

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

**Vergleich des Adhäsionsverhaltens verschiedener
Staphylococcus aureus Stämme von Patienten mit
Granulomatose mit Polyangiitis und Normalkontrollen an
einer immortalen nasalen Epithelzelllinie**

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

vorgelegt von

KARI ROLFS

geboren in Göttingen

Kiel, 2017

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Laudien
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Rainald Zeuner

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.02.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis verwendeter Abkürzungen	II
Verzeichnis verwendeter Materialien	III
1 Einleitung	1
1.1 Granulomatose mit Polyangiitis.....	1
1.2 Epidemiologie.....	2
1.3 Ätiologie und der mikrobielle Einfluss auf den pathophysiologischen Entstehungsprozess	2
1.4 Hypothese und Zielsetzung.....	3
2 Patienten und Methoden	4
2.1 RPMI 2650.....	5
2.2 Anzüchten der nasalen Epithelzelllinie RPMI 2650.....	5
2.3 Versuch der Adhäsion krankheitsspezifischer <i>S. aureus</i> -Stämme an der nasalen Epithelzelllinie RPMI 2650.....	6
2.4 Arbeiten unter dem Mikroskop.....	8
2.5 Statistische Methoden.....	10
2.6 Das Adhäsionsverhalten von <i>S. aureus</i> -Stämmen an krankheitsspezifischen primären nasalen Epithelzellen.....	11
3 Ergebnisse	13
3.1 Statistik zu den Versuchskontrollen.....	13
3.2 Statistik zu den Gesamtzellen beider Patientengruppen.....	14
3.3 Statistik zu den Zellen mit adhärirten Bakterien beider Patientengruppen.....	15
3.4 Statistik zu den Gesamtbakterien beider Patientengruppen.....	18
3.5 Statistik zu den adhärirten Bakterien beider Patientengruppen.....	19
3.6 Die Stärke des Zusammenhangs im Adhäsionsverhalten von Zellen und Bakterien.....	21
4 Diskussion	22
4.1 Zum Erstversuch: Das Adhäsionsverhalten krankheitsspezifischer <i>S. aureus</i> -Stämme an der nasalen Epithelzelllinie RPMI 2650.....	22
4.2 Zum Zweitversuch: Adhäsionsverhalten von <i>S. aureus</i> -Stämmen an krankheitsspezifischen primären nasalen Epithelzellen.....	29
5 Zusammenfassung	32
Literaturverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Danksagung	X
Akademischer Lebenslauf und Veröffentlichungen	XI

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

ANCA	Anti-Neutrophile Zytoplasmatische Antikörper
BHIB	Brain-Heart-Infusion-Bouillon
bmi-1	B-lymphoma MMLV insertion region 1
Cba	Collagen-binding adhesin
cfA	clumping factor A
cPR3	Leserahmen, der komplementär zum Gen für Proteinase 3 liegt
DMSO	Dimethylsulfoxid
Eap	Extracellular adhesive protein
FnBPA /B	Fibronectin-binding proteine A und B
hTERT	humane Telomerase reverse Transkriptase
IL	Interleukin
LPXTG	Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin
MEM	Minimum Essential Media
MPA	Mikroskopische Panarteriitis
PBS	Phosphat Buffered Saline
PR3	Proteinase 3
SAg	Superantigen
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
TEER	Transepithelialer Elektrischer Widerstand
TNF	Tumornekrosefaktor
TSST-1	Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1

Verzeichnis verwendeter Materialien

Airway Epithelial Cell Growth Nährmedium (Fa. Promo Cell, Heidelberg)
AxioVision LE (Digitales Programm zur Zell -und Bakteriendokumentation, ZEISS)
Baclight Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Live/Dead Färbung)
Brain-Heart-Infusion-Bouillon (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Brutschrank (Sanyo CO2 Incubator, München)
8 Chamber Culture Slides (BP Falcon)
Deckgläser (Marienfeld, Gelsenkirchen)
Dispase (Invitrogen, Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO, Gefrierschutzmittel, Merck, Darmstadt)
Fötale Kälberserum (Biochrom AG, Berlin)
Klebstoff (Glue Colle, Herma, Filderstadt)
Minimum-Essential-Media (MEM-Medium, Biochrom AG, Berlin)
Methanol (Fa. Geyer, Hamburg)
Mikroskop (ZEISS, Scope.A1 Axio)
PBS (phosphat buffered saline, pH: 7,4)
Penicillin (Biochrom AG, Berlin)
Petrischalen (Sarstedt, TC Schale 100)
Pipetten (Sarstedt, serological pipette)
Prolong Gold Antifade (ProLong Gold Reagents)
Reagenzröhrchen (10 ml, Fa. Sarstedt, Nümbrecht)
RPMI 2650 Zelllinie (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig)
Skalpell (Feather, disposable scalpel)
Streptomycin (Biochrom AG, Berlin)
Trypsin (Biochrom AG, Berlin)
Werkbank (Köttermann 8511, Uetze/Hänigsen)
Zellkulturflasche (Sarstedt Tissue Culture Flask 25 cm³, Nümbrecht)
Zentrifuge (Eppendorf, Centrifuge 5804 R, Hamburg)

1 Einleitung

1.1 Granulomatose mit Polyangiitis

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, früher Wegener Granulomatose) ist eine systemische Autoimmunerkrankung und gehört laut den American College of Rheumatology-Klassifikationskriterien von 1990 und den Chapel Hill Consensus Conference-Definitionen von 1992 zu der Gruppe der primären Anti-Neutrophile zyttoplasmatische Antikörper (ANCA)-assoziierten Vaskulitiden mit unbekannter Ätiologie. Neben der GPA zählen auch die mikroskopische Panarteriitis (MPA) sowie die eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (früher auch Churg-Strauss-Syndrom) zu den primären ANCA -assoziierten Vaskulitiden [1-3].

1931 wurde die Erkrankung erstmalig von Heinz Klinger als Grenzform der „Periarteriitis nodosa“ beschrieben [4] und später nach Friedrich Wegener benannt, der nähere Untersuchungen durchführte und diese in seinen Veröffentlichungen von 1936 und 1939 publizierte [5, 6].

Gekennzeichnet ist die GPA durch chronische nekrotisierende Vaskulitiden, vorwiegend der kleinen bis mittelgroßen Gefäße, kombiniert mit der Bildung nicht verkäsender Granulome im Bereich des Respirationstraktes [7]. Besonders häufig betroffen sind sowohl oberer, als auch unterer Respirationstrakt sowie die Nieren. Darüber hinaus können aber auch Augen, Ohren, Speicheldrüsen, Gelenke, Haut und das zentrale Nervensystem betroffen sein [7, 8]. In einer Vielzahl der Fälle manifestiert sich die GPA zunächst im Kopf-Hals- Bereich, bevor es unbehandelt zu einer letztlich generalisierten Vaskulitis mit renaler und pulmonaler Beteiligung kommen kann [9]. In 60-90% der Fälle werden die Nase und die Nasennebenhöhlen befallen [10-14]. Hierbei ist auffällig, dass bei 60-70% der GPA Patienten, verglichen mit einer Kontrollgruppe, eine signifikant höhere endonasale Besiedlungsrate mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) nachgewiesen werden konnte [8, 9, 15]. Symptomatisch werden die Patienten häufig durch blutigen-borkigen Schnupfen, chronische Rhinitis/Sinusitis/Otitis, Septumperforationen, Ausbildung einer Sattelnase sowie durch Ulzerationen im Oropharynx [8, 13]. Im fortgeschrittenen, generalisierten Stadium der GPA lassen sich histologisch oft Granulome, eine nekrotisierende Vaskulitis, sowie eine

Glomerulonephritis nachweisen [3, 16]. Vor allem renale und pulmonale Manifestationen können bei progressivem Verlauf schnell zu Organversagen bis hin zum Tod führen [3, 17].

Für die GPA charakteristisch ist der serologische Nachweis hochspezifisch gegen Proteinase 3 (PR3) gerichteter zytoplasmatischer Anti-Neutrophiler zytoplasmatischer Antikörper (C-ANCA)[18, 19]. PR3 ist als Serinproteinase in den primären azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten sowie in monozytären Lysosomen gespeichert. Nach Stimulierung durch den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) α oder Interleukin (IL-)-1, wird die PR3 an der Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten freigesetzt und kann dort mit den C-ANCA interagieren. Diese Bindung bewirkt eine Aktivierung neutrophiler Granulozyten und leitet entzündliche Prozesse ein [20-22].

1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz der Granulomatose mit Polyangiitis liegt in Europa bei ca. 8 Neuerkrankungen /1.000.000/Jahr, wobei in mehreren Veröffentlichungen ein Nord-Südgefälle beschrieben werden konnte. So wird die Inzidenz in Norwegen (10,6/1.000.000 Einwohner) im Vergleich zu Spanien (4,9/1.000.000 Einwohner) als deutlich höher beschrieben [23]. Die Prävalenz der GPA liegt in Europa bei ca. 50/1.000.000. Die höchste Manifestationsrate liegt zwischen dem 55. und 70. Lebensjahr und betrifft etwas häufiger Männer als Frauen [21, 24, 25].

1.3 Ätiologie und der mikrobielle Einfluss auf den pathophysiologischen Entstehungsprozess

Die Ätiologie der Granulomatose mit Polyangiitis ist weitgehend ungeklärt. Sie wird jedoch mehr und mehr als multifaktoriell bedingt angesehen und mit exogenen Umwelteinflüssen sowie genetischen und epigenetischen Prädispositionen in Zusammenhang gebracht [26, 27].

In vergangenen und auch aktuellen Studien wird zunehmend die Rolle mikrobieller Triggerfaktoren diskutiert, wobei insbesondere *S. aureus* als potenter mikrobieller Trigger der Krankheitsaktivität postuliert wird [26].

So konnte *S. aureus* als ein unabhängiger Risikofaktor für GPA-Rezidive nachgewiesen werden [28, 29]. Stegemann et al. machte die Beobachtung, dass die Gabe des Antibiotikums Cotrimoxazol bei in Remission befindlichen GPA -Patienten zu weniger Rezidiven führte, als bei nicht behandelten Patienten mit GPA. Wie genau Cotrimoxazol die mikrobielle Flora positiv beeinflusst, bleibt jedoch unklar [30].

Auch den von *S. aureus* produzierten Superantigenen (SAg) könnte eine Rolle in der Pathogenese der GPA zukommen, da sie nach Freisetzung eine stark stimulierende Wirkung auf Immunzellen ausüben. Das Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1) wirkt stimulierend auf T-Zellen und das Protein A, ein Bestandteil der staphylokokkalen Zellwand, auf B-Zellen [31-33].

Darüber hinaus konnte in dem Immunglobulin-Genrepertoire der nasalen Granulome der Patienten mit GPA eine Prädominanz von VH3+B-Zellen gesichert werden, die sowohl eine Affinität zu PR3, als auch zu dem *S. aureus* -Superantigen Protein A aufwiesen. Diese Granulome könnten somit lymphoide Strukturen darstellen, in denen eine lokale Produktion von Autoantikörpern gegen PR3 hervorgerufen wird [34].

Des Weiteren konnten in mehreren Mikroorganismen, darunter auch *S. aureus*, Gensequenzen gefunden werden, die zur Proteinbiosynthese von komplementärer PR3 (cPR3) führen könnten. Bei der cPR3 handelt es sich um ein Peptid, das durch Ablesen des Antisense-DNA-Stranges von PR3 entsteht und in dessen Anwesenheit nicht nur anti-cPR3-, sondern auch anti-PR3-Autoantikörper gebildet werden [35].

Es stellt sich die Frage, ob die erhöhte Nachweisrate von *S. aureus* auf den phänotypischen Eigenschaften der Bakterien beruht oder, ob der ursächliche Pathomechanismus auf zellulärer Wirtsebene begründet ist. Beiden Fragen wurde in der hier vorliegenden Arbeit nachgegangen.

1.4 Hypothese und Zielsetzung

Im Fokus der Arbeit steht der Vergleich des Adhäsionsverhaltens verschiedener *S. aureus* Stämme von Patienten mit GPA und gesunden Normalkontrollen an einer immortalen nasalen Epithelzelllinie. Hiermit wird der Fragestellung nachgegangen, ob die erhöhte Nachweisrate von *S. aureus* auf phänotypischen Eigenschaften der Bakterien beruht. Darüber hinaus fanden erste Tests zu einem weiteren Versuchsansatz statt.

Hierbei sollte geprüft werden, ob an den primären nasalen Epithelzellen von Patienten mit GPA verschiedene Bakterienstämme besser adhäreren als an den Primärkulturen von Normalkontrollen. Ein solcher Nachweis unterschiedlicher Adhärenz würde eher für eine Ursache auf Wirtsebene sprechen.

Ziel ist die Untersuchung folgender Fragestellungen:

1. Lässt sich ein signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten von *S. aureus* – Stämmen von Patienten mit GPA und Normalkontrollen an einer immortalen nasalen Epithelzelllinie nachweisen?
2. Liegt ein signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten von *S. aureus* – Stämmen an primären nasalen Epithelzellen von Patienten mit GPA und Normalkontrollen vor?

2 Patienten und Methoden

Die Studie wurde nach Zustimmung der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (letzte Revision im Oktober 2013) durchgeführt (AZ A101/07).

