

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

(Direktorin: Prof. Dr. med. Petra Ambrosch)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Fehlregulation der durch Makrophagen  
vermittelten nasalen Barriere bei Patienten mit  
Granulomatose mit Polyangiitis**

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

vorgelegt von  
**Agnetha Hahn**  
geboren in Stralsund

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. M. Laudien,  
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde,  
Kopf- und Halschirurgie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Podschun  
Institut für Infektionsmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 13.04.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.02.2017

gez.: Prof. Dr. Johann Roider  
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1 Granulomatose mit Polyangiitis	4
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.3 Fibronektin	7
1.4 Makrophagen	9
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1 Patientengruppen	10
2.2 Biopsate und Aufbereitung	12
2.3 Immunhistochemische Färbung	13
2.3.1 Verwendete Primärantikörper	13
2.3.2 Färbung	13
2.3.3 Einscannen der Schnittpräparate	17
2.4 Beurteilung der immunhistochemischen Präparate	17
2.4.1 Studiendesign	17
2.4.2 Voraussetzung der Beurteilenden	17
2.4.3 Ablauf der Beurteilung	17
2.5 Statistische Auswertung	23
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1 Nachweis von <i>Staphylococcus aureus</i>	27
3.2 Nachweis von Fibronektin	28
3.3 Korrelation zwischen Fibronektin und <i>Staphylococcus aureus</i>	29
3.4 Nachweis von Makrophagen	30
3.5 Korrelation zwischen Makrophagen und <i>Staphylococcus aureus</i>	31

<b>4. Diskussion</b>	<b>33</b>
4.1 Nachweis von <i>Staphylococcus aureus</i>	33
4.2 Nachweis von Fibronektin	34
4.3 Korrelation zwischen Fibronektin und <i>Staphylococcus aureus</i>	36
4.4 Nachweis von Makrophagen	37
4.5 Korrelation zwischen Makrophagen und <i>Staphylococcus aureus</i>	38
4.6 Kritische Würdigung der Arbeit	39
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>41</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>43</b>
<b>7. Veröffentlichung</b>	<b>48</b>
<b>8. Votum der Ethikkommission</b>	<b>50</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>51</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>52</b>
<b>11. Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>53</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
C-ANCA	-	cytoplasmatische antineutrophile cytoplasmatische Antikörper
CD 68	-	Cluster of Differentiation 68
GPA	-	Granulomatose mit Polyangiitis
hBD3	-	humanes $\beta$ -Defensin 3
HCl	-	Chlorwasserstoff = Salzsäure
M	-	Molar
min	-	Minute(n)
mM	-	Millimolar
NaCl	-	Natriumchlorid
pH-Wert	-	potentia Hydrogenii (neulateinisch) = Konzentration des Wasserstoffs
RPGN	-	rasch progrediente Glomerulonephritis
<i>S. aureus</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>
TBS	-	Tris-gepufferte Salzlösung, Tris buffered Saline (engl.)

# 1. Einleitung

## 1.1 Granulomatose mit Polyangiitis

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ist eine Autoimmunerkrankung und zählt zu den granulomatösen, chronisch entzündlichen, primären Kleingefäßvaskulitiden (Silva et al., 2010). Erstmals wurde die Erkrankung von dem schottischen Arzt McBride beschrieben, 1897, als dieser im Rahmen eines Fallberichtes eine destruktive Entzündung der Nase und des Gesichtes schilderte (McKinney et al., 2014). Ebenfalls gehört Heinz Klinger zu den Erstbeschreibern der Erkrankung (Klinger, 1931). Die erste detaillierte Beschreibung der Erkrankung erfolgte 1936 vom Namensgeber der Erkrankung Friedrich Wegener (Wegener, 1936). Wegener benannte drei wesentliche Kriterien der Erkrankung: Nekrose, granulomatöse Läsionen des Respirationstraktes sowie generalisiert fokal nekrotisierende Vaskulitis und nekrotisierende Glomerulonephritis (Wegener, 1939).

Die GPA manifestiert sich vor allem sowohl am oberen als auch am unteren Respirationstrakt sowie an den Nieren (Cocco und Gasparyan, 2010, Holle et al., 2010). Die Nasenatmungsbehinderung, Epistaxis, Dyspnoe und Nasendeformitäten durch Knorpel- und Knochendestruktionen, wie zum Beispiel die Sattelnase, können typische Symptome der GPA sein (Lee et al., 2013, Grayson et al., 2015). Aber auch die Haut und Schleimhäute, Augen, Gelenke und das Nervensystem können betroffen sein (Mukae et al., 2015, Isa et al., 2012). So zeigt sich die systemische GPA zum Teil mit Gewichtsverlust, Fieber, Müdigkeit, Muskel- und Gelenkschmerzen (Tarzi et al., 2014).

Die Prävalenz der Erkrankung beträgt 3 auf 100.000 Menschen, mit einem Verhältnis von Mann zu Frau 3:2. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr (Cocco und Gasparyan, 2010).

Der klinische Verlauf der GPA, zuvor als Wegenersche Granulomatose bezeichnet, ist gekennzeichnet durch eine große Anzahl an Rezidiven und insbesondere auf dem Hals-, Nasen-, Ohrenärztlichen Fachgebiet durch den häufigen Nachweis einer sogenannten „grumbling disease“. Hierunter versteht man eine persistierende Krankheitsaktivität (Wohlert et al., 2012, Garske et al., 2012).

Die Granulomatose mit Polyangiitis ist gekennzeichnet durch eine Dysfunktion der epithelialen Barriere. Hierdurch besteht eine Anfälligkeit für Infektionen sowie die erleichterte bakterielle Kolonisation (Laudien et al., 2010). In der Literatur findet man Angaben, dass 60-70% der GPA-Patienten chronisch nasal mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) besiedelt sind (Ohlsson et al., 2012). Diese nasale Besiedelung mit *S. aureus* ist wiederum assoziiert mit einem erhöhten Rezidivrisiko (Glasner et al., 2015).

Eine Besonderheit ist die herabgesetzte ziliäre Schlagfrequenz bei der Granulomatose mit Polyangiitis (Ullrich et al., 2009). Eine dadurch bedingte verlängerte Verweildauer von *S. aureus* im Respirationstrakt kann zu einer größeren Wahrscheinlichkeit des Eindringens von *S. aureus* in den Organismus führen.

Die Erkrankung ist assoziiert mit antineutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern, abgekürzt ANCA (Laudien et al., 2009, Lee et al., 2013). Diese Antikörper sind Autoantikörper, welche gegen Antigene gerichtet sind, die im Cytoplasma von Neutrophilen und Monozyten zu finden sind. Ein Hauptvertreter der Antigene ist die Proteinase 3 (PR3), an welche sich vor allem die cytoplasmatischen ANCA binden (C-ANCA). In 75% der Fälle der GPA-Patienten sind C-ANCA in der Untersuchung feststellbar (Rowaiye et al., 2015). Eine weitere Form sind die P-ANCA, die perinukleären ANCA, welche an die Myeloperoxidase binden. Diese Autoantikörper sind in 70% der Fälle bei Patienten mit idiopathischer rasch progredienter Glomerulonephritis (RPGN) vorhanden (Rowaiye et al., 2015).

Hinzu kommt die verminderte Antwort epithelialer nasaler Zellen hinsichtlich des humanen  $\beta$ -Defensin 3 (hBD3) auf die Stimulation mit *S. aureus* (Hui et al., 2011). Das antimikrobielle Peptid hBD3 ist einer der Bausteine zur Modulation der bakteriellen Kolonisation. Ist dies nur vermindert verfügbar, ist das Risiko einer Dysbalance der mikrobiellen Besiedlung und einer möglichen Kolonisation mit *S. aureus* erhöht.

Interleukin 8, ein Vertreter der Zytokine, stellt einen weiteren Bestandteil der Barriere gegen eine Besiedlung mit potentiell pathogenen Bakterien dar. Die Aufgabe des Interleukin 8 ist zum einen die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und die dadurch bedingte Aktivierung der Chemotaxis (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992).

Zum anderen ist Interleukin 8 der Schlüsselmediator der Neoangiogenese, der Ausbildung von neuen Blutgefäßen (Choi et al., 2014), welche ein wichtiger Baustein der Reparaturvorgänge in Entzündungsprozessen ist. Da bei Patienten mit GPA die Sekretion von Interleukin 8 reduziert ist (Laudien et al., 2010), kann dies zu einer geschwächten Abwehr bei bakterieller Besiedlung beitragen.

Aufgrund dieser beschriebenen Besonderheiten bei der Granulomatose mit Polyangiitis, welche die Besiedlung mit *S. aureus* begünstigen, ergibt sich die erste Fragestellung der vorliegenden Dissertation.

**Fragestellung 1: Lassen sich bei GPA-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen vermehrt *S. aureus*-Bakterien im Gewebe nachweisen?**

### **1.2 *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* ist ein gram-positiver, ubiquitär verbreiteter Keim mit Potenz für ein weites Spektrum an Krankheiten, die durch ihn hervorgerufen werden können (Guo et al., 2017). Sie reichen von milden superfiziellen Hautinfektionen bis zu einer lebensgefährlichen Sepsis, Endokarditis und Pneumonie. Er gehört zu den Keimen, die am häufigsten bei einer nosokomialen Infektion des Respirationstraktes vorliegen (Mongodin et al., 2002).

Aber nicht jede Besiedlung mit dem Bakterium führt zu einer Symptomatik. Rund 20-30% der Bevölkerung sind Träger des Keimes mit in der Regel asymptomatischen Verläufen (Glasner et al., 2015), da *S. aureus* nicht nur zu den pathogenen Keimen zählt, sondern auch zu den Kommensalen (Wang et al., 2015).

Man unterscheidet drei Arten von gesunden *S. aureus*-Trägern: Dauerhafte und intermittierende Träger, sowie Nichtträger (Fard-Mousavi et al., 2015). Dabei besiedelt *S. aureus* bei Gesunden verschiedene Bereiche, wie zum Beispiel am Vestibulum nasi, der Haut und der Vagina (Fard-Mousavi et al., 2015). Die Nase ist jedoch die Region, an welcher der Keim am häufigsten nachgewiesen werden konnte (Williams et al., 1963). Bei jungen Kindern, hospitalisierten Patienten sowie Patienten mit chronischen Erkrankungen ist die Prävalenz von *S. aureus* höher (Fard-Mousavi et al., 2015).



Obwohl dieser Keim in den meisten Fällen einer Infektion lokalisiert verbleibt, kann das Bakterium auch in tiefere Gewebe einwandern und in Zellen internalisieren. Dadurch ist er in der Lage chronische und wiederkehrende Erkrankungen hervorzurufen (Hamza und Li, 2014). *S. aureus* nutzt dabei Fibronectin. Über das Fibronectinbindeprotein A bindet sich *S. aureus* an Fibronectin und ist so migrationsfähig (Kneidl et al., 2013).

Fibronectin dient als eine Art Brückenmolekül zwischen dem Fibronectin-Bindeprotein auf der Seite des *S. aureus* und dem Integrin  $\alpha 5\beta 1$ , der Rezeptor für Fibronectin, auf der Oberfläche der Wirtszelle (Hauck und Ohlsen, 2006).

In einer Studie wurde gezeigt, dass *S. aureus* sich sowohl in vitro, als auch in vivo vor allem an den schwach differenzierten menschlichen Epithelzellen des Respirationstraktes sammelt (Mongodin et al., 2002).

### **1.3 Fibronectin**

Fibronectin ist ein Glykoprotein und unter anderem eines der Bestandteile der Extrazellulärmatrix (Bachmann et al., 2015). Generell lassen sich zwei verschiedene Arten von Fibronectin unterscheiden: Zum einen das plasmatische, gelöste und zum anderen das zelluläre, an die Zelloberfläche gebundene Fibronectin (Pankov und Yamada, 2002).

Fibronectin erfüllt folgende Funktionen: zelluläre Adhäsion (Anhaftung), Differenzierung, Gewebereparatur nach Verletzungen und eine adhäsive Wirkung auf verschiedene Moleküle, zum Beispiel Heparin, Kollagen, Fibrin und spezifische Integrine (Menzies, 2003, Bachmann et al., 2015). Daher ist Fibronectin ein typischer Baustein der Extrazellulärmatrix des verletzten Gewebes, welches sich in Regeneration befindet (Bachmann et al., 2015).

Das zelluläre Fibronectin lagert in fibrillären Bündeln an der Oberfläche von verschiedenen Zellarten, unter anderem auch Fibroblasten, Astrozyten, Epithel- und Endothelzellen. Das plasmatische Fibronectin fungiert als Bindemolekül zum einen bei Zell-Zell-Kontakten, aber auch bei Zell-Substrat-Kontakten. Dadurch wird die zelluläre Adhäsion, die Anheftung an Makromoleküle der Extrazellulärmatrix, erleichtert (Beier et al., 2007).

Neben Fibroblasten kann Fibronectin auch von Makrophagen gebildet werden (Alitalo et al., 1980). Zusammenfassend stellt Fibronectin eine Komponente des Abwehrmechanismus gegen eine bakterielle Besiedlung dar und demzufolge auch gegen das in dieser Arbeit betrachtete Bakterium *S. aureus*.

Die 2. Fragestellung der vorliegenden Dissertation soll daher einen möglichen Unterschied zwischen dem Auftreten von Fibronectin bei Patienten mit GPA und Gesunden aufzeigen. In der 3. Fragestellung wird die Beziehung zwischen *S. aureus* und Fibronectin betrachtet. Es soll gezeigt werden, ob in den histologischen Schnitten, bei welchen *S. aureus* nachgewiesen wurde eine vermehrte oder verminderte Fibronectinanreicherung nachgewiesen werden kann und ob dies bezüglich Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen auftreten.

**Fragestellung 2: Unterscheiden sich Patienten mit GPA und Normalkontrollen hinsichtlich des Fibronektin Gehaltes der Extrazellulärmatrix der nasalen Schleimhaut?**

**Fragestellung 3: Wie zeigt sich das Verhältnis zwischen *S. aureus* und Fibronectin und sind Unterschiede zwischen GPA-Patienten und Normalkontrollen erkennbar?**

## **1.4 Makrophagen**

In jedem Organ des Körpers sind Makrophagen vertreten, die allesamt von Monozyten abstammen. Zum einen sind sie Bestandteil des unspezifischen, angeborenen Abwehrsystems und sind beispielsweise in der Lage, Bakterien abzutöten. Zum anderen sind sie ein Bestandteil der spezifischen, erworbenen Immunabwehr und können durch T-Helferzellen aktiviert werden. Zwar haben Makrophagen organspezifische Aufgaben, doch sie alle sind in der Lage, Partikel zu phagozytieren (Lüllmann-Rauch, 2003). Makrophagen können über die Ausschüttung von Zytokinen andere Abwehrzellen aktivieren. Beispiele hierfür sind Granulozyten und Lymphozyten, welche ebenfalls Vertreter der Immunabwehr sind (Lüllmann-Rauch, 2003).

