

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

**Adhäsionsverhalten von *Staphylokokkus aureus* Stämmen von
Patienten mit Chronischer Rhinosinusitis und
Normalkontrollen an einer immortalen nasalen Epithelzelllinie**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Charis Letkemann, geb. Ruhland

aus Wiesbaden

Kiel, 2019

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

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Felix Treumer, Klinik für Ophthalmologie

Tag der mündlichen Prüfung: 02.09.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel den 29.04.2020

gez.: Priv.-Doz. Dr. Hey

<u>INHALTSVERZEICHNIS.....</u>	<u>III</u>
<u>VERZEICHNIS VERWENDETER ABKÜRZUNGEN.....</u>	<u>IV</u>
<u>VERZEICHNIS VERWENDETER MATERIALIEN</u>	<u>V</u>
<u>1. EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1. DEFINITION DER CHRONISCHEN RHINOSINUSITIS (CRS).....	1
1.2. PATHOPHYSIOLOGIE DER CRS UND DIE ROLLE VON <i>S. AUREUS</i> BEI DEREN GENESE	2
1.3. HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG	4
<u>2. MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>5</u>
2.1. PATIENTEN UND METHODIK	5
2.2. KULTIVIERUNG RPMI 2650 ZELLINIE.....	5
2.3. KULTIVIERUNG DER <i>S. AUREUS</i> - STÄMME	6
2.4. ADHÄSIONSVERSUCH	6
2.5. DIGITALE DOKUMENTATION	8
2.6. DATENERHEBUNG UND STATISTIK.....	9
2.7. KULTIVIERUNG PRIMÄRER NASALER EPITHELZELLINIEN IM ALTERNATIVVERSUCH	10
<u>3. ERGEBNISSE</u>	<u>13</u>
3.1. STATISTIK ZU DEN VERSUCHSKONTROLLEN	13
3.2. STATISTIK ZU DER GESAMTZELLZAHL BEIDER PATIENTENGRUPPEN.....	13
3.3. STATISTIK ZU DEN ZELLEN MIT ADHÄRIERTEN BAKTERIEN.....	15
3.4. STATISTIK ZU DEN GESAMTBAKTERIEN BEIDER PATIENTENGRUPPEN.....	17
3.5. STATISTIK ZU DEN AN ZELLEN ADHÄRIERTEN BAKTERIEN BEIDER PATIENTENGRUPPEN	19
3.6. ERFAHRUNGSWERTE MIT KRANKHEITSSPEZIFISCHEN NASALEN PRIMÄRKULTUREN IM ALTERNATIVVERSUCH.....	21
<u>4. DISKUSSION</u>	<u>23</u>
4.1. DISKUSSION ZUR VERWENDUNG DER RPMI- ZELLINIE UND ZUM VERSUCHSAUFBAU.....	23
4.2. DISKUSSION DES ADHÄSIONSVERHALTENS VON BAKTERIEN DER CRS- UND DER KONTROLL-GRUPPE.....	27
4.3. ALTERNATIVVERSUCH MIT PRIMÄREN NASALEN EPITHELZELLEN	32
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>35</u>
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>VII</u>
<u>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>XII</u>
<u>DANKSAGUNG</u>	<u>XIII</u>
<u>AKADEMISCHER LEBENS LAUF UND VERÖFFENTLICHUNGEN.....</u>	<u>XIV</u>

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

AG	Arbeitsgemeinschaft
A-MEM	Alpha-Minimum Essential Medium
ARS	akute Rhinosinusitis
Bbp	Bone sialoprotein binding protein
ClfA	clumping factor A
ClfB	clumping factor B
CNA	Collagen Adhesin
CRS	chronische Rhinosinusitis
CRScNP	chronische Rhinosinusitis mit nasalen Polypen
CRSSNP	chronische Rhinosinusitis ohne nasale Polypen
CWA	„cell wall anchored“
DMSO	Dimethylsulfoxide
<i>EPOS</i>	<i>European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
FnBPA	Fibronectin binding protein A
FnBPB	Fibronectin binding protein B
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
Isd	„Iron regulated surface determinant protein“
IQR	Interquartilsabstand
MEM	Minimum Essential Media
MSCRAMMs	microbial surface components recognising adhesive matrix molecules
NS	nicht signifikant
PBS	Phosphate buffered Saline
S.	<i>Staphylokokkus</i>
Sdr	„serin-aspartat repeat protein“
SEB	<i>Staphylokokken</i> Enterotoxin B
SSSS	<i>Staphylococcal</i> scaled skin syndrom
St.	Stamm
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand
TH	T-Helfer
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig Holstein