Die Studie umfasste einen Zeitraum von 18 Monaten (September 2013 bis Februar 2015). In dieser Zeit wurden insgesamt 21 Bakterienstämme des *S. aureus* auf ihr Adhäsionsverhalten an der immortalen nasalen Epithelzelllinie RPMI 2650 untersucht und verglichen. Zwölf der Bakterienstämme wurden aus dem Respirationstrakt von Patienten mit dem Krankheitsbild der Granulomatose mit Polyangiitis isoliert und neun Bakterienisolate gehörten zu dem gesunden Patienten-Vergleichskollektiv. Die Auswahl der Bakterienstämme erfolgte randomisiert mit Hilfe des Programms www.zufallsgenerator.net. Die ausgewählten Bakterienstämme entstammten einer entsprechenden Sammlung verschiedener *S. aureus* -Isolate aus dem Institut für Infektionsmedizin zu Kiel, die zuvor in Kooperation mit der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf –und Halschirurgie der CAU Kiel kollektiviert wurden. Jeder einzelne Bakterienstamm wurde durch zwei verblindete Untersucher mittels des digitalen Zell –und Bakteriendokumentationsprogrammes AxioVisions LE mikroskopisch auf sein Adhäsionsverhalten an den RPMI-Zellen untersucht und die Ergebnisse anschließend statistisch analysiert, um einen möglichen

Adhäsionsunterschied zwischen *S. aureus* -Stämmen von Patienten mit GPA und denen der Normalkontrollen detektieren zu können.

2.1 RPMI 2650

Die immortale nasale Epithelzelllinie RPMI 2650 wurde 1962 aus einem Plattenepithel-Karzinom isoliert [36]. Für die Versuche wurde die Zelllinie aus der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, angefordert und die Passagen 34 und 35 verwendet.

2.2 Anzüchten der nasalen Epithelzelllinie RPMI 2650

Alle Arbeiten an den Zellkulturen fanden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank (Köttermann 8511, Uetze/Hänigsen) statt und es wurden sterile Einwegmaterialien benutzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in wasserdampfgesättigter 5% CO₂ haltiger Atmosphäre bei 37°C im Brutschrank (Sanyo CO₂ Incubator, München).

Die bei -196°C in Flüssigstickstoff gelagerte und mit 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, Gefrierschutzmittel, Merck, Darmstadt) versetzte RPMI 2650-Zelllinie (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) wurde zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurde das Zellmaterial in ein steriles Reagenzröhrchen, ca. 3 ml DMSO-freies, speziell hergestelltes RPMI-Medium (500ml MEM-Earle -Medium, gebrauchsfertig, Biochrom AG, Berlin + 10 % Fötale Kälberserum, zum optimalen Zellwachstum) enthaltend, überführt und vermischt. Durch den Zusatz des DMSO-freien Mediums wurde die DMSO-Toxizität herabgesetzt und dadurch eine mögliche Zelltoxizität verhindert. Anschließend wurde der Inhalt bei 1000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert (Eppendorf, Zentrifuge 5804 R). Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen und das abgesetzte Zellmaterial erneut mit dem RPMI-Medium vermischt. Nach gründlichem Auf- und Abpipettieren wurde die Zellsuspension in sterile 8 Chamber Culture Slides (BD Falcon, 8 Chamber Culture Slides) mit einem acht-Kammeraufsatz aus Polystyrol auf einem für Zellkulturen vorbehandelten Glas-Objektträger, überführt. Jede einzelne Kammer der 8 Chamber Culture Slides wurde mit 170 µl der RPMI-Zellsuspension gefüllt und im Anschluss

daran mit 300 µl reinem RPMI-Medium aufgefüllt. Somit befanden sich in jeder der Kammern 470µl.

Nach einem sterilen Verschluss der 8 Chamber Culture Slides, wurden diese nun für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis jede einzelne der Kammern mit einem gleichmäßigen präkonfluenten Monolayer von RPMI Zellen bewachsen war.

2.3 Versuch der Adhäsion krankheitsspezifischer *S. aureus* -Stämme an der nasalen Epithelzelllinie RPMI 2650

Zunächst wurde aus jeder einzelnen der acht Kammern der 8 Chamber Culture Slides der Zellkulturüberstand abpipettiert und die RPMI Epithelzellen dreimal mit warmer PBS (Phosphat buffered saline, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden diese mit den zuvor randomisiert ausgewählten Bakterienstämmen der Patientengruppen (GPA und Normalkontrollen) sowie mit Positiv -und Negativkontrollen über eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Bakterienstämme entstammten dem Abstrichmaterial der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf -und Halschirurgie der CAU Kiel. Vor der standardisierten Abstrichentnahme wurde sichergestellt, dass die Patienten während der vorherigen vier Wochen nicht antibiotisch vorbehandelt wurden. Die Gruppe der Normalkontrollen umfasste Patienten, die aufgrund einer Nasenatmungsbehinderung operativ versorgt wurden und an keiner akuten, chronischen oder autoimmunen Entzündung der Nase und der Nasennebenhöhlen litten.

Die Bakterienstämme wurden zuvor über Nacht in einer 10ml Brain-Heart-Infusion-Bouillon (BHIB) kultiviert, morgens erneut in eine 10ml BHIB überimpft und für drei Stunden bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Anschließend wurden die Bakterien zweimal mit dem RPMI Zellkulturmedium gewaschen. Um die Zelldichte der Bakterienkulturen zu bestimmen, folgte die Messung der optischen Dichte (OD-Messung) und die Keimzahlkonzentration im Zellkulturmedium wurde auf 1×10^6 /ml eingestellt. Diese Bakterienkonzentration blieb immer konstant. Die Kontrollstäme wurden in Vorversuchen im Institut für Infektionsmedizin zu Kiel als gut beziehungsweise gering adhärierend bestimmt.

Der Bakterienstamm eines Patienten wurde zur Kontrolle immer in zwei Kammern injiziert. So erfolgte auch die Beimpfung von jeweils zwei Kammern mit der

Positivkontrolle Chronische Rhinosinusitis- Stamm 224 (S.224, adhärent) sowie der Negativkontrolle *S. aureus* -Stamm 155 (S.155, nicht adhärent). Sowohl Positiv-, also auch Negativkontrolle wurden zusätzlich jeweils in eine zellfreie Kammer injiziert, um ein korrektes Versuchsvorgehen zu kontrollieren. Zu Vergleichszwecken und um Kontaminationen auszuschließen bzw. zu detektieren, wurden zusätzlich an jedem Versuchstag zum einen zwei völlig unbehandelte Kammern und zum anderen zwei Kammern mit steril angelegten Zellkulturen zunächst gefärbt und anschließend fixiert. Genauso wurden auch die restlichen, mit Bakterien inkubierten Kammern behandelt (siehe Abbildung 1).



Abbildung 1: Beispiel eines 8 Chamber Culture Slides

Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die Bakteriensuspension wieder abpipettiert und die Zellen wurden dreimal mit warmer PBS (pH 7,4, je 1 ml) gewaschen, um diese von Restbeständen der Bakteriensuspension zu reinigen. Anschließend wurde die Färbung BacLight Bacterial Viability Kit Invitrogen Live/Dead (Komponente A 1,5µl + Komponente B 1,5µl in 1ml PBS) aufgetragen und die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS-Lösung gewaschen und im Anschluss für fünf Minuten bei -20°C mit Methanol fixiert. Das Methanol wurde zuvor bei -20 °C im Kühlschrank gelagert. Sobald die Zellen fixiert

waren, wurden sie anschließend ein letztes Mal mit PBS gewaschen. Luftgetrocknet wurden sie daraufhin unter Verwendung des ProLong Gold Antifade (ProLong Gold Antifade Reagents, 5 x 2 ml) eingedeckelt, um ein Ausbleichen zu verhindern. Fixiert wurden die Deckgläser (Marienfeld, Gelsenkirchen) mit dem Klebstoff Glue Colle (Herma, Filderstadt).

2.4 Arbeiten unter dem Mikroskop

Pro Kammer wurden 10 Bilder von je 10 unterschiedlichen Gesichtsfeldern erstellt, insgesamt also 20 Bilder pro Bakterienstamm.

Bei 64-facher Vergrößerung wurde pro Gesichtsfeld und je Versuchsansatz für jeden Bakterienstamm die Gesamtzellzahl sowie die bakterienbehafteten Zellen unter dem Mikroskop (ZEISS, Scope.A1 Axio) durch zwei verblindete Untersucher ausgezählt. Ebenso wurden auch die freien und die an Zellen adhärenen Bakterien ermittelt. Die Zahl der Zellen ohne adhärenen Bakterien und die Gesamtbakterienzahl wurde rechnerisch bestimmt (siehe Abbildung 2).

Durch Mittelung der Gesamtzellzahlen aller 20 Einzelbildaufnahmen pro Bakterienstamm, wurde der Mittelwert für die Gesamtzellen pro Bakterienstamm berechnet. Ebenso wurde auch ein Mittelwert für die bakterienbehafteten Zellen sowie für die freien und die adhärenen Bakterien pro Bakterienstamm ermittelt und tabellarisch festgehalten. Aufgrund der kleinen Anzahl (n) der Bakterienstämme und um Ausreißer zu relativieren, wurde neben dem Mittelwert auch der Median der Gesamtzellen, der bakterienbehafteten Zellen, der freien Bakterien und der adhärenen Bakterien pro Bakterienstamm, berechnet (siehe Tabelle 1).

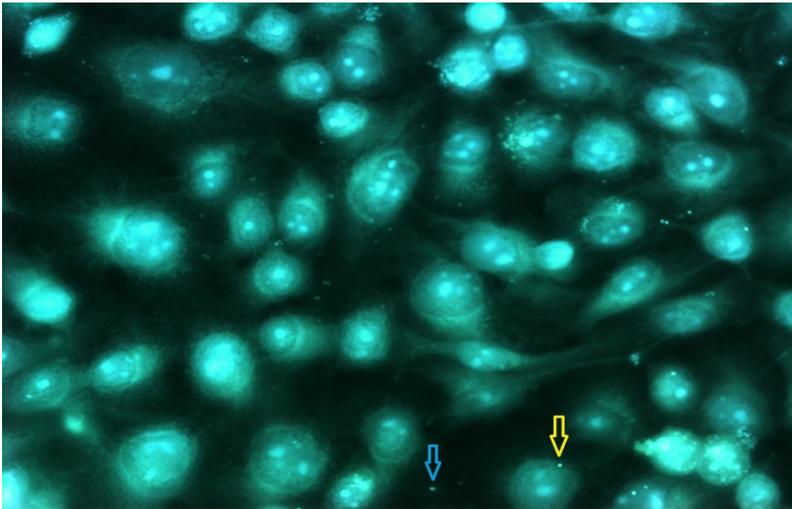


Abbildung 2: RPMI 2650 Zellen mit adhärirten Bakterien.
gelber Pfeil = an RPMI 2650 Zelle adhärirtes Bakterium
blauer Pfeil = Bakterium im Interzellularräum

Tabellarische Datendarstellung eines Patientenstammes

Patient	Stamm	Zm	Zs	Zmin	Zmax	Zmedian
GPA	S. 227	52,35	10,33	32	75	52,5
		Z+m	Z+s	Z+min	Z+max	Z+median
		12,75	11,55	2	41	9
		Bm	Bs	Bmin	Bmax	Bmedian
		45,25	34,33	2	142	22
		B+m	B+s	B+min	B+max	B+median
		44,6	42,76	2	140	21,5

Tabelle 1: Summierte Daten des *S. aureus*- Stammes S. 227 eines Patienten mit GPA

Legende

Zm: Mittelwert der Gesamtzellen	Z+m: Mittelwert der bakterienbehafteten Zellen
Zs: Standardabweichung der Gesamtzellen	Z+s: Standardabweichung der bakterienbehafteten Zellen
Zmin: Minimum der Gesamtzellen	Z+min: Minimum der bakterienbehafteten Zellen
Zmax: Maximum der Gesamtzellen	Z+max: Maximum der bakterienbehafteten Zellen
Zmedian: Median der Gesamtzellen	Z+median: Median der bakterienbehafteten Zellen
Bm: Mittelwert der Bakterien	B+m: Mittelwert der adhärirten Bakterien
Bs: Standardabweichung der Bakterien	B+s: Standardabweichung der adhärirten Bakterien
Bmin: Minimum der Bakterien	B+min: Minimum der adhärirten Bakterien
Bmax: Maximum der Bakterien	B+max: Maximum der adhärirten Bakterien
Bmedian: Median der Bakterien	B+median: Median der adhärirten Bakterien

2.5 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der erhobenen Daten erfolgte mittels der Analysesoftware SPSS Statistics Version 20. Die Rohdaten wurden aus den 12x20 Fotos der GPA-Patienten sowie den 9x20 Fotos der Normalkontrollen erhoben. Sie umfassten die Anzahl der gesamten Zellen (siehe Tabelle 3, Abbildung 3), die der bakterienbehafteten Zellen (siehe Tabelle 4, Abbildung 4 und 5), die Anzahl der gesamten Bakterien (siehe Tabelle 5, Abbildung 6) und die der adhärenierten Bakterien (siehe Tabelle 6, Abbildung 7) und wurden durch Maßzahlen wie Mittelwert (M), Standardabweichung (S), Minimum (Min.), Maximum (Max.), Medianwert (\tilde{X}) und der Quartildistanz (IQR, Quartile bei Q1/Q3) beschrieben.

