15-34.
- 2 Widdicombe JH, Bastacky SJ, Wu DX, Lee CY (1997) Regulation of depth and composition of airway surface liquid. *Eur Respir J* 10:2892-2897.
- 3 Wilson WR, Allansmith MR (1976) Rapid, atraumatic method for obtaining nasal mucus samples *Ann Otol Rhinol Laryngol* 85:391-393.
- 4 Ullrich S, Gustke H, Lamprecht P, Gross WL, Schumacher U, Ambrosch P, Laudien M (2009) Severe impaired respiratory ciliary function in Wegener granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 68:1067-1071.
- 5 Cohen NA (2006) Sinonasal mucociliary clearance in health and disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 196:20-26.
- 6 Cole AM, Liao HI, Stuchlik O, Tilan J, Pohl J, Ganz T (2002) Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. *J Immunol* 169:6985-6991.
- 7 Koizumi J, Kojima T, Kamekura R, Kurose M, Harimaya A, Murata M, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N (2007) Changes of gap and tight junctions during differentiation of human nasal epithelial cells using primary human nasal epithelial cells and primary human nasal fibroblast cells in a noncontact coculture system. *J Membr Biol* 218:1-7.
- 8 Yeo NK, Jang YJ (2010) Rhinovirus infection-induced alteration of tight junction and adherens junction components in human nasal epithelial cells. *Laryngoscope* 120:346-352.
- 9 Zuckerman JD, Lee WY, del Gaudio JM, Moore CE, Nava P, Nusrat A, Parkos CA (2008) Pathophysiology of nasal polyposis: the role of desmosomal junctions. *Am J Rhinol* 22:589-597.
- 10 Hartsock A, Nelson WJ (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778:660-669.
- 11 Schneeberger EE, Lynch RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:1213-1228.
- 12 Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84: 381-388.
- 13 Ramanathan M, Jr., Lane AP (2007) Innate immunity of the sinonasal cavity and its role in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 136:348-356.
- 14 Diamond G, Legarda D, Ryan LK (2000) The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev* 173:27-38.
- 15 Lane AP (2009) The role of innate immunity in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 9:205-212.
- 16 Medzhitov R, Janeway C, Jr. (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173:89-97.
- 17 Lane AP, Truong-Tran QA, Myers A, Bickel C, Schleimer RP (2006) Serum amyloid A, properdin, complement 3, and toll-like receptors are expressed locally in human sinonasal tissue. *Am J Rhinol* 20:117-123.
- 18 Vandermeer J, Sha Q, Lane AP, Schleimer RP (2004) Innate immunity of the sinonasal cavity: expression of messenger RNA for complement cascade components and toll-like receptors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130:1374-1380.
- 19 Bogefors J, Rydberg C, Uddman R, Fransson M, Mansson A, Benson M, Adner M, Cardell LO (2010) Nod1, Nod2 and Nalp3 receptors, new potential targets in treatment of allergic rhinitis? *Allergy* 65:1222-1226.
- 20 Kato A, Schleimer RP (2007) Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 19:711-720.

- 21 Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D, Avila PC (2007) Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 120:1279-1284.
- 22 Lee S, Lane AP (2011) Chronic rhinosinusitis as a multifactorial inflammatory disorder. *Curr Infect Dis Rep* 13:159-168.
- 23 Maune S (2005) Strategies of the nasal mucous membranes for defense against infection. Current knowledge of antimicrobial peptides. *HNO* 53 Suppl 1:21-25.
- 24 Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, Guy RH, Macgowan AL, Tazi-Ahnini R, Ward SJ (2009) Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 129:1892-1908.
- 25 Matricon J, Barnich N, Ardid D (2010) Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself* 1:299-309.
- 26 Laudien M, Ambrosch P, Till A, Podschun R, Lamprecht P (2008) Diagnosis, therapy and current research aspects of selected chronic inflammatory diseases with head and neck involvement. *Z Rheumatol* 67:397-406.
- 27 Holgate ST (2008) The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int* 57:1-10.
- 28 de Benedetto A, Agnihothri R, McGirt LY, Bankova LG, Beck LA (2009) Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *J Invest Dermatol* 129:14-30.
- 29 Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, Tripathi-Peters A, Grammer LC, Schleimer RP (2008) Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol* 22:549-559.
- 30 Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, Di Giovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH (2006) Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 38:441-446.
- 31 Kezic S, Kemperman PM, Koster ES, de Jongh CM, Thio HB, Campbell LE, Irvine AD, McLean WH, Puppels GJ, Caspers PJ (2008) Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 128:2117-2119.
- 32 Seguchi T, Cui CY, Kusuda S, Takahashi M, Aisu K, Tezuka T (1996) Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Arch Dermatol Res* 288:442-446.
- 33 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O' Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:599-603.
- 34 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:603-606.
- 35 Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G (2003) Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 278:5509-5512.
- 36 Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M (2005) Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet* 6:376-388.
- 37 Breuer K, Kapp A, Werfel T (2001) Bacterial infections and atopic dermatitis. *Allergy* 56:1034-1041.

- 38 Zhang N, Gevaert P, van Zele T, Perez-Novo C, Patou J, Holtappels G, van Cauwenberge P, Bachert C (2005) An update on the impact of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in chronic sinusitis with nasal polyposis. *Rhinology* 43:162-168.
- 39 Barton GM (2008) A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest* 118:413-420.
- 40 Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428-435.
- 41 Nathan C (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6:173-182.
- 42 Imhof BA, Dunon D (1997) Basic mechanism of leukocyte migration. *Horm Metab Res* 29:614-621.
- 43 Rudack C, Bachert C (1999) Cytokines and chemokines in paranasal sinus diseases. *Laryngorhinootologie* 78:481-490.
- 44 Serhan CN, Savill J (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6:1191-1197.
- 45 Serhan CN (2007) Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol* 25:101-137.
- 46 Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH (2006) Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol* 7:344-353.
- 47 Williams GT, Williams WJ (1983) Granulomatous inflammation - a review. *J Clin Pathol* 36:723-733.
- 48 Müller A, Trabandt A, Gloeckner-Hofmann K, Seitzer U, Csernok E, Schonermarck U, Feller AC, Gross WL (2000) Localized Wegener's granulomatosis: predominance of CD26 and IFN-gamma expression. *J Pathol* 192:113-120.
- 49 Klinger H (1931) Grenzformen der Periarteriitis nodosa. *Frankf Zschr Pathol* 42: 455-480.
- 50 Wegener F (1939) Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Ateriensystems und der Nieren. *Beitr Path Anat* 109:36-38.
- 51 Godman G, Churg J (1954) Wegener's granulomatosis: pathology and review of the literature. *AMA Arch Pathol* 58:533-553.
- 52 Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, Hoffman GS, Jayne DR, Jennette JC, Kallenberg CG, Luqmani R, Mahr AD, Matteson EL, Merkel PA, Specks U, Watts RA (2011) Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): an alternative name for Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 63:863-864.
- 53 Carruthers DM, Watts RA, Symmons DP, Scott DG (1996) Wegener's granulomatosis - increased incidence or increased recognition? *Br J Rheumatol* 35: 142-145.
- 54 Lamprecht P, Gross WL (2007) Current knowledge on cellular interactions in the WG-granuloma. *Clin Exp Rheumatol* 25:49-51.
- 55 Reinhold-Keller E, Herlyn K, Wagner-Bastmeyer R, Gross WL (2005) Stable incidence of primary systemic vasculitides over five years: results from the German vasculitis register. *Arthritis Rheum* 53:93-99.
- 56 Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY, Hallahan CW, Lebovics RS, Travis WD, Rottem M, Fauci AS (1992) Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Ann Intern Med* 116:488-498.
- 57 Reinhold-Keller E, Beuge N, Latza U, de Groot K, Rudert H, Nölle B, Heller M, Gross WL (2000) An interdisciplinary approach to the care of patients with Wegener's granulomatosis: long-term outcome in 155 patients. *Arthritis Rheum* 43:1021-1032.
- 58 Bacon PA (2005) The spectrum of Wegener's granulomatosis and disease relapse. *N Engl J Med* 352:330-332.