Verzeichnis verwendeter Materialien

Reagenzien

Airway Epithelial Cell Growth Nährmedium (Fa. Promo Cell, Heidelberg)
Baclight Bacterial Viability Kit Invitrogen (Live/Dead Färbung)
Brain-Heart-Infusion-Bouillon (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Dispase (Invitrogen, Karlsruhe)
DMSO (Gefrierschutzmittel, Merck, Darmstadt)
Fötales Kälberserum (Biochrom AG, Berlin)
Flüssigstickstoff
Klebstoff (Glue Colle, Herma, Filderstadt)
Minimum-Essential-Media (MEM-Medium, Biochrom AG, Berlin)
Methanol (Fa. Geyer, Hamburg)
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, pH: 7,4)
Penicillin (Biochrom AG, Berlin)
Prolong Gold Antifade (ProLong Gold Reagents)
Streptomycin (Biochrom AG, Berlin)
Trypsin (Biochrom AG, Berlin)

Utensilien

AxioVision LE (Digitales Programm zur Zell- und Bakteriendokumentation)
Brutschrank (Sanyo CO2 Incubator, München)
8 Chamber Culture Slides (BP Falcon)
Deckgläser (Marienfeld, Gelsenkirchen)
Mikroskop (ZEISS, Scope.A1 Axio)
Petrischalen (Sarstedt, TC Schale 100)
Pipetten (Sarstedt, serological pipette)
Reagenzröhrchen (10 ml, Sarstedt, Nümbrecht)
Skalpell (Feather, disposable scalpel)
Werkbank (Köttermann 8511, Uetze/Hänigsen)
Zellkulturflasche (Sarstedt Tissue Culture Flask 25 cm², Nümbrecht)
Zentrifuge (Eppendorf, Centrifuge 5804 R, Hamburg)

Bakterien und Zelllinien

RPMI 2650 Zelllinie (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig)

Staphylokokkus aureus -Stämme (Institut für Infektionsmedizin, UKSH Campus Kiel)

1. Einleitung

1.1. Definition der chronischen Rhinosinusitis (CRS)

Unter der CRS versteht man eine Entzündung der Nase und ihrer Nebenhöhlen, bei der Symptome länger als 12 Wochen bestehen [1]. Da fast immer Nasen- und Nasennebenhöhlenschleimhäute zusammen betroffen sind, spricht man im Allgemeinen von „Rhinosinusitis“ [2]. Bei der CRS wird zusätzlich zwischen CRS mit (CRScNP) und CRS ohne Polypen (CRSsNP) unterschieden [3].

Die Symptome der CRS decken sich zum großen Teil mit denen der akuten Rhinosinusitis (ARS) [4], allerdings sind sie weniger schwer [1]. Vor allem zeigen sich Nasenatmungsbehinderung, Kopfschmerzen, Druck- oder Schwellgefühl im Gesicht, Riechstörungen, anterograde und/oder postnasale Sekretion sowie Allgemeinsymptome wie mangelnde Belastbarkeit oder Erschöpfung [1, 5-7].

Die klinische Definition nach dem *European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps (EPOS)* setzt für die Charakterisierung der Nasen- beziehungsweise Nasennebenhöhlenentzündung mindestens zwei der folgenden Symptome voraus: Nasale Obstruktion, Nasensekretion („anterior or postnasal drip“), Gesichtsschmerzen oder Druckgefühl sowie Hyp- oder Anosmie. Dazu kommen müssen zudem ein pathologischer Befund in der Rhinoskopie oder der nasalen Endoskopie oder in einem bildgebenden Verfahren [2, 3]. All dies kann zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität führen [8] und hat erhebliche volkswirtschaftliche Bedeutung [1].

Im Zusammenhang mit der CRS werden Komplikationen beschrieben, obwohl sie im Allgemeinen selten sind. Zu den Komplikationen gehören Mukozelen, Knochenentzündungen, Knochenarrosion, -Expansion und entzündungsbedingte Metaplasien sowie die Optikusneuropathie durch entzündliche Reizung des Nervus opticus [3].