Nach Analyse der Ergebnisse jedes einzelnen Bakterienstammes, wurden die Ergebnisse auf die beiden Patientengruppen übertragen. So wurde u.a. der Median aus den summierten und gemittelten Gesamtzellzahlen der einzelnen Bakterienstämme für die Gruppe der Patienten mit GPA und die Gruppe der Normalkontrollen berechnet (siehe Tabelle 3, Abbildung 3).

Die graphische Darstellung erfolgte mittels Boxplots. Um die Adhäsion von Zellen und Bakterien in der Gruppe der Patienten mit GPA, sowie in der der Normalkontrollen zu beschreiben, wurde zu den aggregierten Werten eine vollständige deskriptive Statistik erstellt. Die Verteilung der Messwerte wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Dieser wies für einige Größen statistisch signifikante Abweichungen zum Modell einer Normalverteilung auf, sodass eine Normalverteilung der Daten nicht grundsätzlich angenommen werden konnte. Daher erfolgte der Vergleich des Adhäsionsverhaltens zwischen den beiden untersuchten Gruppen (GPA- Patienten und Normalkontrollen) mittels eines nichtparametrischen Verfahrens, dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests. Die Stärke des Zusammenhangs im Adhäsionsverhalten von Zellen und Bakterien wurde entsprechend mittels des Spearman Rang-Korrelationskoeffizienten bewertet (Tabelle 7).

Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde für P-Werte $p \leq 0,05$ angenommen.

2.6 Das Adhäsionsverhalten von *S. aureus* -Stämmen an krankheitsspezifischen primären nasalen Epithelzellen

Es fanden weitere Versuchsansätze statt, bei denen die Rolle des Wirts, als möglicherweise maßgeblicher Einflussfaktor auf eine erhöhte Adhäsion von *S. aureus*, analysiert wurde.

Hierfür wurden primäre Epithelzellkulturen von Patienten mit GPA sowie von Normalkontrollen angezüchtet, um an diesen das Adhäsionsverhalten von *S. aureus*-Stämmen zu prüfen und zu vergleichen.

Zur Gewinnung der Primärkulturen wurden den Patienten während Nasennebenhöhlen- oder funktionellen Naseneingriffen etwa reiskorngroße Nasenschleimhautproben der unteren Muschel entfernt. Alle Patienten wurden am Vortag aufgeklärt und erbrachten schriftliche Einverständniserklärungen zur Teilnahme an der Studie. Die Schleimhautproben wurden postoperativ in Reagenzröhrchen, ca. 5 ml Airway Epithelial Cell Growth Nährmedium enthaltend, in einer Kühlbox bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Zur Gewinnung der Epithelzellen wurden die Schleimhautproben unter sterilen Bedingungen an der Werkbank (Köttermann 8511, Uetze/Hänigsen) in eine Petrischale überführt und anschließend mit einem Skalpell in feine Teilchen zerschnitten. Zur Abtrennung der nasalen Epithelzellen von der Basallamina und dem darunterliegenden Bindegewebe wurden die Biopsien entweder über Nacht bei 8°C im Kühlschrank oder für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank in Dispase-Lösung (2 Einheiten (U)/ml PBS; Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert. Die Dispase bewirkt eine enzymatische Spaltung des Kollagens der Basalmembran, die Zellmembranen bleiben dabei intakt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Biopsien erneut in eine Petrischale überführt und die Epithelzellen vorsichtig mit einem Skalpell von der Basalmembran abgelöst. Anschließend wurde die Zell-Dispase-Suspension mittels einer Pipette in ein 10 ml Reagenzröhrchen überführt und dann bei Raumtemperatur für fünf Minuten bei 900 Umdrehungen/Minute zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg). Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das in dem Reagenzröhrchen verbliebene Zellpellet wurde mit ca. 7ml Airway Cell Growth-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 20 U/ml Penicillin und 20 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin) erfolgte die Kultivierung der Epithelzellen in 25 cm²-großen Zellkulturflaschen (Sarstedt Tissue Culture Flask 25 cm², Nümbrecht) in

wasserdampfgesättigter 5%iger CO₂-Atmosphäre bei 37°C im Brutschrank (Sanyo CO₂ Incubator, München). Mehrmals wöchentlich wurden die Zellen nun auf ihr Wachstum und mögliche Kontaminationen untersucht. Nach drei bis vier Tagen wurde das Nährmedium gewechselt, jetzt ohne Zugabe von Antibiotikum. Um Rückstände des alten Mediums zu entfernen, wurden die Zellen mit warmer PBS gewaschen. Nach ca. 14 Tagen, bei Erreichen eines präkonfluenten Monolayers, konnten die Zellen passagiert werden. Hierbei erfolgte eine erneute Inkubation der Zellkulturen für ca. 20 Minuten bei 37°C in Dispase-Lösung (0,66 U/ml PBS), um die Zellen enzymatisch vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Nach erneuter Zugabe des Nährmediums, anschließender Zentrifugation für fünf Minuten bei 900 Umdrehungen/Minute und Abpipettieren des Überstandes, konnten die Zellen unter Resuspension in Zellkulturmedium überführt und erneut kultiviert werden.

Da 20 verschiedene Bakterienstämme pro Patient getestet werden sollten, stellte sich die einheitliche nicht separierte Fläche der Zellkulturflaschen als Problem dar. Alternativ wurde der Versuch mit sterilen 8 Chamber Culture Slides durchgeführt, bestehend aus einem acht-Kammeraufsatz aus Polystyrol auf einem für Zellkulturen vorbehandelten Glas-Objektträger.

Jede einzelne Kammer wurde nach Resuspension der Zellpellets mit dem Airway Cell Growth Medium, sowie dem Antibiotikazusatz mit 0,6ml gefüllt und anschließend ebenfalls in wasserdampfgesättigter 5%iger CO₂-Atmosphäre bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Aufgrund eines ungleichen Wachstumsmusters innerhalb der 8er Wells wurde versucht, die Zellen wie zuvor in Kulturflaschen anzuzüchten und anschließend in die 8 Chamber Culture Slides zu passagieren. Auch hier zeigte sich jedoch, dass die Zellen schlecht auf dem Deckgläschen adhärten und vielmehr an den aus Polystyrol bestehenden Kammerwänden hafteten.

Bedingt durch die Schwierigkeiten einer ausreichend großen Biopsieentnahme der oftmals stark beeinträchtigten Nasenschleimhaut bei den Patienten mit GPA, den Schwierigkeiten, die Epithelzellkulturen ohne Kontamination nach Antibiotikaentzug anzuzüchten und durch die Adhäsionsproblematik der Zellen auf dem Glasdeckgläschen der 8 Chamber Culture Slides, wurden die Versuche mit primären nasalen Epithelzelllinien zunächst eingestellt.

3 Ergebnisse

Nach Auswertung und anschließender Mittelung der Bilder aller Bakterienstämme aus beiden Patientengruppen, konnte eine deskriptive Statistik angelegt werden, wobei hier insbesondere auf die Maßzahlen Minimum, Maximum, Median, Quartildistanz und Anteil eingegangen wurde. Jeder Wert wurde auf seine Streuung und Signifikanz im Vergleich zur jeweils anderen Patientengruppe geprüft. Durch die Ergebnisse der Positiv – und Negativkontrollen sowie der Leerkontrollen und den Ansätzen, bei denen nur Epithelzellen angezüchtet wurden, ließ sich ein stabiler Versuchsaufbau nachweisen. So betrug der Median der adhärierenden Bakterien bei der Positivkontrolle 16 und der Median der adhärierenden Bakterien bei der Negativkontrolle 4. Die Positivkontrolle zeigte also im Median eine vier Mal so hohe Anzahl an adhärierenden Bakterien im Vergleich zu der Negativkontrolle. Bei den Leerkontrollen konnten im Median 0 Zellen und 1 Bakterium nachgewiesen werden. Die Kontrollansätze, bei denen nur die Epithelzellen angezüchtet wurden ergaben einen Median von 36 Zellen. Der Median der Gesamtbakterien und der adhärierenden Bakterien betrug 0 (siehe Tabelle 1).

Im Folgenden finden sich Tabellen und Abbildungen, die die Ergebnisse bildlich veranschaulichen. So werden in den Boxplots insbesondere die Mediane dargestellt und mit der jeweils anderen Patientengruppe verglichen, um sie auf mögliche signifikante Unterschiede zu prüfen. Darüber hinaus werden eventuelle Ausreißer sowie die Quartile Q_1 bis Q_3 dargestellt. Die Quartile begrenzen die “Box“ (blau hinterlegt) und kennzeichnen den Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen.

3.1 Statistik zu den Versuchskontrollen

	Zellen-Median	Zellen mit adhärerten Bakterien	Bakterien-Median	Adhärirte Bakterien
Positivkontr.	36	6	16	16
Negativkontr.	36	3	6	4
Leerkontrolle	0	0	1	0
RPMI-Kontr.	36	0	0	0

Tabelle 2: Statistik zu den Versuchskontrollen

3.2 Statistik zu den Gesamtzellen beider Patientengruppen

Maßzahl	Gruppe	n	Min.	Max.	\tilde{X}	IQR [Q ₁ -Q ₃]	p-Wert
Minimum	Kontrolle	9	24,00	41,00	32,00	28,00-37,00	0,021
	GPA	12	0,00	36,00	23,50	18,00-29,75	
Maximum	Kontrolle	9	73,00	99,00	78,00	75,00-85,00	0,001
	GPA	12	45,00	83,00	61,50	55,75-68,00	
Median	Kontrolle	9	39,50	69,00	55,00	52,50-58,00	0,003
	GPA	12	30,50	52,50	42,25	35,88-48,50	

Tabelle 3: Statistische Auswertung zu den Gesamtzellen beider Patientengruppen

Der Median der Gesamtzellen betrug in der Kontrollgruppe 55,00 und in der Patientengruppe mit GPA 42,25. Beide Mediane der Gesamtzellen aus beiden Patientengruppen verglichen, ergaben einen signifikanten Unterschied (★) von 12,75 (p-Wert=0,003).

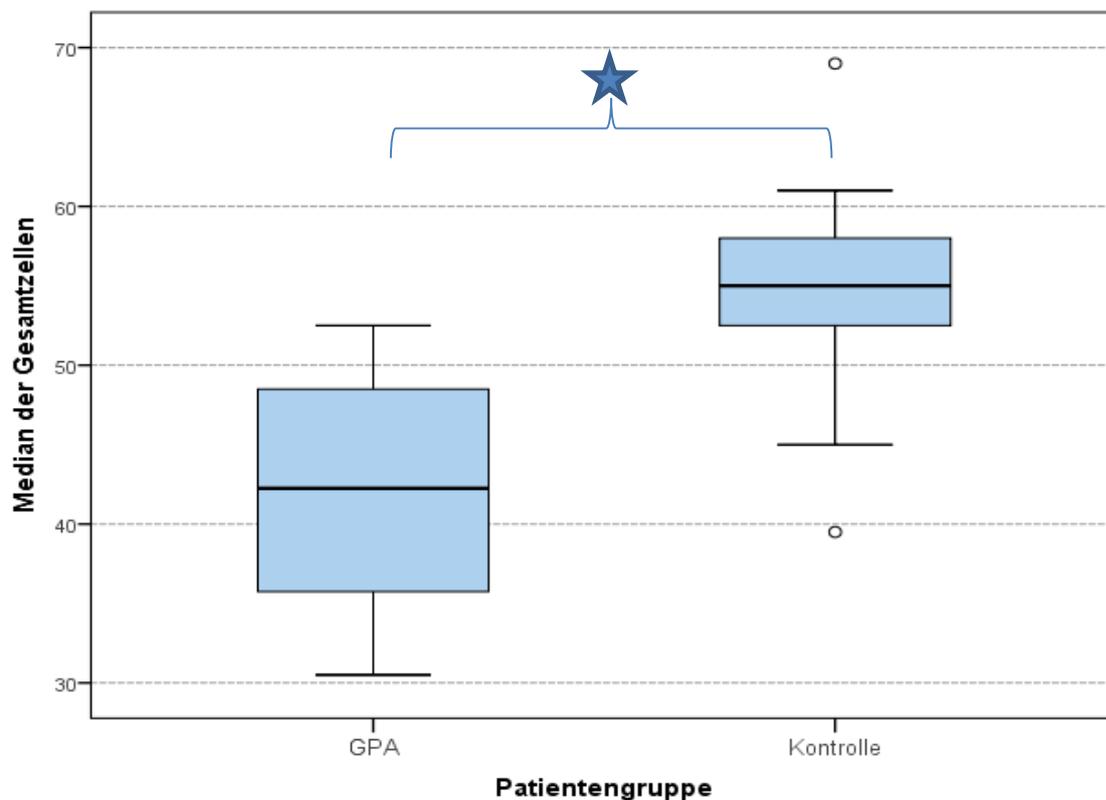


Abbildung 3: Mediane der Gesamtzellen beider Patientengruppen

3.3 Statistik zu den Zellen mit adhärirten Bakterien beider Patientengruppen

Maßzahl	Gruppe	n	Min.	Max.	\tilde{X}	IQR [Q ₁ -Q ₃]	p-Wert
Minimum	Kontrolle	9	1,00	12,00	3,00	2,00-8,00	0,162
	GPA	12	0,00	6,00	2,50	0,00-4,25	
Maximum	Kontrolle	9	9,00	77,00	13,00	13,00-53,00	0,352
	GPA	12	6,00	41,00	13,50	10,00-19,25	
Median	Kontrolle	9	5,00	41,00	6,00	6,00-19,50	0,618
	GPA	12	3,00	14,00	7,75	4,38-8,50	
Anteil	Kontrolle	9	0,11	0,65	0,15	0,12-0,36	0,776
	GPA	12	0,08	0,42	0,16	0,13-0,25	

Tabelle 4: Statistische Auswertung zu den Zellen mit adhärirten Bakterien beider Patientengruppen

Der Median der Zellen mit adhärirten Bakterien ergab in der Kontrollgruppe 6,00 und in der Patientengruppe mit GPA 7,75. Es ergab sich ein nicht signifikanter Unterschied (NS) von 1,75 (p-Wert=0,618) im Median der mit Bakterien behafteten Zellen. Der Median des prozentualen Anteils aller mit Bakterien behafteten Zellen (siehe Abbildung 5) betrug in der Kontrollgruppe 0,15 und in der Patientengruppe mit GPA 0,16. Im Vergleich ergab sich hieraus ein nicht signifikanter Unterschied von 0,01 (p-Wert=0,776) zwischen beiden Patientengruppen.