- 
- 59 van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH (1985) Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1:425-429.
  - 60 Falk RJ, Jennette JC (1988) Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 318:1651-1657.
  - 61 Ludemann J, Utecht B, Gross WL (1990) Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *J Exp Med* 171:357-362.
  - 62 Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, Oost W, Hermans J, Kallenberg CG, Limburg PC, Tervaert JW (2000) Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. *Arthritis Rheum* 43:2025-2033.
  - 63 Han WK, Choi HK, Roth RM, McCluskey RT, Niles JL (2003) Serial ANCA titers: useful tool for prevention of relapses in ANCA-associated vasculitis. *Kidney Int* 63:1079-1085.
  - 64 Holle JU, Gross WL, Holl-Ulrich K, Ambrosch P, Noelle B, Both M, Csernok E, Moosig F, Schinke S, Reinhold-Keller E (2010) Prospective long-term follow-up of patients with localised Wegener's granulomatosis: does it occur as persistent disease stage? *Ann Rheum Dis* 69:1934-1939.
  - 65 Gottschlich S, Ambrosch P, Gross WL, Hellmich B (2004) Wegener's granulomatosis in the head and neck region. *HNO* 52:935-945.
  - 66 Paulsen JI, Rudert H (2001) Manifestations of primary vasculitis in the ENT region. *Z Rheumatol* 60:219-225.
  - 67 Gross WL, Hauschild S, Schmitt WH (1993) Immunodiagnostic and immunopathogenetic significance of anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Dtsch Med Wochenschr* 118:191-199.
  - 68 Sarraf P, Sneller MC (2005) Pathogenesis of Wegener's granulomatosis: current concepts. *Expert Rev Mol Med* 7:1-19.
  - 69 Lamprecht P, Csernok E, Gross WL (2006) Effector memory T cells as driving force of granuloma formation and autoimmunity in Wegener's granulomatosis. *J Intern Med* 260:187-191.
  - 70 van der Geld YM, Limburg PC, Kallenberg CG (2001) Proteinase 3, Wegener's autoantigen: from gene to antigen. *J Leukoc Biol* 69:177-190.
  - 71 Csernok E, Ernst M, Schmitt W, Bainton DF, Gross WL (1994) Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol* 95:244-250.
  - 72 Csernok E, Schmitt WH, Ernst M, Bainton DF, Gross WL (1993) Membrane surface proteinase 3 expression and intracytoplasmic immunoglobulin on neutrophils from patients with ANCA-associated vasculitides. *Adv Exp Med Biol* 336:45-50.
  - 73 Muller Kobold AC, Kallenberg CG, Tervaert JW (1998) Leucocyte membrane expression of proteinase 3 correlates with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis. *Br J Rheumatol* 37:901-907.
  - 74 Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC (1990) Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4115-4119.
  - 75 Keogan MT, Esnault VL, Green AJ, Lockwood CM, Brown DL (1992) Activation of normal neutrophils by anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Clin Exp Immunol* 90:228-234.
  - 76 Savage CO, Pottinger BE, Gaskin G, Pusey CD, Pearson JD (1992) Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity toward cultured endothelial cells. *Am J Pathol* 141:335-342.
  - 77 Donald KJ, Edwards RL, McEvoy JD (1976) An ultrastructural study of the pathogenesis of tissue injury in limited Wegener's granulomatosis. *Pathology* 8:161-169.
  - 78 Jennette JC (1991) Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated diseases: a pathologist's perspective. *Am J Kidney Dis* 18:164-170.
-

- 
- 79 Willcocks LC, Lyons PA, Rees AJ, Smith KG (2010) The contribution of genetic variation and infection to the pathogenesis of ANCA-associated systemic vasculitis. *Arthritis Res Ther* 12:202 doi: 10.1186/ar2928.
- 80 Holle JU, Wieczorek S, Epplen JT, Gross WL (2011) The genetics of vasculitides. *Z Rheumatol* 70:198-204.
- 81 Wieczorek S, Holle JU, Epplen JT (2010) Recent progress in the genetics of Wegener's granulomatosis and Churg-Strauss syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 22:8-14.
- 82 Jagiello P, Gencik M, Arning L, Wieczorek S, Kunstmann E, Csernok E, Gross WL, Epplen JT (2004) New genomic region for Wegener's granulomatosis as revealed by an extended association screen with 202 apoptosis-related genes. *Hum Genet* 114:468-477.
- 83 Arning L, Holle JU, Harper L, Millar DS, Gross WL, Epplen JT, Wieczorek S (2011) Are there specific genetic risk factors for the different forms of ANCA-associated vasculitis? *Ann Rheum Dis* 70:707-708.
- 84 Heckmann M, Holle JU, Arning L, Knaup S, Hellmich B, Nothnagel M, Jagiello P, Gross WL, Epplen JT, Wieczorek S (2008) The Wegener's granulomatosis quantitative trait locus on chromosome 6p21.3 as characterised by tagSNP genotyping. *Ann Rheum Dis* 67:972-979.
- 85 Gregersen PK, Olsson LM (2009) Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 27:363-391.
- 86 Jagiello P, Aries P, Arning L, Wagenleiter SE, Csernok E, Hellmich B, Gross WL, Epplen JT (2005) The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 52:4039-4043.
- 87 Baslund B, Szpirt W, Eriksson S, Elzouki AN, Wiik A, Wieslander J, Petersen J (1996) Complexes between proteinase 3, alpha 1-antitrypsin and proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies: a comparison between alpha 1-antitrypsin PiZ allele carriers and non-carriers with Wegener's granulomatosis. *Eur J Clin Invest* 26:786-792.
- 88 Borgmann S, Endisch G, Urban S, Sitter T, Fricke H (2001) A linkage disequilibrium between genes at the serine protease inhibitor gene cluster on chromosome 14q32.1 is associated with Wegener's granulomatosis. *Clin Immunol* 98: 244-248.
- 89 Esnault VL, Testa A, Audrain M, Roge C, Hamidou M, Barrier JH, Sesboue R, Martin JP, Le-savre P (1993) Alpha 1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis. *Kidney Int* 43:1329-1332.
- 90 Mahr AD, Edberg JC, Stone JH, Hoffman GS, St Clair EW, Specks U, Dellaripa PF, Seo P, Spiera RF, Rouhani FN, Brantly ML, Merkel PA (2010) Alpha-antitrypsin deficiency-related alleles Z and S and the risk of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 62:3760-3767.
- 91 Dolman KM, van de Wiel BA, Kam CM, Abbink JJ, Hack CE, Sonnenberg A, Powers JC, von dem Borne AE, Golschmeding R (1992) Determination of proteinase 3-alpha 1-antitrypsin complexes in inflammatory fluids. *FEBS Lett* 314:117-121.
- 92 Rarok AA, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CG (2002) Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 13:2232-2238.
- 93 Audrain MA, Sesboue R, Baranger TA, Elliott J, Testa A, Martin JP, Lockwood CM, Esnault VL (2001) Analysis of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): frequency and specificity in a sample of 191 homozygous (PiZZ) alpha1-antitrypsin-deficient subjects. *Nephrol Dial Transplant* 16:39-44.
- 94 Jagiello P, Gross WL, Epplen JT (2005) Complex genetics of Wegener granulomatosis. *Autoimmun Rev* 4:42-47.
- 95 Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl: 245-254.
- 96 Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell* 128:669-681.
-

