

Aus der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Direktorin: Prof. Dr. med. Petra Ambrosch

**DIE ROLLE DER ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDE
HUMANES β -DEFENSIN 3 (hBD-3) UND LL-37 BEI
CHRONISCH POLYPÖSER RHINOSINUSITIS UND
NASALER BESIEDELUNG MIT *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS***

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

MAIKE LUISA THIENHAUS

aus Bremerhaven

Kiel 2012

Referent: Prof. Dr. med. P. Ambrosch

Korreferent: Prof. Dr. med. R. Gläser

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	2
2	Einleitung	3
2.1	Anatomie der Nase und Nasennebenhöhlen	3
2.2	Chronisch polypöse Rhinosinusitis	3
2.3	Nasale Besiedelung mit <i>Staphylococcus (S.) aureus</i>	4
2.4	Barrierefunktion der Mukosa	5
2.5	Antimikrobielle Peptide (AMP)	6
2.6	Fragestellung	7
3	Patienten, Material und Methoden.....	8
3.1	Patienten	8
3.2	Nasensekrete	9
3.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	10
3.4	Immunhistochemie	11
3.5	Kultivierung primärer nasaler Epithelzellen.....	12
3.6	Bakterielle Stimulation der nasalen Epithelzellen	12
3.7	Statistische Auswertung.....	13
4	Ergebnisse	14
4.1	hBD-3 und LL-37 in Nasensekreten.....	14
4.2	Immunhistochemie für hBD-3 und LL37	16
4.3	Stimulation nasaler Epithelzellen	19
4.4	Zusammenfassung.....	21
5	Diskussion	22
5.1	hBD-3 und LL-37 Konzentrationen in Nasensekreten	22
5.2	Immunhistochemische Lokalisierung antimikrobieller Peptide (AMP)	25
5.3	Induktion antimikrobieller Peptide (AMP) durch <i>Staphylococcus (S.) aureus</i>	25
5.4	Therapeutischer Ausblick.....	27
6	Zusammenfassung.....	29
7	Anhang	31
7.1	Literaturverzeichnis	31
7.2	Material- und Bezugsquellenverzeichnis	37
7.3	Veröffentlichung	40
7.4	Danksagung	41
7.5	Lebenslauf.....	42

1 Abkürzungsverzeichnis

AMP:	antimikrobielle Peptide
ASS:	Acetylsalicylsäure
BSA:	Rinderserumalbumin
BSG:	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CRP:	C-reaktives Protein
CRS:	chronisch polypöse Rhinosinusitis
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
hBD-1/-2/-3:	humanes β -Defensin 1/-2/-3
IFN- γ :	Interferon- γ
IgE:	Immunglobulin E
IL-1 β :	Interleukin-1 β
Leu:	Leukozytenanzahl
LL-37:	humanes Cathelicidin
Max:	Maximum
Min:	Minimum
MW:	arithmetischer Mittelwert
n:	Stichprobengröße
PBS:	phosphate buffered saline
RNase-7:	Ribonuklease 7
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD:	Standardabweichung
TBS:	Tris-buffered saline
TSB :	<i>Tryptic Soy Bouillon</i>
TMB:	Tetramethylbenzidinlösung
TNF- α :	Tumornekrosefaktor- α

2 Einleitung

2.1 Anatomie der Nase und Nasennebenhöhlen

Die beiden Nasenhaupthöhlen werden mittig durch das Nasenseptum getrennt. An der lateralen Wand befinden sich jeweils drei Nasenmuscheln, die die Oberfläche der Schleimhaut vergrößern. Die nasale Mukosa erwärmt, befeuchtet und filtert die eingeatmete Luft und stellt eine erste Barriere gegenüber eingeatmeten Partikeln dar. Sie schwillt durch die sehr gute Durchblutung in regelmäßigen Abständen jeweils seitenwechselnd an und wieder ab.

Die Nasennebenhöhlen werden unterteilt in die Stirnhöhle (Sinus frontalis), Siebbeinhöhle (Cellulae ethmoidales), Kieferhöhle (Sinus maxillaris) und die Keilbeinhöhle (Sinus sphenoidales), die jeweils eine kleine Öffnung (Ostium) besitzen und in die Nasenhaupthöhle drainieren.

Das Nasen- und Nasennebenhöhlensystem ist durch mehrreihiges respiratorisches Epithel ausgekleidet. Oberflächlich finden sich kinezilientragende Zellen und Becherzellen. Seröse und seromuköse Drüsen sind in dem darunter liegenden Bindegewebe lokalisiert. Der Zilienschlag erfolgt in den Nasennebenhöhlen immer in Richtung des jeweiligen Ostiums in die Nasenhaupthöhlen und anschließend in Richtung Rachen (1).

Nase und Nasennebenhöhlen sind als ein gemeinsames System zu verstehen. Entzündliche Erkrankungen beschränken sich kaum auf nur einen Bereich und werden deshalb als Rhinosinusitis bezeichnet.

2.2 Chronisch polypöse Rhinosinusitis

Die chronisch polypöse Rhinosinusitis (CRS) ist eine entzündliche Erkrankung der Schleimhäute der Nase und der Nasennebenhöhlen. Nasale Polypen weisen typischerweise eine lockere, traubenartige, ödematöse Morphologie auf und sind teilweise gestielt. Histologisch findet man in dem polypoiden Gewebe hyperämische Gefäße, lymphozytäres Infiltrat, teilweise in Form von Lymphfollikeln, und eine Hyperplasie der Schleimdrüsen und Becherzellen. Häufig ist auch eine reichliche Infiltration mit eosinophilen Granulozyten vorhanden. Die chronische Entzündung

führt zu einer Metaplasie des respiratorischen mehrreihigen Epithels in ein robusteres Plattenepithel (2-4).

Die pathophysiologischen Grundlagen sind komplex und größtenteils noch nicht verstanden. Diverse endogene und exogene Faktoren, wie zum Beispiel Allergien, Infektionen und anatomische Verhältnisse, stehen im Verdacht die entzündliche Reaktion zu triggern und somit zu einem Neuauftreten, beziehungsweise zu einem Rezidiv nach entsprechender Behandlung zu führen. Außerdem kann ein Zusammenhang zwischen Asthma bronchiale, einer Acetylsalicylsäure (ASS)-Unverträglichkeit und nasalen Polypen beobachtet werden (Samter-Trias) (5-8).

CRS-Patienten leiden typischerweise an Nasenatmungsbehinderung, Rhinorrhoe, Cephalgien und Riechstörungen (2;8). Durch eine medikamentöse Therapie mit intranasalen und systemischen immunmodulierenden Pharmaka, wie zum Beispiel Corticosteroiden, können die Größe der nasalen Polypen reduziert werden sowie Symptome wie Nasenatmungsbehinderung und Rhinorrhoe gemildert werden. Auch durch den Einsatz von Antibiotika konnte eine Besserung der Symptome der Erkrankung gezeigt werden. Sprechen die nasalen Polypen nicht auf eine medikamentöse Therapie an und bestehen weiterhin Symptome, kann zusätzlich ein chirurgisches Entfernen der Polypen indiziert sein (2). Trotz aller bisheriger Therapieansätze weist die CRS eine hohe Rezidivrate auf (9).

2.3 Nasale Besiedelung mit *Staphylococcus (S.) aureus*

Staphylococcus (S.) aureus gehört zu den grampositiven, meistens in Haufen gelagerten Kokken. Sie sind auf gewöhnlichen Nährböden leicht zu kultivieren und bilden runde, glänzende, weiß bis goldgelbe Kolonien. Auf Blutagar lässt sich häufig ein Hämolysehof beobachten. An die Zellwand gebunden finden sich typische Oberflächenproteine, wie Protein A, Clumpingfaktor und Fibronectin-Bindeprotein, die im Rahmen von Agglutinationsverfahren einem *S. aureus*-Nachweis dienen können. *S. aureus* sezerniert eine Reihe von extrazellulären Produkten, die teilweise toxische Eigenschaften haben und zum Beispiel das Überleben, Vermehren, sowie eine Invasion und Adhärenz im umliegenden Gewebe ermöglichen. Kommt es zu Infektionen, werden diese in invasive Prozesse und toxinvermittelte Erkrankungen unterteilt. Die Therapie der ersten Wahl bei einer Infektion stellen Penicilline dar.

S. aureus ist als Kommensale der physiologischen Körperflora anzusehen, wobei Besiedelungsraten in unterschiedlichen Gruppen stark schwanken. Eine herkömmliche Antibiotikabehandlung (zum Beispiel aufgrund einer akuten Infektion) bei chronischen *S. aureus*-Trägern führt meistens nur während der Behandlungszeit zu einem Verschwinden des Keimes (10;11).

Eine Besiedelung der oberen Atemwege mit *S. aureus* konnte als bedeutender exogener Trigger für die Entwicklung einer CRS identifiziert werden. Bis zu 70 % der CRS-Patienten weisen eine nasale Besiedelung mit *S. aureus* auf. Im Gegensatz hierzu sind nur etwa 25 % der Normalkontrollen Träger (12;13).

Exotoxine, die von *S. aureus* sezerniert werden, haben die Eigenschaft als Superantigene zu agieren und die charakteristischen Inflammationsinfiltrate der CRS, wie die Eosinophilie und lymphozytäre Infiltrate, zu triggern. Insbesondere *Staphylococcal* enterotoxin B und toxic shock syndrome toxin scheinen in diesem Zusammenhang folgende besondere Rolle zu spielen: In polypoidem Gewebe zeigen sich zum einen höhere Konzentrationen an gesamtem Immunglobulin E (IgE), des Weiteren lassen sich aber auch spezifische IgE gegen diese beiden Exotoxine nachweisen. Die IgE Produktion scheint vor allem einen lokalen Prozess darzustellen und spricht für eine Organisation von ektopem lymphatischem Gewebe mit polyklonaler B-Zell Aktivierung in polypoidem Gewebe (12;14-18).