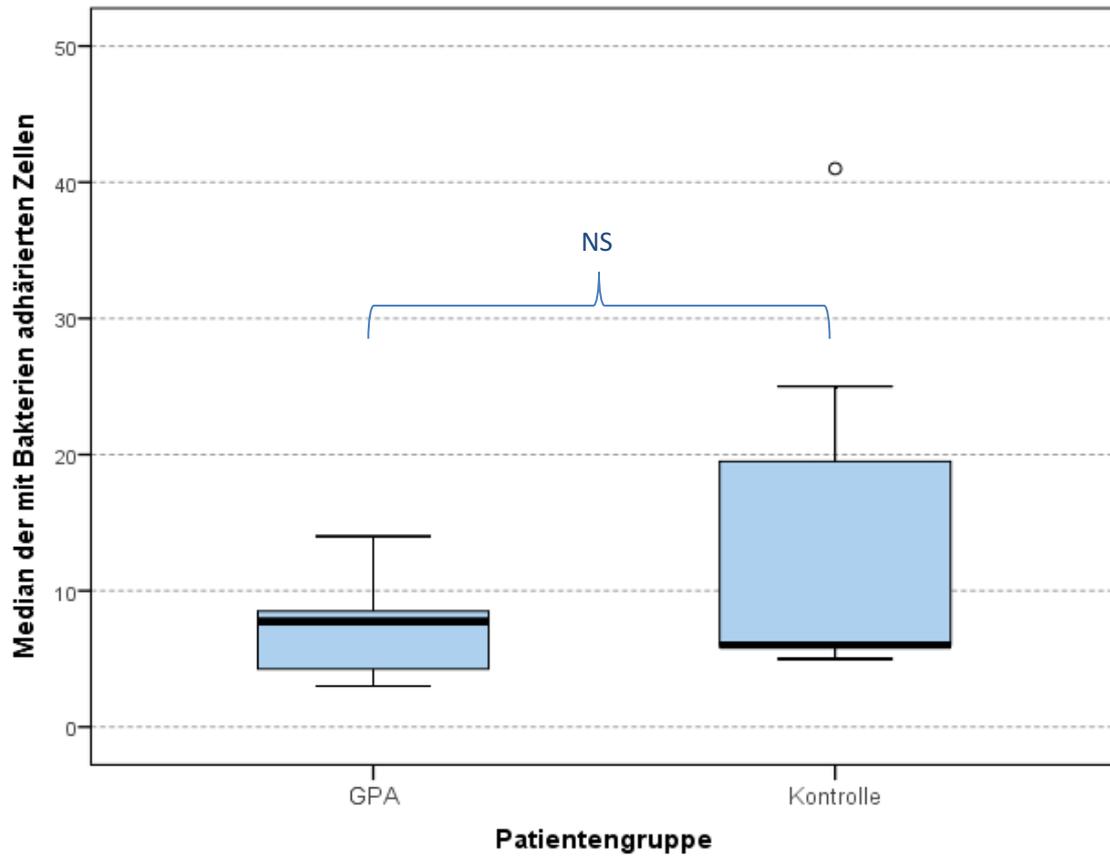


Abbildung 4: Mediane der bakterienbehafteten Zellen beider Patientengruppen

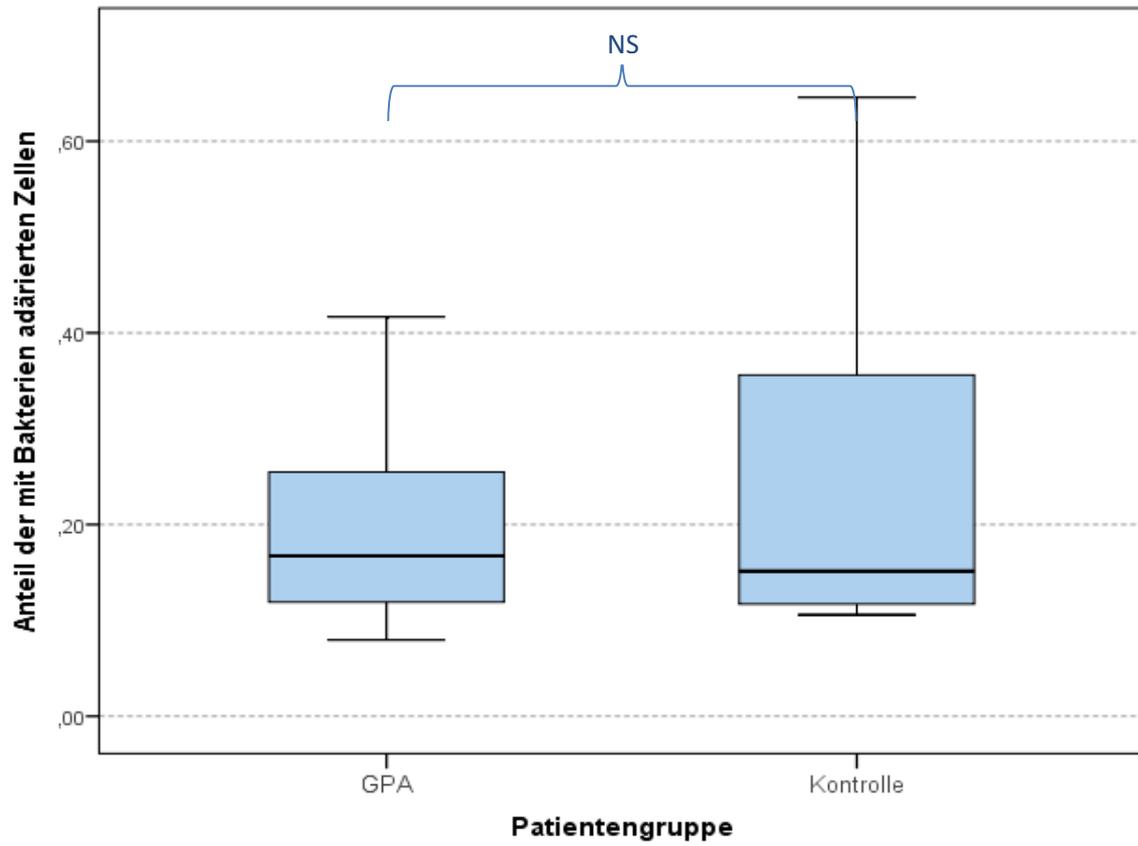


Abbildung 5: Prozentuale Anteile an Zellen mit adhärierenden Bakterien

3.4 Statistik zu den Gesamtbakterien beider Patientengruppen

Maßzahl	Gruppe	n	Min.	Max.	\tilde{X}	IQR [Q ₁ -Q ₃]	p-Wert
Minimum	Kontrolle	9	1,00	25,00	8,00	3,00-13,00	0,116
	GPA	12	0,00	10,00	4,00	1,50- 8,50	
Maximum	Kontrolle	9	29,00	274,00	83,00	56,00-159,00	0,394
	GPA	12	14,00	142,00	63,50	41,00-113,75	
Median	Kontrolle	9	10,00	144,00	33,50	15,00-49,00	0,20
	GPA	12	5,00	57,00	18,75	15,38-27,13	

Tabelle 5: Statistische Auswertung zu den Gesamtbakterien beider Patientengruppen

Der Median der Gesamtbakterien lag bei den Kontrollen bei 33,50 und bei den Patienten mit GPA bei 18,75. Beide Patientengruppen verglichen, ergaben einen nicht signifikanten Unterschied von 14,75 (p-Wert=0,20).

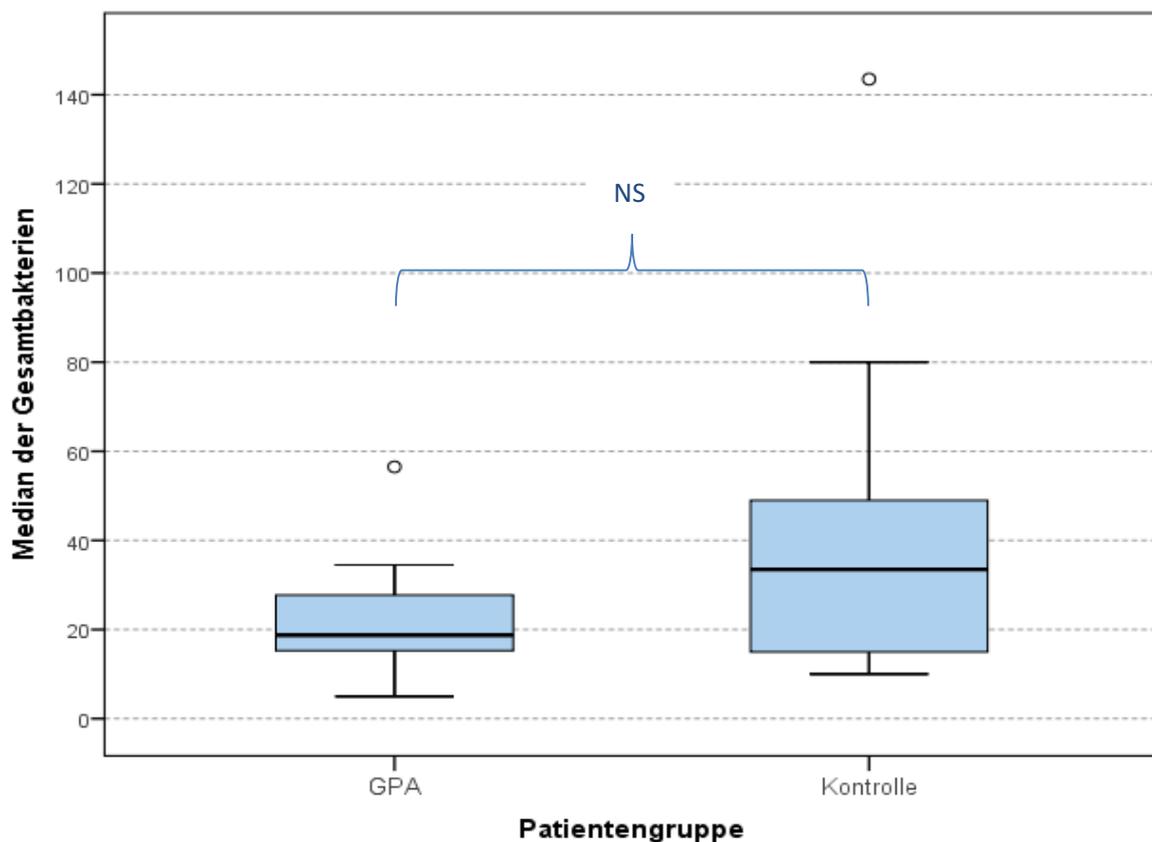


Abbildung 6: Mediane der Gesamtbakterien beider Patientengruppen

3.5 Statistik zu den adhärirten Bakterien beider Patientengruppen

Maßzahl	Gruppe	n	Min.	Max.	\bar{X}	IQR [Q ₁ -Q ₃]	p-Wert
Minimum	Kontrolle	9	1,00	23,00	8,00	3,00-13,00	0,068
	GPA	12	0,00	10,00	3,50	0,00- 7,25	
Maximum	Kontrolle	9	20,00	276,00	81,00	51,00-149,00	0,255
	GPA	12	9,00	140,00	53,50	30,75- 87,50	
Median	Kontrolle	9	8,50	143,00	31,00	15,00-44,50	0,126
	GPA	12	4,00	46,50	17,75	11,75-23,75	
Anteil	Kontrolle	9	0,72	0,99	0,95	0,86-0,98	0,522
	GPA	12	0,51	1,00	0,83	0,74-0,99	

Tabelle 6: Statistische Auswertung zu den adhärirten Bakterien beider Patientengruppen

Der Median der adhärirten Bakterien ergab bei den Kontrollen 31,00 und bei den Patienten mit GPA 17,75. Es ergab sich ein nicht signifikanter Unterschied im Median der adhärirten Bakterien von 13,25 (p-Wert=0,126). Der Median des prozentualen Anteils aller adhärirter Bakterien betrug bei den Kontrollen 0,95 und bei den Patienten mit GPA 0,83. Der Vergleich beider Patientengruppen resultierte in einem nicht signifikanten Unterschied von 0,12 (p-Wert=0,522).