- 
- 97 Ciavatta DJ, Yang J, Preston GA, Badhwar AK, Xiao H, Hewins P, Nester CM, Pendergraft WF, III, Magnuson TR, Jennette JC, Falk RJ (2010) Epigenetic basis for aberrant upregulation of autoantigen genes in humans with ANCA vasculitis. *J Clin Invest* 120:3209-3219.
  - 98 Dambacher S, Hahn M, Schotta G (2010) Epigenetic regulation of development by histone lysine methylation. *Heredity* 105:24-37.
  - 99 Ciavatta D, Falk RJ (2011) Epigenetics and complementary proteins. *Clin Exp Immunol* 164 Suppl 1:17-19.
  - 100 Lloyd G, Lund VJ, Beale T, Howard D (2002) Rhinologic changes in Wegener's granulomatosis. *J Laryngol Otol* 116:565-569.
  - 101 Muhle C, Reinhold-Keller E, Richter C, Duncker G, Beigel A, Brinkmann G, Gross WL, Heller M (1997) MRI of the nasal cavity, the paranasal sinuses and orbits in Wegener's granulomatosis. *Eur Radiol* 7:566-570.
  - 102 Tadema H, Heeringa P, Kallenberg CG (2011) Bacterial infections in Wegener's granulomatosis: mechanisms potentially involved in autoimmune pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 23:366-371.
  - 103 Tadema H, Abdulahad WH, Lapse N, Stegeman CA, Kallenberg CG, Heeringa P (2011) Bacterial DNA motifs trigger ANCA production in ANCA-associated vasculitis in remission. *Rheumatology (Oxford)* 50:689-696.
  - 104 Tadema H, Abdulahad WH, Stegeman CA, Kallenberg CG, Heeringa P (2010) Expression of Toll-like receptors 2, 4 and 9 by peripheral blood leucocytes in patients with ANCA associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 62:20-23.
  - 105 Newman B, Rubin LA, Siminovitch KA (2003) NOD2/CARD15 gene mutation is not associated with susceptibility to Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol* 30:305-307.
  - 106 Mukae H, Matsumoto N, Ashitani J, Mashimoto H, Kadota J, Nakazato M, Kohno S, Matsukura S (1996) Neutrophil-related cytokines and neutrophil products in bronchoalveolar lavage fluid of a patient with ANCA negative Wegener's granulomatosis. *Eur Respir J* 9:1950-1954.
  - 107 Vordenbäumen S, Timm D, Bleck E, Richter J, Fischer-Betz R, Chehab G, Sander O, Schneider M (2010) Altered serum levels of human neutrophil peptides (HNP) and human beta-defensin 2 (hBD2) in Wegener's granulomatosis. *Rheumatol Int.* doi: 10.1007/s00296-010-1702-0
  - 108 Kato A, Peters A, Suh L, Carter R, Harris KE, Chandra R, Conley D, Grammer LC, Kern R, Schleimer RP (2008) Evidence of a role for B cell-activating factor of the TNF family in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 121:1385-1392.
  - 109 Bader L, Koldingsnes W, Nossent J (2010) B-lymphocyte activating factor levels are increased in patients with Wegener's granulomatosis and inversely correlated with ANCA titer. *Clin Rheumatol* 29:1031-1035.
  - 110 Krumbholz M, Specks U, Wick M, Kalled SL, Jenne D, Meinel E (2005) BAFF is elevated in serum of patients with Wegener's granulomatosis. *J Autoimmun* 25:298-302.
  - 111 Ohlsson S, Falk R, Yang JJ, Ohlsson K, Segelmark M, Wieslander J (2003) Increased expression of the secretory leukocyte proteinase inhibitor in Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 131:190-196.
  - 112 Xu W, He B, Chiu A, Chadburn A, Shan M, Buldys M, Ding A, Knowles DM, Santini PA, Cerutti A (2007) Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol* 8:294-303.
  - 113 Zhang RX, Yu SQ, Jiang JZ, Liu GJ (2007) Complementary DNA microarray analysis of chemokines and their receptors in allergic rhinitis. *J Invest Allergol Clin Immunol* 17:329-336.
  - 114 Bjerkeli V, Damas JK, Fevang B, Holter JC, Aukrust P, Froland SS (2007) Increased expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, in Wegener's granulomatosis - possible role in vascular inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 46:1422-1427.
-

- 
- 115 Balding CE, Howie AJ, Drake-Lee AB, Savage CO (2001) Th2 dominance in nasal mucosa in patients with Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 125:332-339.
- 116 Pichler WJ (1997) Regulation of the immune response: the TH1/TH2 concept. *Schweiz Med Wochenschr* 127:341-348.
- 117 Laudien M, Gadola SD, Podschun R, Hedderich J, Paulsen J, Reinhold-Keller E, Csernok E, Ambrosch P, Hellmich B, Moosig F, Gross WL, Sahly H, Lamprecht P (2010) 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* 28:51-55.
- 118 Stegeman CA, Tervaert JW, Sluiter WJ, Manson WL, de Jong PE, Kallenberg CG (1994) Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 120:12-17.
- 119 Zycinska K, Wardyn KA, Zielonka TM, Demkow U, Traburzynski MS (2008) Chronic crusting, nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and relapse rate in pulmonary Wegener's granulomatosis. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 6:825-831.
- 120 Richter AG, Stockley RA, Harper L, Thickett DR (2009) Pulmonary infection in Wegener granulomatosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 64:692-697.
- 121 Popa ER, Stegeman CA, Kallenberg CG, Tervaert JW (2002) *Staphylococcus aureus* and Wegener's granulomatosis. *Arthritis Res* 4:77-79.
- 122 Voswinkel J, Krämer J, Müller A, Herlyn K, Lamprecht P, Gross WL (2004) B lymphocytes infiltrating Wegener's granuloma: the immunoglobulin VH gene repertoire from granulomatous tissues displays an antigen-driven maturation and suggests a microbial trigger. *Arthritis Res Ther* 6:74 doi: 10.1186/ar1116.
- 123 Voswinkel J, Müller A, Lamprecht P (2005) Is PR3-ANCA formation initiated in Wegener's granulomatosis lesions? Granulomas as potential lymphoid tissue maintaining autoantibody production. *Ann N Y Acad Sci* 1051:12-19.
- 124 Mayet WJ, Märker-Hermann E, Schlaak J, Meyer zum Büschenfelde KH (1999) Irregular cytokine pattern of CD4+ T lymphocytes in response to *Staphylococcus aureus* in patients with Wegener's granulomatosis. *Scand J Immunol* 49: 585-594.
- 125 Kain R, Exner M, Brandes R, Ziebermayr R, Cunningham D, Alderson CA, Davidovits A, Raab I, Jahn R, Ashour O, Spitzauer S, Sunder-Plassmann G, Fukuda M, Klemm P, Rees AJ, Kerjaschki D (2008) Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med* 14:1088-1096.
- 126 Kain R, Firmin DA, Rees AJ (2010) Pathogenesis of small vessel vasculitis associated with autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens: new insights from animal models. *Curr Opin Rheumatol* 22:15-20.
- 127 Pendergraft WF, Preston GA, Shah RR, Tropsha A, Carter CW, Jr., Jennette JC, Falk RJ (2004) Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat Med* 10:72-79.
- 128 Aries PM, Herlyn K, Reinhold-Keller E, Latza U (2008) No seasonal variation in the onset of symptoms of 445 patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 59:904.
- 129 Duna GF, Cotch MF, Galperin C, Hoffman DB, Hoffman GS (1998) Wegener's granulomatosis: role of environmental exposures. *Clin Exp Rheumatol* 16:669-674.
- 130 Hellmich B, Flossmann O, Gross WL, Bacon P, Cohen-Tervaert JW, Guillevin L, Jayne D, Mahr A, Merkel PA, Raspe H, Scott DG, Witter J, Yazici H, Luqmani RA (2007) EULAR recommendations for conducting clinical studies and/or clinical trials in systemic vasculitis: focus on anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 66:605-617.
- 131 Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, Janssen BA, Pall A, Emery P, Savage C, Adu D (1994) Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM* 87:671-678.
-

- 132 Reinhold-Keller E, Kekow J, Schnabel A, Schmitt WH, Heller M, Beigel A, Duncker G, Gross WL (1994) Influence of disease manifestation and antineutrophil cytoplasmic antibody titer on the response to pulse cyclophosphamide therapy in patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 37:919-924.
- 133 Luqmani RA (2002) Assessing disease activity in the systemic vasculitides. *Curr Opin Rheumatol* 14:23-28.
- 134 DeRemee RA, McDonald TJ, Harrison EG, Jr., Coles DT (1976) Wegener's granulomatosis. Anatomic correlates, a proposed classification. *Mayo Clin Proc* 51: 777-781.
- 135 Benninger MS, Ferguson BJ, Hadley JA, Hamilos DL, Jacobs M, Kennedy DW, Lanza DC, Marple BF, Osguthorpe JD, Stankiewicz JA, Anon J, Denny J, Emanuel I, Levine H (2003) Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology. *Otolaryngol Head Neck Surg* 129:1-32.
- 136 Holtfreter S, Grumann D, Schmudde M, Nguyen HT, Eichler P, Strommenger B, Kopron K, Kolata J, Giedrys-Kalemba S, Steinmetz I, Witte W, Bröker BM (2007) Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 45:2669-2680.
- 137 Vaudaux P, Waldvogel FA (1979) Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 16:743-749.
- 138 Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352.
- 139 Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, Suri P, Wicha MS (2006) Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 66:6063-6071.
- 140 Song LB, Zeng MS, Liao WT, Zhang L, Mo HY, Liu WL, Shao JY, Wu QL, Li MZ, Xia YF, Fu LW, Huang WL, Dimri GP, Band V, Zeng YX (2006) Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer Res* 66:6225-6232.
- 141 Fulcher ML, Gabriel SE, Olsen JC, Tatreau JR, Gentzsch M, Livanos E, Saavedra MT, Salmon P, Randell SH (2009) Novel human bronchial epithelial cell lines for cystic fibrosis research. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296:82-91.
- 142 Haga K, Ohno S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Fujita M, Sakamoto M, Galloway DA, Kiyono T (2007) Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci* 98:147-154.
- 143 Okamoto T, Aoyama T, Nakayama T, Nakamata T, Hosaka T, Nishijo K, Nakamura T, Kiyono T, Toguchida J (2002) Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 295:354-361.
- 144 Takeda Y, Mori T, Imabayashi H, Kiyono T, Gojo S, Miyoshi S, Hida N, Ita M, Segawa K, Ogawa S, Sakamoto M, Nakamura S, Umezawa A (2004) Can the life span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J Gene Med* 6:833-845.
- 145 Yamashita S (2007) Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 41:141-200.
- 146 Ball SL, Siou GP, Wilson JA, Howard A, Hirst BH, Hall J (2007) Expression and immunolocalisation of antimicrobial peptides within human palatine tonsils. *J Laryngol Otol* 121:973-978.
- 147 Bryborn M, Mansson A, Cardell LO, Adner M (2008) Differentiated S100A7 expression in infected tonsils and tonsils from allergic individuals. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53:413-420.
- 148 Claeys S, de Belder T, Holtappels G, Gevaert P, Verhasselt B, van Cauwenberge P, Bachert C (2003) Human beta-defensins and toll-like receptors in the upper airway. *Allergy* 58:748-753.