Derzeit gibt es für die Bundesrepublik Deutschland keine zuverlässigen Studien zur Prävalenz der CRS [1, 9]. Bei einer Europa-weiten Studie wurde die Gesamtprävalenz der CRS in Europa mit 10,9% bestimmt [10].

1.2. Pathophysiologie der CRS und die Rolle von *S. aureus* bei deren Genese

Man geht davon aus, dass die CRS durch eine schleichende Obstruktion durch Gewebezunahme im ostiomeatalen Komplex sowie verschiedener Entzündungsreaktionen der Mukosa verursacht wird [1]. Noch immer kennt man aber nicht den oder die initialen Auslöser. Die genaue Pathophysiologie ist vielmehr Gegenstand der Forschung. Mittlerweile wird von einem multifaktoriellen Entstehungsmechanismus ausgegangen. Der Begriff der CRS kann auf pathophysiologischer Ebene als Sammelbegriff diverser Erkrankungen gesehen werden. Anhand der endoskopischen Diagnostik unterscheidet man die CRScNP und die CRSsNP. Hierbei handelt es sich um unterschiedliche Phänotypen. Anhand der Pathophysiologie unterscheidet man (vor allem für die CRScNP) unterschiedliche Endotypen, kennzeichnend sind die unterschiedlichen Signalwege der Entzündungsreaktion [11]. Bei der CRSsNP sind sowohl Typ 2 T-Helferzellen (TH2-Zellen) als auch Typ1 T-Helferzellen (TH1-Zellen) an der Entzündungsreaktion beteiligt [3]. Darüber hinaus wird die CRScNP noch in vier Endotypen unterschieden. Hierbei handelt es sich um den T-Zell/TH2 Zytokin-basierenden Typ, den Eosinophilen-basierenden Typ, den B-Zell/IgE-basierenden Typ und den Cysteinyl-basierenden Typ [12]. Diese Endotypen scheinen zudem in Zusammenhang mit gewissen Komorbiditäten zu stehen [11].

Bei der CRS handelt es sich um eine Grenzflächenerkrankung, eine multifaktorielle Erkrankung, die sich an der Grenzfläche des respiratorischen Epithels abspielt. Durch diverse Störungen der immunologischen oder mechanischen Abwehr (endogene Faktoren) kommt es zu Auswirkungen auf die Abwehr von mikrobiellen Erregern (exogene Faktoren). Die endogenen Faktoren prädisponieren für eine Erkrankung. Bei zusätzlichem Vorliegen von exogenen Faktoren, zum Beispiel Bakterien, kommt es zur Manifestation der Erkrankung [13]. So wird zum Beispiel *S. aureus* eine mögliche Rolle bei der Entstehung der CRS zugewiesen [14].

Die Rolle von Bakterien bei der ARS ist seit langem etabliert, inwieweit sie aber auch als Auslöser der CRS wirken, bleibt ungeklärt [3]. Es wird angenommen, dass sie die mukosale Entzündung beeinflussen [15] und die Immunantwort des Wirtes modulieren [16]. Auf einige Arten dieser Beeinflussung wird im Folgenden genauer eingegangen.

In der westlichen Welt ist *S. aureus* das am häufigsten nachgewiesene Bakterium bei der CRS [17]. Korrespondierend gibt es die *Staphylokokken*-Superantigen-Hypothese, die sich vor allem mit der Rolle der *Staphylokokken*-Superantigene bei der CRS mit Polypen beschäftigt. Superantigene sind eine Gruppe von Proteinen, die eine massive Aktivierung des Immunsystems verursachen können [18]. Der Hypothese nach sollen die von *S. aureus*

sezernierten, superantigenischen Toxine die lokale eosinophile Entzündung amplifizieren sowie Polypenformation fördern [18, 19]. Sie haben Einfluss auf die T-Helferzell-Polarisation, die eosinophile Entzündung und die polyklonale IgE-Produktion, wodurch sie zur Amplifizierung und Chronifizierung der Entzündung beitragen [19].

In einer Studie von Bachert et al. wurde nachgewiesen, dass 50% nasaler Schleimhautproben (nasale Polyposis) spezifische IgE- Antikörper für die Superantigene *Staphylokokken* Enterotoxin A und B (SEA, SEB) enthielten, was für eine Rolle der Superantigene als „Disease-Modifizier“ spricht [19]. Zudem spricht eine Antikörperbildung für eine systemische Antwort auf das Superantigen. Allerdings wiesen die anderen 50% dieses Ergebnis nicht auf und zeigten trotzdem ein gleiches/ähnliches Krankheitsgeschehen. Dies spricht für gleichzeitig interferierende Faktoren des Wirts (endogene Faktoren) [3] und/oder weitere exogene Faktoren.