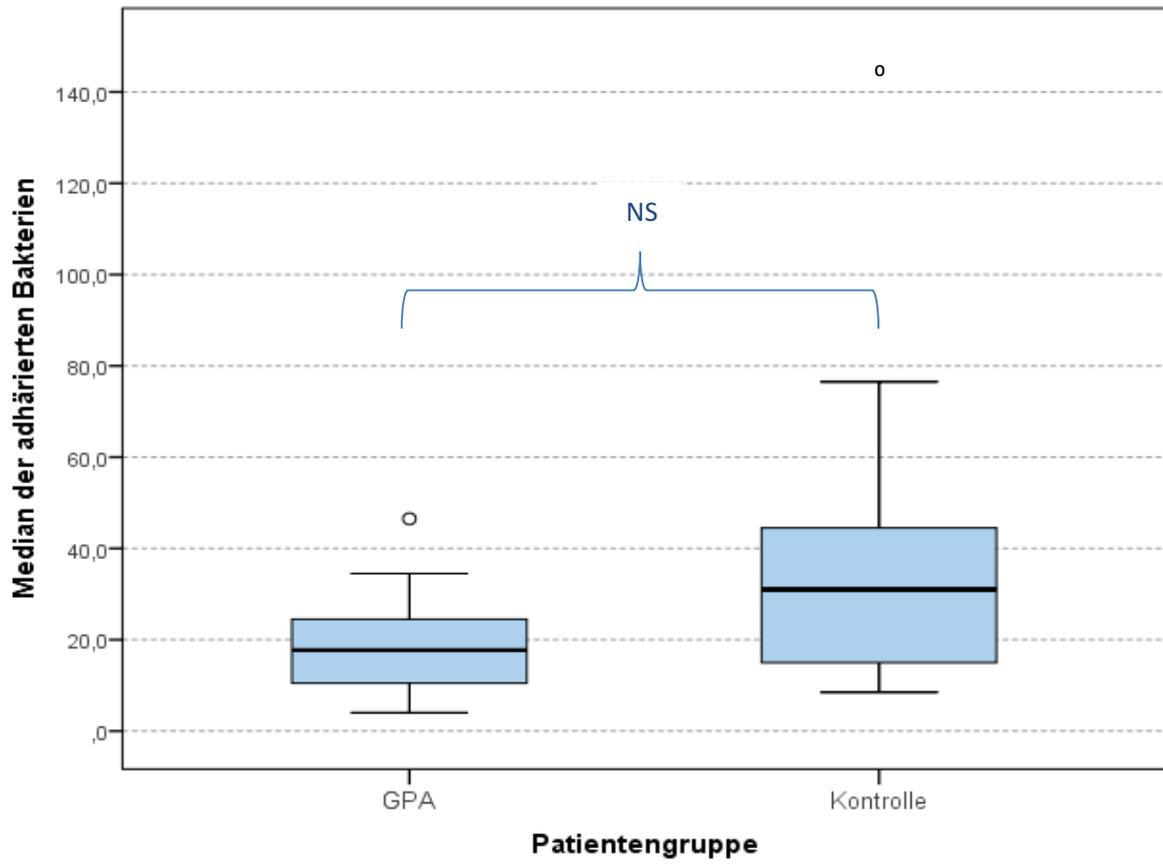


Abbildung 7: Mediane der an Zellen adhärrierenden Bakterien

3.6 Die Stärke des Zusammenhangs im Adhäsionsverhalten von Zellen und Bakterien

Die Stärke des Zusammenhangs im Adhäsionsverhalten von Zellen und Bakterien wurde mittels des Spearman Rang-Korrelationskoeffizienten berechnet.

1. Variable	2. Variable	Kontrollen	GPA
Median der Gesamtzellen	Median der bakterienbehafteten Zellen	0,44 (p=0,235)	0,183 (p=0,568)
Median der Gesamtbakterien	Median adhärierter Bakterien	0,98 (p< 0,001)	0,958 (p< 0,001)

Tabelle 7: Statistische Darstellung der Stärke des Zusammenhangs im Adhäsionsverhalten von Zellen und Bakterien

Mittels des Spearman Rang-Korrelationskoeffizienten von 0,44 konnte in der Kontrollgruppe kein signifikanter Zusammenhang (p-Wert=0,235) zwischen dem Median der Gesamtzellen und den bakterienbehafteten Zellen nachgewiesen werden. Auch in der Patientengruppe mit GPA ergab sich mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,183 kein signifikanter Zusammenhang (p-Wert=0,568). Im Gegensatz dazu konnte sowohl in der Kontrollgruppe (p-Wert< 0,001), als auch in der Patientengruppe mit GPA (p-wert< 0,001) mittels des Spearman Rang-Korrelationskoeffizienten ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Median der Gesamtbakterien und den adhärerten Bakterien ermittelt werden.

Insgesamt stellten die erhobenen Daten statistisch keine signifikanten Unterschiede im Adhäsionsverhalten zwischen den beiden Gruppen dar.

4 Diskussion

4.1 Zum Erstversuch: Das Adhäsionsverhalten krankheitsspezifischer *S. aureus* - Stämme an der nasalen Epithelzelllinie RPMI 2650

Durch die Ergebnisse der Kontrollansätze konnten ein stabiler Versuchsaufbau sowie ein steriles Arbeiten nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle zeigte eine 4 Mal so hohe Anzahl an adhärenierten Bakterien, verglichen mit der Negativkontrolle und die Kontrollansätze, bei denen nur Epithelzellen angezüchtet wurden, erwiesen sich als nicht kontaminiert. Bei den Leerkontrollen konnte im Median lediglich ein Bakterium nachgewiesen werden. Die Generationszeit von *S. aureus* beträgt 15 Minuten. Bei einer frühen Kontamination hätten demnach 16 Bakterien nachweisbar sein müssen. Der Median von einem Bakterium könnte für eine nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit stattgefundene Kontamination sprechen [37].

Die Auswertung der Gesamtzellen beider Patientengruppen ergab im Vergleich signifikante Unterschiede sowohl im Minimum, Maximum, als auch im Median. Da die RPMI-Zellen sowohl bei den Patienten mit GPA, als auch bei den Normalkontrollen unter gleichen Bedingungen kultiviert und inkubiert wurden und die Epithelzelllinie in vielen Studien als eine bei in-vitro Untersuchungen gut einsetzbare Zelllinie gilt [38], stellt sich die Frage, ob die *S. aureus*- Stämme, als einzige veränderte Variable in dem Versuch, in der Patientengruppe mit GPA, eine höhere Mortalität der Zellen verursachten. So kann vermutet werden, dass die Bakterienstämme in der Patientengruppe mit GPA, bedingt durch phänotypische Unterschiede, zu einer Zellnekrose und damit zum Untergang der Epithelzellen führten. Möglich wäre hierbei z.B. die Freisetzung von TSST-1, welches der Integrität des Epithels schadet und durch Invasion der Bakterien zum Zelluntergang führen kann [39]. Auch könnten Zellen, aufgrund eines geschwächten Zellverbandes, bei den abschließenden Waschvorgängen verloren gehen. Um der Vermutung nachzugehen, könnte in nachfolgenden Versuchen, die verworfene Waschlösung auf Epithelzellen untersucht werden.

Der Vergleich der Mediane der Zellen mit adhärenierten Bakterien ergab einen nicht signifikanten Unterschied. Genauso wenig auch der Vergleich der prozentualen Anteile aller mit Bakterien behafteten Zellen. Die Statistiken zu den Gesamtbakterien, sowie zu

den adhärerten Bakterien ergaben ebenfalls nicht signifikante Unterschiede zwischen den Patienten mit GPA und den Normalkontrollen.

Schlussfolgernd adhärerten also bei den Patienten mit GPA vergleichbar viele Bakterien an ähnlich vielen Zellen, trotz verminderter Gesamtzellzahl. Die Vermutung, dass die Bakterien in der Patientengruppe mit GPA demnach in einer höheren Konzentration adhärerten oder insgesamt mehr freie Bakterien vorhanden waren, konnte durch die Ergebnisse der adhärerten Bakterien nicht bestätigt werden. Sowohl bei den Normalkontrollen, als auch in der Gruppe der Patienten mit GPA adhärerte der Großteil der nachgewiesenen Bakterien und dies zu vergleichbaren Anteilen.

Mittels des Spearman Rang-Korrelationskoeffizienten, konnte sowohl in der Gruppe der Patienten mit GPA, als auch in der Gruppe der Normalkontrollen kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Median der Gesamtzellen und den bakterienbehafteten Zellen nachgewiesen werden. Oft adhärerten die Bakterien in kleinen Haufen, ohne dabei an jede einzelne Zelle zu adhären. Die Lagerung in Haufen ist typisch für *Staphylokokken* [40]. Die Vermutung, dass eine steigende Zellzahl und eine eventuell damit einhergehende Erschöpfung des Nährbodens, zu einer steigenden bakteriellen Adhäsion führen, findet keine Bestätigung. Im Gegensatz dazu zeigte sich in beiden Patientengruppen ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Median der Gesamtbakterien und den adhärerten Bakterien. Die Zellen wurden über eine Stunde bei 37°C mit den Bakterien inkubiert. Es wurde versucht, optimale Bedingungen für eine bakterielle Adhäsion zu schaffen. Je höher die Bakterienanzahl, desto höher war auch die Wahrscheinlichkeit, dass die Bakterien adhären würden.

S. aureus ist in der Lage über Oberflächenproteine an der extrazellulären Matrix von Wirtszellen zu adhären. Diese Oberflächenproteine lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Zellwand-verankerte und nicht Zellwand-verankerte. Die Zellwand-verankerten Proteine werden auch als „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ (MSCRAMMs) bezeichnet und sind in der Zellwand der Bakterien über ein Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin (LPXTG)-Motiv verankert [41]. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem der „Clumping Factor A“ (cfa), die „Fibronectin-binding proteine A und B“ (FnBPA /B), sowie das „Collagen-binding adhesin“ (cba) [42].

S. aureus bindet über sein Oberflächenprotein cfA spezifisch an den C-Terminus der γ -Untereinheit des Fibrinogens, ein in der Leber synthetisiertes Glykoprotein in Form eines Hexamers [43, 44]. Bei dem cfA handelt es sich um einen Fibrinogen-Rezeptor, der Fibrinmonomere durch Bindung aktiviert, zu Fibrin umwandelt und so die Bildung eines Thrombus fördert. Durch seine spezifische Adhäsion an das Fibrinogen spielt der cfA eine Rolle im Infektionsprozess und ist demnach ein wichtiger Virulenzfaktor des *S. aureus* [43-45]. Darüber hinaus bindet *S. aureus* über „Fibronectin-binding proteine A und B“ auch an das Fibronectin, ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix der Wirtszellen. Sowohl das FnBPA, also auch das FnBPB binden über ihren N-Terminus Fibrinogen und Elastin und über den C-Terminus das Fibronectin [46, 47]. Eine Kooperation beider Proteine soll häufiger durch leichtere Adhäsion und Invasion des Bakteriums zu einer lebensbedrohlichen Sepsis führen können [48]. *S. aureus* kann auch über das cba an die Kollagen ähnliche Domäne C1q binden, eine Subkomponente des ersten Kollagenfaktors. Durch diese Bindung an C1q wird die Aktivierung des klassischen Komplementweges gehemmt und somit auch ein Teil des unspezifischen humoralen Immunsystems, welches zur Eliminierung von Antigenen beiträgt [49].

All diese extrazellulären Matrixproteine dienen als Verbindung zwischen der Zelloberfläche des Bakteriums und den Zellrezeptoren des Wirts. Dadurch wird dem Bakterium eine Adhäsion bzw. Invasion des Wirtsepithels ermöglicht und gleichzeitig Schutz vor Phagozytose durch neutrophile Granulozyten gewährt [50].

Die hier durchgeführten Untersuchungen wurden mittels einer immortalen Epithelzelllinie durchgeführt, die nicht in Interaktion mit dem physiologischen Schleimhautgewebe stand, wodurch mögliche Einflüsse der beschriebenen Adhäsionsfaktoren des *S. aureus*, wie z.B. die MSCRAMMs, welche von den Bakterien sezerniert werden und mit der Extrazellulärmatrix interagieren, nicht berücksichtigt werden konnten [41, 42]. Dennoch war die Verwendung einer solchen Epithelzelllinie unter nicht künstlich erschaffenen physiologischen Bedingungen, eine ganz bewusste Entscheidung. In Anbetracht der verschiedenen Möglichkeiten in vitro Untersuchungen durchzuführen, erweist sich exzidiertes Gewebe in seinen Eigenschaften zwar den physiologischen Bedingungen am ähnlichsten, weist jedoch, insbesondere gegenüber immortaler Epithelzellen, auch gravierende Nachteile auf. Erschwerte Beschaffungsmöglichkeiten, die begrenzte Vitalität, wodurch eine Reproduzierbarkeit

von Ergebnissen stark beeinträchtigt wird und der erschwerte Vergleich von Versuchsergebnissen, aufgrund von inter- und intraindividuellen Schwankungen [51]. Um physiologische Bedingungen zu imitieren, besteht die Möglichkeit den Objektträger mit einem Kollagen- oder Fibronektinnetz zu beschichten. Kollagen wird insbesondere von Fibroblasten und Myofibroblasten synthetisiert und ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix sowie der Basalmembran, die die Basis der Epithelzellschicht darstellt und wichtige Stütz- und Verankerungsfunktionen innehat. Auch das Fibronektin ist ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran [52, 53]. Wengst et al. inkorporierte in vorangegangenen Studien Fibroblasten in ein solches Kollagenetz, die zu einer höheren mechanischen Stabilität des RPMI-Zellverbundes führten und einen stimulierenden Einfluss auf die Epithelzeldifferenzierung hatten. Dennoch können diese imitierten physiologischeren Gegebenheiten auch zu Problematiken im Versuchsablauf führen. So besteht bei einer Fibronektin- oder Kollagenbeschichtung die Gefahr einer Ablösung durch den häufigen Wechsel des Zellkulturmediums, der insbesondere bei den sehr schnell wachsenden RPMI Zellen notwendig ist. Auch die in das Kollagenetz inkorporierten vitalen Fibroblasten können durch induzierte Kontraktionen des Kollagenetzes dazu führen, dass sich die Epithelzellen auch unterhalb der Kollagenschicht anheften und so den Versuchsablauf stören sowie zu nicht einheitlichen und verfälschten Ergebnissen führen [51].