In dieser Arbeit sind Makrophagen als Stellvertreter des zellulären Abwehrsystems ausgewählt worden. Weitere Fragestellungen dieser Arbeit beziehen sich auf die Häufigkeit des Auftretens von Makrophagen und die räumliche Korrelation zwischen *S. aureus* und Makrophagen.

**Fragestellung 4: Gibt es einen Unterschied zwischen Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis und Normalkontrollen hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens von Makrophagen?**

**Fragestellung 5: Kann bei einem Nachweis von *S. aureus* ein verminderter Nachweis von Makrophagen bei GPA-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen beobachtet werden?**

## **2. Material und Methoden**

Nach Zustimmung der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel wurde die Studie in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (letzte Revision im Oktober 2008) durchgeführt.

### **2.1 Patientengruppen**

Insgesamt erfolgte die Untersuchung von 23 Biopsien. Zu der Gruppe der Patienten mit GPA zählten dabei 11 Patienten, wovon 2 therapierefraktär waren. Die weiteren 12 Personen waren Normalkontrollen.

Die Gruppe der GPA-Patienten setzte sich aus 4 Frauen und 7 Männern im Alter von 26 bis 77 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 57,8 Jahren zum Untersuchungszeitpunkt zusammen. Die Diagnose bestand zum Untersuchungszeitpunkt zwischen 3 Monaten und nahezu 9 Jahren.

Ähnlich war die Verteilung der Normalkontrollen mit 4 Frauen und 8 Männern im Alter von 19 bis 68 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 41,6 Jahren. Dieses Patientenkollektiv war frei von autoimmunen Erkrankungen und chronischen Nasennebenhöhlenentzündungen. Auch lagen bei dieser Patientengruppe keine akuten Entzündungen vor.

Zum Untersuchungszeitpunkt konnte bei 4 Patienten mit GPA eine geringe und bei 2 Patienten eine mäßige endonasale Aktivität der Erkrankung festgestellt werden. Bei den weiteren 5 GPA-Patienten wurde keine endonasale Aktivität festgestellt.

Bei 10 der Patienten mit GPA erfolgte die Einnahme von Prednisolon, einem Glukokortikoid mit entzündungshemmenden Eigenschaften (Barnes, 1998). Die Dosierung von Prednisolon lag zwischen 2,5 und 40 mg pro Tag. Die durchschnittliche Dosierung des Prednisolons der 10 Patienten mit GPA lag bei 11,6 mg pro Tag.

Immunsuppressive Medikamente, als verwendete Vertreter seien hier Cyclophosphamid, Azathioprin, Methotrexat, Rituximab und Leflunomid genannt, wurden von 10 Patienten mit GPA eingenommen.

Ein Patient mit GPA nahm weder Glucocortikoide noch Immunsuppressiva ein.

In Untersuchungen auf C-ANCA konnte bei 7 Patienten mit GPA festgestellt werden, dass diese C-ANCA positiv waren. Bei weiteren 3 Patienten konnten keine C-ANCA nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurden ebenfalls die P-ANCA Werte untersucht mit folgendem Ergebnis: Bei einem C-ANCA negativen Patienten konnte ein positiver P-ANCA-Wert nachgewiesen werden. Alle übrigen 10 Patienten mit GPA zeigten sich P-ANCA negativ zum Untersuchungszeitpunkt.

Im Vasculitis Damage Index (VDI), ein Index zur Messung des Outcomes der Vasculitis und Beurteilung der Effektivität der Therapie (Luqmani, 2014), werden folgende Symptombereiche beurteilt: Muskuloskeletal, Haut und Schleimhäute, Augen, Hals-Nasen-Ohren, pulmonal, kardiovaskulär, periphere Gefäßerkrankungen, gastrointestinal, renal, neuropsychiatrisch und weitere (zum Beispiel Diabetes, maligne Erkrankungen). Insgesamt sind 64 Punkte zu beurteilen, mit einer höchstmöglichen Punktzahl von 64. Bei den 11 Patienten mit GPA in unseren Untersuchungen lagen im Durchschnitt 2 Punkte vor, wobei 3 Patienten einen Punkt hatten, 4 Patienten 2 Punkte, 2 Patienten 3 Punkte sowie ein Patient 4 Punkte und ein Patient keinen Punkt.

Ein weiterer Index, welcher verwendet wurde, ist der Disease Extent Index. Dieser Index wird zur Beurteilung des Ausmaßes der Erkrankung und der Krankheitsaktivität bei Patienten mit Vaskulitiden, welche mit ANCA assoziiert sind, herangezogen (de Groot et al., 2001). Folgende Organmanifestationen finden dabei Berücksichtigung: Hals-Nasen-Ohren und oberer Respirationstrakt, entzündliche Augenläsionen, Herz, Lunge und unterer Respirationstrakt, Nieren, gastrointestinaler Trakt, peripheres Nervensystem, zentrales Nervensystem, Haut, Arthralgien und Arthritiden sowie konstitutionelle Symptome. Die höchstmögliche Punktzahl beträgt 21, wobei kein Punkt eine völlige Remission bedeutet. In unseren Untersuchungen hatten 4 der 11 Patienten mit GPA 2 Punkte, 2 Patienten 4 Punkte, 1 Patient 9 Punkte sowie ein weiterer Patient 11 Punkte. Weitere 3 Patienten hatten keinen Punkt, sodass sich eine durchschnittliche Punktzahl von 3,27 Punkten ergab.

Bei einer genaueren Betrachtung der einzelnen Symptomfelder zeigten sich bei 6 von 11 Patienten mit GPA Symptome im Bereich des oberen Respirationstraktes sowie bei 3 von 11 Patienten Symptome der Lunge. Ein Auftreten von Symptomen der Niere ließ sich bei 2 von 11 Patienten mit GPA verzeichnen.

Bei 8 Patienten mit GPA erfolgte die Entnahme von Biopsien zum histologischen Nachweis der Erkrankung. Die Entnahmelokalisationen waren Auge, Niere, Muskel oder Vulva. Bei 6 von 9 Biopsien wurde auch histologisch die Diagnose bestätigt.

## **2.2 Biopsate und Aufbereitung**

Es erfolgte die intraoperative Entnahme von respiratorischer Nasenschleimhaut aus den Conchae nasales inferiores, den unteren Nasenmuscheln. Bei der Entnahme wurde auf die Entzündungsfreiheit der Entnahmestelle geachtet. Die ausgewählte Lokalisation sollte zum Beispiel frei von Krusten, Blutauflagerungen, eitrigem Sekretionen, Ödemen oder Granulomen sein. Die Biopsien der Normalkontrollen wurden im Rahmen von Operationen bei Nasenatmungsbehinderung entnommen. Die Entnahme erfolgte ebenfalls von den Conchae nasales inferiores.

Im Anschluss an die Entnahme erfolgte die vorübergehende Lagerung in Zellmedium (Airway Epithelial Cell Growth Medium, PromoCell GmbH, Heidelberg) sowie die anschließende Fixierung der Biopsien für mindestens 24 Stunden in 4%iger, gepufferter Formaldehydlösung (Walter-CMP GmbH & Co.KG, Kiel). Die etwa 3x3 mm großen Biopsien wurden danach einer aufsteigenden Alkoholreihe zum Entzug des enthaltenen Wassers unterzogen. Dabei erfolgte für jeweils 30 min die Lagerung in 70%igem, 80%igem, 2 x 96%igem (Büfa Chemikalien GmbH & Co.KG; Hude/Alt Moorhausen), 2 x 100%igem Äthanol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) und 2 x Aceton (J.T. Baker, Deventer, Niederlande).

Nach Abschluss der Alkoholreihe wurden die Biopsien in flüssigem Paraffin (Paraplast Plus, Gewebe-Einbettmedium, McCormick Scientific LLC., St. Louis, USA) eingebettet und härteten unter Raumtemperatur aus.

Zur Verbesserung der Schnittqualität wurden die Blöcke tiefgekühlt um anschließend mittels eines Schlittenmikrotoms (Model 2050 Supercut, Reichert-Jung/Cambridge, Instruments, Nussloch) 4 µm dicke Schnitte anfertigen zu können, welche auf beschichtete Objektträger (Menzel-Gläser Superfrost ® Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen wurden (freundlicherweise in Kooperation mit A. Rösen, Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel). Bei 37°C wurden die Schnitte für mindestens 48 Stunden getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

## **2.3 Immunhistochemische Färbung**

### **2.3.1 Verwendete Primärantikörper**

*Staphylococcus aureus* wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen Protein A (Clone SP-27, Spezies: Maus, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), welches auf der Zelloberfläche von *S. aureus* exprimiert wird, angefärbt.

In einer weiteren Färbereihe wurde Fibronectin mit Hilfe eines monoklonalen antihumanen Fibronectin-Antikörpers (Fn-3, Spezies Maus, Abcam, Cambridge, UK) angefärbt.

Zur Darstellung der Makrophagen erfolgte die Anfärbung der Präparate mit dem monoklonalen Mausantikörper KP1 (Abcam, Cambridge, UK), welcher gegen CD 68 gerichtet ist (Warnke et al., 1989, Lin, C.Y. et al., 2005). In der Literatur wird eine konstante und verlässliche Anfärbung durch diesen Antikörper beschrieben (Facchetti et al., 1991).

### **2.3.2 Färbung**

Begonnen wurde die Färbung in einem Bad aus Xylolersatz (XEM-200, National diagnostics, Vogel GmbH KG, Gießen) für zwei Mal 10 min, gefolgt von zwei Mal 10 min in 100%igem Äthanol. Dann folgten zwei Mal 5 min in 96%igem Äthanol, ein Mal 5 min in 80%igem Äthanol und zum Abschluss ein Mal 5 min in 70%igem Äthanol.

Nach der oben beschriebenen Entparaffinisierung wurden die Objektträger für wenige Sekunden in Aqua destillata gespült und dann für 10 min in einem Bad aus TBS (Tris-gepufferte Salzlösung, 150 mM Natriumchlorid, 50 mM Tris-Chlorwasserstoff) mit einem pH-Wert von 7,4 rehydriert.

Anschließend erfolgte die Antigen-Demaskierung in einem 0,01 M Citratpuffer (10 mM Citronensäure-Monohydrat, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) bei einem pH-Wert von 6,0. Die Objektträger in der Glasschale wurden locker abgedeckt und für zwei Mal 7 min bei 450 W in einer Mikrowelle erhitzt. Nach den ersten 7 min wurde kontrolliert, wie viel Flüssigkeit bei dem Vorgang verdunstet war und gegebenenfalls mit Aqua destillata aufgefüllt.

Nach dem Erhitzen kühlten die Schnitte für 15 min in demselben Citratpuffer ab und wurden danach für wenige Sekunden in Aqua destillata gespült.

Nun folgte das Blocken der endogenen Peroxidase mit 1%iger Peroxidaselösung. Dafür wurde zuvor die überschüssige Flüssigkeit von den Objektträgern heruntergeschüttelt und nicht gewischt, damit die Biopsien so wenig wie möglich tangiert und dadurch verunreinigt wurden. Im Anschluss wurden die Objektträger für 10 min in die Peroxidaselösung, bestehend aus 100 ml Methanol (Merck KGaA, Darmstadt) und hinzugesetztem 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid, 30%, J.T. Baker, Deventer, Niederlande), gestellt.

Erneut wurde die Flüssigkeit entfernt und dann die Schnitte zuerst für einige Sekunden in Aqua destillata und anschließend in TBS gespült. Es folgte das Blocken mit einer 3%igen Blockinglösung bestehend aus 30 µl Normalserum vom Kaninchen (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) und 970 µl TBS. Es wurde mit dem Serum des Tieres geblockt, von welchem auch der Sekundärantikörper stammte. Die Beschreibung dieses Arbeitsschrittes erfolgt im weiteren Verlauf.

Nach 15 min wurde die überschüssige Flüssigkeit von den Objektträgern entfernt ohne die Biopsate zu berühren. Es schloss sich die 60 minütige Inkubation mit dem Primärantikörper an.

Bei der Anfärbung der *S. aureus*-Bakterien handelte es sich um eine Konzentration von 1 µl Antikörper:4000 µl TBS. Um die Makrophagen histologisch darstellen zu können, erfolgte die Anfärbung mit einer Konzentration von 1 µl Antikörper:400 µl TBS. Bei der Darstellung des Fibronektins erwies sich eine Konzentration von 0,5 µg Antikörper pro 1 ml TBS am effektivsten.



Nach 60 min wurde die noch übrige Flüssigkeit von den Objektträgern entfernt. Die Träger wurden daraufhin für 3 Mal je 5 min in TBS gespült. Erneut wurde die Flüssigkeit von den Schnitten herunter geschüttelt und der Sekundärantikörper für 30 min aufgetragen. Der polyklonale Sekundärantikörper, Kaninchen-Immunglobulin, anti-Maus (biotinyliert, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) wurde in einer Konzentration von 1 µl Antikörper:100 µl TBS verwendet. Danach folgte erneut das Spülen mit TBS, jedoch nun für 3 Mal je 10 min. Zeitgleich wurde der Vectastain Elite ABC-Komplex (Vector Laboratories, Burlingame, USA) angemischt, da dieser 30 min vor dem Auftragen ruhen sollte.

Der ABC-Komplex bestand aus 5 ml TBS sowie 2 Tropfen der Substanz A und 2 Tropfen der Substanz B. Dieser ABC-Komplex wurde für 30 min aufgetragen, nachdem die Objektträger von überschüssiger Flüssigkeit nach dem bereits beschriebenen Prinzip befreit wurden.

Erneut erfolgte danach die Spülung der Schnitte für 3 Mal je 5min in TBS. Nun wurde das Vector NovaRed™ Substrat (Substratkit für Peroxidase, Vector Laboratories, Burlingame, USA) auf die Schnitte aufgetragen, welches laut Produktinformation erst kurz vorher angemischt werden durfte. Es bestand aus 5ml TBS, 3 Tropfen der Flüssigkeit 1 und jeweils 2 Tropfen der Flüssigkeiten 2, 3 und 4. Bei der Anfärbung der Makrophagen und der Bakterien verblieb das Substrat für 2 min auf den Objektträgern. Lediglich bei der Anfärbung des Fibronektins wurde das Substrat für 3 min aufgetragen. Die Zeit musste dabei exakt gemessen werden, da sonst erhebliche Unterschiede in der Intensität der Anfärbung zu sehen sein würden. Dies konnte in den zu Beginn zur Prozessoptimierung durchgeführten Probefärbungen beobachtet werden.