- 
- 149 Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (2001) Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276:5707-5713.
- 150 Harder J, Schröder JM (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 277:46779-46784.
- 151 Josephy PD, Eling T, Mason RP (1982) The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *J Biol Chem* 257:3669-3675.
- 152 Köten B, Simanski M, Gläser R, Podschun R, Schröder JM, Harder J (2009) RNase 7 contributes to the cutaneous defense against *Enterococcus faecium*. *PLoS One* 4:e6424 doi: 10.1371/journal.pone.0006424.
- 153 Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87:206-210.
- 154 Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- 155 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- 156 Sanes JR, Rubenstein JL, Nicolas JF (1986) Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J* 5:3133-3142.
- 157 Horwitz J, Chua J, Curby R, Tomsom A, Darooge M, Fisher B, Maurico J, Klundt I (1964) Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl-beta-D-glycopyranosides. *J Med Chem* 7:574-575.
- 158 Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- 159 Kim RH, Kang MK, Shin KH, Oo ZM, Han T, Baluda MA, Park NH (2007) Bmi-1 cooperates with human papillomavirus type 16 E6 to immortalize normal human oral keratinocytes. *Exp Cell Res* 313:462-472.
- 160 Oliveira K, Procop GW, Wilson D, Coull J, Stender H (2002) Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 40:247-251.
- 161 Laudien M, Häslér R, Wohlers J, Böck J, Lipinski S, Bremer L, Podschun R, Ambrosch P, Lamprecht P, Rosenstiel P, Till A (2011) Molecular signatures of a disturbed nasal barrier function in the primary tissue of Wegener's granulomatosis. *Mucosal Immunol* 4:564-573.
- 162 Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM (1998) The peptide antibiotic LL-37/ hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9541-9546.
- 163 Hui Y, Wohlers J, Podschun R, Hedderich J, Lamprecht P, Ambrosch P, Laudien M (2011) Antimicrobial peptides in nasal secretion and mucosa with respect to *S. aureus* colonization in Wegener's Granulomatosis. *Clin Exp Rheumatol* 29:49-56.
- 164 Holl-Ulrich K (2010) Histopathology of systemic vasculitis. *Pathologe* 31:67-76.
- 165 Müller A, Holl-Ulrich K, Lamprecht P, Gross WL (2008) Germinal centre-like structures in Wegener's granuloma: the morphological basis for autoimmunity? *Rheumatology (Oxford)* 47:1111-1113.
- 166 Noruddin NA, Saim AB, Chua KH, Idrus R (2007) Human nasal turbinates as a viable source of respiratory epithelial cells using co-culture system versus dispase-dissociation technique. *Laryngoscope* 117:2139-2145.
- 167 Sachse F, Becker K, Rudack C (2010) Incidence of staphylococcal colonization and of the 753Q Toll-like receptor 2 variant in nasal polyposis. *Am J Rhinol Allergy* 24:10-13.
-

- 
- 168 Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Okuda D, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H (2005) Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Dermatol Sci* 40:123-132.
- 169 Morrison G, Kilanowski F, Davidson D, Dorin J (2002) Characterization of the mouse beta defensin 1, Defb1, mutant mouse model. *Infect Immun* 70:3053-3060.
- 170 Silverstein RL, Febbraio M (2009) CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* 2:re3 doi: 10.1126/scisignal.272re3.
- 171 Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zähringer U, Beutler B (2005) CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433:523-527.
- 172 Baranova IN, Kurlander R, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Chen Z, Remaley AT, Csako G, Patterson AP, Eggerman TL (2008) Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling. *J Immunol* 181:7147-7156.
- 173 Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP (1997) CD36 mediates the *In vitro* inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 138:707-717.
- 174 Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA (2006) Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203:2271-2279.
- 175 Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P (1999) Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42:963-970.
- 176 Dong G, Ye R, Shi W, Liu S, Wang T, Yang X, Yang N, Yu X (2003) IL-17 induces autoantibody overproduction and peripheral blood mononuclear cell overexpression of IL-6 in lupus nephritis patients. *Chin Med J (Engl)* 116:543-548.
- 177 Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52:65-70.
- 178 Abdulhad WH, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CG (2008) Skewed distribution of Th17 lymphocytes in patients with Wegener's granulomatosis in remission. *Arthritis Rheum* 58:2196-2205.
- 179 Csernok E, Szymkowiak CH, Mistry N, Daha MR, Gross WL, Kekow J (1996) Transforming growth factor-beta (TGF-beta) expression and interaction with proteinase 3 (PR3) in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Clin Exp Immunol* 105:104-111.
- 180 Aoki CA, Borchers AT, Li M, Flavell RA, Bowls CL, Ansari AA, Gershwin ME (2005) Transforming growth factor beta (TGF-beta) and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 4:450-459.
- 181 Mantel PY, Schmidt-Weber CB (2011) Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance. *Methods Mol Biol* 677:303-338.
- 182 Kozak M (2007) Some thoughts about translational regulation: forward and backward glances. *J Cell Biochem* 102:280-290.
- 183 Kenney JS, Baker C, Welch MR, Altman LC (1994) Synthesis of interleukin-1 alpha, interleukin-6, and interleukin-8 by cultured human nasal epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 93:1060-1067.
- 184 Damm M, Quante G, Rosenbohm J, Rieckmann R (2006) Proinflammatory effects of *Staphylococcus aureus* exotoxin B on nasal epithelial cells. *Otolaryngol Head Neck Surg* 134:245-249.
- 185 Becker S, Koren HS, Henke DC (1993) Interleukin-8 expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokines tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8:20-27.
- 186 Fan GK, Wang H, Takenaka H (2007) Eosinophil infiltration and activation in nasal polyposis. *Acta Otolaryngol* 127:521-526.
-

- 
- 187 Pawankar RU, Okuda M, Hasegawa S, Suzuki K, Yssel H, Okubo K, Okumura K, Ra C (1995) Interleukin-13 expression in the nasal mucosa of perennial allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 152:2059-2067.
- 188 Salvi S, Semper A, Blomberg A, Holloway J, Jaffar Z, Papi A, Teran L, Polosa R, Kelly F, Sandstrom T, Holgate S, Frew A (1999) Interleukin-5 production by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:984-991.
- 189 Xu R, Li Y, Xie M, Xu G, Zhang G, Wang S (2002) Concentration, distribution and expression of interleukin-5 in human nasal polyp tissues. *Chin Med J (Engl)* 115:1386-1389.
- 190 Muller B, de Groot EJ, Kortekaas IJ, Fokkens WJ, van Drunen CM (2007) Nasal epithelial cells express IL-10 at levels that negatively correlate with clinical symptoms in patients with house dust mite allergy. *Allergy* 62:1014-1022.
- 191 Coulomb-L'hermine A, Capron F, Zou W, Piard F, Galateau F, Laurent P, Crevon MC, Galanaud P, Emilie D (2001) Expression of the chemokine RANTES in pulmonary Wegener's granulomatosis. *Hum Pathol* 32:320-326.
- 192 Zhou Y, Huang D, Farver C, Hoffman GS (2003) Relative importance of CCR5 and antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol* 30:1541-1547.
- 193 Wikman A, Fagergren A, Gunnar OJ, Lundahl J, Jacobson SH (2003) Monocyte activation and relationship to anti-proteinase 3 in acute vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 18:1792-1799.
- 194 Tesar V, Jelinkova E, Masek Z, Jirsa M, Jr., Zabka J, Bartunkova J, Stejskalova A, Janatkova I (1997) The effect of plasmapheresis on cytokine serum levels and adhesion molecules in ANCA-positive renal vasculitis. *Cas Lek Cesk* 136: 627-632.
- 195 Kekow J, Szymkowiak CH, Sticherling M, Schröder JM, Christophers E, Gross WL (1993) Pro- and anti-inflammatory cytokines in primary systemic vasculitis. *Adv Exp Med Biol* 336:341-344.
- 196 Borish LC, Steinke JW (2003) 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111:460-475.
- 197 Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA (2009) Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 84:353-360.
- 198 Lamprecht P, Kumanovics G, Müller A, Csernok E, Komocsi A, Trabandt A, Gross WL, Schnabel A (2002) Elevated monocytic IL-12 and TNF-alpha production in Wegener's granulomatosis is normalized by cyclophosphamide and corticosteroid therapy. *Clin Exp Immunol* 128:181-186.
- 199 Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M (2002) Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 72:847-855.
- 200 Rudack C, Sachse F, Albert N, Becker K, von Eiff C (2009) Immunomodulation of nasal epithelial cells by *Staphylococcus aureus*-derived serine proteases. *J Immunol* 183:7592-7601.
- 201 Ohkuni T, Kojima T, Ogasawara N, Masaki T, Fuchimoto J, Kamekura R, Koizumi J, Ichimiya S, Murata M, Tanaka S, Himi T, Sawada N (2011) Poly(I:C) reduces expression of JAM-A and induces secretion of IL-8 and TNF-alpha via distinct NF-kappaB pathways in human nasal epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 250:29-38.
- 202 Yang JH, Li Y, Zhang GH, Yang QT (2010) Regulation of NF-kappaB signal transduction pathway on cytokines in cultured nasal epithelium. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 45:592-596.
- 203 Eyles JL, Roberts AW, Metcalf D, Wicks IP (2006) Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils - forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2:500-510.
- 204 Roberts AW (2005) G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors* 23:33-41.
- 205 Saba S, Soong G, Greenberg S, Prince A (2002) Bacterial stimulation of epithelial G-CSF and GM-CSF expression promotes PMN survival in CF airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:561-567.
-