S. aureus ist klassifiziert als ein extrazellulärer Keim. Dennoch konnte er innerhalb nasaler Epithelzellen und muköser Drüsen bei Patienten mit rezidivierender *S. aureus*-Rhinosinusitis nachgewiesen werden. Somit verlieren extrazelluläre Abwehrmechanismen und viele herkömmliche Antibiotika (zum Beispiel β -Laktame) weitgehend ihre Wirkung (19;20).

2.4 Barrierefunktion der Mukosa

Potentiell schädigende Partikel, wie unter anderem Mikroorganismen, werden ununterbrochen über die Atemluft aufgenommen und geraten so in Kontakt mit den Schleimhäuten der Nase und den weiteren luftleitenden Wegen. Eine intakte Barriere, die primär durch die Mukosa des Respirationstraktes gebildet wird, ist unerlässlich um Mikroorganismen bereits an der Eintrittspforte abzufangen und so die Integrität nicht nur des Respirationstraktes, sondern auch des Gesamtorganismus

zu bewahren und vor entzündlichen Veränderungen, wie bei einer Rhinosinusitis, zu schützen (21).

Diese Barriere wird im Wesentlichen durch drei Komponenten sichergestellt: mechanische, zelluläre und chemische Abwehrmechanismen. Die mechanische Barriere wird zum einen durch die epitheliale Schichtung der Zellen und deren Zell-Zell-Kontakte aufrechterhalten, zum anderen verfügt das respiratorische System über einen Selbstreinigungsmechanismus, die mukoziliäre Clearance. Durch Kinozilien, die kontinuierlich in Richtung Rachen schlagen, werden so Schleim und eingeatmete Partikel abtransportiert (22). Zu den zellulären Komponenten der Schleimhautbarriere gehören unter anderem Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, die unterhalb des Epithels gegen Pathogene wirken. Unterstützend wirken die chemischen Abwehrmechanismen, wie sekretorisches IgA, Lysozym, Laktoferrin und antimikrobielle Peptide (AMP), die alle an der Oberfläche des Respirationstraktes einen Schutzfilm bilden (21-24).

Kommt es an dieser Barriere zu Störungen, kann es zum Eindringen von Erregern und Antigenen führen, die so eine akute oder auch chronische Entzündungsreaktion auslösen oder aufrechterhalten (21).

2.5 Antimikrobielle Peptide (AMP)

Zwei für den Menschen bedeutende AMP sind das humane β -Defensin-3 (hBD-3) und das einzige humane Cathelicidin LL-37.

hBD-3 und LL-37 besitzen ein weites Spektrum antimikrobieller Aktivität auf gramnegative und grampositive Bakterien, Viren und Hefepilze, wie *Candida albicans*. Insbesondere die antimikrobielle Aktivität gegen grampositive Erreger, wie *S. aureus*, ist charakteristisch für hBD-3 und LL-37, die sich hierdurch von anderen AMP, wie hBD-1 und hBD-2 abheben (25-29). Die antimikrobielle Aktivität konnte auch elektronenmikroskopisch dargestellt werden und zeigte für hBD-3 eine Perforation der peripheren Zellwand mit einer explosionsartigen Freisetzung der Plasmamembran und somit einer Bakteriolyse (28).

Im Gegensatz zu einigen anderen AMP sind hBD-3 und LL-37 induzierbar. Eine Induktion der AMP durch inflammatorische Stimuli, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-1 β (IL-1 β) und durch den Kontakt zu Bakterien und Hefepilzen konnte nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu

inhibieren Corticosteroide und Retinolsäure die Expression. Andererseits sind AMP auch selbst in der Lage stimulierend und chemotaktisch auf Monozyten, T-Zellen und dendritische Zellen zu wirken. Zusätzlich wurden für AMP modulierende Eigenschaften in Bezug auf Proliferation, Freisetzung von Zytokinen, Wundheilung und Gleichgewicht von Proteasen und Protease-Inhibitoren nachgewiesen (27;28;30-38).

Eine AMP-Expression ist vor allem in Barriereorganen präsent. Hierzu zählen zum Beispiel die Epidermis, der Gastrointestinaltrakt und die Luftwege. In Nasensekreten gesunder Probanden konnten AMP der Hauptgruppen (β -Defensine, Cathelicidine, Psoriasin und Ribonuklease 7 [RNase 7]) nachgewiesen werden. In Schleimhautbiopsien gesunder Probanden zeigten sich Epithelzellen, inflammatorische Zellen in subepithelialen Schichten und Zellen der submukösen Drüsen als Quelle der AMP (28;39;40).

Zusammenfassend tragen AMP zum einen entscheidend zur Abwehr, insbesondere an Barriereorganen, bei, zum anderen sind sie in vielfältige immunologische Prozesse vernetzt, die bisher nur in begrenztem Umfang verstanden sind.

2.6 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, Barrierestörungen der nasalen Mukosa bei CRS-Patienten aufzudecken und Abweichungen der Sekretion von hBD-3 und LL-37 unter Berücksichtigung einer nasalen *S. aureus*-Besiedelung zu analysieren.

Des Weiteren sollten die lokalen zellulären Expressionsquellen bestimmt und ihr Beitrag zur AMP-Sekretion mittels Stimulationsexperimenten dargestellt werden.

3 Patienten, Material und Methoden

Die verwendeten Materialien und Chemikalien sind dem Bezugsquellenverzeichnis im Anhang unter 7.2 zu entnehmen.

Die Ergebnisse der Normalkontrollen wurden in Kooperation mit weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe erarbeitet.

3.1 Patienten

Von Februar 2008 bis November 2008 wurden 12 CRS-Patienten und 13 Normalkontrollen in die Studie einbezogen. Die Gruppe der CRS-Patienten umfasste 4 Frauen und 8 Männer. Das mittlere Alter betrug 42 Jahre und bei 6 CRS-Patienten wurde eine nasale *S. aureus*-Besiedelung nachgewiesen. Die Gruppe der Normalkontrollen bestand aus 4 Frauen und 9 Männern, wobei das mittlere Alter 41 Jahre betrug und ebenfalls bei 6 Patienten eine nasale *S. aureus*-Besiedelung vorlag. Zeichen einer systemischen Entzündungsreaktion wurden durch die Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP), der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) und Leukozytenanzahl (Leu) erfasst. Angaben zu Asthma, einer ASS-Intoleranz und Allergien wurden strukturiert anamnestisch durch einen Fragebogen erhoben (Tabelle 1).

Die Diagnose aller CRS-Patienten wurde anhand von nasalem, polypoidem Gewebe histologisch durch das Institut für Pathologie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel gesichert. Die Kriterien der American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, der American Academy of Otolaryngic Allergy, der American Rhinologic Society und der Sinus and Allergy Health Partnership dienten hierbei als Grundlage. Bei den Normalkontrollen gab es keinerlei Anhalt für entzündliche Erkrankungen. Alle gesunden Kontrollen wiesen endoskopisch eine regelrechte nasale Mukosa auf und unterzogen sich lediglich funktionellen Operationen zur Verbesserung der Nasenatmung.

Patienten bei denen eine Schwangerschaft oder Störungen der Hämostase vorlagen wurden, ebenso wie minderjährige Patienten ausgeschlossen. Alle Teilnehmer an der Studie wurden ausführlich aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Zustimmung. Für die Studie lag ein positives Votum der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vor (AZ A 101/07).

Tabelle 1: Patientencharakteristik

	Normalkontrollen (n = 13)	CRS-Patienten (n = 12)
Mittelwert Alter	41 (19-68)	42 (18-58)
Geschlecht	4 weiblich, 9 männlich	4 weiblich, 8 männlich
<i>S. aureus</i> -Besiedelung (%)	6 (46)	6 (50)
Mittelwert CRP in mg/dl (SD)	1,3 (0,8)	3,4 (5,1)
Mittelwert BSG in mm nach einer Stunde (SD)	7,3 (4,4)	9,3 (3,8)
Mittelwert Leu /nl (SD)	6,9 (1,7)	6,1 (1,8)
Asthma (%)	1 (8)	2 (17)
ASS-Intolreanz (%)	2 (15)	1 (8)
Allergien (%)	3 (23)	5 (42)

S. aureus: *Staphylococcus aureus*, CRP: C-reaktives Protein
 BSG: Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, Leu: Leukozytenanzahl, ASS:
 Acetylsalicylsäure

3.2 Nasensekrete

Mit einem sterilen Tupfer mit einem Fassungsvermögen von 20 µl wurden nach einem standardisierten Vorgehen für 10 Sekunden aus beiden Nasenhaupthöhlen Abstriche genommen. Der Tupfer wurde in einem sterilen Röhrchen für 45 min bei Raumtemperatur in 500 µl 10 mM Natriumphosphat mit 0,1 % Rinderserumalbumin (BSA) unter Rotation inkubiert. Das in dem Tupfer verbleibende Material (20 µl) wurde durch Zentrifugieren für 1 min gewonnen und der restlichen Lösung zugeführt. 100 µl des Sekretes und der Tupfer, eingelegt in 200 µl *Tryptic Soy Bouillon* (TSB), wurden für den Nachweis einer möglichen *S. aureus* Besiedelung durch das Institut

für Infektionsmedizin im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, verwendet. Das übrige Sekret wurde in Aliquots in 50 µl Einheiten bei –80°C asserviert.

3.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

In den wie oben beschrieben gewonnenen Nasensekreten wurden hBD-3 und LL-37 quantifiziert. Hierzu wurde ein Sandwich ELISA durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden aus dem Mittelwert der im doppelten Ansatz gemessenen Werte ermittelt. Der gesamte Versuch erfolgte in 96 Well Platten bei Raumtemperatur. Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf ein Loch der Platte.