Eine in vitro Studie zeigte, dass eine 30-minütige Stimulation von nasalem Polypengewebe mit *S. aureus* Protein A zu einer Mastzelldegranulierung führt, eine 24-stündige Inkubation des Gewebes mit SEB zu einer Zytokinerrhöhung mit T-Helferzell betontem Muster [20]. Ebenso zeigten Huvenne et al. bei der Stimulation mit SEB eine Erhöhung proinflammatorischer Mediatoren, die die neutrophile Migration und die Überlebenszeit von eosinophilen Granulozyten erhöhen [21]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von Epithelzellen von CRS-Patienten mit *S. aureus*-Überstand zu vermehrter Bildung von Interleukin 8 führte, das chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt [22]. Klinische Erfahrung zeigt, dass es bei der CRS, trotz intensiver antibiotischer Behandlung, oft zu wiederkehrenden Infektionen kommt. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre ein „escape“-Mechanismus des Bakteriums in den intrazellulären Bereich. Die zelluläre Invasion konnte bei der CRS für *S. aureus* als signifikant erhöht gegenüber einem Kontrollkollektiv nachgewiesen werden [23]. Ihr könnte, als erleichternder Schritt, eine erhöhte Adhäsion vorausgehen. Eine höhere Besiedlungsrate könnte konsekutiv zu einer vermehrten Ausschüttung der oben genannten Stoffe führen. Dies wiederum würde eine vermehrte Entzündungsreaktion zur Folge haben.

1.3. Hypothese und Zielsetzung

Wie beschrieben gibt es diverse Hypothesen zur Pathophysiologie der CRS und es wird von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen. Als möglicher kausaler Faktor wird der Einfluss von potentiell pathogenen bakteriellen Erregern gesehen. Ein vermehrtes Vorkommen von *S. aureus* sowie ein Zusammenhang mit der Manifestation der Erkrankung sind bekannt [15]. Worauf dieses vermehrte Vorkommen beruht, ist noch unklar. Denkbar wäre eine Prädisposition auf Seiten des Wirts oder eine vermehrte Adhäsionsneigung bestimmter Bakterienstämme.

Dieser Frage wird mit der vorliegenden Arbeit nachgegangen. Dafür werden verschiedene Bakterienstämme auf ihr Adhäsionsverhalten an der gleichen Zelllinie (RPMI 2650) untersucht. Hierfür wurden Zellkulturen angezchtet, die mit Bakterien von CRS-Patienten und von einem nicht an CRS erkrankten Kontrollkollektiv beimpft wurden. Nach standardisierter Inkubationszeit, Fixierung und Färbung wurden mikroskopisch die adhärenierten Bakterien bestimmt.

Hierdurch wird folgenden Fragestellungen in chronologischer Reihenfolge der durchgeführten Versuche nachgegangen:

- 1.) Eignet sich die verwendete Zelllinie (RPMI 2650) und der konkrete Versuchsaufbau zur Untersuchung der unten genannten Fragestellung?
- 2.) Lässt sich ein signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten von *S. aureus*-Stämmen von Patienten mit CRS und einem nicht an CRS erkranktem Kontrollkollektiv an einer immortalen nasalen Epithelzelllinie nachweisen?
- 3.) Eignen sich primäre nasale Epithelzellen als Alternative zum durchgeführten Versuch?

2. Material und Methoden

2.1. Patienten und Methodik

Die dieser Dissertation zugrunde liegende Studie wurde nach Zustimmung der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Aktenzeichen A 101/07) in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (letzte Revision im Oktober 2013) durchgeführt.

Die hier beschriebene Studie umfasste einen Zeitraum von 18 Monaten (September 2012 bis Februar 2014). In dieser Zeit wurden insgesamt 17 *S. aureus* Isolate, 8 *S. aureus* Isolate von CRS- Patienten und 9 *S. aureus* Isolate von einem gesunden Kontrollkollektiv, bezüglich ihres Adhäsionsverhaltens an der immortalen nasalen Epithelzelllinie RPMI 2650 untersucht und in diesem Verhalten vergleichend analysiert.