Nach der angegebenen Zeit wurde die Färbung gestoppt indem die Objektträger für 10 min in einem Bad aus TBS ruhten. Es folgte die Gegenfärbung mit frisch gefilterter Hämalaunlösung (Merck KGaA, Darmstadt; Filterpapier 3, qualitativ, Whatmann International Ltd., Maidstone, Großbritannien) in der Konzentration 1:2. Dieser Schritt dauerte 3 Sekunden. Auch hier war eine genaue Einhaltung der Zeit notwendig. Danach wurden die Schnitte für 10 min in einer Schale unter fließendes Wasser gestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte durch den direkten Wasserstrahl nicht beschädigt wurden.

Es folgte die Alkoholreihe, jedoch nun in entgegengesetzter Reihenfolge: 70%iger, 80%iger und zweimal 96%iger Äthanol, jeweils für wenige Sekunden. Danach folgten 2 Mal je 10 min in Xylolersatz. Zum Abschluss wurden die Schnitte eingebettet in schnell aushärtendem Eindeckmedium, Eukitt® (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und mit Menzel Deckgläschen (rund, 12 mm Durchmesser, Heinz Herne Medizinalbedarf GmbH, Hamburg) abgedeckt.

Bei den bereits erwähnten Probefärbungen wurde festgestellt, dass ein Tupfen und Wischen der Objektträger zur Reduktion der sich darauf befindenden Flüssigkeit zu einer Verunreinigung des Objektes führt, sodass das Mikroskopieren und Auffinden der Strukturen zum Teil nicht mehr möglich war. Kleine Staubpartikel waren in der Lage, das Bild des angefärbten Gewebes so zu verändern, dass ein Erkennen, zum Beispiel von *S. aureus*, nicht mehr valide möglich war.

Zur Optimierung unserer Färbeergebnisse verwendeten wir probeweise zwischen den genannten Arbeitsschritten eine Waschlösung. Diese setzte sich aus TBS und 0,05% des Detergens Tween® 20 (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) zusammen. Beim anschließenden Mikroskopieren mussten wir jedoch feststellen, dass nicht nur eine eventuelle Reinigung stattgefunden haben könnte, sondern auch, dass die in den vorherigen Schnitten sichtbar gemachten Zielstrukturen nun nicht mehr erkennbar waren. Neue Schnitte der gleichen Patientenbiopsien wurden ohne das zuvor genannte Tween® 20 Detergens angefärbt mit dem Ergebnis, dass nun die angefärbte Struktur, in diesen Fällen *S. aureus*, dargestellt werden konnte. In der daraus resultierenden Annahme, das Detergens sei verantwortlich für diesen Prozess, verzichteten wir auf deren Verwendung.

Um die ideale Anfärbung des Fibronektins zu erzielen wurde sowohl die Konzentration des Primärantikörpers variiert als auch die Einwirkzeit des Vector NovaRed™ Substrates. Die Konzentrationen des Primärantikörpers waren von 0,5 bis 2,5 µg/µl in 0,5er-Schritten. Beim anschließenden Mikroskopieren (Durchlichtmikroskop Axioplan, Zeiss, Göttingen) stellten sich alle Färbungen ab 1 µg/µl als zu intensiv dar, sodass wir uns auf die Konzentration von 0,5 µg/µl festlegten.

Ebenfalls veränderten wir die Einwirkzeiten des Vector NovaRed™-Substrates zwischen 2 bis 4,5 min. Da sich die Anfärbungen bei 4,5 min als zu intensiv darstellten und bei 2 min zum Teil zu schwach, legten wir die Einwirkzeit auf 3 min fest.

Bei der Festlegung der Konzentration des Primärantikörpers KP1 testeten wir die Konzentrationen 1:200, 1:300 und 1:400 mit einer anschließenden Einwirkzeit des Vector NovaRed™-Substrates von 2 min. Unter dem Mikroskop zeigten sich bei allen Konzentrationen angefärbte Makrophagen, sodass wir uns für die geringste Konzentration (1:400) entschieden.

### 2.3.3 Einscannen der Schnittpräparate

Um eine Standardisierung der Beurteilung der Schnitte durch die beteiligten Untersucher zu erreichen, wurden sämtliche zu untersuchenden Schnitte mittels eines Scanners (Mirax Midi, Carl Zeiss AG, Oberkochen) eingescannt.

## **2.4 Beurteilung der immunhistochemischen Präparate**

### 2.4.1 Studiendesign

In dieser retrospektiven, deskriptiven Studie erfolgte die Auswertung der 69 histologischen Schnitte durch drei unabhängige Untersucher. Dabei waren die einzelnen Präparate zufällig nummeriert, sodass eine Zugehörigkeit zur jeweiligen untersuchten Gruppe durch die Untersucher nicht feststellbar war.

### 2.4.2 Voraussetzung der Beurteilenden

Zur möglichst gleichwertigen Untersuchung der Präparate erfolgte zuvor die Unterrichtung der Untersucher sowie das Verdeutlichen von Färbeabstufungen durch Beispielaufnahmen. Des Weiteren wurde eine strukturierte Tabelle zum Eintragen der Ergebnisse (siehe 2.4.3 Tabelle 1) erläutert und nachfolgende Kriterien erklärt.

### 2.4.3 Ablauf der Beurteilung

Betrachtet wurden jeweils 2-3 Gesichtsfelder eines zufälligen Ausschnittes des Präparates für das jeweilige Kriterium. Kam es zu keiner Anfärbung, entsprach dies der Stufe 0. Stufe 1 brachte die schwache Anfärbung von Fibronectin oder *S. aureus* oder Makrophagen zum Ausdruck.

Dies bedeutet, dass die gesuchte Struktur nicht in jedem der 2-3 Gesichtsfelder gesehen werden musste, jedoch mindestens in einem. Dementsprechend ergibt sich Stufe 2 bei Detektion der Struktur in mehr als einem der 2-3 Gesichtsfelder.

Auch die Lokalisation des Auftretens der beurteilten Struktur findet Berücksichtigung in der Tabelle. Hierzu erfolgt die Unterteilung des Gewebes in die Schichten: „Epithelial“, „Subepithelial“, „Stroma“ und „Drüsen“. Anfärbungen im Epithel sind dementsprechend zwischen oder in den Epithelzellen. „Subepithelial“ ist die Beschreibung für das Areal unmittelbar unter dem Epithel. Kommt es zu angefärbten Strukturen im Bereich der Drüsen, so ist dies in der Tabelle bei „Drüsen“ zu vermerken. Eine Anfärbung in den sonstigen Bereichen des histologischen Schnittes kann unter der Beschreibung „Stroma“ erfolgen.

Da die einzelnen zu untersuchenden Strukturen verschiedene Größen aufweisen, wurde zuvor die entsprechende Vergrößerung festgelegt. Das Mikroskopieren von *S. aureus* erfolgte bei einer 40-fachen Vergrößerung. Makrophagen und Fibronectin wurden bei einer 20-fachen Vergrößerung beurteilt.

Die folgenden Bilder galten als Beispiele, in welchen ausschließlich das Vorhandensein oder das Fehlen der jeweiligen Struktur dargestellt wurde.

Abbildung 1: Anfärbung *Staphylococcus aureus* im Gewebe, *Staphylococcus aureus* vorhanden, Areale mit Pfeilen gekennzeichnet

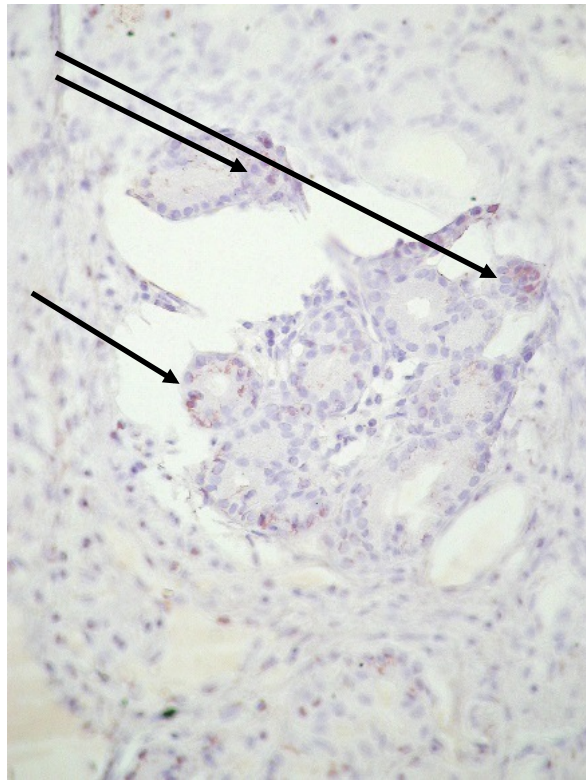


Abbildung 2: Anfärbung von *Staphylococcus aureus* im Gewebe, *Staphylococcus aureus* nicht vorhanden

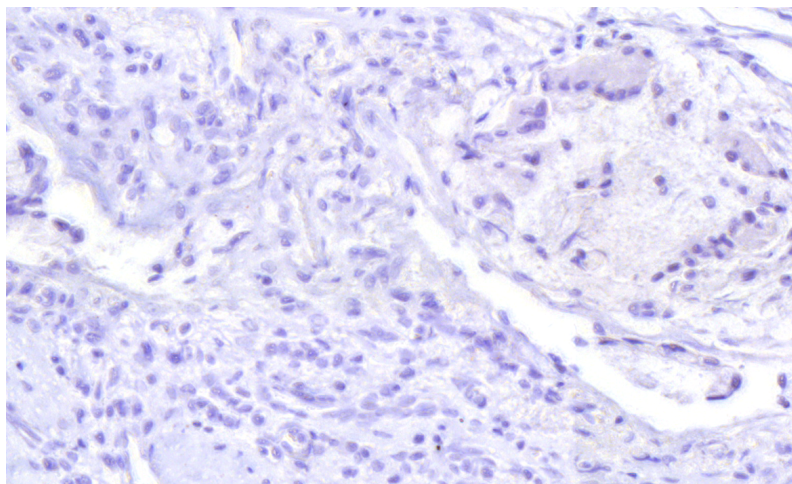


Abbildung 3: Anfärbung von Fibronektin im Gewebe, Fibronektin vorhanden

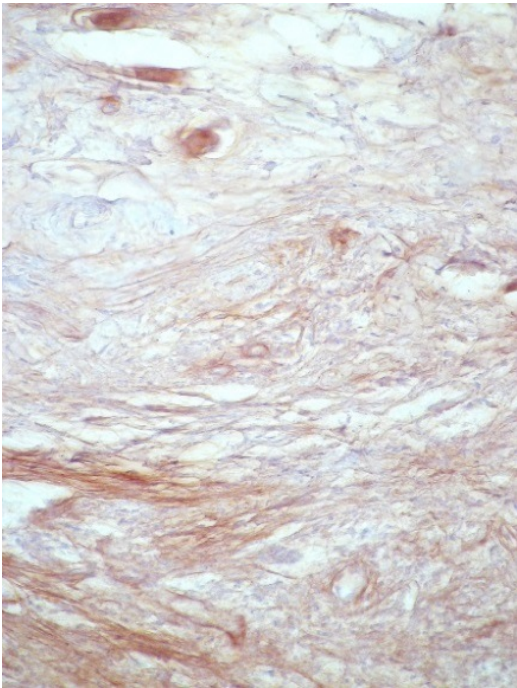


Abbildung 4: Anfärbung von Fibronektin im Gewebe, Fibronektin nicht vorhanden

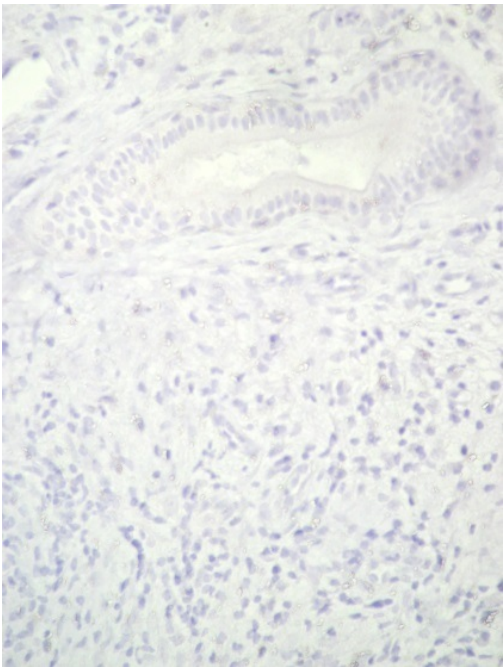


Abbildung 5: Anfärbung von Makrophagen in nasaler Schleimhaut, Makrophagen vorhanden

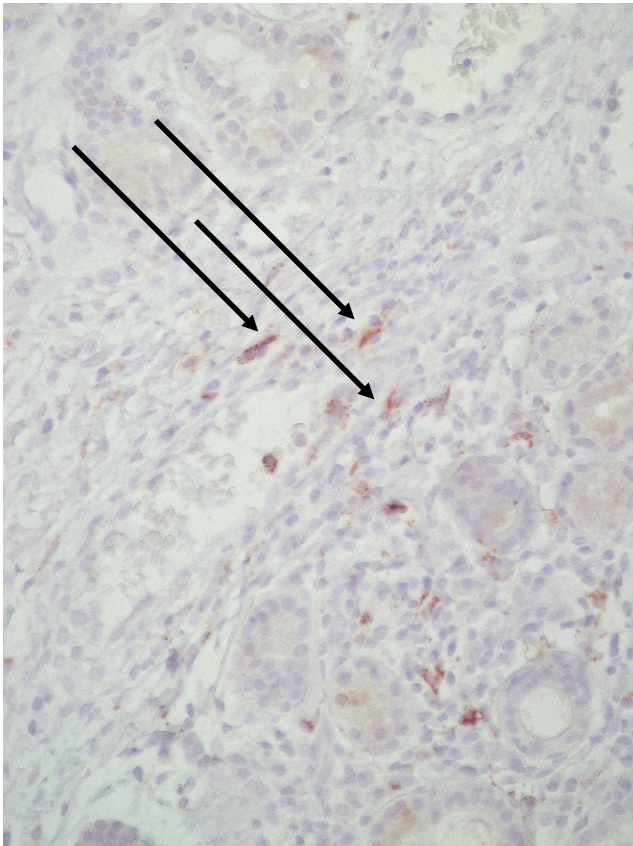
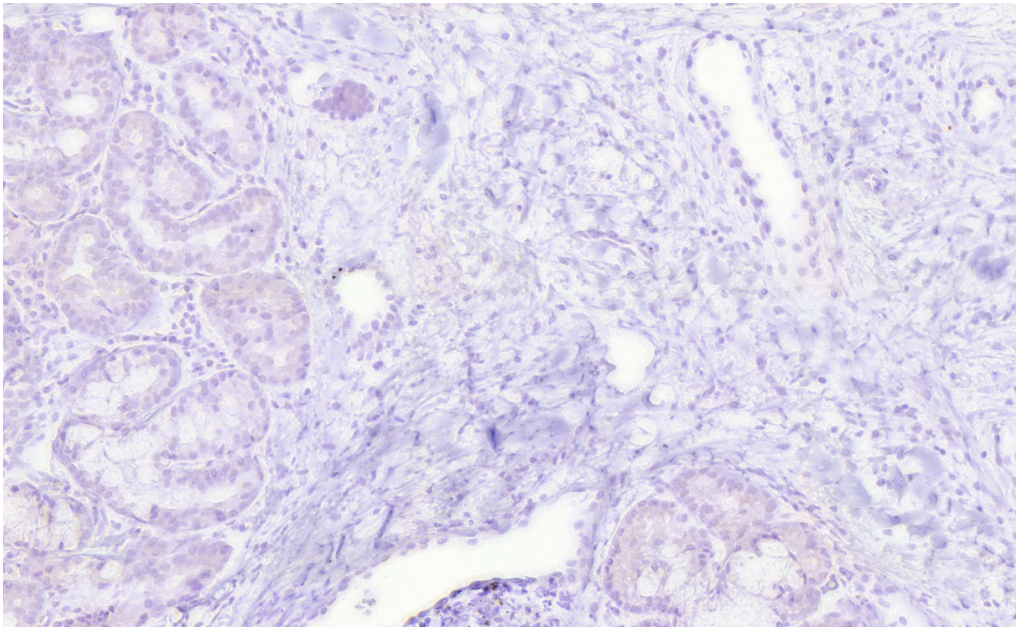