- 
- 206 Huvenne W, Callebaut I, Reekmans K, Hens G, Bobic S, Jorissen M, Bullens DM, Ceuppens JL, Bachert C, Hellings PW (2010) Staphylococcus aureus enterotoxin B augments granulocyte migration and survival via airway epithelial cell activation. *Allergy* 65:1013-1020.
- 207 Hekiart AM, Kofonow JM, Doghramji L, Kennedy DW, Chiu AG, Palmer JN, Leid JG, Cohen NA (2009) Biofilms correlate with TH1 inflammation in the sinonasal tissue of patients with chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 141: 448-453.
- 208 Ina K, Kusugami K, Hosokawa T, Imada A, Shimizu T, Yamaguchi T, Ohsuga M, Kyokane K, Sakai T, Nishio Y, Yokoyama Y, Ando T (1999) Increased mucosal production of granulocyte colony-stimulating factor is related to a delay in neutrophil apoptosis in Inflammatory Bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 14:46-53.
- 209 Maianski NA, Mul FP, van Buul JD, Roos D, Kuijpers TW (2002) Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils. *Blood* 99:672-679.
- 210 Schneider EM, Lorenz I, Ma X, Weiss M (2003) G-CSF modulates LPS-induced apoptosis and IL-8 in human microvascular endothelial cells: involvement of calcium signaling. *Ann NY Acad Sci* 1010:78-85.
- 211 Leavey PJ, Sellins KS, Thurman G, Elzi D, Hiester A, Silliman CC, Zerbe G, Cohen JJ, Ambroso DR (1998) In vivo treatment with granulocyte colony-stimulating factor results in divergent effects on neutrophil functions measured in vitro. *Blood* 92:4366-4374.
- 212 Sachse F, von Eiff C, Stoll W, Becker K, Rudack C (2006) Induction of CXC chemokines in A549 airway epithelial cells by trypsin and staphylococcal proteases - a possible route for neutrophilic inflammation in chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Immunol* 144:534-542.
- 213 Sachse F, von Eiff C, Becker K, Rudack C (2008) Anti-inflammatory effects of ciprofloxacin in *S. aureus* Newman induced nasal inflammation in vitro. *J Inflamm (Lond)* 5:11 doi: 10.1186/1476-9255-5-11.
- 214 Becker MN, Sauer MS, Muhlebach MS, Hirsh AJ, Wu Q, Verghese MW, Randell SH (2004) Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 169:645-653.
- 215 Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710-720.
- 216 De Smet K, Contreras R (2005) Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 27:1337-1347.
- 217 Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodriguez-Jimenez J, Forssmann U, Adermann K, Kluver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann WG, Bals R (2001) Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* 306:257-264.
- 218 Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy A (2006) The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta* 1758:1499-1512.
- 219 Bucki R, Leszczynska K, Namiot A, Sokolowski W (2010) Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58:15-25.
- 220 Hiemstra PS (2007) The role of epithelial beta-defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Exp Lung Res* 33:537-542.
- 221 Nijnik A, Hancock RE (2009) The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr Opin Hematol* 16:41-47.
- 222 Hata TR, Gallo RL (2008) Antimicrobial peptides, skin infections, and atopic dermatitis. *Semin Cutan Med Surg* 27:144-150.
-

- 
- 223 Pacova H, Kucera T, Astl J, Martinek J (2004) Detection of beta-defensins and NOS in healthy and pathological nasal mucosa. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 148:239-240.
- 224 Chen PH, Fang SY (2004) The expression of human antimicrobial peptide LL-37 in the human nasal mucosa. *Am J Rhinol* 18:381-385.
- 225 Kim ST, Cha HE, Kim DY, Han GC, Chung YS, Lee YJ, Hwang YJ, Lee HM (2003) Antimicrobial peptide LL-37 is upregulated in chronic nasal inflammatory disease. *Acta Otolaryngol* 123:81-85.
- 226 Quinn GA, Cole AM (2007) Suppression of innate immunity by a nasal carriage strain of *Staphylococcus aureus* increases its colonization on nasal epithelium. *Immunology* 122:80-89.
- 227 Nell MJ, Tjabringa GS, Vonk MJ, Hiemstra PS, Grote JJ (2004) Bacterial products increase expression of the human cathelicidin hCAP-18/LL-37 in cultured human sinus epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42:225-231.
- 228 Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schröder JM, Stange EF (2003) Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 9:215-223.
- 229 Zanger P, Nurjadi D, Vath B, Kremsner PG (2011) Persistent nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is associated with deficient induction of human beta-defensin 3 after sterile wounding of healthy skin in vivo. *Infect Immun* 79:2658-2662.
- 230 Laube DM, Yim S, Ryan LK, Kisich KO, Diamond G (2006) Antimicrobial peptides in the airway. *Curr Top Microbiol Immunol* 306:153-182.
- 231 Harder J, Gläser R, Schröder JM (2007) The role and potential therapeutical applications of antimicrobial proteins in infectious and inflammatory diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 7:75-82.
- 232 Zwierzina H, Holzinger I, Gaggl S, Wolf H, Schollenberger S, Lam C, Bammer T, Geissler D, Lindley I (1993) Recombinant human interleukin-8 restores function in neutrophils from patients with myelodysplastic syndromes without stimulating myeloid progenitor cells. *Scand J Immunol* 37:322-328.
- 233 Gluck U, Gebbers JO (2003) Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and beta-hemolytic streptococci). *Am J Clin Nutr* 77:517-520.
- 234 Eberhard J, Pietschmann R, Falk W, Jepsen S, Dommisch H (2009) The immune response of oral epithelial cells induced by single-species and complex naturally formed biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 24:325-330.
- 235 Harder J, Dressel S, Wittersheim M, Cordes J, Meyer-Hoffert U, Mrowietz U, Fölster-Holst R, Proksch E, Schröder JM, Schwarz T, Gläser R (2010) Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury. *J Invest Dermatol* 130:1355-1364.
- 236 Tjabringa GS, Vos JB, Olthuis D, Ninaber DK, Rabe KF, Schalkwijk J, Hiemstra PS, Zeeuwen PL (2005) Host defense effector molecules in mucosal secretions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 45:151-158.
- 237 Lysenko ES, Gould J, Bals R, Wilson JM, Weiser JN (2000) Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun* 68:1664-1671.
- 238 Laudien M, Dressel S, Harder J, Gläser R (2011) Differential expression pattern of antimicrobial peptides in nasal mucosa and secretion. *Rhinology* 49:107-11.
- 239 Ooi EH, Wormald PJ, Carney AS, James CL, Tan LW (2007) Human cathelicidin antimicrobial peptide is up-regulated in the eosinophilic mucus subgroup of chronic rhinosinusitis patients. *Am J Rhinol* 21:395-401.
-