Für hBD-3 wurde als primärer Antikörper ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen hBD-3 (0,6 µg/ml in 50 mM Natriumcarbonatpuffer) genutzt. Die Platte wurde mit 100 µl dieser Lösung über Nacht beschichtet. Es folgte ein 3-maliges Spülen mit einem Waschpuffer, bestehend aus phosphate buffered saline (PBS) mit 0,05 % Tween 20. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 250 µl PBS mit 1 % BSA für 1 h um unspezifische Bindungsreaktionen zu blocken. Nach erneutem 3-maligem Spülen mit der Waschlösung wurden 50 µl des Nasensekretes, beziehungsweise rekombinantes hBD-3 in PBS mit 0,1 % BSA in ansteigender Konzentration als Standardlösung aufgebracht und für 2 h inkubiert. Anschließend wurde wieder 3-mal mit genannter Lösung gewaschen. Als Detektions-Antikörper diente ein biotinylierter polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen hBD-3 (0,25 µg/ml in PBS mit 0,1 % BSA). 100 µl von diesem wurden für 1 h inkubiert. Hiernach erfolgte eine 3-malige Spülung. Daraufhin wurden 100 µl einer Streptavidin-konjugierten Peroxidase (1:200 in PBS + 0,1 % BSA) für 30 min inkubiert und es wurde erneut 3-mal gespült. Als Substrat wurden 100 µl einer Tetramethylbenzidinlösung verwendet. Nach 15 min wurden 50 µl 1 M Schwefelsäure hinzu pipettiert um die enzymatische Reaktion zu stoppen. Anschließend wurde die Absorption mittels eines ELISA-Messgerätes (Dynatech MR 5000, Virginia, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 550 nm nach Anleitung des Herstellers gemessen.

Für LL-37 wurde das gleiche Verfahren angewendet. Ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen LL-37 (0,5 µg/ml) wurde als primärer Antikörper genutzt und ein biotinylierter polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen LL-37 (0,25 µg/ml) diente als Detektions-Antikörper. Humanes rekombinantes LL-37 wurde zur Herstellung der Standardlösung verwendet.

3.4 Immunhistochemie

Die Biopsien der unteren Nasenmuschel wurden in einer 4 %igen Formaldehydlösung fixiert, in einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol) dehydriert und in Paraffin eingebettet. 4 µm dicke Schnitte dieser Blöcke wurden auf Objektträger gebracht und für die immunhistochemische Färbung verwendet. Bis auf einmalige Erhitzung in der Mikrowelle wurde die gesamte Färbung unter Raumtemperatur durchgeführt.

Die Objektträger mit den darauf befindlichen Schnitten wurden zunächst in Xylol und danach in einer der Konzentration absteigenden Alkoholreihe (Ethanol) für jeweils 10 min entparaffiniert und in Tris-buffered saline (TBS) rehydriert. In der Mikrowelle wurden die Schnitte in 0,01 M Citratpuffer (pH 6,0) für 15 min erhitzt, um eine Antigendemaskierung zu erreichen. Die Objektträger wurden in dem Citratpuffer belassen um für 1 h abzukühlen. Nach 5-minütiger Spülung mit TBS wurden die Schnitte für 10 min in 1 %iger Wasserstoffperoxidlösung inkubiert, um die Aktivität endogener Peroxidase zu blocken. Es folgte eine weitere Spülung mit TBS. 100 µl 3 %iges Normalschweineserum wurde auf jeden Schnitt pipettiert und für 15 min inkubiert, um spätere nicht spezifische Bindungen zu verhindern. Die Lösung wurde anschließend vorsichtig ausgeschüttelt und randständig abgesaugt. Der polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen hBD-3 (5 µg/ml in TBS) beziehungsweise gegen LL-37 (6 µg/ml in TBS) diente als Primärantikörper und 100 µl pro Schnitt wurden für 1 h aufgebracht. Die Schnitte wurden ausgeschlagen und 3-mal für 5 min in TBS unter Schütteln gespült. Nun erfolgte für 30 min eine Inkubation mit biotinyliertem Schwein Anti-Kaninchen Immunglobulin (4,4 µg/ml in TBS) als Sekundärantikörper. Dieser wurde anschließend wieder entfernt und die Objektträger in TBS gespült. Mittels ABC-Methode wurde eine Komplexbildung zwischen Biotin, Streptavidin und Peroxidase erreicht. Hierzu erfolgte eine Inkubation des Vectastain Elite ABC-Kit für

30 min. Das Vector NovaRED Substrate Kit diente als Substrat für die Peroxidase und wurde für 3 min (hBD-3) beziehungsweise für 5 min (LL-37) aufgetragen. Anschließend wurde sofort für 10 min mit TBS gespült. Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger für ca. 3 sec in eine 1:3 verdünnte Hämalaunlösung getaucht und im Anschluss sofort 10 min unter fließendem Wasser gespült. Die Schnitte wurden zur Dehydrierung durch eine in der Konzentration aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol) gezogen und mittels Eukitt eingebettet.

In früheren Studien konnten hBD-3 und LL-37 bereits in der Tonsilla palatina nachgewiesen werden. Somit dienten solche Biopsate als positive Kontrolle (28;41). Die Färbung der Negativkontrollen erfolgte nach gleichem Protokoll, nur der primäre Antikörper wurde durch TBS ersetzt. Die Beurteilung der gefärbten Schnitte erfolgte lichtmikroskopisch und die Dokumentation der Färbungen digitalfotografisch.

3.5 Kultivierung primärer nasaler Epithelzellen

Biopsate einer Untergruppe bestehend aus 5 CRS-Patienten und 5 Normalkontrollen wurden in die Versuche der Primärzellkulturen und Stimulation durch *S. aureus* einbezogen. Die Biopsien erfolgten an den unteren Nasenmuscheln und dienten zur Isolierung der humanen nasalen Epithelzellen.

Die Kultivierung erfolgte unter humifizierter 5 % CO₂-haltiger Atmosphäre bei 37°C. Nach Inkubation in Dispase-Lösung (2 U/ml) bei 4°C über Nacht wurden die Epithelzellen von der Dermis abgelöst und in Zellkulturmedium in 25 cm²-großen Zellkulturflaschen kultiviert. Nach Erreichen von präkonfluenten Monolayern erfolgte die weitere Kultivierung für ca. 13 Tage in 96 Well Platten und alle 3-4 Tage ein Austausch des Zellkulturmediums. Die epitheliale Morphologie, das Wachstum und mögliche Kontaminationen wurden regelmäßig durch ein Phasenkontrastmikroskop beurteilt.

3.6 Bakterielle Stimulation der nasalen Epithelzellen

Nasale *S. aureus* Besiedlungen werden in Westeuropa zum größten Teil durch den Stamm T190-2 hervorgerufen (42). Dieser Stamm wurde in den Versuchen zur

bakteriellen Stimulation der nasalen Epithelzellen verwendet und freundlicherweise durch B.M. Bröker der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt.

S. aureus wurde über Nacht bei 37°C in TSB kultiviert, bis eine Konzentration von etwa 5×10^8 /ml erreicht war. Der bakterielle Überstand wurde durch Zentrifugieren für 15 min bei 4000g abgetrennt und steril gefiltert.

Die Morphologie der nasalen Epithelzellen wurde vor Stimulation erneut mikroskopisch überprüft und in 96 Well Platten erfolgte die Stimulation durch Austausch des Zellkulturmediums, wobei der bakterielle Überstand in einer Verdünnung von 1:5 verwendet wurde. Nasale Epithelzellen inkubiert mit frischem Medium ohne Zusatz dienten als Negativkontrollen. Nach 16 h Inkubationszeit wurden die Überstände in Aliquots bei -80°C asserviert.

Die Zellviabilität nach Stimulation wurde durch Aufbringen einer 0,25 %igen Trypanblaulösung und lichtmikroskopischer Prüfung der Zellmorphologie sichergestellt. Eine bakterielle Kontamination wurde durch Inkubation von 10 µl des Überstandes auf Columbia Blutagarplatten bei 37°C über Nacht ausgeschlossen. Die Quantifizierung der AMP in dem Überstand erfolgte gleich der, der Nasensekrete durch Sandwich ELISA (siehe 3.3).

3.7 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mittels der Statistiksoftware SPSS 17.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Die Beschreibung der Daten erfolgte durch Stichprobengröße (n), arithmetische Mittelwerte (MW), \pm Standardabweichung (SD), Maximum (Max) und Minimum (Min). Um Unterschiede der Konzentrationen der AMP in den Nasensekreten zwischen Normalkontrollen und CRS-Patienten beziehungsweise zwischen *S. aureus* besiedelten und nicht besiedelten zu ermitteln wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. Da die Daten des Stimulationversuchs auf einer kleinen Probengröße (n = 5) basierten und sich sehr homogene Ergebnisse für hBD-3 und LL-37 zeigten, wurde hierfür eine t-Test Statistik angewendet. Für alle statistischen Tests wurden Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

Im Gegensatz hierzu waren die LL-37 Konzentrationen in Proben von *S. aureus* besiedelten Normalkontrollen signifikant höher, als in denen von nicht besiedelten (besiedelt MW 31,06, SD 20,36, Max 61,87, Min 5,44 und nicht besiedelt MW 6,33, SD 7,11, Max 20,27, Min 0; $p = 0,014$). Erstaunlicherweise konnte kein Effekt der *S. aureus*-Besiedelung auf die LL-37-Konzentrationen bei CRS-Patienten festgestellt werden (besiedelt MW 21,22, SD 16,43, Max 42,79, Min 1,87 und nicht besiedelt MW 11,51, SD 13,40, Max 31,15, Min 0; $p = 0,180$) (Abbildung 2).