Abbildung 6: Anfärbung von Makrophagen in nasaler Schleimhaut, Makrophagen nicht vorhanden



Da in den Untersuchungen nicht nur das Vorhandensein der einzelnen Strukturen in ihrer Abstufung beurteilt wurde sondern auch die räumliche Nähe zueinander, wurde dieses Kriterium ebenfalls in die Tabelle zur Beurteilung eingefügt. Zum einen konnte eine Aussage getroffen werden, ob sich Staphylokokken in unmittelbarer Nähe zu zuvor gesichteten Makrophagen darstellen ließen. Zum anderen, ob ein eventuell vermehrtes oder vermindertes Auftreten von *S. aureus* bei fibronektinreichen Präparaten zu beobachten ist.

Tabelle 1: Tabellarischer Auswertungsbogen

Nummer		Staphylokokken			Makrophagen			Staphylokokken in unmittelbarer Nähe zu Makrophagen?		Fibronektin			Bei Staphylokokken vermehrt Fibronektin?	
		0	1	2	0	1	2	Ja	Nein	0	1	2	Ja	Nein
	Epithelial													
	Subepithelial													
	Stroma													
	Drüsen													
	Epithelial													
	Subepithelial													
	Stroma													
	Drüsen													

Nachdem die drei Untersucher sämtliche Präparate gesichtet hatten, wurden aus den Ergebnissen die Mittelwerte der einzelnen Kriterien ermittelt. Anschließend wurden die Ergebnisse zwischen den Patientengruppen verglichen und im Folgenden ausgewertet.



## **2.5 Statistische Auswertung**

Die Biopsien der insgesamt 23 Patienten wurden jeweils an 4 Lokalisationen beurteilt. Daher erfolgte die Auswertung von 48 Normalkontrollen und 44 Fällen mit GPA.

Die genannten Intensitäten wurden von 0, 1 und 2 auf Werte der Ordinalskala folgend von 1,00, 2,00 und 3,00 umgebildet und aus ihnen die Mediane ermittelt.

Zur Beurteilung des Vorliegens einer Normalverteilung erfolgte die Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Testes, welcher auch bei Stichproben eingesetzt werden kann die kleiner als 40 sind. Dem Ergebnis des Testes folgend konnte die Nullhypothese, beide Gruppen würden der Normalverteilung folgen, verworfen werden.

Dementsprechend erfolgte der Vergleich der beiden Patientengruppen bezüglich unserer genannten Hypothesen mit dem Mann-Whitney-U-Test. Dieser nichtparametrische statistische Test ist durch die mögliche Anwendung bei Nichtvorliegen einer Normalverteilung gekennzeichnet und testet zwei voneinander unabhängige Stichproben.

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde bei einem p-Wert von  $p \leq 0,05$  angenommen.

### 3. Ergebnisse

Nach dem Betrachten sämtlicher Schnitte durch die 3 unabhängigen Untersucher wurden die Ergebnisse aller in der Tabelle 2 zusammengefasst. Angegeben sind die Mediane, welche aus den Ergebnissen der 3 Untersucher gebildet wurden. Anhand dieser Tabelle erfolgte die Berechnung mittels der oben genannten statistischen Testmethoden.

Tabelle 2: Auswertung der histologischen Schnitte

Proband	Hautschicht	Staphylokokken numerisch	Makrophagen numerisch	Staphylokokken in Nähe zu Makrophagen nominal	Fibronectin numerisch	Bei Staphylokokken vermehrt Fibronectin nominal
9,00	Epithelial	2,00	2,00	1,00	1,00	2,00
9,00	Subepithelial	1,00	2,00	2,00	3,00	2,00
9,00	Stroma	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
9,00	Drüsen	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
10,00	Epithelial	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
10,00	Subepithelial	1,00	1,00	2,00	3,00	2,00
10,00	Stroma	1,00	2,00	2,00	3,00	2,00
10,00	Drüsen	2,00	2,00	1,00	1,00	2,00
135,00	Epithelial	1,00	3,00	2,00	1,00	2,00
135,00	Subepithelial	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00
135,00	Stroma	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00
135,00	Drüsen	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
149,00	Epithelial	1,00	3,00	2,00	1,00	2,00
149,00	Subepithelial	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00
149,00	Stroma	1,00	2,00	2,00	3,00	2,00
149,00	Drüsen	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
76,00	Epithelial	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00
76,00	Subepithelial	1,00	3,00	2,00	1,00	2,00
76,00	Stroma	1,00	3,00	2,00	3,00	2,00
76,00	Drüsen	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00
83,00	Epithelial	2,00	3,00	1,00	1,00	2,00
83,00	Subepithelial	1,00	3,00	2,00	1,00	2,00
83,00	Stroma	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00
83,00	Drüsen	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
91,00	Epithelial	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
91,00	Subepithelial	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00
91,00	Stroma	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
91,00	Drüsen	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
104,00	Epithelial	1,00	3,00	2,00	1,00	2,00
104,00	Subepithelial	1,00	3,00	2,00	1,00	2,00
104,00	Stroma	1,00	3,00	2,00	1,00	2,00

104,00	Drüsen	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
34,00	Epithelial	3,00	3,00	1,00	1,00	2,00
34,00	Subepithelial	3,00	3,00	1,00	1,00	2,00
34,00	Stroma	2,00	3,00	1,00	1,00	2,00
34,00	Drüsen	3,00	2,00	1,00	2,00	1,00
49,00	Epithelial	1,00	1,00	2,00	data missing	data missing
49,00	Subepithelial	2,00	1,00	2,00	data missing	data missing
49,00	Stroma	1,00	1,00	2,00	data missing	data missing
49,00	Drüsen	2,00	1,00	2,00	data missing	data missing
50,00	Epithelial	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
50,00	Subepithelial	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
50,00	Stroma	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
50,00	Drüsen	3,00	1,00	2,00	1,00	2,00
57,00	Epithelial	2,00	2,00	1,00	1,00	2,00
57,00	Subepithelial	1,00	3,00	2,00	1,00	2,00
57,00	Stroma	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
57,00	Drüsen	2,00	3,00	1,00	1,00	2,00
8,00	Epithelial	1,00	3,00	2,00	1,00	2,00
8,00	Subepithelial	1,00	2,00	2,00	3,00	2,00
8,00	Stroma	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00
8,00	Drüsen	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
13,00	Epithelial	2,00	2,00	1,00	1,00	2,00
13,00	Subepithelial	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
13,00	Stroma	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
13,00	Drüsen	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
19,00	Epithelial	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
19,00	Subepithelial	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
19,00	Stroma	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
19,00	Drüsen	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
26,00	Epithelial	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00
26,00	Subepithelial	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00
26,00	Stroma	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00
26,00	Drüsen	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
157,00	Epithelial	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
157,00	Subepithelial	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
157,00	Stroma	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
157,00	Drüsen	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
177,00	Epithelial	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
177,00	Subepithelial	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
177,00	Stroma	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
177,00	Drüsen	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
195,00	Epithelial	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00
195,00	Subepithelial	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
195,00	Stroma	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00

195,00	Drüsen	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
77,00	Epithelial	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
77,00	Subepithelial	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00
77,00	Stroma	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
77,00	Drüsen	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00
122,00	Epithelial	1,00	3,00	2,00	1,00	2,00
122,00	Subepithelial	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00
122,00	Stroma	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
122,00	Drüsen	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
62,00	Epithelial	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
62,00	Subepithelial	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
62,00	Stroma	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
62,00	Drüsen	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
63,00	Epithelial	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
63,00	Subepithelial	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00
63,00	Stroma	1,00	1,00	2,00	3,00	2,00
63,00	Drüsen	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00

### 3.1 Nachweis von *Staphylococcus aureus*

Werden alle histologischen Schnitte beider Patientengruppen bezüglich des Auftretens von *S. aureus* miteinander verglichen, so kann mit einem p-Wert von 0,268 kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies bedeutet hinsichtlich der 1. Fragestellung, dass histologisch ein vermehrter Nachweis von *S. aureus* bei GPA-Patienten im Vergleich zu den Patienten der Normalkontrollen nicht erfolgte.

Abbildung 7: Anfärbung von *Staphylococcus aureus* bei GPA-Patient

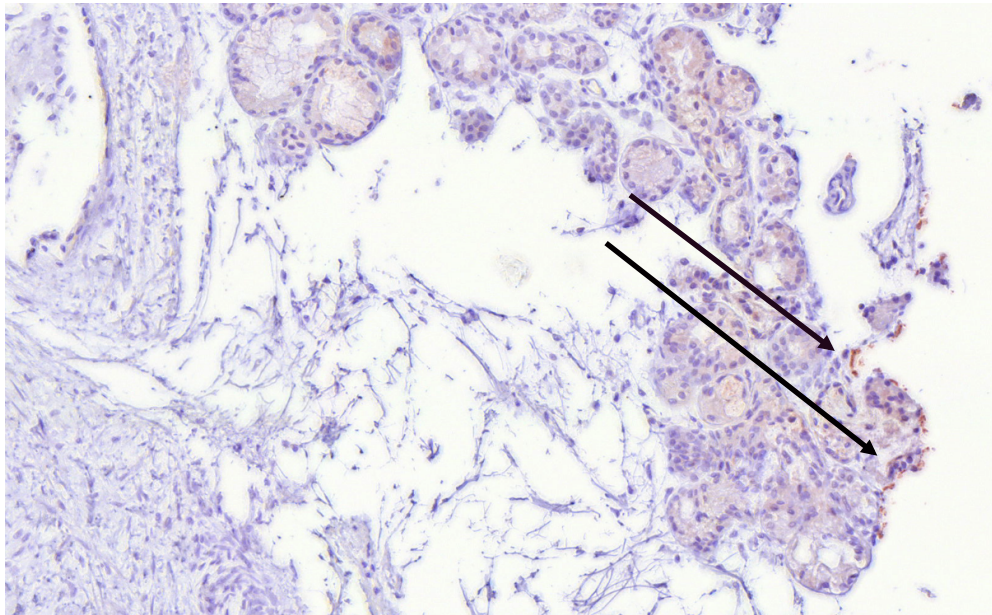
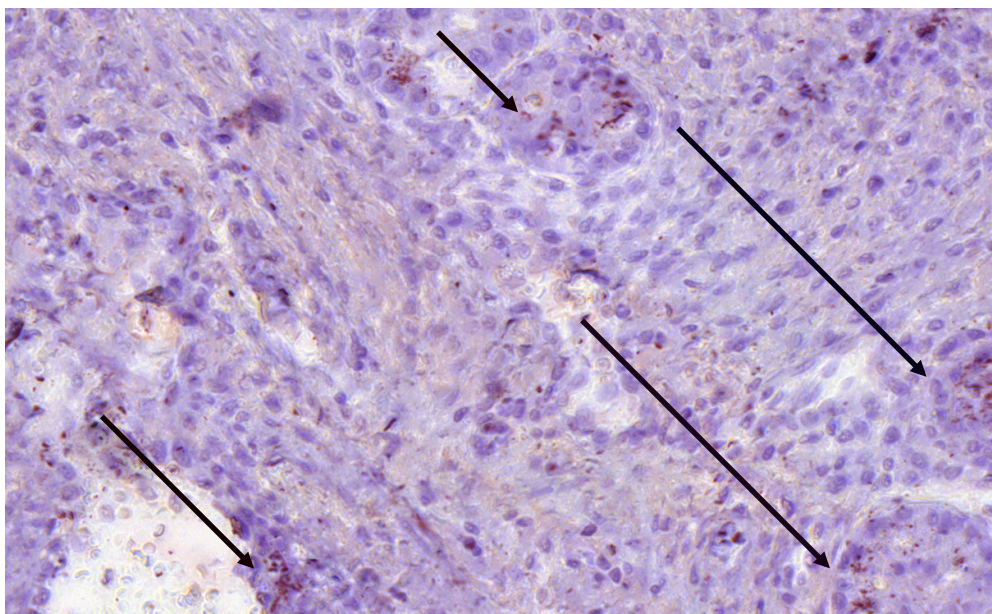


Abbildung 8: Anfärbung von *Staphylococcus aureus* bei Normalkontrolle



### **3.2 Nachweis von Fibronectin**

Im Anschluss erfolgte die Betrachtung der auf Fibronectin angefärbten Präparate. Hierbei zeigte sich zwischen den Patienten mit GPA und den Normalkontrollen kein signifikanter Unterschied ( $p=0,830$ ). Bezugnehmend auf die 2. Fragestellung kann somit die Aussage getroffen werden, dass bei Patienten mit GPA kein Nachweis eines vermehrten oder verminderten Fibronektingehaltes möglich war.