2.2. Kultivierung RPMI 2650 Zelllinie

Die immortale nasale Epithelzelllinie RPMI 2650 wurde 1962 aus einem Squamosa-Zell-Karzinom isoliert [24]. Sie stammt aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig. Für die Versuche wurden die Passagen 34 und 35 verwendet.

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

Die Zellen wurden vor Gebrauch bei -196°C in Flüssigstickstoff gelagert. Um sie zu verwenden, wurden sie mit 10% (v/v) DMSO (Merck, Darmstadt) versetzt und bei Zimmertemperatur aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in einem sterilen Reagenzröhrchen mit 3 ml RPMI-spezifischem Medium (MEM- Earle- Medium, gebrauchsfertig, Biochrom AG, Berlin + 10% Fötale Kälberserum, zum optimalen Zellwachstum) versetzt. Anschließend wurde das Zell- Medium- Gemisch bei 900 U/min für 5 Minuten zentrifugiert (Eppendorf, Centrifuge 5804 R). Der Überstand wurde entfernt und die abgesetzten Zellen erneut mit 3 ml RPMI-Medium vermischt. Nach gründlichem Auf- und Abpipettieren wurde je eine Kammer der Culture Slides (BP Falcon, 8 Chamber Culture

Slides), ein Acht-Kammeraufsatz aus Polystyrol auf einem für Zellkulturen vorbehandelten Glas-Objektträger, mit 170 µl der RPMI-Zellsuspension befüllt und mit 300 µl sterilem RPMI-Medium aufgefüllt. In jeder einzelnen Kammer der Culture Slides befanden sich somit 470 µl .

Anschließend wurden die Culture Slides für 48 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis jede einzelne Kammer mit einem gleichmäßigen präkonfluentem Zellmonolayer bewachsen war. Dies wurde für jede Kammer vor dem Adhäsionsversuch unter dem Mikroskop überprüft.

2.3. Kultivierung der *S. aureus*- Stämme

Die Bakterienstämme stammen aus einer Sammlung des Instituts für Infektionsmedizin des UKSH Campus Kiel und wurden verblindet und randomisiert ausgewählt. Hierzu erfolgte eine Auswahl mit Hilfe des Programms www.zufallsgenerator.net.

Alle Bakterienstämme stammen aus Abstrichmaterial der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Die Abstriche wurden mittels standardisiertem Verfahren durchgeführt und es war sichergestellt, dass die Patienten zuvor 4 Wochen nicht antibiotisch behandelt worden waren. Als gesunde Kontrollgruppe wurden Patienten definiert, die auf Grund einer Nasenatmungsbehinderung operiert wurden und nicht an einer akuten, chronischen oder autoimmunen Entzündung litten. Die Bakterienstämme wurden über Nacht in Brain-Heart-Infusion-Bouillon kultiviert, am Morgen mit 10 ml der Bouillon überimpft und für 3 Stunden im Brutschrank bei 37° C kultiviert. Anschließend wurden die Stämme zweimal im Abstand von 15 Minuten mit dem RPMI- Zellkulturmedium gewaschen. Die Keimzahl im Zellkulturmedium wurde mit Hilfe der optischen Dichte-Messung auf 1×10^6 eingestellt.

2.4. Adhäsionsversuch

Nach dem Anzüchten der RPMI 2650 Zellen wurde zunächst der Überstand aus allen Kammern der Culture Slides abpipettiert und diese drei mal mit 37 °C warmer PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit den zuvor randomisiert ausgewählten Bakterienstämmen beimpft. Hierfür wurden die Zellen nach dem dritten Waschgang in den Culture Slides mit 1 ml der Bakteriensuspension beimpft. Im Anschluss wurden die Zellen 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank in wasserdampfgesättigter 5% CO₂-haltiger Atmosphäre mit den Bakterien inkubiert.

Der Bakterienstamm eines Patienten wurde zur Kontrolle immer in zwei Kammern injiziert (Stamm X, siehe Abb. 1). Außerdem erfolgte die Beimpfung mit der Positivkontrolle St. 224, in Vorversuchen als gut adhätierend bestimmt, der Negativkontrolle St. 155, in Vorversuchen als kaum adhätierend bestimmt (jeweils 2 Kammern), eine Beimpfung von jeweils einer Kammer ohne Zellen mit den beiden Kontrollstämmen sowie die Färbung und Fixierung von zwei unbeimpften Kammern ohne Zellen zur Sicherstellung der Kontaminationsfreiheit. Zusätzlich wurden an jedem Versuchstag zwei Kammern allein mit Zellen gefärbt, um eine Kontamination während der Kultivierungsphase der RPMI- Zellen auszuschließen.