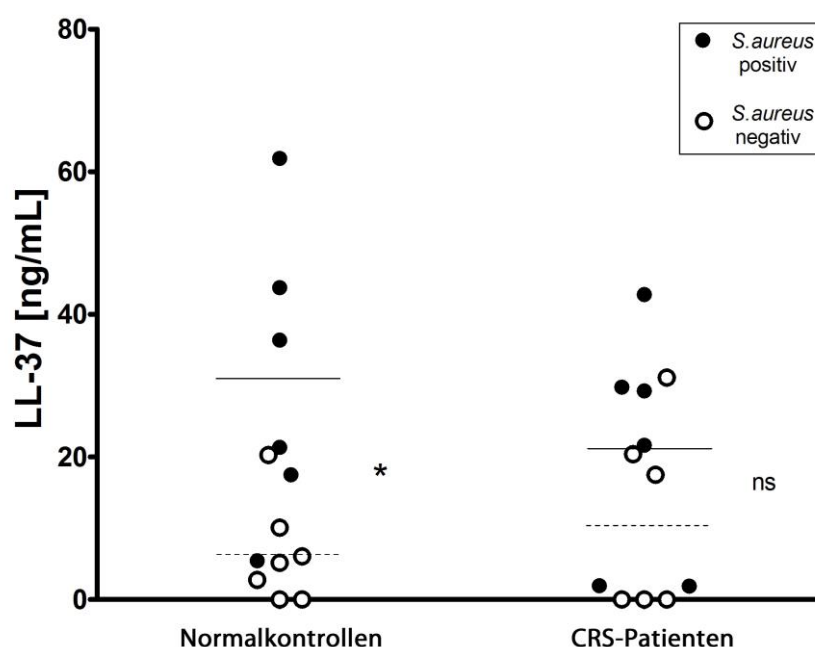


Abbildung 2: Effekt einer *Staphylococcus (S.) aureus* Besiedelung
 LL-37-Konzentrationen in Nasensekreten von Normalkontrollen ($n = 13$, $p = 0,014$) und CRS-Patienten ($n = 12$, $p = 0,180$)
 Balken markieren den Mittelwert für besiedelte (durchgehend) und unbesiedelte (gestrichelt), * $p < 0,05$, ns = nicht signifikant

In der Analyse der Gesamtkohorte CRS-Patienten gegen Normalkontrollen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in den Konzentrationen von hBD-3 festgestellt werden (Normalkontrollen MW 2,70, SD 5,43, Max 19,77, Min 0 und CRS-Patienten MW 0,94, SD, 1,89, Max 5,96, Min 0 ng/ml; $p = 0,295$).

Dies gilt ebenso für LL-37 (Normalkontrollen MW 17,74, SD 19,04, Max 61,87, Min 0 und CRS-Patienten MW 16,37, SD 15,17, Max 42,79, Min 0 ng/ml; $p = 0,852$).

4.2 Immunhistochemie für hBD-3 und LL37

In allen Biopsien der CRS-Patienten und auch der Normalkontrollen zeigte sich eine positive Anfärbung für hBD-3 und LL-37. hBD-3 konnte vor allem im Epithel und in submukösen Drüsen angefärbt werden (Abbildung 3). Anfärbungen für LL-37 waren ebenfalls in den epithelialen Schichten und submukösen Drüsen zu beobachten. Zusätzlich waren für LL-37 einige Zellen im Bindegewebe angefärbt, welche morphologisch Granulozyten entsprechen (Abbildung 4). In den negativen Kontrollen ohne Inkubation eines primären Antikörpers blieb eine positive Anfärbung aus.

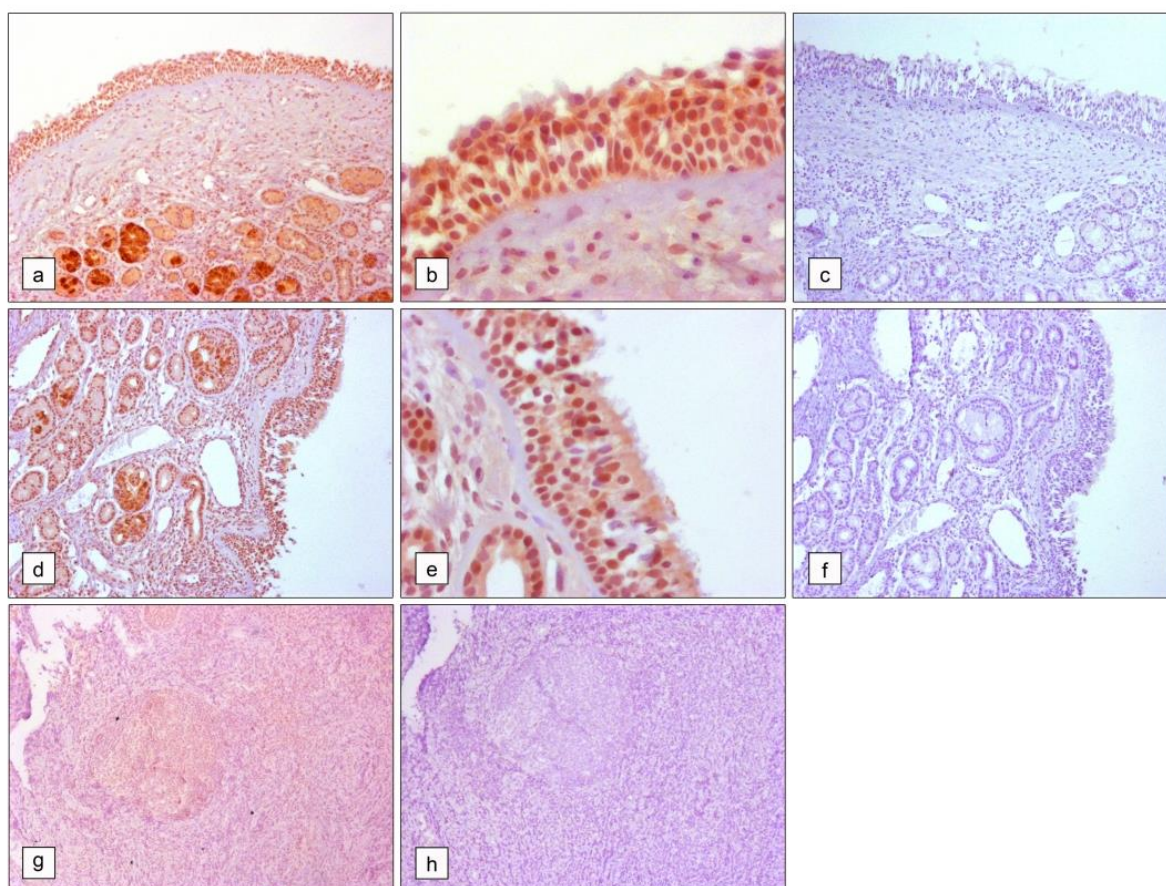


Abbildung 3: Immunhistochemie für humanes β -Defensin 3 (hBD-3)
a: CRS 100x, b: 400x, c: negative Kontrolle
d: Normalkontrolle 100x, e: 400x, f: negative Kontrolle
g: Tonsilla palatina positive Kontrolle,
h: Tonsilla palatina negative Kontrolle

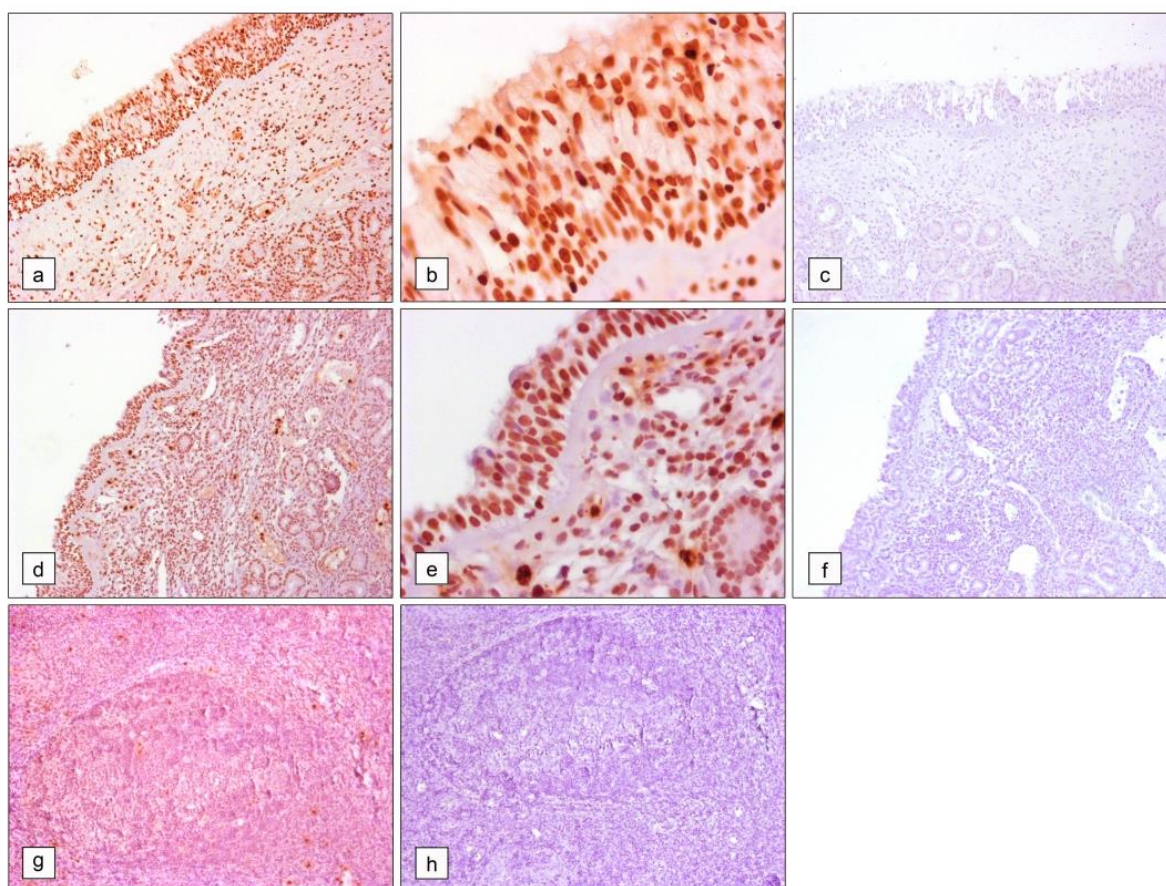


Abbildung 4: Immunhistochemie für LL-37
a: CRS 100x, b: 400x, c: negative Kontrolle
d: Normalkontrolle 100x, e: 400x, f: negative Kontrolle
g: Tonsilla palatina positive Kontrolle
h: Tonsilla palatina negative Kontrolle

4.3 Stimulation nasaler Epithelzellen

Nasale Epithelzellen von Normalkontrollen, die mit *S. aureus* stimuliert wurden, sezernierten signifikant größere Mengen an hBD-3 (MW 100,73, SD 4,56, Max 107,38, Min 95,04) als solche, die nicht stimuliert wurden (MW 1,34, SD 0,17, Max 1,63, Min 1,16 ng/ml; $p < 0,001$). Der gleiche Effekt konnte für Epithelzellen von CRS-Patienten beobachtet werden (stimuliert MW 78,64, SD 41,58, Max 103,21, Min 5,63 und nicht stimuliert MW 2,28, SD 1,52, Max 4,91, Min 1,16 ng/ml; $p = 0,015$) (Abbildung 5).