- 
- 240 Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM (2004) Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 123:522-529.
- 241 Burian M, Wolz C, Goerke C (2010) Regulatory adaptation of *Staphylococcus aureus* during nasal colonization of humans. *PLoS One* 5:e10040 doi: 10.1371/journal.pone.0010040.
- 242 Otri AM, Mohammed I, Abedin A, Cao Z, Hopkinson A, Panjwani N, Dua HS (2010) Antimicrobial peptides expression by ocular surface cells in response to *Acanthamoeba castellanii*: an in vitro study. *Br J Ophthalmol* 94:1523-1527.
- 243 Sahly H, Schubert S, Harder J, Rautenberg P, Ullmann U, Schröder JM, Podschun R (2003) *Burkholderia* is highly resistant to human beta-defensin 3. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1739-1741.
- 244 Gläser R, Meyer-Hoffert U, Harder J, Cordes J, Wittersheim M, Kobliakova J, Fölster-Holst R, Proksch E, Schröder JM, Schwarz T (2009) The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. *J Invest Dermatol* 129:641-649.
- 245 Sachse F, Becker K, von Eiff C, Metze D, Rudack C (2010) *Staphylococcus aureus* invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells in vitro. *Allergy* 65:1430-1437.
- 246 Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G (2006) Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 4:295-305.
- 247 Zautner AE, Krause M, Stropahl G, Holtfreter S, Frickmann H, Maletzki C, Kreikemeyer B, Pau HW, Podbielski A (2010) Intracellular persisting *Staphylococcus aureus* is the major pathogen in recurrent tonsillitis. *PLoS One* 5:e9452 doi: 10.1371/journal.pone.0009452.
- 248 Clement S, Vaudaux P, Francois P, Schrenzel J, Huggler E, Kampf S, Chaponnier C, Lew D, Lacroix JS (2005) Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J Infect Dis* 192:1023-1028.
- 249 Plouin-Gaudon I, Clement S, Huggler E, Chaponnier C, Francois P, Lew D, Schrenzel J, Vaudaux P, Lacroix JS (2006) Intracellular residency is frequently associated with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *Rhinology* 44:249-254.
- 250 Corriveau MN, Zhang N, Holtappels G, van Roy N, Bachert C (2009) Detection of *Staphylococcus aureus* in nasal tissue with peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization. *Am J Rhinol Allergy* 23:461-465.
- 251 Krut O, Sommer H, Krönke M (2004) Antibiotic-induced persistence of cytotoxic *Staphylococcus aureus* in non-phagocytic cells. *J Antimicrob Chemother* 53:167-173.
- 252 Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH (1999) Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . *Cell Microbiol* 1:101-117.
- 253 Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ, Keblusek P, Itahana K, van Lohuizen M, Campisi J, Wazer DE, Band V (2002) The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 62:4736-4745.
- 254 Kurose M, Kojima T, Koizumi J, Kamekura R, Ninomiya T, Murata M, Ichimiya S, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N (2007) Induction of claudins in passaged hTERT-transfected human nasal epithelial cells with an extended life span. *Cell Tissue Res* 330:63-74.
- 255 Yip YL, Tsang CM, Deng W, Cheung PY, Jin Y, Cheung AL, Lung ML, Tsao SW (2010) Expression of Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and hTERT extends the life span and immortalizes primary cultures of nasopharyngeal epithelial cells. *J Med Virol* 82:1711-1723.
- 256 Gruenert DC, Willems M, Cassiman JJ, Frizzell RA (2004) Established cell lines used in cystic fibrosis research. *J Cyst Fibros* 3 Suppl 2:191-196.
-

## VIII Danksagung

Zu dieser Doktorarbeit haben viele Personen ihren Beitrag geleistet, sei es durch ihre Hilfsbereitschaft, aufmunternden Worte, hitzigen Diskussionen oder ein warmes Lächeln. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

An erster Stelle gilt der Direktorin der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie Frau Prof. Dr. Petra Ambrosch mein Dank für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrem Hause durchführen zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. Helmut Fickenscher möchte ich mich herzlich für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung und das Interesse an dieser Arbeit bedanken. Des Weiteren danke ich Frau Prof. Dr. Manuela Dittmar für die freundliche Übernahme des Korreferats. Herrn Dr. Martin Laudien danke ich besonders für die ständige Diskussionsbereitschaft und sein großes Engagement. Ein großer Dank geht an Herrn PD Dr. Tibor Görögh für seine permanente Hilfsbereitschaft und Unterstützung, seine Ermutigungen, die immer offene Tür und die inspirierenden Diskussionen und noch so vieles mehr. Bei allen Rückschlägen hat mich Deine Motivation nie das Ziel aus den Augen verlieren lassen!

Diese Doktorarbeit wäre ohne die großartigen Kooperationen mit den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Rainer Podschun und Herrn Prof. Dr. Jürgen Harder in dem vorliegenden Umfang nicht realisierbar gewesen. Herzlich bedanken möchte ich mich für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die fachliche Unterstützung und die sehr angenehme Zusammenarbeit. Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter/innen dieser beiden Arbeitsgruppen für die freundliche Arbeitsatmosphäre sowie für die mir jederzeit entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Konstanze Holl-Ulrich (Institut für Pathologie der Universität Lübeck) für die Zusammenarbeit bei den Cytokeratin-Färbungen und Frau Dr. Marie-Luise Kruse (Labor für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie der Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Christian-Albrecht-Universität zu Kiel) für die Hilfe am konfokalen Mikroskop. Herrn Dr. Tohru Kiyono (National Cancer Center

Research Institute, Tokio, Japan) danke ich für die großzügige Bereitstellung der retroviralen Vektoren.

Nicht nur für die exzellente technische Unterstützung, sondern auch für viele schöne Stunden im Labor möchte ich mich bei Frau Annemarie Röen, Frau Gudrun Scherer und ganz besonders bei Frau Ute Kreutz herzlich bedanken. Herrn Hui Yuan und Frau Wenya Li danke ich für die vielen lustigen Momente im Büro. Norbert, Heidi, Thomas und allen anderen „Kellerkindern“ sei für die Aufhellung meiner Tage durch nette Gespräche oder manchen Spaß am Rande gedankt. Ein besonderer Dank geht an alle, die diese Arbeit aufmerksam gelesen und durch ihre konstruktive Kritik und hilfreichen Vorschläge einen wesentlichen Beitrag zur Verbesserung geleistet haben!

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen. Auf Euren Rückhalt konnte ich mich immer verlassen und Ihr wart immer da, wenn ich Euch brauchte.

Mein größter Dank gilt jedoch Jan, der mich immer wieder ermutigt und mich gerade in den letzten Monaten in jeder Hinsicht unterstützt hat. Es ist schön, Dich an meiner Seite zu wissen!

## IX Lebenslauf und Veröffentlichungen

### Persönliche Daten

Name: Janet Wohlers  
Geburtsdatum/-ort: 30. Mai 1979 in Niebüll  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
derzeitige Anschrift: Kapellenweg 22, 79415 Bad Bellingen OT Bamlach

### Schulbildung

1986 - 1990 Grundschole in Breklum  
1990 - 1999 Theodor-Storm-Schule (Gymnasium) in Husum

### Beruflicher Werdegang

1999 - 2002 Ausbildung zur Milchwirtschaftlichen Laborantin in der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel  
2002 - 2007 Studium der molekularen Biotechnologie an der Universität Bielefeld  
Sept. 2006 - Aug. 2007 Diplomarbeit am Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster (PD Dr. T. Kuczius) sowie an der Universität Bielefeld mit dem Thema „Charakterisierung verschiedener Glykosylierungsmuster und Proteinfragmente bei Prionproteinen“  
14. August 2007 Abschluss Diplom-Biotechnologin  
seit Jan. 2008 Doktorarbeit an der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Laudien unter Betreuung von Prof. Dr. H. Fickenscher (Institut für Infektionsmedizin der Universität zu Kiel) mit dem Thema „Barrierestörung der nasalen Mukosa bei Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener)“

### **Veröffentlichungen aus diesem Promotionsprojekt**

Laudien M, Häsler R, **Wohlers J**, Böck J, Lipinski S, Bremer L, Podschun R, Ambrosch P, Lamprecht P, Rosenstiel P, Till A (2011) Molecular signatures of a disturbed nasal barrier function in the primary tissue of Wegener's granulomatosis. *Mucosal Immunol* 4:564-573.

Hui Y, **Wohlers J**, Podschun R, Hedderich J, Lamprecht P, Ambrosch P, Laudien M (2011) Antimicrobial peptides in nasal secretion and mucosa with respect to *S. aureus* colonization in Wegener's Granulomatosis. *Clin Exp Rheumatol* 29 (1 Suppl 64):49-56.

Thienhaus ML, **Wohlers J**, Podschun R, Hedderich J, Ambrosch P, Laudien M (2011) Antimicrobial peptides in nasal secretion and mucosa with respect to *Staphylococcus aureus* colonization in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rhinology* 49:554-561.