Abbildung 9: Anfärbung von Fibronectin bei GPA-Patient

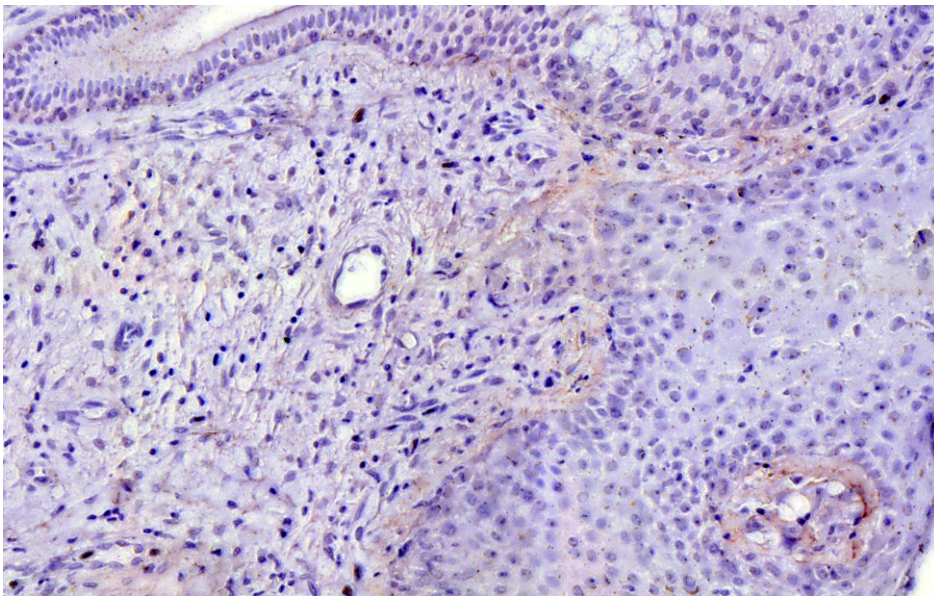
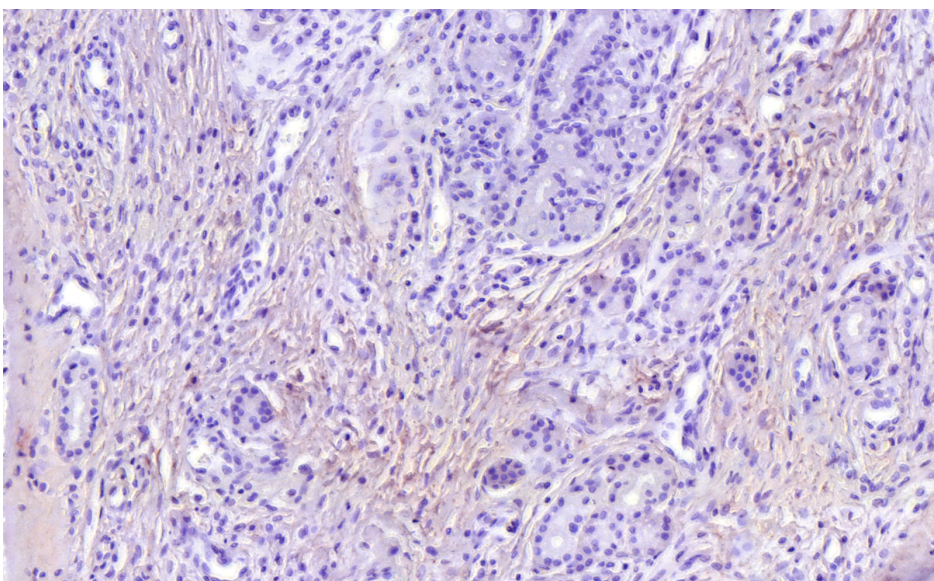


Abbildung 10: Anfärbung von Fibronectin bei Normalkontrolle



### **3.3 Korrelation zwischen Fibronektin und *Staphylococcus aureus***

Die 3. Fragestellung sollte klären, wie der Fibronektin Gehalt und *S. aureus* zueinander im Verhältnis stehen und wie dieses Merkmal zwischen den Patientengruppen ausgebildet ist. Nach Auswertung der Ergebnisse der Untersucher konnte eine vermehrte Anfärbbarkeit von Fibronektin in der Nähe von angefärbten *S. aureus*-Arealen nicht festgestellt werden. Mit einem p-Wert von 1,000 wurde ein signifikanter Unterschied dieses Merkmals zwischen den Patientengruppen nicht festgestellt.

Abbildung 11, 12: Anfärbung von Fibronektin (li) und *Staphylococcus aureus* (re) bei GPA-Patient (Serienschnitte)

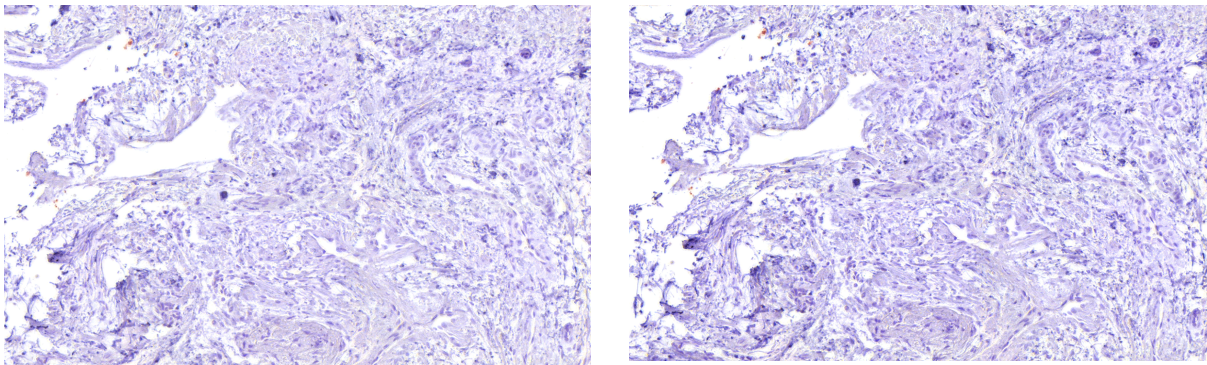
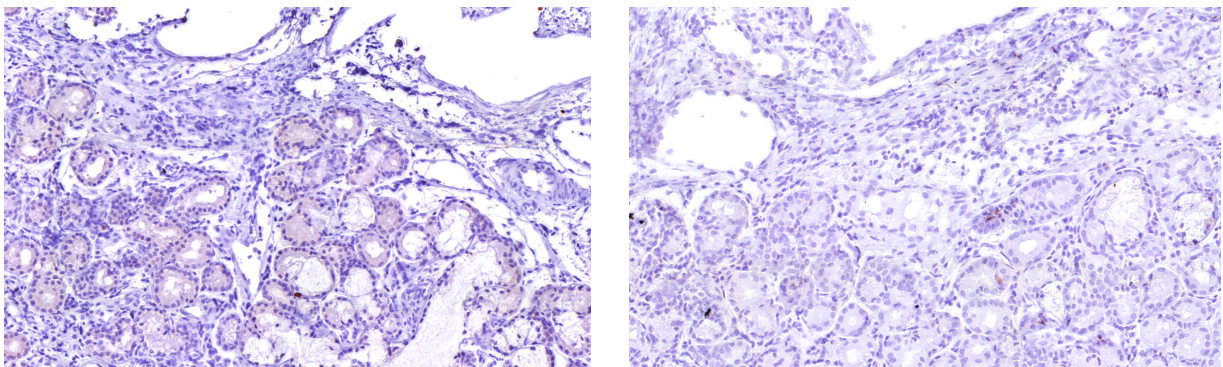


Abbildung 13, 14: Anfärbung von Fibronektin (li) und *Staphylococcus aureus* (re) bei Normalkontrolle (Serienschnitte)



### **3.4 Nachweis von Makrophagen**

Makrophagen stellen die dritte Struktur dar, welche in den Präparaten untersucht wurde. Nach der immunhistochemischen Färbung zeigte sich bei Patienten mit GPA ein signifikant geringeres Auftreten von Makrophagen im Vergleich zu den Normalkontrollen ( $p=0,001$ ). Stellvertretend hierfür folgen die Abbildungen 15 und 16, wobei letztere eine deutlich häufigere Anfärbung von Makrophagen zeigt.

Abbildung 15: Anfärbung von Makrophagen bei Patient mit GPA

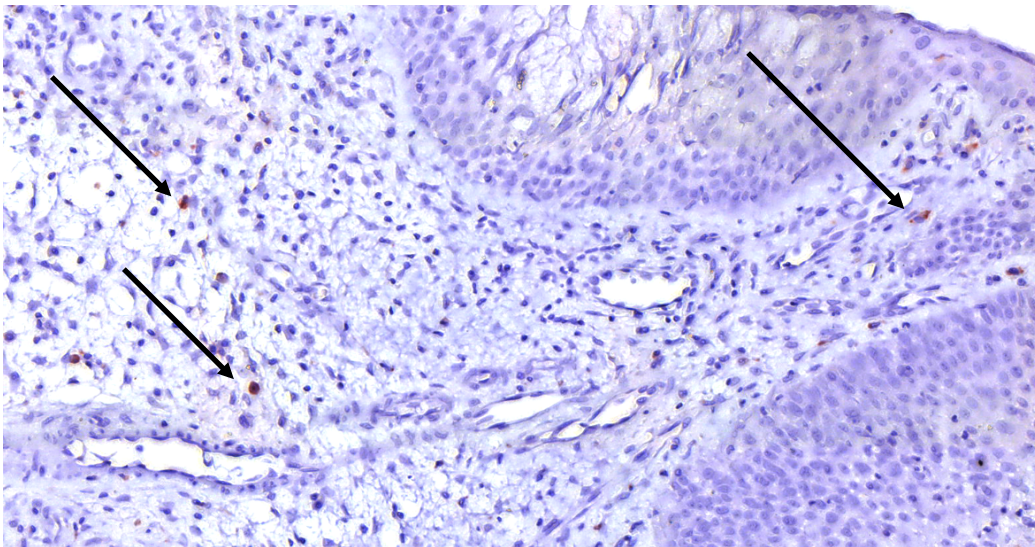
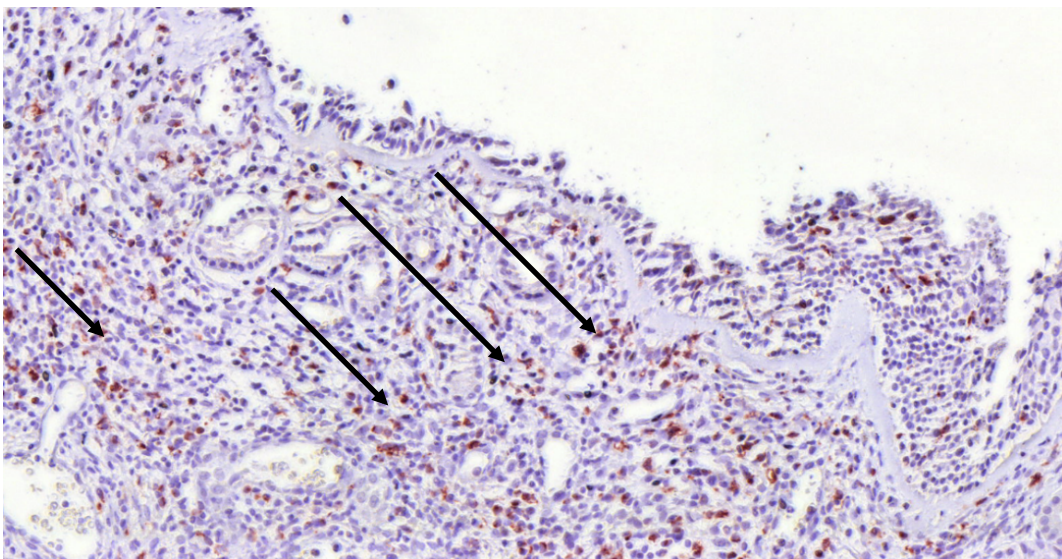


Abbildung 16: Anfärbung von Makrophagen bei Normalkontrolle



Bezug nehmend auf die 4. Fragestellung besteht somit ein Unterschied bezüglich des Auftretens von Makrophagen zwischen den Patientengruppen.



### 3.5 Korrelation zwischen Makrophagen und *Staphylococcus aureus*

Ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *S. aureus* und Makrophagen besteht und ob es bezüglich dieses Merkmals einen Unterschied zwischen den Patientengruppen gibt, sollte mit der 5. Fragestellung geklärt werden. Mit Hilfe der durchgeführten Untersuchungen gelang ein signifikant seltenerer Nachweis von Makrophagen in der Nähe zu *S. aureus* bei GPA-Patienten im Vergleich zu den Normalkontrollen ( $p=0,012$ ).