Die nicht Zellwand-verankerten Oberflächenproteine werden als „secreted expanded-repertoire adhesive molecules“ (SERAMs) bezeichnet und sind strukturell nicht miteinander verwandt. Hierzu zählen unter anderem das „extracellular fibrinogen binding protein (Efb)“, das „extracellular matrix binding protein“ (Emp) und das „extracellular adhesive protein“ (Eap) [54]. Das Efb bindet direkt an das Fibrinogen und inhibiert die Thrombozytenaggregation [55]. Darüber hinaus bindet es über den C-Terminus an die beiden Komplementfaktoren C3b und C3d, wodurch sowohl die Opsonierung, als auch die Phagozytose von Antigenen gestört werden können [56-58]. Das Emp interagiert mit Fibronektin, Fibrinogen, Kollagen und Vitronektin [59]. Auch das Eap interagiert mit vielen Plasma- und extrazellulären Matrixproteinen. Dazu gehören unter anderem das Fibrinogen und Kollagen 1,4 und 5 [54, 60]. Jüngste Veröffentlichungen zeigten darüber hinaus, dass *S. aureus* über das Eap in der Lage ist, die Aktivität neutrophiler Serinproteasen zu inhibieren. Dazu zählen die neutrophile Elastase, Proteinase 3 und Cathepsin G. Durch Inaktivität dieser neutrophilen

Serinproteasen, ist die Immunabwehr mittels neutrophiler Granulozyten deutlich herabgesetzt [61]. Demnach ist es *S. aureus* möglich auf vielfältige Art und Weise eine Verbindung zum Wirt herzustellen ohne dabei direkt eliminiert zu werden.

Auch in der Gruppe der SERAMs spielen erneut Fibrinogen, Fibronectin, sowie das Kollagen, eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion von *S. aureus*. Doch auch hier gilt es, aufgrund der Entscheidung die Untersuchungen mittels immortalen Epithelzelllinien durchzuführen und das Risiko für Abweichungen und Verfälschungen des Versuchsablaufes durch künstlich imitierte physiologische Bedingungen gering zu halten, die genannten Adhäsionsfaktoren nur vermindert zu betrachten.

Im Verlauf soll eben diese Versuchsmethodik sowie die hierbei gegebenen Bedingungen genauestens hinterfragt und diskutiert werden.

Die Verwendung einer immortalen nasalen Epithelzelllinie konnte im Hinblick auf Untersuchungen mit Epithelzellen bereits in mehreren Studien als positiv und sinnvoll verzeichnet werden und bietet verglichen mit primären Zellkulturen bedeutende Vorteile [62]. Zum einen sind die Kultivierungsbedingungen der Epithelzelllinie einfacher und die Zellen weniger empfindlich, die Zellen sind phänotypisch identisch, stabil reproduzierbar und immortal [51, 63]. Die enzymatisch metabolische Barriere der RPMI 2650 Zelllinie ist hingegen den Barrieren primärer Zellkulturen sehr ähnlich [64]. Durch die Polarisierung der Epithelzellen und deren Verbindung durch interzelluläre Conektine, wie den Tight junctions ZO-1, Occludin, Claudin-1, E-cadherin und β -catenin entsteht auch bei der RPMI 2650 Zelllinie eine parazelluläre Barriere, deren Dichtheit durch den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) beschrieben wird. Sowohl die Expression der Junction-Proteine, als auch der gemessene TEER sind bei den RPMI Zellen ähnlich derer bei Primärzellen [38, 62]. Merkle HP et al. fasst zusammen, dass sich die RPMI 2650 Zelllinie in Karyotyp, dem Zytokeratin Polypeptidmuster, sowie in dem Vorhandensein einer Mukoidschicht auf den Zelloberflächen kaum von einer primären Zellkultur unterscheidet [36, 63, 65, 66]. Überlegungen zu einer zu starken Ungleichheit im Zellaufbau zwischen RPMI Zelllinien und Primärkulturen und einer damit verbundenen verminderten Adhäsion an der RPMI 2650 Zelllinie werden durch die oben genannten Faktoren abgeschwächt. Kreft et al. konnte zudem in einer seiner Studien berichten, dass die RPMI Zellen in der Lage waren, Mikrovilli auszubilden [62]. Genau wie bei den Primärkulturen kommt es demnach zu einer

Oberflächenvergrößerung, die eine vermehrte bakterielle Adhäsion ermöglichen kann. Zusätzlich wurden durch das Verwenden einer immortalen Zelllinie jegliche Störfaktoren durch spenderspezifische immunologische Faktoren ausgeschlossen. Demnach war es möglich, isoliert die Potenz der Bakterien hinsichtlich einer Adhäsion zu untersuchen. Nichtsdestotrotz bietet die Verwendung der immortalen nasalen RPMI Zelllinie auch Nachteile. So konnte Salib RJ et al. in einer seiner Studien beobachten, dass die RPMI Zellen deutlich weniger Zilien ausbildeten, was zu einer gestörten nasalen Reinigung bzw. zu einem stark eingeschränkten Abtransport von Fremdkörpern führen kann [67]. Eine bakterielle Adhäsion könnte dadurch fälschlicherweise deutlich höher sein.

Es gilt demnach zu bedenken, dass durch die Beeinflussung des genetischen Bestandes einer kontinuierlich wachsenden immortalisierten Zelllinie zwar krankheitsspezifische Defekte analysiert werden können, diese aber abschließend exemplarisch mit Primärkulturen verifiziert werden müssen, um die *in vivo* Bedingungen so realistisch wie möglich wiedergeben zu können [68].

Neben der nasalen RPMI 2650 Zelllinie selbst, gilt es auch ihre Kultivierungsbedingungen näher zu betrachten und zu diskutieren. Kreft et al. berichtet in einer seiner Veröffentlichungen über Möglichkeiten diese zu optimieren.

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der RPMI Zellen an Grenzflächen untersucht. Anders als in dem von uns angewandten Kultivierungssystem, befanden sich die Zellen in einem Zwei-Phasen-System. So wurden das Adhäsions-, -sowie das Proliferationsverhalten der Zellen in einem air-liquid Interphasensystem mit denen in einem liquid-liquid Interphasensystem verglichen und untersucht. In der air-liquid Interphase waren die Zellen in der Lage, mehr Epithelschichten auszubilden und erreichten einen höheren TEER. Durch den Kontakt zur Luft wurde eine Differenzierung der RPMI Zellen stimuliert und ein kontinuierliches homogenes Wachstum angeregt [38]. Darüber hinaus war die Permeabilität für bestimmte Polysaccharide bei den Zellen der air-liquid Interphase, verglichen mit den Zellen der liquid-liquid Interphase, deutlich geringer. Gleichzeitig wurden Untersuchungen bezüglich des verwendeten Zellmediums durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Zellen mittels des Mediums A-MEM besser proliferierten, als mit dem in unserer Studie verwendeten MEM-Medium und darüber hinaus weniger Serum für ihr Wachstum benötigten. Eine verbesserte

Zellproliferation und die damit verbundene erhöhte Anzahl von Zellschichten führten zu einer dichteren Zellbarriere und der maximale TEER wurde schneller erreicht. Im Verlauf konnte jedoch beobachtet werden, dass insbesondere bei der Kombination des A-MEM Mediums mit dem air-liquid Interphasensystem, die obersten Zellschichten nekrotisch wurden, was vermutlich auf den erhöhten Nährstoffbedarf der Zellen zurückzuführen ist und auch erklären würde, warum der durchschnittliche TEER bei Verwendung des MEM-Mediums höher ist. Zudem könnten ein erhöhter Zelluntergang und der Verlust der Zellintegrität in einer falsch hohen bakteriellen Adhäsion resultieren. Die intakten Zellschichten zeichneten sich jedoch insbesondere bei Verwendung des air-liquid Interphasensystems und unabhängig vom Medium, durch Ausbildung von interzellulären Conektinen, wie den Tight-junctions Occludin, Claudin-1 und E-Cadherin, aus. Insbesondere Claudin-1 und E-cadherin wurden eher in Bereichen mit mehreren Zellschichten beobachtet.

In unserem Versuch wurde die Adhäsion der Bakterien an einem präkonfluenten Monolayer untersucht. Dies hat den Vorteil, dass es zu keiner Zellüberlagerung kommt und eine bakterielle Adhäsion visuell leichter zu untersuchen ist. Darüber hinaus, ist das Risiko eines Nährstoffmangels geringer. Vorteil des MEM Mediums ist, dass der TEER konstant bleibt und es in vielen Studien als ein sehr zuverlässiges Zellmedium bei der Kultivierung von RPMI Zellen gilt [62]. Nichtsdestotrotz, könnte die air-liquid Kultivierung von RPMI Zellen in der Untersuchung der bakteriellen Adhäsion, eine interessante Alternative darstellen, die insbesondere durch die Ausbildung eines dichten Zellverbandes, den in vivo Bedingungen sehr nahekommt.

Ein weiterer Grund für den nicht signifikanten Unterschied im Adhäsionsverhalten könnte die einstündige Inkubationszeit sein. Diese ist gegebenenfalls nicht ausreichend, um signifikante Unterschiede der Adhäsion abzubilden. Allerdings limitieren die durch die Bakterien über die Zeit der Kokultivierung zunehmenden, für die Epithelzellen toxischen Effekte, die Versuchszeit [69]. Zudem wurde der Einfluss des pH-Wertes auf eine bakterielle Adhäsion bereits in mehreren Studien untersucht. So habe laut Nostro et al. ein alkalischer pH einen hemmenden Effekt auf die bakterielle Adhäsion [70]. Des Weiteren lässt sich die gegebene Temperatur während der Adhäsion diskutieren. Da die Temperatur in der Nase physiologisch unter 37°C liegt, verglich Hoefnagels-Schuermans et al. das bakterielle Adhäsionsverhalten an nasalen Epithelzellen bei 23°C

und 37°C. Bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten, konnte kein signifikanter Unterschied in der Adhäsion nachgewiesen werden, sodass, wie auch in unserem Versuch, 37°C als optimale Inkubationstemperatur gewählt wurde [71]. Nichtsdestotrotz, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei niedrigeren Inkubationstemperaturen signifikante Unterschiede in der Adhäsion zwischen einzelnen Bakterienstämmen detektiert werden können.

Phänotypische Eigenschaften der Bakterien, die eine Adhäsion beeinflussen können, sind laut Pöhlmann-Dietze et al. z.B. das Vorhandensein einer Polysaccharidkapsel vom Typ 5 und 8. Beide Typen würden eine verminderte Adhäsion bewirken. Darüber hinaus spielen auch die Wachstumsphase, in der sich die Bakterien bei der Adhäsion befinden, eine Rolle. Die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase würden deutlich mehr adhäreren, als die Bakterien in der stationären Phase [72]. Die genannten Faktoren sind in dieser Arbeit dahingehend berücksichtigt worden, als dass die Bakterien beider Patientengruppen stets gleichen Bedingungen ausgesetzt waren.

Um einen möglicherweise sehr geringen Unterschied im Adhäsionsverhalten abbilden zu können, bedarf es größerer Kohorten. Aufgrund der in diesem Versuchsansatz gewählten Patientenzahlen lässt sich nicht ausschließen, dass die Ergebnisse durch Ausreißer, bspw. in der Kontrollgruppe verfälscht wurden. Andererseits stellt sich die Frage ob ein solch geringer Unterschied im Adhäsionsverhalten überhaupt von klinischer Relevanz ist.