Abbildung 1: Achter Well Culture Slide a)

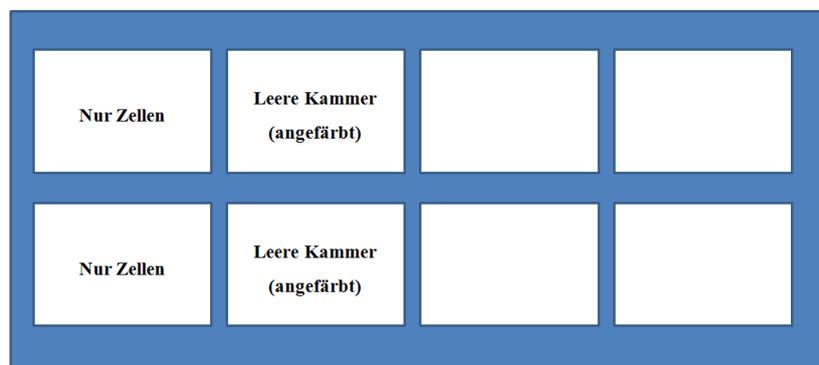


Abbildung 2: Achter Well Culture Slide b)

Abbildung 1 und 2 zeigen die Zusammenstellung des Versuchsaufbaus wie oben beschrieben. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die Bakteriensuspension abpipettiert und die Zellen dreimal mit 37 °C warmer PBS (je 1 ml) gewaschen. Anschließend wurde die Färbelösung (BacLight Bacterial Viability Kit Invitrogen Live/Dead Färbung (Komponente A 1,5 + Komponente B 1,5 in 1ml PBS) aufgetragen und die Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss verwahrt. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit 37 °C warmer PBS-Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung. Hierfür wurden die Wells jeweils mit 300 µl Methanol gefüllt und für 5 Minuten bei -20 °C im Kühlschrank verwahrt. Anschließend wurde ein letztes Mal mit 37 °C warmer PBS gewaschen. Luftgetrocknet

wurden sie daraufhin mittels Prolong Gold Antifade (ProLong Gold Antifade Reagents, 5 x 2 ml) eingedeckelt, um das Ausbleichen zu verhindern. Zuletzt wurden die Deckgläser (Marienfeld, Gelsenkirchen) mit dem Klebstoff Glue Colle (Herma, Filderstadt) fixiert.

2.5. Digitale Dokumentation

Zur Auszählung der Zellen und der adhärenierten Bakterien wurden ein Mikroskop (ZEISS, Scope.A1 Axio) sowie das Programm AxioVision LE verwendet. Die Bilder wurden bei 64-facher Vergrößerung betrachtet. Es wurden pro Kammer 10 Bilder von jeweils unterschiedlichen Gesichtsfeldern gemacht, insgesamt demnach 20 Bilder (Rohdaten) pro Bakterienstamm.

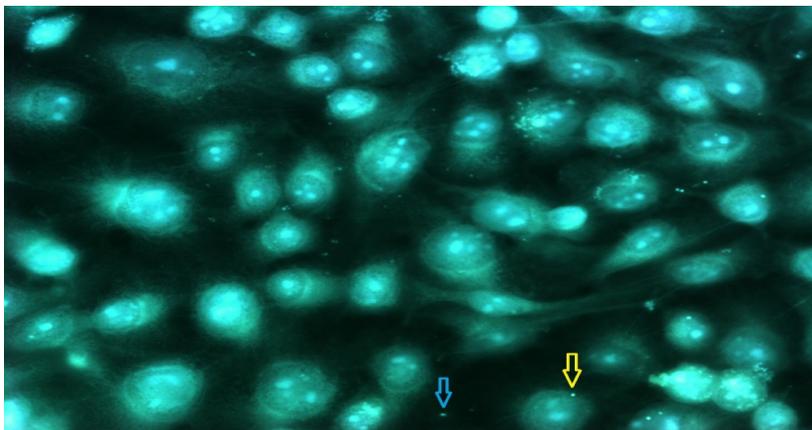


Abbildung 3: Foto der RPMI Zellen mit adhärenierten und nicht adhärenierten Bakterien

Blauer Pfeil: nicht adhäreniertes Bakterium, gelber Pfeil: adhäreniertes Bakterium

Anhand der Bilder (vgl. Abbildung 3) wurde durch die BacLight Invitrogen life dead Färbung belegt, dass sich sowohl die Zellen als auch alle Bakterien zur Zeit der Anfärbung in einem vitalen Stadium befanden.