Abbildung 17: Anfärbung von Makrophagen bei GPA

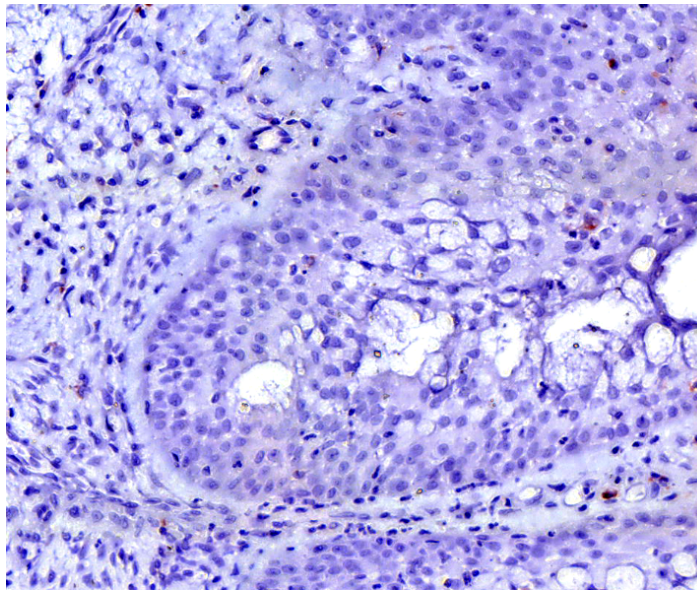


Abbildung 18: Anfärbung von *Staphylococcus aureus* bei GPA (Serienschnitt zu Abb. 17)

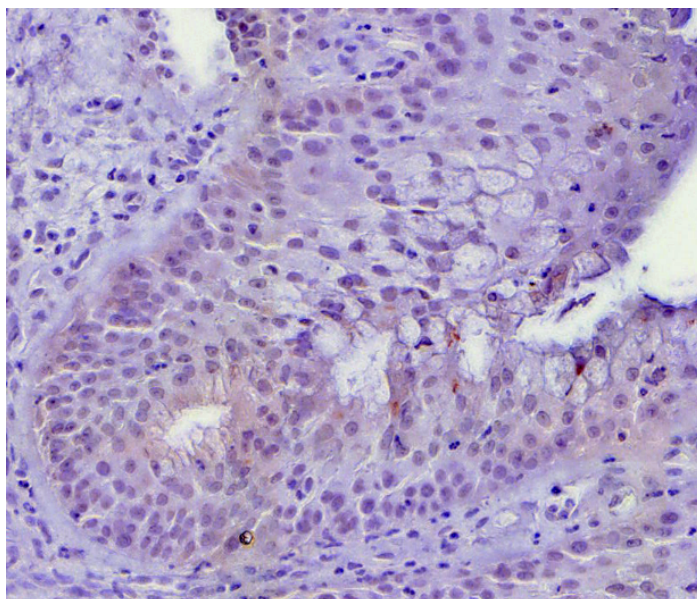


Abbildung 19: Anfärbung von Makrophagen bei Normalkontrolle

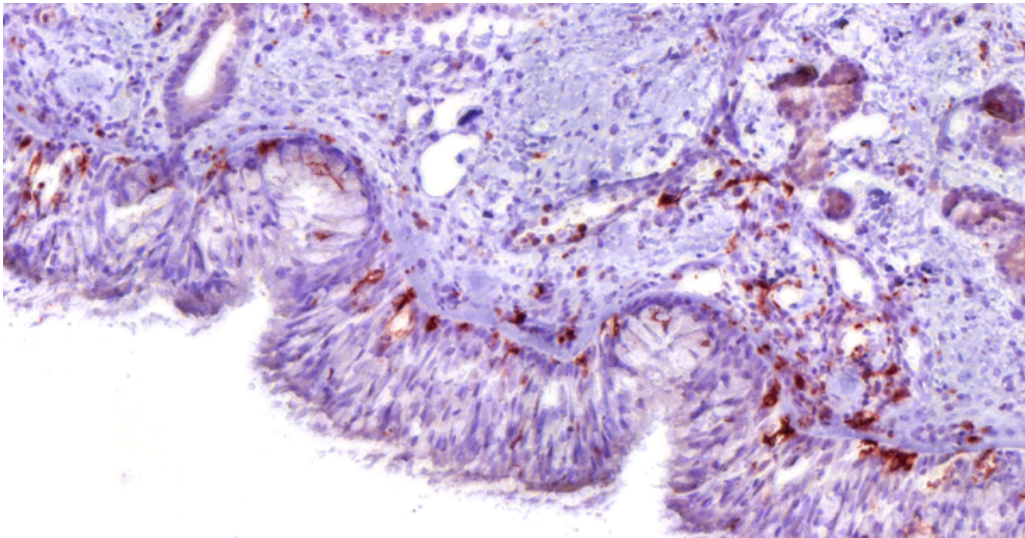
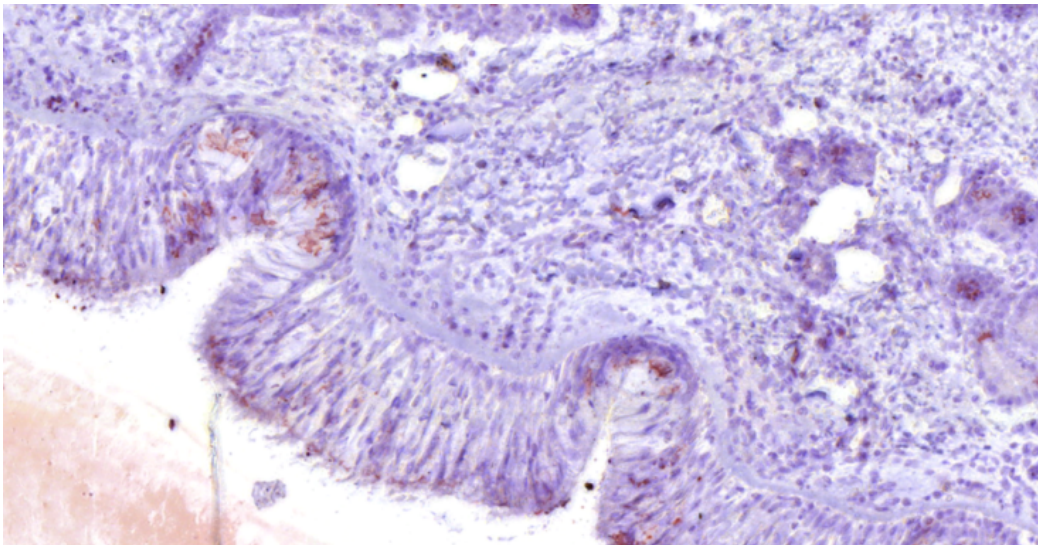


Abbildung 20: Anfärbung von *Staphylococcus aureus* bei Normalkontrolle  
(Serienschnitt zu Abb. 19)



## 4. Diskussion

### 4.1 Nachweis von *Staphylococcus aureus*

Bei der immunhistochemischen Färbung von *S. aureus* wäre ein vermehrtes Auftreten von *S. aureus* in der Gruppe der GPA-Patienten aufgrund der schlechteren Immunabwehr dieser Patientengruppe denkbar gewesen. Auch in der Literatur wird im Allgemeinen beschrieben, dass 60-70% der GPA-Patienten *S. aureus*-Träger sind (Ohlsson et al., 2012) sowie 20-30% der gesunden Bevölkerung (Glasner et al., 2015). Jedoch zeigte sich eine scheinbar gleiche Häufigkeit des Auftretens in beiden Patientengruppen in unseren Untersuchungen. Möglich wäre eine tatsächlich ausgewogene Verteilung von *S. aureus* sowohl in der GPA-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe.

Eine weitere Möglichkeit ist die anzunehmende ungleichmäßige, nicht ubiquitäre Verteilung von *S. aureus* in der Nasenschleimhaut. Die Biopsieentnahmestelle könnte daher auch ohne *S. aureus*-Besiedelung gewesen sein, obwohl der Patient *S. aureus*-Träger war.

Üblicherweise werden Abstriche 1-2 cm von den Nasenostien entfernt entnommen. In einer Studie, bei welcher Abstriche von der Nasenschleimhaut entnommen wurden und strikt auf eine Kontamination durch den Bereich der Naseneingänge geachtet wurde, wurde *S. aureus* nur in 32% anstatt zuvor in 76% von insgesamt 34 Probanden nachgewiesen (Moss et al., 1948).

Des Weiteren ist zu bedenken, ob das Auftreten von *S. aureus* durch eine gegebenenfalls vorhandene Immunsuppression des Patienten mit GPA beeinflusst werden kann. In einer Studie von 2015 wurde die nasale Besiedlung von *S. aureus* während der Einnahme von Rituximab untersucht (Besada et al., 2015). Rituximab ist ein immunsuppressives Medikament, welches unter anderem zur Induktionstherapie bei GPA verwendet wird (Azar et al., 2014). In der eben genannten Studie wurden 29 Patienten mit GPA vor und während der Einnahme des Immunsuppressivums Abstriche der Nase entnommen und untersucht. Es wurde dabei gezeigt, dass die Einnahme von Rituximab keinen Einfluss auf die nasale Besiedlung mit *S. aureus* hat.

## **4.2 Nachweis von Fibronektin**

Fibronektin wurde als ein Baustein der Extrazellulärmatrix angefärbt, um möglicherweise Unterschiede zwischen den Patientengruppen aufzeigen zu können.

Die ebenso schwache, beziehungsweise ebenso starke Anfärbung von Fibronektin und *S. aureus* in unseren Untersuchungen bei den Normalkontrollen und bei den Patienten mit GPA ist möglicherweise durch einen nur marginalen Unterschied in der Verteilung zwischen den Patientengruppen begründbar.

In dem Abschnitt 2.3.2 Färbung wurde bereits auf die Optimierung der Färbeergebnisse eingegangen. Neben den bereits beschriebenen Versuchen zur Optimierung der Färbeergebnisse wurde auch die Konzentration des Primärantikörpers für Fibronektin variiert um auf der einen Seite eine garantierte, aber auf der anderen Seite nicht zu intensive Färbung des Fibronektins zu erzielen.

Weiterhin beinhaltet der Färbeprozess einige Arbeitsschritte, welche nur wenige Sekunden andauern. So zum Beispiel auch die Anfärbung des Objektes mit Hämalaun gegen Ende des Färbeprotokolls. Hierfür sind lediglich 3 Sekunden vorgesehen. Es ist denkbar, dass eine Veränderung der Anfärbezeit mit Hämalaun um Bruchteile von Sekunden zu einer Veränderung des Erscheinungsbildes des Fibronektins führen kann. Daraus resultierend kann es zu einer Beeinflussung der Ergebnisse kommen.

Betrachtet man die auf Fibronektin angefärbten Schnitte verschiedener Patienten sind wohl Unterschiede erkennbar. Dies ist auch anhand der Tabelle 2 im Kapitel Ergebnisse nachvollziehbar. Durch die Auswahl von zufälligen Gesichtsfeldern der Schnitte sind Unterschiede in der Intensität des Fibronektins möglich. Daher kann dies zu einer scheinbar gleichmäßigen Verteilung dieser Struktur in beiden Patientengruppen beigetragen haben. Tatsächlich vorhandene Unterschiede sollten sich dennoch durch den gewählten Versuchsaufbau mit der verwendeten Anzahl der Schnitte sowie der Anzahl der Untersucher darstellen lassen.

Ebenfalls möglich könnte eine insuffiziente oder fehlende Heraufregulation des Fibronektins bei Befall mit *S. aureus* sein. Die Möglichkeit der Heraufregulierung von Fibronektin ist in Studien ebenfalls immunhistochemisch gezeigt worden, zum Beispiel bei einer Form der kongenitalen Muskeldystrophie (Mehuron et al., 2014). Aber auch bei einer Infektion mit dem Ebolavirus im Rahmen einer Studie ist eine Heraufregulation von Fibronektin gezeigt worden (Kindrachuk et al., 2014). Da das Auftreten von *S. aureus* nicht mit einer vermehrten Anreicherung von Fibronektin bei GPA in unseren Untersuchungen beantwortet wurde, spricht dies für eine Störung des Abwehrmechanismus.

In Untersuchungen vom April 2015 ist eine vermehrte Expression von Genen, welche an der Zelladhäsion beteiligt sind, bei GPA-Patienten gezeigt worden (Grayson et al., 2015). So war auch die Expression des Gens für Fibronektin 1, ein Untertyp des Fibronektins, bei Patienten mit GPA erhöht im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Gruppe aus Gesunden, Patienten mit Sarkoidose und Patienten mit allergischer Rhinitis). Auf ein eventuell ebenfalls vermehrtes Auftreten von Fibronektin auf Proteinebene wird in dieser Studie nicht eingegangen. Des Weiteren besteht die Kontrollgruppe nicht ausschließlich aus gesunden Patienten, wodurch eine unmittelbare Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit unseren nicht gegeben ist.

### **4.3 Korrelation zwischen Fibronectin und *Staphylococcus aureus***

Bei dem Betrachten von zwei unmittelbar benachbarten Schnitten einer Biopsie sollte festgestellt werden, ob an der Position, an welcher *S. aureus* detektiert wurde, auch ein vermehrtes Auftreten von Fibronectin festgestellt werden konnte. Bei beiden Patientengruppen ist diese Koexistenz nicht festgestellt worden und daher ist auch bei einem Vergleich dieses Merkmals zwischen beiden Patientengruppen kein Unterschied aufgezeigt worden.

Zu erwarten wäre in der Gruppe der Normalkontrollen eine vermehrte Fibronectinanreicherung an Stellen der *S. aureus*-Detektion als Ausdruck der Abwehr von Bakterien. Analog dazu wäre eine verminderte Anfärbbarkeit des Fibronectins bei eventuell gestörten Abwehrmechanismen in der GPA-Gruppe zu erwarten gewesen.

Die möglichen Fehlerquellen sind dabei ähnlich, wie in den beiden zuvor genannten Abschnitten. Möglicherweise ist das immunhistochemische Nachweisverfahren für die quantitative Bestimmung von Fibronectin zwischen diesen Patientengruppen nicht ausreichend sensitiv, bei eventuell nur marginalen Unterschieden der Verteilung dieser Zellstruktur.

Eine prinzipielle Eignung des immunhistochemischen Nachweisverfahrens zur quantitativen Bestimmung von Fibronectin wurde allerdings in Studien gezeigt (Mehuron et al., 2014, Moradi et al., 2015). Ebenso wurde in einer Studie zur Bestimmung von Fibronectin beim Prostatacarcinom das immunhistochemische Nachweisverfahren gewählt (Kolijn et al., 2015).

Eine Fehlerquelle kann in der geringen Größe der *S. aureus*-Bakterien liegen, welche zu einem Übersehen dieses Untersuchungsmerkmals geführt haben könnte.

Bei dem Betrachten von zwei benachbarten Schnitten wäre es möglich, dass der Abstand zwischen dem einen und dem anderen Schnitt dennoch so groß war, dass eine zu erwartende Zellstruktur bereits wieder aus dem Betrachtungsfeld verschwunden war. Dieses Problem dürfte eventuell eher bei *S. aureus* Bakterien eine Rolle gespielt haben, da diese meist gebündelt punktuell auftraten. Fibronectin hingegen ist meist flächig erschienen, sodass in benachbarten Schnitten ein Verschwinden bzw. eine Reduktion dieser Struktur der Extrazellulärmatrix nahezu ausgeschlossen werden kann.

Quellen, welche das Auftreten von *S. aureus* und Fibronektin zueinander in Bezug setzen und weitere Auskünfte über die Verhältnisse geben, können nicht herangezogen werden, da hierzu bislang weiterführende Literatur nicht vorhanden ist.

#### **4.4 Nachweis von Makrophagen**

Der immunhistochemische Nachweis von Makrophagen und damit der Nachweis eines Repräsentanten des zellulären Abwehrsystems sollte ebenso mögliche Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen aufzeigen.

Die vierte Fragestellung bestätigend ist ein vermindertes Auftreten von Makrophagen bei GPA und somit ein Unterschied zwischen beiden Patientengruppen festgestellt worden. Insbesondere aus diesem Ergebnis kann also der Rückschluss gezogen werden, dass durch den verminderten Nachweis von Makrophagen bei Patienten mit GPA die Abwehrmechanismen auf zellulärer Ebene herabgesetzt sind. Eine dadurch bedingte geschwächte Infektabwehr bei GPA ist denkbar.