**Wohlers J**, Breucker K, Podschun R, Hedderich J, Lamprecht P, Ambrosch P, Laudien M (2011) Aberrant cytokine pattern of the nasal mucosa in Granulomatosis with Polyangiitis. *Arthritis Res Ther*, zur Veröffentlichung eingereicht.

## X Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer, selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken und Grafiken sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden und hat weder ganz noch teilweise an anderer Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegen. Des Weiteren bestätige ich, dass ich zuvor noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Publikation eingereicht (siehe oben).

Bad Bellingen, den .....

.....

(Janet Wohlers)



## XI Anhang

### 1 Details zu den in diese Studie eingeschlossenen Patienten

Tab. 12: Allgemeine und serologische Parameter der drei Gruppen\*

	NK	GPA	CRS
Anzahl	81	138	63
Alter (Jahre)	43 ± 17 (18 - 76)	56 ± 15 (21 - 79)	46 ± 15 (18 - 76)
Geschlecht (w/m)	28 / 53	70 / 68	26 / 37
C-reaktives Protein (mg/dl) #	1,25; IQA: 2,20 (0,9 - 8,8)	0,5; IQA: 1,2 (0 - 21,6)	1,2; IQA: 2,05 (0,9 - 51,7)
Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit nach der 1. Stunde (mm)	8,5 ± 6,5 (1 - 36)	32,4 ± 26,7 (2 - 110)	8,7 ± 8,4 (1 - 40)
Leukozytenanzahl (Zellen/nl)	6,95 ± 1,75 (4,22 - 12,54)	8,06 ± 3,02 (0,7 - 18,60)	7,28 ± 2,77 (2,71 - 19,47)

\*Die Daten sind, soweit angebracht, als Mittelwerte mit Standardabweichung und Wertebereich dargestellt. # Darstellung als Median mit Interquartilsabstand (IQA) und Wertebereich. NK: Normalkontrollen, GPA: Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis, CRS: Patienten mit chronischer Rhinosinuitis mit Polyposis nasi et sinuum.

Tab. 13: GPA-spezifische Parameter\*

Parameter	Wert
Anzahl Patienten mit histologisch gesicherter Diagnose	82
Zeitdauer Erstmanifestation bis Studieneintritt (Jahre)	3,7; IQA: 6,1 (51 – 0)
Zeitdauer Erstdiagnose bis Studieneintritt (Jahre)	1,7; IQA: 5,1 (19 – 0)
C-ANCA-Titer (1:x)	80; IQA: 320 (0 – 5120)
BVAS-1	0; IQA: 6 (0 – 31)
BVAS-2	0; IQA: 1 (0 – 10)
VDI	1; IQA: 2 (0 – 7)
DEI	2; IQA: 4 (0 – 11)
Einteilung in Untergruppen nach EULAR	
lokalisiert	10
früh systemisch	28
generalisiert	94
schwer	2
refraktär	4
Aktivität nach EULAR	
Remission	43
Minorrezidiv	33
Majorrezidiv	22
refraktär	6
“grumbling disease”	25
Therapieansprechen	9
Endonasale Aktivität	
ohne	32
mild	26
moderat	6

\*Angabe der Daten als Anzahl Patienten bzw. als Median mit Interquartilsabstand (IQA) und Wertebereich.

Tab. 14: Einzelkohorten der Studien\*

Parameter	Genexpression		Basale Cytokin-expression		IL-8, Stimulationen		AMP in Nasensekreten		AMP, Stimulationen		Intrazellulärer <i>S. aureus</i>	
	GPA	NK CRS	GPA	NK	GPA	NK CRS	GPA	NK CRS	GPA	NK CRS	GPA	NK CRS
n	29	31 27	20	19	10	10 10	14	13 12	5	5 5	9	10 10
Alter (Jahre)	59 (26-79)	38 43 (19-66) (18-76)	52 (24-71)	40 (18-76)	51 (24-71)	43 46 (23-56) (18-76)	56 (26-77)	41 42 (19-68) (18-58)	45 (26-60)	42 45 (20-66) (18-58)	56 (39-77)	41 49 (18-68) (18-76)
Geschlecht (m/w)	15/14	21/10 18/8	12/8	11/8	7/3	7/3 6/4	8/6	9/4 8/4	4/1	2/3 2/3	4/5	6/4 6/4
C-reaktives Protein (mg/dl) <sup>#</sup>	0,3;0,6 (0-21,6)	0,7;1,0 (0-4,1) (0-12,5)	0,7;2,7 (0-8,6)	1,0;1,3 (0,9-5,8)	0,9;2,7 (0,1-8,6)	1,5;0,8 (1,3-3,4) (0,9-6,0)	0,2;0,8 (0,1-8,6)	0,9;0,9 (0,9-3,4) (0,9-12,5)	0,8;4,6 (0,1-8,6)	1,4;- (0,9-3,4) (6,0-12,5)	0,4;0,9 (0,1-3,7)	0,9;1,1 (0,9-3,5) (0,9-7,2)
Blutkörperchen- senkungs- geschwindigkeit (mm/1 h)	36,2 ±28,5	7,1 ±4 7,7 ±8,2	33,0 ±27,6	8,1 ±3,9	52,4 ±35,6	8,0 ±2,9 ±13,4	39,1 ±25,4	7,3 ±4,4 ±3,8	48,0 ±22,4	6,0 ±3,4 ±3,7	33,6 ±30,4	8,0 ±4,7 ±13,1
Leukozyten/nl	8,1 ±2,9	6,8 ±1,5 6,5 ±1,4	8,2 ±2,8	6,7 ±1,6	7,8 ±2,3	7,9 ±2,0 ±2,4	7,7 ±2,6	6,9 ±1,7 ±1,8	6,8 ±2,0	6,9 ±2,5 ±2,7	8,8 ±2,3	6,0 ±1,2 ±1,9

\* Angabe der Daten als Mittelwerte mit Wertebereich bzw. Standardabweichung. # Angabe als Median mit Interquartilsabstand und Wertebereich.

Tab. 15: GPA-Parameter aller Einzelkohorten \*

Parameter	Gen- expression	Basale Cytokin- expression	IL-8, Stimulationen	AMP in Nasensekreten	AMP, Stimulationen	Intrazellulärer <i>S. aureus</i>
n	29	20	10	14	5	9
Anzahl Patienten mit histolog. gesicherter Diagnose	17	12	7	12	5	6
Zeitdauer Erstmanifestation bis Studieneintritt (Jahre)	4,8; 7,5 (51-0)	3,8; 5,4 (19-0)	3,3; 5,0 (9-0)	2,8; 6,9 (26-0)	3,0; 4,8 (8-0)	4,8; 11,0 (18-0)
Zeitdauer Erstdiagnose bis Studien-eintritt (Jahre)	2,7; 6,0 (18-0)	1,6; 4,9 (19-0)	3,1; 5,0 (9-0)	2,5; 3,3 (18-0)	2,6; 3,9 (6-0)	2,1; 9,9 (15-0)
C-ANCA-Titer (1:x)	80;640(0-2560)	80;640(0-2560)	640;1260(0-2560)	120 310(0-2560)	160;1440(0-2560)	40;80(0-640)
BVAS-1	4; 6 (0-31)	3; 10 (0-13)	1,5; 7 (0-12)	1,5; 6 (0-13)	2; 9 (0-12)	4; 6 (0-6)
BVAS-2	0; 2 (0-5)	0; 0 (0-4)	0; 0 (0-4)	0; 0 (0-4)	0; 2 (0-4)	0; 2 (0-5)
VDI	1; 2 (0-4)	0,5; 2 (0-3)	2; 3 (0-4)	1,5; 2 (0-4)	2; 2 (1-3)	2; 3 (0-4)
DEI	2; 4 (0-9)	2; 4 (0-5)	2; 3 (0-5)	2; 2 (0-4)	2; 2 (0-4)	2; 3 (0-9)
Einteilung in Untergruppen nach EULAR	3 2 22 - 2	1 5 14 - -	- 1 8 1 -	- 1 11 - 2	- - 4 - 1	1 1 6 - 1
Aktivität nach EULAR	8 7 4 - 5 3	6 8 4 1 1 -	2 2 3 - 2 1	4 2 1 2 3 2	1 1 1 1 1 -	2 1 2 1 1 2
Endonasale Aktivität	16 10 2 -	12 7 0 1	4 4 2 -	7 6 1 -	2 3 - -	7 2 1 -
	ohne mild moderat nicht ermittelt					

\* Angabe der Daten als Anzahl Patienten bzw. als Median mit Interquartilsabstand (IQA) und Wertebereich.