4.2 Zum Zweitversuch: Adhäsionsverhalten von *S. aureus* -Stämmen an krankheitsspezifischen primären nasalen Epithelzellen

Aufgrund der Überlegungen, dass der ursächliche Pathomechanismus auch auf Wirtsebene begründet sein könnte, untersuchten wir in einem Zweitversuch die Rolle des Wirtes. Es wurden primäre Epithelzellkulturen von Patienten mit GPA sowie von Normalkontrollen mit *S. aureus* -Stämmen kultiviert. Die Nasenschleimhautbiopsien wurden alle an der unteren Muschel entnommen und hatten etwa die Größe eines Reiskornes. Neben der Seltenheit der Erkrankung, was ein schnelles Voranschreiten der Untersuchungen sehr erschwerte, stellte sich oft auch die Größe des Biopsates als problematisch dar. Da einige der Patienten starke Beeinträchtigungen der

Nasenschleimhaut aufwies, war es teilweise nicht möglich, ein ausreichend großes Biopsat zu gewinnen. Die Bedingungen eine primäre Zellkultur aus dem gewonnenen Zellmaterial zu generieren waren demnach deutlich erschwert. Neben der geringen Zellanzahl bestand auch eine Problematik in der kontaminationsfreien Adhäsion der Primärzellen auf den gläsernen Deckgläschen der 8 Chamber Culture Slides. Nicht selten kam es nach Antibiotikazugabe zu einer Kontamination und die Zellen adhärten vielmehr an den aus Polystyrol bestehenden Kammerwänden. Dies erschwerte die Entstehung eines präkonfluenten Monolayers, wodurch sich die geplante Kultivierungsdauer verlängerte und so das Risiko für Zellschäden stieg. Hoefnagels-Schuermans et al. beschreibt in einer seiner Studien, dass es durch Reduzierung des Flüssigkeitsvolumens innerhalb der Mikrotiter-Wells auf nur 100µl Medium, möglich war, den Kontakt zwischen den Bakterien und den Wänden der Mikrotiter-Wells zu minimieren und zu standardisieren. Diese Idee ließe sich möglicherweise auch auf die Kultivierung der Zellen übertragen, um eine Adhäsion an den Zellwänden zu verhindern. Des Weiteren wurde der Boden der verwendeten Mikrotiter-Plates zuvor mit einem Kollagen Typ 1-Gel beschichtet, was zur Folge hatte, dass mehr als 80% der Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden an dem Kollagengel adhärten und stabile Zell-Zell-Kontakte, sowie Mikrovilli ausbildeten. Der apikale Pol der Zellen richtete sich gegen Kulturmedium aus und der basale Pol gegen Kollagengel [71]. Durch Verwendung von kollagenbeschichteten Materials, werden zwar physiologische Gegebenheiten simuliert und laut Hoefnagels-Schuermans et al. auch das Zellwachstum, sowie die Ausbildung der zellspezifischen Morphologie gefördert, dennoch muss beachtet werden, dass die Zellen einen komplett konfluenten Layer auf dem Kollagengel ausbilden müssen, um eine direkte Adhäsion der Bakterien über Adhäsionsfaktoren an dem Kollagen zu verhindern. Das eigentliche Ziel, nämlich die Adhäsion der Bakterien an den Zellen zu untersuchen, wäre dadurch stark gefährdet. Darüber hinaus besteht die Gefahr, dass sich die Kollagenbeschichtung aufgrund von häufigen Waschprozessen lösen könnte und die Versuchsmethodik nicht mehr einheitlich und reproduzierbar durchzuführen wäre [51].

Im Gegensatz zu den RPMI-Zellen, die innerhalb von drei Tagen einen präkonfluenten Monolayer bildeten und hierbei ein Einsatz von Antibiotika nicht notwendig war, betrug die Wachstumszeit der Primärzellen unter Antibiotikazugabe bis Erreichen eines präkonfluenten Monolayers ca. 14 Tage. Demnach könnte auch die Gabe von Antibiotika

einen negativen Einfluss auf den Zellverband der primären Zellen gehabt haben und ein nicht konfluentes Wachstum an den Kammerwänden begünstigt haben [73]. Zudem konnte in weiteren Studien nachgewiesen werden, dass die Zellproliferation primärer Zellkulturen unter Antibiotikaeinfluss stark herabgesetzt war [74].

Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum sich sowohl der Waschprozess, als auch die Färbung der Primärzellen als problematisch gestaltete. Immer wieder gingen auffallend viele Zellen verloren, was die Annahme schwacher interzellulärer Bindungen bekräftigt. Auch aus technischer Sicht stellten die schwachen Zellverbände und das nicht konfluente Wachstum der Primärzellen ein Problem dar. Bei Ablösen der Deckgläschen der 8 Chamber Culture Slides von dem Kammeraufsatz, lösten sich die Zellen teilweise vollständig, wodurch das weitere Versuchsgeschehen stark beeinträchtigt war.

Ein Lösungsansatz könnte die Generierung transformierter nasaler Epithelzelllinien sein, mit denen unabhängig von zellzahllimitierenden und zeitlich begrenzten Primärzellkulturen, die Adhäsion von *S. aureus* an Epithelzellen untersucht werden könnte. In einer Studie von Wohlers et al. wurden hierfür nasale Primärzellkulturen mit den B-lymphoma MMLV insertion region 1 (bmi-1) - bzw. dem Gen für die reverse Transkriptase der humanen Telomerase (hTERT) - übertragenden Retroviren transduziert. Sowohl die bmi-1, also auch die hTERT transduzierten Zellen wiesen verglichen mit den Primärzellkulturen, die meist nicht länger als 21 Tage kultiviert werden können, eine deutlich längere Überlebensdauer auf. Die mit bmi-1 generierten Zelllinien zeigten eine Kultivierungsdauer von bis zu 9,2 Wochen und konnten bis zu 15 Mal passagiert werden. Generierte transformierte nasale Epithelzellen bieten demnach, durch Umgehen von limitierenden Faktoren, eine Möglichkeit, die Interaktion von Mikroorganismen unabhängiger zu untersuchen [68].

Darüber hinaus könnte die Untersuchung des Mikrobioms, also der Gesamtheit der im Menschen befindlichen Mikroorganismen, einen Ansatz in der Ursachenforschung der GPA darstellen. Durch Abstrichentnahme an der nasalen Schleimhaut können Anzahl und Art der verschiedenen Bakterien untersucht und mit Gesunden verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden bereits Abstriche sowohl von gesunden Patienten, als auch von Patienten mit GPA entnommen. In weiteren Untersuchungen gilt es nun, die bakteriellen Zusammensetzungen zu vergleichen, um eventuell ein Muster möglicher Keimbesiedlungen zu erkennen.

5 Zusammenfassung

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ist eine systemische Autoimmunerkrankung und gehört zu der Gruppe der primären Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA)-assoziierten Vaskulitiden mit unbekannter Ätiologie. Gekennzeichnet ist die GPA durch chronische nekrotisierende Vaskulitiden, vorwiegend der kleinen bis mittelgroßen Gefäße, kombiniert mit der Bildung nicht verkäsender Granulome vorwiegend im Bereich des Respirationstraktes. In 60-90% der Fälle manifestiert sich die GPA in der Nase und den Nasennebenhöhlen. Die Ursache der Erkrankung wird als multifaktoriell bedingt angesehen, wobei die Rolle mikrobieller Triggerfaktoren zunehmend diskutiert und insbesondere dem *S. aureus* als potentem mikrobiellen Trigger eine relevante Rolle im pathogenetischen Prozess der Erkrankung zugetragen wird. In 60-70% der Fälle konnte eine chronisch erhöhte nasale Besiedlungsrate mit *S. aureus* bei Patienten mit GPA nachgewiesen werden. Um die erhöhte Prävalenz des *S. aureus* näher zu untersuchen, wurde in der hier vorliegenden Studie getestet, ob verschiedene *S. aureus*-Stämme von Patienten mit GPA, sowie von Normalkontrollen ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten an nasalem Epithel aufweisen. Dazu wurde eine immortale nasale Epithelzelllinie (RPMI 2650) mit den Bakterienstämmen inkubiert und nach einstündiger Adhäsionszeit mittels einer Fluoreszenzfärbung analysiert. Unter dem Mikroskop wurden die adhärenierten Bakterien gezählt und statistisch mit den Werten der Normalkontrollen verglichen, um eine möglicherweise erhöhte Adhäsion der Bakterien von Patienten mit GPA nachzuweisen.

Die Untersuchungen ergaben einen nicht signifikanten Unterschied im Adhäsionsverhalten des *S. aureus* zwischen den beiden untersuchten Patientengruppen, wobei berücksichtigt werden muss, dass dies ein in-vitro Ergebnis ist und nicht vollends auf eine in-vivo Situation übertragen werden kann. Ein nicht signifikanter Unterschied könnte jedoch bedeuten, dass der ursächliche Pathomechanismus nicht auf unterschiedlichen bakteriellen Phänotypen beruht, sondern auf Wirtsebene begründet ist.

Aufgrund dieser Überlegungen fanden erste Versuche statt, in denen die Einflussfaktoren der krankheitsspezifischen Epithelzellen und des Gewebes auf das Adhäsionsverhalten geprüft wurden, um die Bedeutung des Wirts für die bekannte erhöhte endonasale Besiedlungsrate mit *S. aureus* zu analysieren. Hierbei wurden

primäre nasale Epithelzellen von Patienten mit GPA, sowie von Normalkontrollen angezüchtet und nach Erreichen eines präkonfluenten Monolayers mit jeweils den gleichen *S. aureus* -Stämmen inkubiert.

Zusammenfassend ermöglichen die in vitro erzielten Resultate trotz der Tatsache diese nicht vollends auf eine in vivo Situation übertragen zu können, ein besseres Verständnis für die Komplexität des Pathomechanismus der GPA. Darüber hinaus ermöglichen die Ergebnisse neue Ansätze und Perspektiven für weitere Untersuchungen. Dazu zählen zum einen die Generierung transformierter nasaler Epithelzellen und zum anderen vertiefende Untersuchungen des Mikrobioms der Patienten mit GPA.

Literaturverzeichnis

1. Csernok, E. and W.L. Gross, *Current understanding of the pathogenesis of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's)*. Expert Rev Clin Immunol, 2013. **9**(7): p. 641-8.
2. Jennette, J.C., et al., *Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference*. Arthritis Rheum, 1994. **37**(2): p. 187-92.
3. Holle, J.U., T. Bley, and W.L. Gross, *[Classification and therapy of vasculitis according to recommendations of the European League Against Rheumatism (EULAR)]*. Radiologe, 2010. **50**(10): p. 846-54.
4. H., K., *Grenzformen der Periarteritis nodosa*. Frankfurt Ztschr. Pathol, 1931: p. 42:455-60.
5. F., W., *Ueber generalisierte septische Gefäßkrankungen*. Verh Deut Pathol Ges, 1936: p. 29:202-10
6. F., W., *Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren*. Beitr Pathol Anat Allg Pathol., 1939: p. 102:36-58.
7. Bacon, P.A., *The spectrum of Wegener's granulomatosis and disease relapse*. N Engl J Med, 2005. **352**(4): p. 330-2.
8. Laudien, M., et al., *[Diagnosis, therapy and current research aspects of selected chronic inflammatory diseases with head and neck involvement]*. Z Rheumatol, 2008. **67**(5): p. 397-406.
9. Gottschlich, S., et al., *[Wegener's granulomatosis in the head and neck region]*. HNO, 2004. **52**(10): p. 935-45; quiz 946-7.
10. Gottschlich, S., et al., *Head and neck manifestations of Wegener's granulomatosis*. Rhinology, 2006. **44**(4): p. 227-33.
11. Morales-Angulo, C., et al., *[Ear, nose and throat manifestations of Wegener's granulomatosis (granulomatosis with polyangiitis)]*. Acta Otorrinolaringol Esp, 2012. **63**(3): p. 206-11.
12. Kornblut, A.D., et al., *Wegener's granulomatosis*. Laryngoscope, 1980. **90**(9): p. 1453-65.
13. Martinez Del Pero, M., et al., *Structured clinical assessment of the ear, nose and throat in patients with granulomatosis with polyangiitis (Wegener's)*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2013. **270**(1): p. 345-54.
14. McDonald, T.J. and R.A. DeRemee, *Head and neck involvement in Wegener's granulomatosis (WG)*. Adv Exp Med Biol, 1993. **336**: p. 309-13.
15. Laudien, M., 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): p. 51-5.
16. Devaney, K.O., et al., *Interpretation of head and neck biopsies in Wegener's granulomatosis. A pathologic study of 126 biopsies in 70 patients*. Am J Surg Pathol, 1990. **14**(6): p. 555-64.
17. Kostianovsky, A., et al., *Alveolar haemorrhage in ANCA-associated vasculitides: 80 patients' features and prognostic factors*. Clin Exp Rheumatol, 2012. **30**(1 Suppl 70): p. S77-82.
18. Kallenberg, C.G., *Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated small-vessel vasculitis*. Curr Opin Rheumatol, 2007. **19**(1): p. 17-24.
19. Tervaert, J.W., et al., *Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies*. Arch Intern Med, 1989. **149**(11): p. 2461-5.
20. Falk, R.J., et al., *Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(11): p. 4115-9.
21. de Groot, K. and E. Reinhold-Keller, *[Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis]*. Z Rheumatol, 2009. **68**(1): p. 49-63; quiz 64.
22. Ralston, D.R., et al., *Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3, alpha1-antitrypsin, and Fcgamma receptors*. J Clin Invest, 1997. **100**(6): p. 1416-24.