In einer Studie mit 234 Patienten, bestehend aus 36 Patienten mit GPA und 198 mit sonstigen orbitalen Erkrankungen, wurde anhand von Biopsien des Auges histologisch das Erscheinen unter anderem von Makrophagen untersucht (Isa et al., 2012). Im Vergleich zu den Nicht-GPA Patienten zeigten sich Makrophagen bei GPA-Patienten in verstärkter Häufigkeit. Allerdings wurden keine gesunden Patienten in diese Studie eingeschlossen, sodass keine Rückschlüsse darauf gezogen werden können, wie sich das Makrophagenverhältnis der GPA-Patienten im Vergleich zu Gesunden darstellen würde.

In einer weiteren Studie wurden periphere Blutproben von 23 Gesunden, 28 Patienten mit ANCA-assoziierten Vaskulitiden und 14 mit einem Nierentransplantat entnommen (Ohlsson et al., 2012). Die gewonnenen Proben wurden unter anderem hinsichtlich ihrer Blutzelllinien analysiert. Es war dabei kein Unterschied zwischen der totalen Monozytenanzahl der drei Patientengruppen feststellbar. Da Makrophagen von Monozyten abstammen (Lüllmann-Rauch, 2003) kann aus diesem Untersuchungsergebnis ein Rückschluss auf eine möglicherweise ähnliche Makrophagenverteilung gezogen werden.

Es findet jedoch in der 28 Personen starken Patientengruppe keine weitere Differenzierung in Bezug auf die unterschiedlichen Subtypen der Erkrankungen statt. So wird also auch nicht im Besonderen auf GPA-Patienten eingegangen.

Eine andere Ursache des verminderten Nachweises von Makrophagen könnte ein Nebeneffekt einer möglichen Medikation des Patienten sein. Als ein Bestandteil der Induktionstherapie bei GPA werden Corticosteroide verwendet (Tarzi et al., 2014). Ein weiterer Bestandteil der Induktionstherapie sind Immunsuppressiva, die bereits zuvor im Kapitel 4.1 erwähnt wurden. Prednisolon ist dabei ein typischer Vertreter der Corticosteroide bei GPA (Kim et al., 2013, Stegemann et al., 1996). In einer Studie von 2014 wurde unter anderem die Wirkung von Prednisolon auf Makrophagen bei Hepatitis untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass unter der Behandlung von Prednisolon hepatische Makrophagen vermindert nachweisbar waren (Kwon et al., 2014). Da Prednisolon eines der Corticosteroide zur Therapie bei GPA ist, wäre eine ebenfalls verminderte Makrophagenanzahl bei Patienten mit GPA denkbar. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass es sich bei der zuletzt genannten Studie und unseren Untersuchungen um verschiedene Gewebeentitäten handelt, die jedoch die Entzündung des Gewebes als gemeinsames Merkmal aufweisen.

#### **4.5 Korrelation zwischen Makrophagen und *Staphylococcus aureus***

Neben der zuvor in den Untersuchungen festgestellten verringerten Makrophagenanzahl bei Patienten mit GPA kommt nun hinzu, dass auch bei dem Auftreten von *S. aureus* bei Patienten mit GPA trotzdem keine vermehrte Ansammlung von Makrophagen nachweisbar war. Die zellulären Abwehrmechanismen bei den untersuchten Patienten mit GPA sind dementsprechend vermutlich nicht in der Lage mit einer adäquaten Makrophagenantwort der bakteriellen Besiedlung entgegenzuwirken.

Denkbar wäre, dass aufgrund der zuvor festgestellten verminderten Präsenz der Makrophagen bei GPA-Patienten auch weniger Makrophagen rekrutiert werden können, um am Ort der Besiedlung mit *S. aureus* einzugreifen. Bei bekannter hoher Pathogenität des *S. aureus* liegt dabei eine Verschlechterung des Krankheitsprozesses durch den Befall mit *S. aureus* nahe.

Diese Zusammenhänge unterstreichend wurden in einer Studie die Beziehungen von Immunglobulin G und *S. aureus* beleuchtet (Glasner et al., 2015).



Immunglobulin G ist ein Bestandteil der Immunabwehr und ist einer der Aktivatoren von Makrophagen (Boyle et al., 2012). In die Studie wurden 35 Patienten mit GPA, von welchen 21 *S. aureus*-Träger waren und 18 gesunde Patienten, von welchen 10 *S. aureus*-Träger waren, eingeschlossen. In dem Patientenserum wurden sie auf die Immunglobulin G-Level auf 59 *S. aureus*-Antigene untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Immunglobulin G-Level bei den GPA-Patienten insgesamt niedriger waren, als bei den gesunden Kontrollpatienten. Durch die herabgesetzten Immunglobulin G-Spiegel bei GPA-Patienten in der genannten Studie ist ebenso wie in unseren Untersuchungen eine verminderte Anzahl an Makrophagen im Vergleich zu gesunden Patienten denkbar.

#### **4.6 Kritische Würdigung der Arbeit**

Mögliche Fehlerquellen können in dem Prozess der Ergebnisermittlung aufgetreten sein, wie zum einen im Rahmen der Biopsieentnahme. Bedingt durch die Entnahme der Biopsien von verschiedenen Patienten ist ein exakt gleicher Anteil der verschiedenen Schleimhautanteile nicht zu gewährleisten. Bei ungleicher Verteilung der untersuchten Zellstrukturen in verschiedenen Schleimhautanteilen kann sich dies in den Ergebnissen widerspiegeln.

Zum anderen ist eine Fehlerquelle im Rahmen des Färbeprozesses denkbar. Hierbei wurden sämtliche Schnitte durch eine Person anhand des standardisierten Färbeprotokolls gefärbt, um mögliche Abweichungen auszuschließen. Von welcher Relevanz jedoch wenige Sekunden Unterschied in den einzelnen Arbeitsschritten sind, ist nicht abschließend beurteilbar. Denkbar sind also Variabilitäten in der Intensität der verschiedenen Anfärbungen, wodurch die Ergebnisse beeinflusst werden können.

Des Weiteren liegt eine mögliche Fehlerquelle bei den Auswertungen der Präparate. Die eingescannten Präparate wurden durch die drei Untersucher an verschiedenen Bildschirmen angesehen und beurteilt. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch unterschiedliche Licht- und Farbverhältnisse ist daher denkbar. Um diese Fehlerquelle möglichst auszuschließen wurden alle zu untersuchenden Strukturen mit Beispielbildern belegt, anhand welcher jeder Untersucher die histologischen Präparate vergleichen konnte.

Bereits in dem Kapitel 4.2 wurde auf die Auswirkung der Auswahl von verschiedenen Gesichtsfeldern in Bezug auf Fibronektin eingegangen. Hierbei kann es sich ebenfalls um eine generelle Fehlerquelle handeln. Durch das Betrachten der Schnitte durch verschiedene Untersucher werden auch unterschiedliche, zufällige Gesichtsfelder ausgewählt. Da die Verteilung der einzelnen untersuchten Strukturen keiner Gleichmäßigkeit unterliegt, können durch die Wahl verschiedener Gesichtsfelder auch die Ergebnisse beeinflusst worden sein.

In der aufgezeigten Tabelle für die Auswertung der Schnitte werden die verschiedenen Schichten des Gewebes in „Epithelial“, „Subepithelial“, „Stroma“ und „Drüsen“ unterschieden. Eine Beispielabbildung wurde dazu nicht vorgelegt. Da in jedem histologischen Präparat die Grenzen variieren können, wurde auf eine Beispielabbildung verzichtet. Hinzukommend waren nicht in allen Schnitten alle Abschnitte der beschriebenen Aufteilung gleich vorhanden. Diese mögliche Fehlerquelle ist jedoch vernachlässigbar, da aus den genannten Kriterien der Median gebildet wurde. Hieraus resultierend scheint eine mögliche Ungleichverteilung der einzelnen Gewebeanteile ausgeglichen.

Ebenfalls denkbar wäre bei der geringen Größe des *S. aureus*, welches auch aus der angewiesenen Vergrößerung zur Beurteilung der Häufigkeit des Auftretens von den Bakterien ersichtlich ist, ein schlichtes Übersehen der Bakterien bei den zufällig gewählten Gesichtsfeldern durch den jeweiligen Untersucher.

## 5. Zusammenfassung

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), zuvor als Wegenersche Granulomatose bekannt, ist eine Autoimmunerkrankung und gehört zu den granulomatösen, chronisch entzündlichen primären Kleingefäßvaskulitiden. Die Erkrankung, welche mit der Bildung von cytoplasmatischen antineutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern (C-ANCA) assoziiert ist, ist durch den Befall vor allem des oberen und unteren Respirationstraktes sowie des Nierensystems gekennzeichnet.

Bei bekannter Störung der Abwehrmechanismen, unter anderem bedingt durch eine Dysfunktion der epithelialen Barriere, sind 60-70% der Patienten chronisch nasal mit *Staphylococcus aureus* besiedelt. Dies ist von deutlicher klinischer Relevanz, da die Besiedlung mit dem genannten Keim mit einer erhöhten Rezidivhäufigkeit der Erkrankung korreliert.

In dieser Arbeit wurden die Abwehrmechanismen immunhistochemisch, stellvertretend abgebildet durch Makrophagen und Fibronectin, untersucht. Anhand von Schleimhautbiopsien der Nase und insgesamt 92 histologischen Schnitten wurden *Staphylococcus aureus*, Fibronectin und Makrophagen immunhistologisch dargestellt und anschließend alle Präparate durch drei Untersucher mikroskopiert und ausgewertet.

Signifikant geringer zeigte sich das Auftreten von Makrophagen bei Patienten mit GPA im Vergleich zu den Normalkontrollen. Ebenso wurde das signifikant geringere Auftreten von Makrophagen in der unmittelbaren Nähe zu *Staphylococcus aureus*-Bakterien bei GPA-Patienten nachgewiesen.

Diese Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf eine tatsächlich verminderte Abwehrfähigkeit bei GPA-Patienten zu.

Keine Unterschiede zeigten sich bei der Häufigkeit des Auftretens von *Staphylococcus aureus* bei gesunden Patienten und Patienten mit GPA. Auch die Verteilung des Fibronectins war auf immunhistologischer Ebene bei beiden Patientengruppen ausgeglichen.

Die aufgezeigte zelluläre Dysfunktion der Abwehr durch Makrophagen lässt Rückschlüsse auf mögliche therapeutische Maßnahmen zu. Die sinunasalen Grenzflächen könnten in den Fokus von Therapieansätzen rücken um beispielsweise hier die Abwehr zu stärken. Eine dadurch bedingte Reduktion der bakteriellen *Staphylococcus aureus*-Besiedlung hätte die theoretische Potenz für eine verminderte Rezidivhäufigkeit und könnte so den Krankheitsverlauf dieser komplexen Autoimmunerkrankung positiv beeinflussen.

## 6. Literaturverzeichnis

Alitalo, K., Hovi, T., Vaheri, A., Fibronectin is produced by human macrophages, *J Exp Med.* 151(3): 602-613 (1980)

Azar, L., Springer, J., Langford, C. A., Hoffmann, G. S., Rituximab with or without a conventional maintenance agent in the treatment of relapsing granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): a retrospective single-center study. *Arthritis Rheumatol* 66(10): 2862-70 (2014)

Bachmann, H., Nicosia, J., Dysart, M., Barker, T. H., Utilizing Fibronectin Integrin-Binding Specificity to Control Cellular Responses. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4(8): 501-511 (2015)

Baggiolini, M. and Clark-Lewis, I., Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 307(1): 97-101 (1992)

Barnes, P. J., Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 94(6):557-72 (1998)

Beier, U. H., Holtmeier, C., Weise, J. B., Görögh, T., Fibronectin suppression in head and neck cancers, inflammatory tissues and the molecular mechanisms potentially involved. *Int J Oncol* 30(3): 621-629 (2007)

Besada, E., Koldingsnes, W., Nossent, J. C., Staphylococcus aureus carriage and long-term Rituximab treatment for Granulomatosis with polyangiitis. *PeerJ.* 25; 3:e1051 (2015)

Boyle, J. J., Christou, I., Iqbal, M. B., Nguyen, A. T., Leung, V. W., Evans, P. C., Liu, Y., Johns, M., Kirkham, P., Haskard, D. O., Solid-phase Immunoglobulins IgG and IgM activate macrophages with solid-phase IgM acting via a novel scavenger receptor a pathway. *Am J Pathol* 181(1): 347-361 (2012)

Choi, S.H., Kwon, O.J., Park, J.Y., Kim do, Y., Ahn, S.H., Kim, S.U., Ro, S.W., Kim, K.S., Park, J.H., Yun, C.O., Han, K.H., Inhibition of tumour angiogenesis and growth by small hairpin HIF-1 $\alpha$  and IL-8 in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 34(4): 632-42 (2014)

Cocco, G., and Gasparyan, A. Y., Myocardial ischemia in Wegener's granulomatosis: coronary atherosclerosis versus vasculitis. *Open Cardiovasc Med J* 4: 57-62 (2010)

Facchetti, F., Bertalot, G., Grigolato, P. G., KP1 (CD 68) staining of malignant melanomas. *Histopathology* 19(2): 141-145 (1991)

Fard-Mousavi, N., Mosayebi, G., Amouzandeh-Nobaveh, A., Japouni-Nejad, A., Ghaznavi-Rad, E., The Dynamic of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage in Central Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2015 Jul; 8(7): e20760 (2015)

Garske, U., Haack, A., Beltrán, O., Flores-Suárez, L. F., Bremer, J. P., and Lamprecht, P., Intra- and inter-rater reliability of endonasal activity estimation in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Clinical and experimental rheumatology* 30: S22-8 (2012)

Glasner, C., van Timmeren, M. M., Stobernack, T., Omansen, T. F., Raangs, E. C., Rossen, J. W., de Goffau, M. C., Arends, J. P., Kampinga, G. A., Koedijk, D. G. A. M., Neef, J., Buist, G., Tavakol, M., van Wamel, W. J. B., Rutgers, A., Stegeman, C. A., Kallenberg, C. G. M., Heeringa, P., van Dijk, J. M., Low anti-staphylococcal IgG responses in granulomatosis with polyangiitis patients despite long-term *Staphylococcus aureus* exposure, *Scientific Reports* 5, Article number: 8188 (2015)

Grayson, P. C., Steiling, K., Platt, M., Berman J. S., Zhang, X., Xiao, J., Alekseyev, Y. O., Liu, G., Monach, P. A., Kaplan, M. J., Spira, A., Merkel, P. A., Defining the nasal transcriptome in granulomatosis with polyangiitis. *Arthritis Rheumatol* (Epub ahead of print) (2015)

Groot, K. de, Gross, W. L., Herlyn, K., Reinhold-Keller, E., Development and validation of a disease extent index for Wegener's granulomatosis. *Clin Nephrol* 55(1): 31-8 (2001)