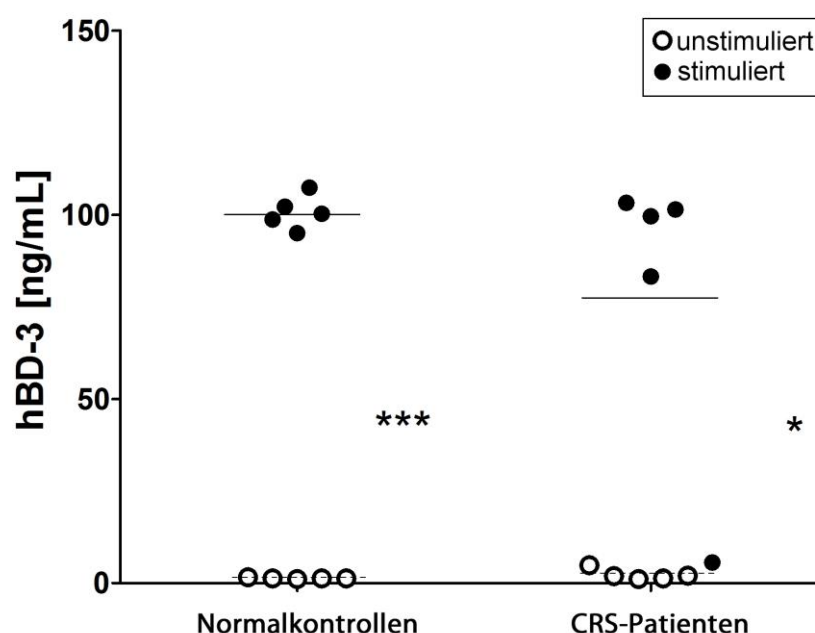


Abbildung 5: Effekt der Stimulation nasaler Epithelzellen mit *Staphylococcus aureus*

Humanes β -Defensin-3 (hBD-3)-Konzentrationen für Normalkontrollen ($n = 5$, $p < 0,001$) und CRS-Patienten ($n = 5$, $p = 0,015$)

Balken markieren den Mittelwert für stimulierte (durchgehend) und unstimulierte (gestrichelt), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Auch für LL-37 konnten nach Stimulation in Normalkontrollen höhere Werte beobachtet werden als in nicht stimulierten (stimuliert MW 39,74, SD 22,31, Max 52,19, Min 0 und nicht stimuliert MW 0,8, SD 0,73, Max 1,95, Min 0 ng/ml; $p = 0,017$). Bei CRS-Patienten war auch hier der beobachtete LL-37 Anstieg nach Stimulation vorhanden (stimuliert MW 37,91, SD 21,83, Max 54,45, Min 0 und nicht stimuliert MW 0,25, SD 0,46, Max 1,06, Min 0 ng/ml; $p = 0,018$) (Abbildung 6).

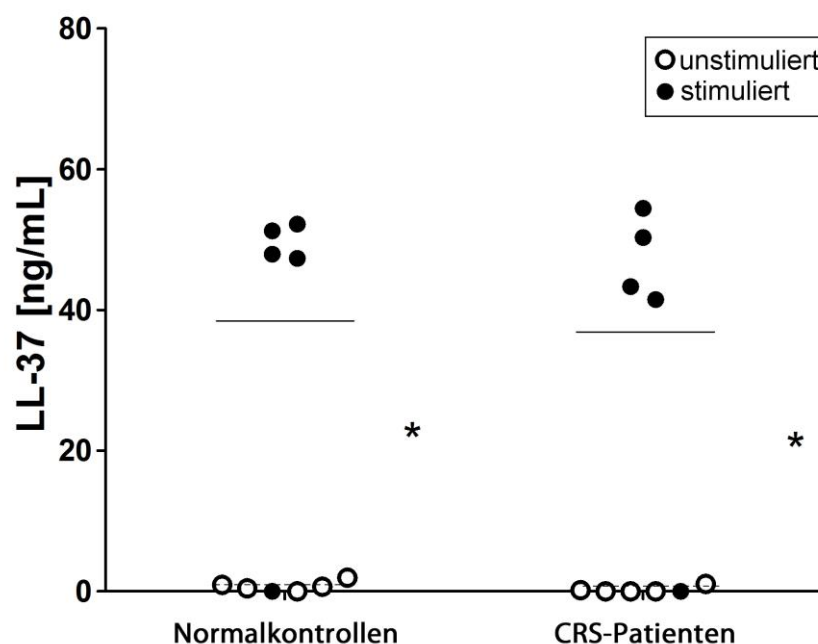


Abbildung 6: Effekt der Stimulation nasaler Epithelzellen mit *Staphylococcus aureus*
 LL-37-Konzentrationen für Normalkontrollen ($n = 5$, $p = 0,017$)
 und CRS-Patienten ($n = 5$, $p = 0,018$)
 Balken markieren den Mittelwert für stimulierte (durchgehend)
 und unstimulierte (gestrichelt), * $p < 0,05$

Der Anstieg der hBD-3-Sekretion nach Stimulation zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Normalkontrollen und CRS-Patienten ($p = 0,269$). Auch für LL-37 konnte kein Unterschied gezeigt werden ($p = 0,924$).

4.4 Zusammenfassung

	hBD-3	LL-37
Normalkontrollen Nasensekret besiedelt versus nicht besiedelt	-	+
CRS Nasensekret besiedelt versus nicht besiedelt	-	-
Normalkontrollen stimulierte versus nicht stimulierte Epithelzellen	+	+
CRS stimulierte versus nicht stimulierte Epithelzellen	+	+

Tabelle 2: Auswirkung einer *Staphylococcus aureus*-Besiedelung/Stimulation
 + gesteigerte Konzentrationen antimikrobieller Peptide
 - keine gesteigerte Konzentrationen antimikrobieller Peptide

5 Diskussion

Der Schutz des Epithels der luftleitenden Wege wird durch ein Zusammenspiel zahlreicher Mechanismen sichergestellt. Fällt ein Part dieses Systems aus oder ist nicht in vollem Funktionsumfang erhalten, zum Beispiel durch genetische Variationen, kann es zu empfindlichen Störungen an dieser Barriere kommen, die zu einem Eindringen von schädigenden Agenzien führen können, und somit Entzündungen verursachen und auch aufrechterhalten können (21).

AMP gehören in diesem Kontext zu dem chemischen Teil der Abwehrfunktion der respiratorischen Schleimhaut (21;25). CRS ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Mukosa (2). Mögliche Zusammenhänge zwischen einer Barrierefunktion durch Störungen auf Ebene der AMP und CRS wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

5.1 hBD-3 und LL-37 Konzentrationen in Nasensekreten

In dieser Studie konnte hBD-3 in Nasensekreten durch ELISA nachgewiesen werden. Sowohl in Normalkontrollen als auch in CRS-Patienten war hBD-3 feststellbar. Ein Unterschied in den Konzentrationen zwischen diesen beiden Gruppen war nicht zu detektieren. Auch im Vergleich von *S. aureus* besiedelten und nicht besiedelten Patienten war kein Unterschied in der hBD-3-Konzentration, jeweils für CRS-Patienten und Normalkontrollen, darstellbar (Tabelle 2).

hBD-3 gehört zu den induzierbaren AMP. Eine Induktion durch den Kontakt zu Bakterien wurde in der Literatur beschrieben (28;37). Dieser Effekt blieb in den Nasensekreten in dieser Studie interessanterweise aus. Dies deckt sich allerdings mit dem Vergleich von Normalkontrollen und Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis. Auch hier konnte keine Korrelation zwischen *S. aureus*-Besiedelung und hBD-3-Konzentration gezeigt werden konnte (43).

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die hBD-3-Sekretion durch multiple Mechanismen der Induktion und Inhibition gesteuert ist. Eine Induktion durch Zytokine und Calcium ist beschrieben. Retinolsäure wiederum konnte als Inhibitor identifiziert werden (37). In diesem Netzwerk der Induktion und Inhibition muss es somit in diesem Fall andere inhibierende Faktoren geben, die überwiegen, wodurch

die *S. aureus*-Besiedelung nicht zum Tragen kommt. Zudem konnte in vorrausgegangenen Studien gezeigt werden, dass verschiedene *S. aureus*-Stämme die hBD-3-Expression unterschiedlich beeinflussen. Insbesondere solche Stämme, die von *S. aureus*-Trägern stammten zeigten eine geringere Stimulation der Expression von hBD-3 (44).

LL-37 konnte bereits in Studien in Nasensekreten von Normalkontrollen nachgewiesen werden (40;45;46). Auch in dieser Studie konnte LL-37 in Nasensekreten quantifiziert werden. Sowohl in Normalkontrollen als auch in CRS-Patienten, jeweils *S. aureus* besiedelt und *S. aureus* nicht besiedelt, war LL-37 nachweisbar. Ein signifikanter Unterschied der Konzentrationen von LL-37 zwischen Normalkontrollen und CRS-Patienten konnte nicht gezeigt werden.

Auch LL-37 gehört zu den induzierbaren AMP. Hefepilze, grampositive sowie gramnegative Bakterien konnten bereits als Induktoren für LL-37 identifiziert werden (34;36). Diese Induktion konnte ebenfalls in Normalkontrollen und Patienten mit Granulosmatose mit Polyangiitis nachgewiesen werden (43).