23. Watts, R.A., et al., *Geoepidemiology of systemic vasculitis: comparison of the incidence in two regions of Europe*. *Ann Rheum Dis*, 2001. **60**(2): p. 170-2.
24. Watts, R.A., et al., *Epidemiology of systemic vasculitis: a ten-year study in the United Kingdom*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(2): p. 414-9.
25. Allen, S.D. and C.J. Harvey, *Imaging of Wegener's granulomatosis*. *Br J Radiol*, 2007. **80**(957): p. 757-65.
26. Tervaert, J.W., E.R. Popa, and N.A. Bos, *The role of superantigens in vasculitis*. *Curr Opin Rheumatol*, 1999. **11**(1): p. 24-33.
27. Wieczorek, S., J.U. Holle, and J.T. Epplen, *Recent progress in the genetics of Wegener's granulomatosis and Churg-Strauss syndrome*. *Curr Opin Rheumatol*, 2010. **22**(1): p. 8-14.
28. Zycinska, K., et al., *Chronic crusting, nasal carriage of Staphylococcus aureus and relapse rate in pulmonary Wegener's granulomatosis*. *J Physiol Pharmacol*, 2008. **59 Suppl 6**: p. 825-31.
29. Popa, E.R., et al., *Staphylococcal toxic-shock-syndrome-toxin-1 as a risk factor for disease relapse in Wegener's granulomatosis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2007. **46**(6): p. 1029-33.
30. Stegeman, C.A., et al., *Trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis*. *Dutch Co-Trimoxazole Wegener Study Group*. *N Engl J Med*, 1996. **335**(1): p. 16-20.
31. Popa, E.R., et al., *Staphylococcus aureus and Wegener's granulomatosis*. *Arthritis Res*, 2002. **4**(2): p. 77-9.
32. Popa, E.R., et al., *Staphylococcal superantigens and T cell expansions in Wegener's granulomatosis*. *Clin Exp Immunol*, 2003. **132**(3): p. 496-504.
33. Schiffenbauer, J., J. Soos, and H. Johnson, *The possible role of bacterial superantigens in the pathogenesis of autoimmune disorders*. *Immunol Today*, 1998. **19**(3): p. 117-20.
34. Voswinkel, J., A. Muller, and P. Lamprecht, *Is PR3-ANCA formation initiated in Wegener's granulomatosis lesions? Granulomas as potential lymphoid tissue maintaining autoantibody production*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1051**: p. 12-9.
35. Pendergraft, W.F., 3rd, et al., *Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3*. *Nat Med*, 2004. **10**(1): p. 72-9.
36. Moore, G.E. and A.A. Sandberg, *Studies of a Human Tumor Cell Line with a Diploid Karyotype*. *Cancer*, 1964. **17**: p. 170-5.
37. Schmidt, K. *Untersuchung zum in vitro Wachstumsverhalten ausgesuchter MRSA-Stämme*. 2010.
38. Bai, S., et al., *Evaluation of human nasal RPMI 2650 cells grown at an air-liquid interface as a model for nasal drug transport studies*. *J Pharm Sci*, 2008. **97**(3): p. 1165-78.
39. Breshears, L.M., P.M. Schlievert, and M.L. Peterson, *A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling drive the epithelial response to Staphylococcus aureus toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1)*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(39): p. 32578-87.
40. Hatcher, J., *A bunch of grapes: the discovery of staphylococci*. *Nurs Times*, 1970. **66**(52): p. 1654.
41. Foster, T.J. and M. Hook, *Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 1998. **6**(12): p. 484-8.
42. Patti, J.M., et al., *MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues*. *Annu Rev Microbiol*, 1994. **48**: p. 585-617.
43. Liu, C.Z., M.H. Shih, and P.J. Tsai, *ClfA(221-550), a fibrinogen-binding segment of Staphylococcus aureus clumping factor A, disrupts fibrinogen function*. *Thromb Haemost*, 2005. **94**(2): p. 286-94.
44. O'Connell, D.P., et al., *The fibrinogen-binding MSCRAMM (clumping factor) of Staphylococcus aureus has a Ca²⁺-dependent inhibitory site*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(12): p. 6821-9.
45. Gong, R., et al., *Evaluation of clumping factor A binding region A in a subunit vaccine against Staphylococcus aureus-induced mastitis in mice*. *Clin Vaccine Immunol*, 2010. **17**(11): p. 1746-52.

46. Keane, F.M., et al., *Fibrinogen and elastin bind to the same region within the A domain of fibronectin binding protein A, an MSCRAMM of Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 2007. **63**(3): p. 711-23.
47. Meenan, N.A., et al., *The tandem beta-zipper model defines high affinity fibronectin-binding repeats within Staphylococcus aureus FnBPA*. J Biol Chem, 2007. **282**(35): p. 25893-902.
48. Shinji, H., et al., *Role of fibronectin-binding proteins A and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 2011. **79**(6): p. 2215-23.
49. Kang, M., et al., *Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway*. J Biol Chem, 2013. **288**(28): p. 20520-31.
50. Sinha, B., et al., *Fibronectin-binding protein acts as Staphylococcus aureus invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1*. Cell Microbiol, 1999. **1**(2): p. 101-17.
51. Wengst, A. and S. Reichl, *RPMI 2650 epithelial model and three-dimensional reconstructed human nasal mucosa as in vitro models for nasal permeation studies*. Eur J Pharm Biopharm, 2010. **74**(2): p. 290-7.
52. Harrisson, F., C. Vanroelen, and L. Vakaet, *Fibronectin and its relation to the basal lamina and to the cell surface in the chicken blastoderm*. Cell Tissue Res, 1985. **241**(2): p. 391-7.
53. Tofrizal, A., et al., *Alterations of collagen-producing cells in human pituitary adenomas*. Med Mol Morphol, 2016.
54. Chavakis, T., et al., *Staphylococcus aureus interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems*. Thromb Haemost, 2005. **94**(2): p. 278-85.
55. Shannon, O. and J.I. Flock, *Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from Staphylococcus aureus binds to platelets and inhibits platelet aggregation*. Thromb Haemost, 2004. **91**(4): p. 779-89.
56. Ricklin, D., et al., *Cutting edge: members of the Staphylococcus aureus extracellular fibrinogen-binding protein family inhibit the interaction of C3d with complement receptor 2*. J Immunol, 2008. **181**(11): p. 7463-7.
57. Lee, L.Y., et al., *Inhibition of complement activation by a secreted Staphylococcus aureus protein*. J Infect Dis, 2004. **190**(3): p. 571-9.
58. Lee, L.Y., et al., *Identification and characterization of the C3 binding domain of the Staphylococcus aureus extracellular fibrinogen-binding protein (Efb)*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 50710-6.
59. Hussain, M., et al., *Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of Staphylococcus aureus with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins*. J Bacteriol, 2001. **183**(23): p. 6778-86.
60. Hussain, M., et al., *More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of Staphylococcus aureus is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation*. Infect Immun, 2008. **76**(12): p. 5615-23.
61. Stapels, D.A., et al., *Staphylococcus aureus secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(36): p. 13187-92.
62. Kreft, M.E., et al., *The Characterization of the Human Nasal Epithelial Cell Line RPMI 2650 Under Different Culture Conditions and Their Optimization for an Appropriate in vitro Nasal Model*. Pharm Res, 2014.
63. Merkle, H.P., et al., *In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **29**(1-2): p. 51-79.
64. HG, P., *Cell culture sheets to study nasal peptide metabolism: The human nasal RPMI 2650 cell line model*. ETH Zurich: Switzerland, 1996.
65. Moorhead, P.S., *Human tumor cell line with a quasi-diploid karyotype (RPMI 2650)*. Exp Cell Res, 1965. **39**(1): p. 190-6.
66. Moll, R., R. Krepler, and W.W. Franke, *Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas*. Differentiation, 1983. **23**(3): p. 256-69.

67. Salib, R.J., L.C. Lau, and P.H. Howarth, *The novel use of the human nasal epithelial cell line RPMI 2650 as an in vitro model to study the influence of allergens and cytokines on transforming growth factor-beta gene expression and protein release*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(6): p. 811-9.
68. Wohlers, J., *Barrierestörung der nasalen Mukosa bei Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener)*. 2012.
69. Kramko, N., et al., *Early Staphylococcus aureus-induced changes in endothelial barrier function are strain-specific and unrelated to bacterial translocation*. Int J Med Microbiol, 2013. **303**(8): p. 635-44.
70. Nostro, A., et al., *Effect of alkaline pH on staphylococcal biofilm formation*. APMIS, 2012. **120**(9): p. 733-42.
71. Hoefnagels-Schuermans, A., et al., *Staphylococcus aureus adherence to nasal epithelial cells in a physiological in vitro model*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999. **35**(8): p. 472-80.
72. Pohlmann-Dietze, P., et al., *Adherence of Staphylococcus aureus to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 4865-71.
73. Alexandrova, O.I., et al., *[Study of common cytotoxicity of aminoglycoside and fluoroquinolone antibiotics in cell cultures]*. Vestn Oftalmol, 2015. **131**(5): p. 43-50, 52-3.
74. Dette, K.G., *Wirkung der Antibiotika Doxycyclin und Cefotaxim auf die MMP-Expression, sowie Proliferation, Adhäsion, Migration und Invasion bei Glioblastomzelllinien*. 2007.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel eines 8 Chamber Culture Slides	7
Abbildung 2: RPMI 2650 Zellen mit adhärirten Bakterien.....	9
Abbildung 3: Mediane der Gesamtzellen beider Patientengruppen.....	14
Abbildung 4: Mediane der bakterienbehafteten Zellen beider Patientengruppen	16
Abbildung 5: Prozentuale Anteile an Zellen mit adhärirten Bakterien.....	17
Abbildung 6: Mediane der Gesamtbakterien beider Patientengruppen.....	18
Abbildung 7: Mediane der an Zellen adhärirten Bakterien	20

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Summierte Daten des <i>S. aureus</i> - Stammes S. 227 eines Patienten mit GPA	9
Tabelle 2 Statistik zu den Versuchskontrollen.....	13
Tabelle 3: Statistische Auswertung zu den Gesamtzellen beider Patientengruppen.....	14
Tabelle 4: Statistische Auswertung zu den Zellen mit adhärierten Bakterien beider Patientengruppen	15
Tabelle 5: Statistische Auswertung zu den Gesamtbakterien beider Patientengruppen.....	18
Tabelle 6: Statistische Auswertung zu den adhärierten Bakterien beider Patientengruppen	19
Tabelle 7: Statistische Darstellung der Stärke des Zusammenhangs im Adhäsionsverhalten von Zellen und Bakterien	21

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Petra Ambrosch, Direktorin der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, für die Möglichkeit, meine Dissertation in ihrem Hause durchführen zu können, bedanken.

Ganz besonders danken möchte ich auch Herrn PD Dr. Martin Laudien für die großartige Betreuung, das immer offene Ohr und die vielen aufmunternden und lehrreichen Worte, die maßgeblich für diese Dissertation waren.

Charis, meiner guten Freundin, Kommilitonin und ebenfalls Doktorandin dieses Projektes, möchte ich für die vielen schönen und oft auch haareraufenden Stunden, die wir gemeinsam im Labor, in der Mikrobiologie oder vor dem Mikroskop verbracht haben, danken. Ohne dich hätte ich so manches Mal kapituliert.

Vielen Dank auch an Herrn PD Dr. Tibor Görögh für die permanente Hilfsbereitschaft, die tatkräftige Unterstützung im Labor und die vielen netten Gespräche.

Ein großes Dankeschön auch an Herrn Prof. Dr. Rainer Podschun und Frau Sylvia Voss, für die fachliche Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit.

Auch an Herrn Dipl. Inform. Jürgen Hedderich vielen Dank für die Beantwortung statistischer Fragen und die große Hilfsbereitschaft.

Danken möchte ich auch meinem Cousin Dr. Hannes Petersen, der uns nicht nur ein sehr hilfreiches Starterpaket erstellt hat, sondern uns insbesondere in den Anfängen, durch neue Ideen und durch Beantworten vieler Fragen, sehr unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gilt abschließend meinen Eltern, die meine Arbeit nicht nur einmal lesen mussten und Thies, den ich mit meinem nicht vorhandenen Formatierungswissen wahrscheinlich bald in den Wahnsinn getrieben hätte.

Akademischer Lebenslauf und Veröffentlichungen

Persönliche Angaben

Name: Kari Rolfs

Geburtsjahr: 1989

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung

04/2012 - 05/2016

Christian-Albrechts-Universität Kiel

- Klinischer Teil der medizinischen Ausbildung

05/2015 - 04/2016

Praktisches Jahr

04/2010 - 03/2012

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

- Vorklinischer Teil der medizinischen Ausbildung

08/2000 - 06/2009

Werner-Heisenberg-Gymnasium, Heide

1996 - 2000

Grundschule Wöhrden

Dissertation

09/2013 - heute

Experimentelle Doktorarbeit in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein

„Vergleich des Adhäsionsverhaltens verschiedener *Staphylococcus aureus* - Stämme von Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis und Normalkontrollen an einer immortalen nasalen Epithelzelllinie“

Veröffentlichungen

Rolfs K, Ruhland C, Podschun R, Hedderich J, Moosig F, Laudien M, (2015) „Adhäsionsverhalten von *Staphylococcus aureus* Stämmen von Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis, chronischer Rhinosinusitis und Normalkontrollen an einer immortalen nasalen Epithelzelllinie“, Postervorstellung auf der 86. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., 05/2015 in Berlin.

Link: <http://www.egms.de/static/de/meetings/hnod2015/15hnod622.shtml>
doi: [10.3205/15hnod622](https://doi.org/10.3205/15hnod622)