Guo, Y. F., Xu, N. N., Sun, W., Zhao, Y., Li, C. Y., Guo, M. Y., Luteolin reduces inflammation in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis by inhibiting NF- $\kappa$ B activation and MMPs expression. *Oncotarget*, Advance Publications (March 10, 2017)

Hamza, T., Li, B., Differential responses of osteoblasts and macrophages upon *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Microbiology* Vol 14(1) (2014)

Hauck, C. R., and K. Ohlsen, Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol* 9(1): 5-11 (2006)

Holle, J. U., Laudien, M., Gross, W. L., Clinical manifestations and treatment of Wegener's granulomatosis. *Rheum Dis Clin North Am* 36(3): 507-526 (2010)

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

Isa, H., Lightman, S., Luthert, P. J., Rose, G. E., Verity, D. H., Taylor, S. R., Histopathological features predictive of a clinical diagnosis of ophthalmic granulomatosis with polyangiitis (GPA). *Int J Clin Exp Pathol* 5(7): 684-689 (2012)

Kim, S. H., Park, J., Bae, J. H. Cho, M. S. Park, K. D., Jeong, J. H., ANCA-negative Wegener's granulomatosis with multiple lower cranial nerve palsies. *J Korean Med Sci*. Nov; 28(11): 1690-6 (2013)

Kindrachuk, J., Wahl-Jensen, V., Safronetz, D., Trost, B., Hoenen, T., Arsenault, R., Feldmann, F., Traynor, D., Postnikova, E., Kusalik, A., Napper, S., Blaney, J. E., Feldmann, H., Jahrling, P. B., Ebola virus modulates transforming growth factor  $\beta$  signaling and cellular markers of mesenchyme-like transition in hepatocytes. *J Virol*. 88 (17): 9877-92 (2014)

Klinger, H., Grenzformen der Periarteriitis nodosa. *Frankfurter Zeitschrift für Pathologie*. 42: 455-480 (1931)

- Kneidl, J., Mysore, V., Geraci, J., Tuchscher, L., Löffler, B., Holzinger, D., Roth, J., Barczyk-Kahlert, K., Soluble CD163 masks fibronectin-binding protein A-mediated inflammatory activation of Staphylococcus aureus infected monocytes. *Cell Microbiol.* 16(3): 364-377 (2013)
- Kolijn, K., Verhoef, E. I., van Leenders, G. J., Morphological and immunohistochemical identification of epithelial-to-mesenchymal transition in clinical prostate cancer. *Oncotarget* 6 (27): 24488-98 (2015)
- Kwon, H.-J., Won, Y. S., Park, O., Feng, D., Gao, B., Opposing effects of prednisolone treatment on T/NKT cell- and hepatotoxin-mediated hepatitis in mice. *Hepatology* Mar; 59(3): 1094-106 (2014)
- Laudien M., Wohlers, J., Podschun R., Lamprecht P., Ambrosch P., Gestörte Barrierefunktion des nasalen Epithels bei Wegenerscher Granulomatose durch verminderte IL-8 Sekretion auf entzündliche Stimuli. *Z.Rheumatol* 68 (Suppl 1): 1-104 (2009)
- Laudien, M., Gadola, S. D., Podschun, R., Hedderich, J., Paulsen, J., Reinhold-Keller, E., Csernok, E., Ambrosch, P., Hellmich, B., Moosig, F., Gross, W.L., Sahly, H., Lamprecht, P., 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(1 Suppl 57): 51-55 (2010)
- Lee, J. H., Kim, K. W., Myong, N. H., Jung, J. Y., Wegener's Granulomatosis presenting as bilateral otalgia with facial palsy: A case report. *Korean J Audiol* 17(1): 35-37 (2013)
- Lin, C. Y., Tsai, F. C., Fang, B.R., Mesothelium/monocytic incidental cardiac excrescences of the heart: case report and literature review. *Int J Clin Pract Suppl*(147): 23-25 (2005)
- Luqmani, R. A., State of the art in the treatment of systemic vasculitides. *Front Immunol* 13; 5: 471 (2014)
- Lüllmann-Rauch, R., Histologie, Verstehen-Lernen-Nachschlagen. Thieme, Stuttgart, S 236-238 (2003)
- McKinney, E. F., Willcooks, L. C., Broecker, V., Smith, K. G., The immunopathology of ANCA-associated vasculitis. *Semin Immunopathol* 36(4): 461-478 (2014)
- Mehuron, T., Kumar, A., Duarte, L., Yamauchi, J., Accorsi, A., Girgenrath, M., Dysregulation of matricellular proteins is an early signature of pathology in laminin-deficient muscular dystrophy. *Skelet Muscle* Jul 2; 4: 14 (2014)
- Menzies, B. E., The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of Staphylococcus aureus infections. *Curr Opin Infect Dis* 16(3): 225-229 (2003)
- Mongodin, E., Bajolet, O., Cutrona, J., Bonnet, N., Dupuit, F., Puchelle, E., de Bentzmann, S., Fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun* 70(2): 620-630 (2002)

Moradi, S., Saghravanian, N., Moushekhian, S., Fatemi, S., Forghani, M., Immunohistochemical Evaluation of Fibronectin and Tenascin Following Direct Pulp Capping with Mineral Trioxide Aggregate, Platelet-Rich Plasma and Propolis in Dogs' Teeth. *Iran Endod J*.10(3):188-92 (2015)

Moss, B., Squire, J. R., Topley, E., Nose and skin carriage of *Staphylococcus aureus* in patients receiving penicillin. *Lancet* 1: 320-325 (1948)

Mukae, H., Furusyo, N., Murata, M., Ogawa, E., Kainuma, M., Shimizu, M., Ihara, T., Hayashi, J., A case of granulomatosis with polyangiitis preceded by subacute thyroiditis. *Clin Case Rep*. 3(3): 139-144 (2015)

Ohlsson, S. M., Pettersson, Å., Ohlsson, S., Selga, D., Bengtsson, A. A., †Segelmark, M., Hellmark, T., Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 170(1): 47-56 (2012)

Pankov, R., and Yamada, K. M., Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115(Pt 20): 3861-3863 (2002)

Rowaiye, O. O., Kusztal, M., Klinger, M., The kidneys and ANCA-associated vasculitis: from pathogenesis to diagnosis. *Clin Kidney J* 8(3): 343–350 (2015)

Silva, F., Hummel, A. M., Jenne, D.E., and Specks, U., Discrimination and variable impact of ANCA binding to different surface epitopes on Proteinase 3, the Wegener's Autoantigen. *J Autoimmun* 35 (4): 299-308 (2010)

Stegemann, C. A., Tervaert, J. W., de Jong, P. E., Kallenberg, C. G., Trimethoprim-Sulfamethoxazole (Co-Trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. Dutch Co-Trimoxazole Wegener Study Group. *N Engl J Med*. Jul 4; 335(1): 16-20 (1996)

Tarzi, R. M. and Pusey, D. C., Current and future prospects in the management of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's granulomatosis). *Ther Clin Risk Manag*. 10: 279-293 (2014)

Ullrich, S., Gustke, H., Lamprecht, P., Gross, W. L., Schumacher, U., Ambrosch, P., Laudien, M., Severe impaired respiratory ciliary function in Wegener granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 68:1067-1071 (2009)

Wang, L., Xue, H., Li, L., Zhao, X., Characterization of Insertion Sequence ISSau2 in the Human and Livestock-Associated *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 10(5): e0127183 (2015)

Warnke, R. A., Pulford, K. A., Pallesen, G., Ralfkiaer, E., Brown, D. C., Gatter, K. C., Mason, D. Y., Diagnosis of myelomonocytic and macrophage neoplasms in routinely processed tissue biopsies with monoclonal antibody KP1. *Am J Pathol* 135(6): 1089-1095 (1989)

Wegener, F., *Verhandlungen der Deutschen Pathologischen Gesellschaft*, 29, 202 (1936)

Wegener, F., *Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie*, 102, 36 (1939)



Williams, R. E. O., Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: It's prevalence and importance. *Bacteriol Rev* 27(1): 56-71 (1963)

Wohlers, J., Breucker, K., Podschun, R., Hedderich, J., Lamprecht, P., Ambrosch, P., and Laudien, M., Aberrant cytokine pattern of the nasal mucosa in granulomatosis with polyangiitis. *Arthritis Research & Therapy*, 14(5):R203, (2012)

## 7. Veröffentlichung

---



### **83rd Annual Meeting of the German Society of Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery**

German Society of Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery  
16.05. - 20.05.2012, Mainz

---

Meeting Abstract

### **Fehlregulation der durch Makrophagen vermittelten nasalen Schleimhautbarriere bei Patienten mit Granulomatosis mit Polyangiitis**

Martin Laudien - Klinik für HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie CAU Kiel, Kiel

Agnetha Hahn - Klinik für HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie der CAU zu Kiel, Kiel

Wenya Li - Klinik für HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie der CAU zu Kiel, Kiel

Antje Müller - Abteilung für Rheumatologie der Universität Lübeck und Abteilung für Rheumatolog, Lübeck

Peter Lamprecht - Abteilung für Rheumatologie der Universität Lübeck und Abteilung für Rheumatolog, Lübeck

Petra Ambrosch - Klinik für HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie der CAU zu Kiel, Kiel

Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 83. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Mainz, 16.-20.05.2012. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2012.

Published: April 4, 2012 © 2012 Laudien et al.

Einleitung: Die Rezidivhäufigkeit, endonasale Aktivität und Manifestation im oberen Aerodigestivtrakt ist bei Patienten mit Granulomatosis mit Polyangiitis (GPA) mit nasaler *S. aureus*-Besiedlung erhöht. Ziel dieser Studie war die Analyse der Interaktion von *S. aureus* mit Makrophagen und möglicher durch extrazelluläre Matrixproteine bedingter Effekte auf die Migrationsfähigkeit des Mikroorganismus an der nasalen Grenzfläche bei GPA.

Patienten und Methoden: In die Studie wurden 44 GPA-Patienten und 48 Normalkontrollen eingeschlossen. Biopsien der Conchae nasalis wurden immunhistochemisch hinsichtlich des Vorkommens von *S. aureus*, Makrophagen, Fibronectin und einem möglichen vermehrten Fibronectin-Nachweis bei positivem *S. aureus* Nachweis, sowie der räumlichen Nähe des invadierenden Mikroorganismus zu Makrophagen untersucht. Hierzu analysierten drei unabhängige Untersucher verblindet die histologischen Schnitte.

Ergebnisse: Bei Patienten mit GPA fanden sich im Vergleich zu Normalkontrollen signifikant weniger Makrophagen ( $p=0.001$ ) und diese signifikant seltener in der Nähe von *S. aureus* ( $p=0.012$ ). Es bestand kein Unterschied im Vergleich des *S. aureus*- und Fibronectin-Nachweises oder der Ausprägung des Fibronectin-Nachweises in der Nähe von *S. aureus* zwischen GPA-Patienten und Normalkontrollen.

Diskussion: Störungen der sinunasalen Grenzfläche bei GPA sind mit einer Zilienfunktionsstörung, Fehlregulation der Defensantwort auf eine *S. aureus*-Stimulation, Fehlregulation des Sensorsystems für pathogen associated molecular pattern und einer Dysregulation im Zytokinmuster beschrieben. Die vorgestellten Daten zeigen erstmals auch eine gestörte Interaktion des den Krankheitsverlauf negativ beeinflussenden *S. aureus* und des zellulären nasalen Abwehrsystems bei GPA.

Unterstützt durch: DFG, klinische Forschergruppe 170

## 8. Votum der Ethikkommission

MEDIZINISCHE FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Herrn  
**Dr. med. M. Laudin**  
Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde,  
Kopf- und Halschirurgie  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
Arnold-Heller-Straße 14  
24105 Kiel

Schwanenweg 20  
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09  
Telefax 04 31 / 597-18 31

Datum:

28.2.2011

**AZ.: A 101/07** (bitte stets angeben)  
**Studienplan:** Einfluss endogener und exogener Faktoren auf die Grenzflächenläsion am respiratorischen Epithel bei Wegenerscher Granulomatose  
**Projektleiter:** Prof. Dr. med. St. Gottschlich, Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, UKSH, Campus Kiel  
**Mitarbeiter:** Dr. med. M. Laudin, UKSH, Campus Kiel  
**Datum des Erstantrages:** 22.12.2006  
**Ihre E-Mail vom:** 28.2.2011

Sehr geehrter Herr Kollege Laudin,

die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel nimmt die ergänzte Patienteninformation zum Teilprojekt 1, ohne Versionsdatum, Studie zur Kenntnis.

Die Hinweise im Schreiben unserer Ethik-Kommission vom 9.1.2008 zu der Patienteninformation wurden zufriedenstellend berücksichtigt.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

Dr. med. Christine Glinicke  
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

## **9. Danksagung**

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Petra Ambrosch für die Bereitstellung der Räume und Geräte bedanken.

Mein größter Dank geht an PD Dr. med. Martin Laudien. Ich bedanke mich sehr für die Bereitstellung des Themas der Dissertation, für die Hilfsbereitschaft und die scheinbar endlose Geduld, die mir entgegengebracht wurde. Ohne diese hervorragende Betreuung wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich bedanke mich bei Janet Wohlers für die angenehme und lehrreiche Zusammenarbeit.

Ein herzlicher Dank geht an PD Dr. rer. nat. Tibor Görögh und Frau Annemarie Rően für die Hilfe in nahezu allen Angelegenheiten rund um das Labor.

Ich danke der Bundeswehr, die mir das Studium der Humanmedizin und die vorliegende Dissertation ermöglicht hat.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und den engsten Freunden bedanken, die durch ihre motivierenden Worte zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Danke.

# 10. Lebenslauf

## Angaben zur Person

Name	Agnetha Hahn
Geburtsdatum	05.02.1987
Geburtsort	Stralsund
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

---

## Berufserfahrung

Ab 05/2016	Truppenärztin Sanitätsversorgungszentrum Stetten am kalten Markt
10/2014 - 04/2016	Truppenärztin Sanitätsversorgungszentrum Alt Duvenstedt
05/2012 - 09/2014	Assistenzärztin der Orthopädie/ Unfallchirurgie Bundeswehrkrankenhaus Westerstede
07/2005	Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffizieranwärter

---

## Studium

10/2005 - 05/2012	Christian-Albrecht-Universität zu Kiel Studium der Humanmedizin 2. Staatsexamen, Approbation als Ärztin
-------------------	---

---

## Schulbildung

1997 - 2005	Hansa-Gymnasium, Stralsund
1993 - 1997	Fritz-Reuter-Grundschule, Stralsund

---

## Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend
Schwedisch	Grundkenntnisse

## 11. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch meinen 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.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht (siehe oben).

Straßberg, den .....

.....

(Agnetha Hahn)