In der Tat zeigte sich auch in dieser Studie eine Induktion durch *S. aureus*. Es konnten statistisch signifikant höhere LL-37-Konzentrationen bei besiedelten Normalkontrollen gegenüber unbesiedelten Normalkontrollen gemessen werden. Hervorzuheben ist, dass dieser Effekt nicht für CRS-Patienten nachgewiesen werden konnte (Tabelle 2).

Die ausbleibende Induktion von LL-37 durch *S. aureus* könnte Folge einer Störung des immunologischen Netzwerkes der Stimulation und Inhibition in Bezug auf LL-37 an der nasalen Mukosa sein. Durch das Ausbleiben der chemischen Immunantwort und somit das Auftreten einer potenziellen Dysfunktion der mukosalen Barriere könnte sich *S. aureus* leichter ansiedeln und somit die höheren Kolonisationsraten bei CRS-Patienten gegenüber Normalkontrollen teilweise erklären. Inflammatorische Trigger könnten so vermehrt und länger an der Schleimhaut angreifen und zu einer entzündlichen Reaktion führen, diese aufrechterhalten oder zu Rezidiven führen.

Dieser Mechanismus ist bereits für andere Erkrankungen, bei denen eine Barrierefunktion eine Rolle spielt, beschrieben. Die atopische Dermatitis geht mit einer verringerten AMP-Expression einher. Typisch für diese Hauterkrankung ist zudem eine Besiedelung mit *S. aureus* (31). Bei der zystischen Fibrose spielen Infektionen der Atemwege im Krankheitsverlauf eine entscheidende Rolle und auch

bei diesen Patienten zeigen sich veränderte AMP-Konzentrationen (47). Für chronisch entzündliche Darmerkrankungen wird postuliert, dass veränderte AMP-Expressionen und die folgende Barrierestörung inflammatorische Prozesse triggern (48;49).

Unter optimalen Bedingungen sind Konzentrationen von 1-10 µg/ml nötig um eine effiziente antimikrobielle Aktivität von AMP zu erreichen (25;50;51).

In dieser Studie lagen die gemessenen Konzentrationen in niedrigeren Bereichen. In Nasensekreten von Normalkontrollen konnten bereits vergleichbare Mengen an AMP gemessen werden (40). In Waschlösungen gesunder Haut waren die nachgewiesenen Konzentrationen allerdings noch niedriger (52). Es stellt sich die Frage, ob in diesen Konzentrationen überhaupt eine wirksame antimikrobielle Aktivität erreicht werden kann und somit die, in den Nasensekreten festgestellten AMP, von Bedeutung für die Abwehr von *S. aureus* sind.

Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die Konzentrationen von AMP direkt an der Oberfläche des Epithels vermutlich viel höher sind, als in weiter apikal gelegenen Schichten des Schleimfilms (46). Allerdings ist die Messung an diesem Ort schwer realisierbar.

Des Weiteren wurde das gewonnene Sekret in der vorliegenden Arbeit in 500 µl Natriumphosphat verdünnt. Bei einer Menge von 20 µl Nasensekret würde man somit durch Rückrechnung auf vielfache AMP Konzentrationen kommen, die damit durchaus in antimikrobiell aktiven Bereichen liegen.

Zudem konnte gezeigt werden, dass durch synergistische und additive Effekte die antimikrobielle Aktivität gesteigert wird. Insbesondere Kombinationen von LL-37, hBD-3, aber auch hBD-1, hBD-2 und Lysozym führten zu wirksamerer antimikrobieller Aktivität in niedrigeren Konzentrationen, als ein isoliertes AMP (51).

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass hBD-3 und LL-37 einen wichtigen Beitrag zur antimikrobiellen Aktivität gegen *S. aureus* in der Barriere der nasalen Mukosa bilden.

5.2 Immunhistochemische Lokalisierung antimikrobieller Peptide (AMP)

hBD-3 konnte bereits in anderen Barriereorganen (Lunge, Tonsilla palatina, Epidermis, Gastrointestinaltrakt) nachgewiesen werden. Als synthetisierende Zellen zeigten sich unter anderem Epithelzellen und Granulozyten (28;40). Durch immunhistochemische Färbungen konnte hBD-3 in dieser Studie in den Epithelzellen und in Zellen der submukösen Drüsen gezeigt werden. Diese Zellen konnten somit als Quelle identifiziert werden. Die Zellen des Bindegewebes waren frei von hBD-3. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von hBD-3 als Teil des primären Schutzschildes der Zellen, die als erstes in Kontakt mit möglichen Eindringlingen treten.

LL-37 ist ebenfalls in den oben genannten Geweben mit Barrierefunktion inklusive der nasalen Mukosa präsent. Als synthetisierende Zellen sind hier ebenfalls Epithelzellen und Zellen der Abwehr, wie z.B. Leukozyten, Monozyten und Granulozyten beschrieben (38;40). Durch die immunhistochemischen Färbungen in dieser Studie konnten Epithelzellen, submuköse Drüsen und im Gegensatz zu hBD-3 ebenfalls Granulozyten als LL-37 beinhaltend gezeigt werden.

Damit ist nachgewiesen, dass AMP lokal, direkt an dem Ort gebildet werden, an dem eine effiziente chemische Barriere gegenüber möglichen pathogenen Eindringlingen essenziell für die Aufrechterhaltung der Integrität der Mukosa ist. Dies unterstreicht die Bedeutung der AMP im Zusammenhang mit Erkrankungen, bei denen Grenzflächenläsionen entscheidend zum Pathomechanismus beitragen, wie bei der CRS.

5.3 Induktion antimikrobieller Peptide (AMP) durch *Staphylococcus (S.) aureus*

Durch die immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nasale Epithelzellen zu den Zellen der Mukosa gehören, die AMP bilden. Um diesen Ort der AMP-Sekretion zu bestätigen und um die Reaktion der Epithelzellen auf einen *S. aureus*-Kontakt hin zu untersuchen wurde der Stimulationsversuch durchgeführt.

Zum einen bestätigten die Ergebnisse, dass Epithelzellen einen wichtigen Beitrag zu der AMP-Sekretion leisten. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind auf eine *S. aureus*-Exposition mit einer gesteigerten Sekretion zu reagieren. Sowohl bei Normalkontrollen als auch bei CRS-Patienten induzierte *S. aureus* die Sekretion von hBD-3 und LL-37 in nasalen Epithelzellen (Tabelle 2).

Von besonderem Interesse war die Gruppe der CRS-Patienten und die Induktion von LL-37. Auch hier wurde durch Stimulation eine gesteigerte Sekretion ausgelöst. Die Messung von LL-37 in den Nasensekreten durch ELISA zeigte in genau dieser Gruppe allerdings keinen Anstieg von LL-37 bei *S. aureus* besiedelten Patienten, wobei bei den Normalkontrollen eine Induktion zu beobachten war.

Diverse Mechanismen der Modulation des Systems der Abwehrfunktion der Mukosa beeinflussen die Expression der AMP. Verschiedene Zelltypen, wie die Epithelzellen, aber auch Zellen der Abwehr, wie Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten sind in der Lage sich gegenseitig zu stimulieren oder auch zu inhibieren. Diese autokrinen und parakrinen Einflüsse stellen ein komplexes Netzwerk dar.

Im Gegensatz hierzu ist der Stimulationsversuch elementar aufgebaut. Die Epithelzellen lagen isoliert vor. Andere Zellen, wie zum Beispiel der Abwehr, waren somit nicht in der Lage immunmodulierend auf die Epithelzellen einzuwirken. Lediglich eine autokrine Stimulation beziehungsweise Inhibition der Epithelzellen war möglich.

Der Stimulationsversuch der Epithelzellen zeigt, dass die Zellen der CRS-Patienten durchaus in der Lage sind adäquat auf eine *S. aureus*-Exposition zu reagieren. Würde es im Rahmen der Synthese von AMP oder bei der Signaltransduktion durch *S. aureus*-Kontakt Störungen geben, so müsste sich dieses in den Ergebnissen widerspiegeln. Da in den Nasensekreten allerdings eine Induktion von LL-37 durch *S. aureus* ausblieb, spricht dies für eine Dysregulation im Rahmen der Stimulation oder Inhibition von LL-37. Offen bleibt an welcher Stelle diese Störung auftritt. Welche Zellen beteiligt sind, ob Abweichungen im Zytokinmuster, eine vermehrte Inhibition oder eine verringerte Stimulation die Ursache ist, bleibt offen. Hier müssen weitere Studien ansetzen, um zum Beispiel mögliche therapeutische Aspekte zu definieren. Auch bei hBD-3 blieb eine Antwort auf *S. aureus*-Besiedelung in Nasensekreten aus, obwohl die nasalen Epithelzellen auf eine Stimulation mit *S. aureus* reagierten, wobei

hier keine Unterschiede zwischen Normalkontrollen und CRS-Patienten zu beobachten waren.

Diese Ergebnisse sprechen ebenso für weitere Mechanismen der Stimulation und Inhibition, die in der Mukosa von übergeordneter Bedeutung sind und sogar bei einer *S. aureus*-Besiedelung überwiegen können. Dennoch zeigt der Stimulationsversuch, dass *S. aureus* einen großen Anteil zu der AMP Sekretion in Epithelzellen der Mukosa beiträgt und in entscheidendem Maße die Sekretion steigern kann.

5.4 Therapeutischer Ausblick

Bisherige Therapiemöglichkeiten der CRS stützen sich vor allem auf Glucocorticoide, Antibiotika und chirurgischen Interventionen (2). Trotz allem werden hohe Rezidivraten beobachtet (9).

Antibiotika haben einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf (2). Hier könnten AMP eine gute Alternative darstellen. Vorteile könnten sich in Hinblick auf Resistenzentwicklung, möglichen Nebenwirkungen und dem Wirkungsspektrum, vor allem gegen *S. aureus* ergeben.