## 2 Statistik-Überblick

### Analyse des Stimulationseffektes gemessen anhand der IL-8-Konzentration nasaler Epithelzellen der verschiedenen Patientengruppen (III 2.2)

		unstim. vs. TSB	unstim. vs. 1:500 Ü	unstim. vs. 1:50 Ü	unstim. vs. 1:5 Ü	unstim. vs. 3B	unstim. vs. 5B	unstim. vs. 7B	stat. Test
NK	16 h	0,536	0,093	0,171	0,065	0,943	0,121	0,083	Mann-Whitney-U-Test
	24 h	0,400	0,364	0,070	<b>0,011</b>	0,962	0,633	<b>0,031</b>	
GPA	16 h	nB	nB	nB	0,052	nB	0,247	nB	
	24 h	0,364	0,562	0,118	<b>0,035</b>	1,000	0,573	<b>0,031</b>	
CRS	16 h	0,315	0,447	0,143	<b>0,015</b>	0,549	0,720	<b>0,012</b>	
	24 h	0,579	0,436	0,089	<b>0,023</b>	0,968	0,897	<b>0,016</b>	

Dargestellt sind die p-Werte. nB: nicht zu berechnen, da zu kleine Stichprobengröße.

### Analyse gruppenspezifischer Unterschiede der IL-8-Konzentration nasaler Epithelzellen bei verschiedenen Stimuli (III 2.2)

	16 h			24 h			stat. Test
	NK vs. GPA	NK vs. CRS	GPA vs. CRS	NK vs. GPA	NK vs. CRS	GPA vs. CRS	
unstim.	<b>0,020</b>	0,315	<b>0,001</b>	<b>0,019</b>	0,089	<b>0,001</b>	Mann-Whitney-U-Test
1:5 Ü	0,065	0,055	<b>0,003</b>	<b>0,009</b>	0,052	<b>0,000</b>	
7B	nB	0,574	nB	<b>0,041</b>	0,345	<b>0,013</b>	
1:5 Ü - unstim.	0,171	<b>0,015</b>	<b>0,002</b>	<b>0,029</b>	0,529	<b>0,035</b>	
7B - unstim.	nB	0,195	nB	0,589	0,491	0,228	

Dargestellt sind die p-Werte. nB: nicht zu berechnen, da zu kleine Stichprobengröße.

### Analyse der Zeiteffekte gemessen anhand der IL-8-Konzentration nasaler Epithelzellen der verschiedenen Patientengruppen und verschiedener Stimuli (III 2.2)

	16 h vs. 24 h			stat. Test
	unstim.	1:5 Ü	7B	
<b>NK</b>	0,203	0,055	0,755	Mann-Whitney-U-Test
<b>GPA</b>	0,181	0,075	nB	
<b>CRS</b>	0,143	0,105	0,279	

Dargestellt sind die p-Werte. nB: nicht zu berechnen, da zu kleine Stichprobengröße.

### Analyse gruppenspezifischer Unterschiede der AMP-Konzentration in Nasensekret (III 3.1)

	NK vs. GPA	NK vs. CRS	GPA vs. CRS	stat. Test
LL-37 Nasensekret	0,650	0,810	0,297	Mann-Whitney-U-Test
hBD3 Nasensekret	0,550	0,361	0,120	
RNase 7 Nasensekret	0,377	0,375	0,170	

Dargestellt sind die p-Werte.

### Analyse des Einflusses nasaler *S. aureus*-Kolonisation auf die AMP-Konzentrationen in Nasensekreten (III 3.1.1)

	mit <i>S. aureus</i> besiedelt vs. unbesiedelt			stat. Test
	LL-37	hBD3	RNase 7	
NK	<b>0,014</b>	0,366	0,345	Mann-Whitney-U-Test
GPA	<b>0,001</b>	0,345	0,607	
CRS	0,240	0,429	0,628	

Dargestellt sind die p-Werte.

### Analyse des Stimulationseffektes gemessen anhand der AMP-Konzentration nasaler Epithelzellen bei den verschiedenen Patientengruppen (III 3.3)

	unstimuliert vs. 1:5 Ü		stat. Test
	LL-37	hBD3	
NK	0,017	< 0,001	t-Test
GPA	< 0,001	< 0,001	
CRS	0,018	0,014	

Dargestellt sind die p-Werte.

### Analyse gruppenspezifischer Unterschiede der AMP-Konzentration nach *S. aureus*-Stimulation nasaler Epithelzellen (III 3.3)

	NK vs. GPA	NK vs. CRS	GPA vs. CRS	stat. Test
LL-37, basal	0,374	0,374	identisch	t-Test
hBD3, basal	<b>0,023</b>	0,166	0,786	
LL-37, stimuliert	0,504	0,899	0,396	
hBD3, stimuliert	<b>0,013</b>	0,272	0,492	
$\Delta$ LL-37 (stim – unstim.)	0,479	0,920	0,396	
$\Delta$ hBD3 (stim – unstim.)	<b>0,007</b>	0,263	0,536	

Dargestellt sind die p-Werte.

### Analyse gruppenspezifischer Unterschiede der intrazellulären *S. aureus*-Lokalisation in Biopsien nasaler Mukosa (III 4)

	NK vs. GPA	NK vs. CRS	GPA vs. CRS	stat. Test
Intrazelluläre Lokalisation von <i>S. aureus</i>	0,211	<b>0,043</b>	0,370	Fisher's exakter Test

Dargestellt sind die p-Werte.

### 3 Gemessene IL-8-Konzentrationen nach Stimulation\*

		16 h					24 h				
		n	Range	MW	Median	SD (IQA)	n	Range	MW	Median	SD (IQA)
<b>NK</b>	<b>unstim.</b>	8	205 - 3604	1983	1859	1028	10	500 - 4935	2876	2805	1498
	<b>TSB</b>	7	440 - 4935	2404	2131	1386	9	489 - 6315	3491	2968	1729
	<b>1:500 Ü</b>	5	1733 - 4357	3242	3708	1241	7	2390 - 6790		3037	4270 <sup>#</sup>
	<b>1:50 Ü</b>	5	2043 - 4726	2944	2584	1044	7	2798 - 10387		4177	2020 <sup>#</sup>
	<b>1:5 Ü</b>	8	518 - 5774	3437	3878	1719	10	1522 - 9516	5647	6161	2408
	<b>3B</b>	5	1458 - 4016		1810	1465 <sup>#</sup>	7	1608 - 5039	2869	2558	1171
	<b>5B</b>	7	342 - 2316	1385	1355	577	8	1828 - 4935		2289	651 <sup>#</sup>
	<b>7B</b>	8	295 - 2043	1003	917	695	6	375 - 3130	1262	943	1052
<b>GPA</b>	<b>unstim.</b>	6	300 - 1380	653	532	407	10	379 - 2735	1248	1077	882
	<b>TSB</b>	3	544 - 1379	877	709	442	7	689 - 2875	1561	1268	906
	<b>1:500 Ü</b>	2	538 - 862	700	700	229	6	617 - 4325		1099	1644 <sup>#</sup>
	<b>1:50 Ü</b>	2	807 - 1484	1146	1145	479	6	900 - 4481	2108	1618	1388
	<b>1:5 Ü</b>	5	708 - 2193	1268	1040	589	10	776 - 6744	2753	2287	1938
	<b>3B</b>	2	454 - 968	711	711	363	6	388 - 4523		1021	1644 <sup>#</sup>
	<b>5B</b>	5	258 - 850		303	372 <sup>#</sup>	8	277 - 4042		700	1315 <sup>#</sup>
	<b>7B</b>	4	57 - 1150	407	210	508	6	128 - 530	338	323	181
<b>CRS</b>	<b>unstim.</b>	10	627 - 7709	3225	2283	2242	10	1092 - 11535	5120	4823	3264
	<b>TSB</b>	10	1459 - 7735	3934	3231	2146	10	2127 - 10380	5989	5767	2820
	<b>1:500 Ü</b>	9	1192 - 9290	3892	3260	2519	10	1779 - 10230	6035	6502	2613
	<b>1:50 Ü</b>	10	1273 - 8211	4990	5786	2480	10	2784 - 13290	7650	7862	3290
	<b>1:5 Ü</b>	10	1438 - 10927	6648	7418	3175	10	3681 - 14379	9352	10773	3956
	<b>3B</b>	9	734 - 4966	2608	2025	1426	9	1600 - 6692	4455	4923	1636
	<b>5B</b>	9	911 - 5904	2482	2310	1562	8	1283 - 8175	4449	4620	2095
	<b>7B</b>	8	241 - 2390	1204	1356	708	8	152 - 4010	2022	2349	1277

\*Alle Werte in pg/ml. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Range (= kleinster und größter gemessener Wert) <sup>#</sup>Darstellung aufgrund nicht gegebener Normalverteilung als Median und Interquartilsabstand (IQA).