Ein chirurgischer Eingriff stellt eine Belastung für den Patienten dar und selbst seltene Komplikationen müssen bei der Häufigkeit der Maßnahmen kalkuliert werden. Bisher ist die Pathophysiologie der CRS nicht geklärt und nicht alle Patienten profitieren dauerhaft und rezidivfrei von einem Eingriff. Eine Stärkung der mukosalen Barriere könnte ein weiterer Ansatz sein das Auftreten einer entzündlichen Reaktion zum Beispiel im Rahmen einer Rezidivprophylaxe zu unterdrücken.

Um *S. aureus* direkt an der Eintrittspforte abzufangen kommen folgende mögliche therapeutische Optionen in Betracht: eine lokale AMP Applikation oder auch ein Eingreifen in immunmodulatorische Prozesse um die Inhibition und Stimulation von Zellen zu beeinflussen und somit eine Steigerung der AMP Sekretion zu erwirken. Der Stimulationsversuch zeigte den positiven Einfluss von *S. aureus* auf die AMP-Sekretion von Epithelzellen. Hieraus resultierend könnten durch bestimmte bakterielle Bestandteile, die ansonsten unschädlich für den Organismus sind, Epithelzellen dazu angeregt werden höhere Mengen an AMP zu synthetisieren. Welche Bestandteile der Bakterien die Epithelzellen in dieser Studie zu der

gesteigerten AMP-Sekretion angeregt haben ist unklar und muss in zukünftigen Studien definiert werden.

Ebenso könnte eine Besiedelung mit apathogenen Mikroorganismen die Epithelzellen zur AMP-Sekretion anregen und so therapeutisch zu den Abwehrmechanismen gegen eine *S. aureus*-Besiedelung beitragen. Eine Inhibition einer nasalen Kolonisation von *S. aureus* durch *S. epidermidis* konnte bereits gezeigt werden (53).

Probiotische Lebensmittel sind in der Lage eine bakterielle Besiedelung der Nase insbesondere von grampositiven Keimen zu verringern (54). Auch dies könnte ein weiterer therapeutischer Ansatz sein.

6 Zusammenfassung

Die chronisch polypöse Rhinosinusitis (CRS) ist eine entzündliche Erkrankung der Nase und der Nasennebenhöhlen. Trotz operativer und medikamentöser Behandlung leiden Patienten häufig an Rezidiven. Die Ätiologie ist zum großen Teil noch unbekannt, jedoch stehen diverse endogene und exogene Faktoren unter Verdacht die entzündlichen Vorgänge auszulösen und zu unterhalten.

Eine nasale Besiedelung mit *Staphylococcus (S.) aureus* ist bei CRS-Patienten häufiger zu beobachten als bei Normalkontrollen und Exotoxine dieses Mikroorganismus können inflammatorische Prozesse in der nasalen Mukosa triggern. Die Mukosa stellt eine erste Barriere gegenüber möglichen schädigenden exogenen Faktoren dar. Zu dieser Barriere tragen antimikrobielle Peptide (AMP) als chemische Abwehrmoleküle einen wesentlichen Teil bei. Humanes β -Defensin 3 (hBD-3) und LL-37 sind in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, da sie über eine antimikrobielle Aktivität auch gegen *S. aureus* verfügen und in diverse immunmodulatorische Prozesse involviert sind.

In dieser Studie wurden mögliche Barrierefunktionsstörungen der nasalen Mukosa, bedingt durch eine veränderte AMP-Sekretion aufgedeckt, die somit zu höheren *S. aureus* Besiedelungsraten und inflammatorischen Folgeprozessen führen könnten.

Hierzu wurden hBD-3- und LL-37-Konzentrationen in Nasensekreten jeweils *S. aureus* besiedelter und nicht besiedelter Normalkontrollen und CRS-Patienten mittels eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) quantifiziert. In korrespondierenden Schleimhautbiopsien wurden genannte AMP durch immunhistochemische Färbungen detektiert. Durch eine Stimulation primärer nasaler Epithelzellen mit *S. aureus* konnten Epithelzellen als AMP-Quelle und *S. aureus* als Induktor der AMP-Sekretion detailliert analysiert werden.

Für beide AMP konnte in den Nasensekreten kein Unterschied der Konzentrationen zwischen Normalkontrollen und CRS-Patienten gezeigt werden. Für hBD-3 konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen *S. aureus* besiedelten und nicht besiedelten Probanden beobachtet werden. Für LL-37 waren in *S. aureus* besiedelten

Normalkontrollen die Konzentrationen jedoch höher als in nicht besiedelten. Dieser Effekt blieb für CRS-Patienten aus.

In den immunhistochemischen Färbungen zeigten sich Epithelzellen, submuköse Drüsen und für LL-37 ebenfalls Granulozyten als Quelle der AMP.

Eine Induktion der AMP-Sekretion konnte durch die Stimulation nasaler Epithelzellen mit *S. aureus* nachgewiesen werden. Stimulierte Epithelzellen sezernierten signifikant höhere Mengen an hBD-3 und LL-37. Hier konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Zusammenfassend spricht dies für *S. aureus* als wichtigen, jedoch nicht alleinigen Faktor in der Induktion der untersuchten AMP. Auch inhibitorische Mechanismen scheinen von zentraler Bedeutung zu sein. Eine Dysregulation im immunologischen Netzwerk könnte Ursache der fehlenden LL-37 Antwort auf eine *S. aureus*-Besiedelung in den Nasensekreten von CRS-Patienten sein, wodurch sich *S. aureus* als inflammatorischer Trigger leichter ansiedeln könnte.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- (1) Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker Karl. Prometheus Kopf und Neuroanatomie. Stuttgart: Thieme, 2006.
- (2) Fokkens W, Lund V, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. Rhinol Suppl 2007;(20):1-136.
- (3) Riede U-N, Werner M, Schäfer H-E. Allgemeine und spezielle Pathologie. Stuttgart: Thieme, 2004.
- (4) Böcker W, Denk H, Heitz PhU, Moch H. Pathologie. Urban & Fischer, 2008.
- (5) Slavin RG. Nasal polyps and sinusitis. JAMA 1997; 278(22):1849-1854.
- (6) Bhattacharyya N. The role of infection in chronic rhinosinusitis. Curr Allergy Asthma Rep 2002; 2(6):500-506.
- (7) Zacharek MA, Krouse JH. The role of allergy in chronic rhinosinusitis. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2003; 11(3):196-200.
- (8) Dykewicz MS. 7. Rhinitis and sinusitis. J Allergy Clin Immunol 2003; 111(2 Suppl):S520-S529.
- (9) Vento SI, Ertama LO, Hytonen ML, Wolff CH, Malmberg CH. Nasal polyposis: clinical course during 20 years. Ann Allergy Asthma Immunol 2000; 85(3):209-214.
- (10) Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G. Medizinische Mikrobiologie. Urban & Fischer, 2001.
- (11) Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P. Taschenlehrbuch Mikrobiologie. Stuttgart: Thieme, 2005.
- (12) Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, Cuvelier C, Cauwenberge P, Bachert C. Organization of secondary lymphoid tissue and local IgE formation

- to *Staphylococcus aureus* enterotoxins in nasal polyp tissue. *Allergy* 2005; 60(1):71-79.
- (13) Laudien M, Gadola SD, Podschun R, Hedderich J, Paulsen J, Reinhold-Keller E et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and endonasal activity in Wegener's granulomatosis as compared to rheumatoid arthritis and chronic Rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28(1 Suppl 57):51-55.
- (14) Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, van Cauwenberge P. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(4):607-614.
- (15) Seiberling KA, Conley DB, Tripathi A, Grammer LC, Shuh L, Haines GK, III et al. Superantigens and chronic rhinosinusitis: detection of *staphylococcal* exotoxins in nasal polyps. *Laryngoscope* 2005; 115(9):1580-1585.
- (16) Wang M, Shi P, Chen B, Zhang H, Jian J, Chen X et al. The role of superantigens in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2008; 70(2):97-103.
- (17) Van Zele T, Gevaert P, Watelet JB, Claeys G, Holtappels G, Claeys C et al. *Staphylococcus aureus* colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(4):981-983.
- (18) Patou J, Gevaert P, Van Zele T, Holtappels G, van Cauwenberge P, Bachert C. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(1):110-115.
- (19) Clement S, Vaudaux P, Francois P, Schrenzel J, Huggler E, Kampf S et al. Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J Infect Dis* 2005; 192(6):1023-1028.
- (20) Sachse F, Becker K, von Eiff C, Metze D, Rudack C. *Staphylococcus aureus* invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells in vitro. *Allergy* 2010; 65(11):1430-1437.

- (21) Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, Tripathi-Peters A et al. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol* 2008; 22(6):549-559.
- (22) Lüllmann-Rauch R. *Hitologie Verstehen - Lernen - Nachschlagen*. 2003.
- (23) Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 2000; 1(3):141-150.
- (24) Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(9):699-710.
- (25) Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(9):710-720.
- (26) De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 2005; 27(18):1337-1347.
- (27) Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodriguez-Jimenez J, Forssmann U et al. 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* 2001; 306(2):257-264.
- (28) Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276(8):5707-5713.
- (29) Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. 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 U S A* 1998; 95(16):9541-9546.
- (30) Nijnik A, Hancock RE. The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr Opin Hematol* 2009; 16(1):41-47.
- (31) Hata TR, Gallo RL. Antimicrobial peptides, skin infections, and atopic dermatitis. *Semin Cutan Med Surg* 2008; 27(2):144-150.

- (32) Duits LA, Rademaker M, Ravensbergen B, van Sterkenburg MA, van Strijen E, Hiemstra PS et al. Inhibition of hBD-3, but not hBD-1 and hBD-2, mRNA expression by corticosteroids. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280(2):522-525.
- (33) Kim ST, Cha HE, Kim DY, Han GC, Chung YS, Lee YJ et al. Antimicrobial peptide LL-37 is upregulated in chronic nasal inflammatory disease. *Acta Otolaryngol* 2003; 123(1):81-85.
- (34) Nell MJ, Tjabringa GS, Vonk MJ, Hiemstra PS, Grote JJ. Bacterial products increase expression of the human cathelicidin hCAP-18/LL-37 in cultured human sinus epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 42(2):225-231.
- (35) Ooi EH, Wormald PJ, Carney AS, James CL, Tan LW. Human cathelicidin antimicrobial peptide is up-regulated in the eosinophilic mucus subgroup of chronic rhinosinusitis patients. *Am J Rhinol* 2007; 21(4):395-401.
- (36) Ooi EH, Wormald PJ, Carney AS, James CL, Tan LW. Fungal allergens induce cathelicidin LL-37 expression in chronic rhinosinusitis patients in a nasal explant model. *Am J Rhinol* 2007; 21(3):367-372.
- (37) Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schroder JM. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 2004; 123(3):522-529.
- (38) Durr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758(9):1408-1425.
- (39) Chen PH, Fang SY. The expression of human antimicrobial peptide LL-37 in the human nasal mucosa. *Am J Rhinol* 2004; 18(6):381-385.
- (40) Laudien M, Dressel S, Harder J, Glaeser R. Differential expression pattern of antimicrobial peptides in nasal mucosa and secretion. *Rhinology* 2011; 49(1):107-11.

- (41) Ball SL, Siou GP, Wilson JA, Howard A, Hirst BH, Hall J. Expression and immunolocalisation of antimicrobial peptides within human palatine tonsils. *J Laryngol Otol* 2007; 121(10):973-978.
- (42) Holtfreter S, Grumann D, Schmudde M, Nguyen HT, Eichler P, Strommenger B et al. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45(8):2669-2680.
- (43) Hui Y, Wohlers J, Podschun R, Hedderich J, Lamprecht P, Ambrosch P et al. Antimicrobial peptides in nasal secretion and mucosa with respect to *S. aureus* colonisation in Wegener's Granulomatosis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2011;in press.
- (44) Quinn GA, Cole AM. Suppression of innate immunity by a nasal carriage strain of *Staphylococcus aureus* increases its colonization on nasal epithelium. *Immunology* 2007; 122(1):80-89.
- (45) Lysenko ES, Gould J, Bals R, Wilson JM, Weiser JN. Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun* 2000; 68(3):1664-1671.
- (46) Tjabringa GS, Vos JB, Olthuis D, Ninaber DK, Rabe KF, Schalkwijk J et al. Host defense effector molecules in mucosal secretions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45(2):151-158.
- (47) Laube DM, Yim S, Ryan LK, Kisich KO, Diamond G. Antimicrobial peptides in the airway. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 306:153-182.
- (48) Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K et al. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9(4):215-223.
- (49) Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6(5):376-388.

- (50) Sahly H, Schubert S, Harder J, Rautenberg P, Ullmann U, Schroder J et al. Burkholderia is highly resistant to human Beta-defensin 3. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(5):1739-1741.
- (51) Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Okuda D, Nagaoka I, Ikeda S et al. Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. J Dermatol Sci 2005; 40(2):123-132.
- (52) Glaser R, Meyer-Hoffert U, Harder J, Cordes J, Wittersheim M, Kobliakova J et al. The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. J Invest Dermatol 2009; 129(3):641-649.
- (53) Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. Nature 2010; 465(7296):346-349.
- (54) Gluck U, Gebbers JO. Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and beta-hemolytic streptococci). Am J Clin Nutr 2003; 77(2):517-520.

7.2 Material- und Bezugsquellenverzeichnis

Verbrauchsmaterialien:

25m ² -Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96 Well Platten (für ELISA) MaxiSorp	Nunc, Roskilde, Dänemark
96 Well Platten (für Stimulation)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Columbia Blutagarplatten	Oxoid, Wesel, Deutschland
Paraffin (Paraplast Plus)	McCormick, Scientific LLC., St. Louis, USA

Chemikalien/Reagenzien:

biotinylierter polyklonaler	Acris, Herford, Deutschland
Kaninchen-Antikörper gegen hBD-3	
biotinylierter polyklonaler	Innovagen, Lund, Schweden
Kaninchen-Antikörper gegen LL-37	
biotinyliertes Schwein	DAKO, Glostrup, Dänemark
Anti-Kaninchen Immunglobulin	
Citronensäure-Monohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dispase-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Büfa Chemikalien, Hude/Altmoorhausen, Deutschland, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Formaldehyd (CH ₂ O)	Walter-CMP, Kiel, Deutschland
Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
humanes rekombinantes LL-37	Innovagen, Lund, Schweden
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol (CH ₄ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumphosphat (Na ₃ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Normalschweineserum	Vector, Burlingame, USA
polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen hBD-3	Acris, Herford, Deutschland
polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen LL-37	Innovagen, Lund, Schweden
rekombinantes hBD-3	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin-konjugierte Peroxidase	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Tetramethylbenzidinlösung	BD, San Diego, USA
Tris-Clorwasserstoff (Tris-HCL)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Trypanblaulösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
<i>Tryptic Soy Boullion</i> (TSB)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Xylol (C ₈ H ₁₀)	Vogel, Giessen, Deutschland
Zellkulturmedium (Epithelial Cell Growth Medium)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Kits:	
Vectastain Elite ABC-Kit	Vector, Burlingame, USA
Vector NovaRED Substrate Kit	Vector, Burlingame, USA
Lösungen:	
Citratpuffer	2,1 g C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O + 1000 ml Aqua dest mit 2 M NaOH auf pH 6 eingestellt
Natriumcarbonatpuffer	2,1 g NaHCO ₃ in 500 ml Aqua dest + 2,65 g Na ₂ CO ₃ in 500 ml Aqua dest vermengen bis pH 9,6
Phosphate buffered saline (PBS)	0,2 g KCl + 0,24 g KH ₂ PO ₄ +1,44 g Na ₂ HPO ₄ + 8 g NaCl + 1000 ml Aqua dest, pH 7,2

Tris-buffered saline (TBS)	26,29 g NaCl + 23,64 g Tris-HCL + 3000 ml Aqua dest mit 2 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt
Waschpuffer	500 ml PBS + 250 µl Tween 20

Bakterienstamm:

S. aureus 190-2

B.M. Bröker, Universität Greifswald,
Deutschland

7.3 Veröffentlichung

Folgende Publikation ist aus dieser Dissertation hervorgegangen:

Thienhaus ML, Wohlers J, Podschun R, Hedderich J, Ambrosch P, Laudien M.
Antimicrobial peptides in nasal secretion and mucosa with respect to *Staphylococcus aureus* colonization in chronic rhinosinusitis with nasal polyps.
Rhinology. 2011 Dec;49(5):554-61.

7.4 Danksagung

Ich danke meiner Doktormutter Frau Prof. Ambrosch für die Aufnahme in ihrer Klinik und die Ermöglichung dieser Dissertation.

Vielen Dank an PD Dr. Martin Laudien für die Bereitstellung eines spannenden Themas, die Einbindung in ein nettes Team und die gute Betreuung während der gesamten Zeit meiner Promotion.

Bei Janet Wohlers möchte ich mich bedanken für die gute Unterstützung im Labor, die Bereitstellung und Stimulation der Epithelzellen und für ein offenes Ohr bei allen Fragen und Problemen.

Bei Yuan Hui bedanke ich mich für die schöne internationale Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch zu diesem Thema.

Vielen Dank auch an PD Dr. rer. nat. Tibor Görögh für die Einweisung und die nette Aufnahme im Labor.

Mein weiterer Dank geht an Annemarie Rően für das Anfertigen der Schnitte.

Bei Dipl. Inform. Jürgen Hedderich bedanke ich mich für die Hilfe bei statistischen Fragen.

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thienhaus
Vorname: Maike Luisa
Adresse: Jungfernstieg 3, 24103 Kiel
Telefon: 0431 9710021
E-Mail: Maike.Thienhaus@gmx.de
Geburtsdatum: 13.07.1985
Geburtsort: Bremerhaven
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1992 - 1996 Grundschule, Pestalozzischule I, Bremerhaven
1996 - 1998 Orientierungsstufe, Pestalozzischule II, Bremerhaven
1998 - 2002 Gymnasium, Pestalozzischule II, Bremerhaven
2002 - 2005 gymnasiale Oberstufe, Schulzentrum Carl von Ossietzky, Bremerhaven
2005 Abitur

Studium

2005 - 2008 vorklinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin, Christian Albrechts Universität zu Kiel
April 2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2008 - 2012 klinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin, Christian Albrechts Universität zu Kiel

Praktika

29.08.2005 - 27.09.2005 Krankenpflagedienst, Seeparkklinik, Debstedt
24.07.2006 - 21.09.2006 Krankenpflagedienst, St. Joseph-Hospital, Bremerhaven
04.08.2008 - 02.09.2008 Famulatur, Hals-Nasen-Ohrenklinik, St. Joseph-Stift, Bremen
16.03.2009 - 29.03.2009 Famulatur, Praxis für Gastroenterologie, Dr. Gülzow, Kiel

- 15.02.2010 - 04.04.2010 Famulatur, Gemeinschaftspraxis für Hals-, Nasen-,
Ohrenheilkunde, HNO Kiel-Wik
- 16.09.2010 - 17.10.2010 Famulatur, Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, Klinikum
Bremerhaven-Reinkenheide
- 28.02.2011 - 19.06.2011 1. Tertial des praktischen Jahres, Klinik für Hals-, Nasen-,
Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel
- 20.06.2011 - 09.10.2011 2. Tertial des praktischen Jahres, Klinik für Innere Medizin,
Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster
- 10.10.2011 - 29.01.2012 3. Tertial des praktischen Jahres, Klinik für Chirurgie,
Hospital General Honorio Delgado, Arequipa, Peru

Promotion

April 2009 - Juli 2012: Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und
Halchirurgie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit
dem Thema: „Die Rolle der antimikrobiellen Peptide
humanes β -Defensin 3 (hBD-3) und LL-37 bei chronisch
polypöser Rhinosinusitis und nasaler Besiedelung mit
Staphylococcus aureus“