Für jeden Stamm wurde die Zahl der Zellen mit adhärenierten Bakterien sowie die Gesamtzellzahl von zwei unabhängigen Untersuchern verblindet bestimmt, das heißt ohne Wissen um die Zuordnung des Stammes zu der Untersuchungsgruppe. Ebenso wurde die Zahl der adhärenierten und der nicht- adhärenierten Bakterien ausgezählt. Rechnerisch wurden die Zahl der Gesamtbakterien sowie die der bakterienfreien Zellen bestimmt. Diese Werte werden im Folgenden als numerische Daten bezeichnet.

2.6. Datenerhebung und Statistik

Die numerischen Daten (gezählte und berechnete Werte) zu den folgenden Kategorien; Gesamtzellen, Zellen mit adhärirten Bakterien, Gesamtbakterien und adhärirten Bakterien wurden zu den deskriptiven Maßzahlen Standardabweichung, Minimum, Maximum und Medianwert mittels EXCEL-Standardsoftware aggregiert. Diese Werte werden im Folgenden aggregierte Werte genannt.

Stamm	Z	Z+	Zp in %	B	B+	Bp in %
167.1	46	3	6,52	16	8	50,00
167.2	37	2	5,41	4	4	100,00
167.3	38	3	7,89	8	8	100,00
167.4	37	7	18,92	16	16	100,00
167.5	37	4	10,81	5	5	100,00
167.6	43	5	11,63	16	16	100,00
167.7	31	8	25,81	34	21	61,76
167.8	44	3	6,82	18	18	100,00
167.9	66	6	9,09	18	18	100,00
167.10	65	5	7,69	9	9	100,00
167.11	40	6	15,00	24	21	87,50
167.12	43	6	13,95	10	7	70,00
167.13	41	7	17,07	15	15	100,00
167.14	44	5	11,36	31	27	87,10
167.15	33	9	27,27	12	12	100,00
167.16	48	3	6,25	21	14	66,67
167.17	54	8	14,81	30	25	83,33
167.18	61	9	14,75	34	32	94,12
167.19	54	8	14,81	13	9	69,23
167.20	53	7	13,21	19	16	84,21
Median	43,5	6	12,42	16	15,5	97,06
Stdw	10,14	2,18	5,90	9,06	7,58	15,59
Mean	45,75	5,70	12,93	17,65	15,05	88,14
Min	31,00	2,00	5,41	4,00	4,00	50,00
Max	66,00	9,00	27,27	34,00	32,00	100,00

Tabelle 1: Zusammenfassung der numerischen Daten (hellgrau hinterlegt) zu den aggregierten Daten (dunkelgrau hinterlegt)

Z: Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld, **Z+:** Zahl der Zellen mit adhärirten Bakterien pro Gesichtsfeld, **Zp:** Anteil der Zellen mit adhärirten Bakterien an der Gesamtzellzahl. **B:** Gesamtbakterienzahl pro Gesichtsfeld, **B+:** an Zellen adhärirte Bakterien pro Gesichtsfeld, **Bp:** Anteil der an Zellen adhärirten Bakterien an der Gesamtbakterienzahl. 167.1- 167.20: Bild 1 bis 20 für St. 167

Tabelle 1 zeigt exemplarisch die Zusammenfassung der numerischen Daten zu den aggregierten Daten anhand des Stamms 167, einem Stamm aus der CRS- Gruppe.

Die weitere statistische Analyse der aggregierten Daten erfolgte mit dem Programm SPSS Version 20.

Zur Beschreibung des bakteriellen Adhäsionsverhaltens in den beiden Gruppen (Kontrolle und CRS) wurde zu den aggregierten Werten eine vollständige deskriptive Statistik im Institut für Medizinische Informatik und Statistik der CAU Kiel erstellt. Hierzu wurden die Standardabweichung (S), Minimum (Min.), Maximum (Max.), Median (M₀) und die Interquartilsabstand (IQR, Quartil bei Q1/Q3) berechnet. Dies erfolgte für die Betrachtung der Gesamtzellen, der Zellen mit adhärenierten Bakterien, der Gesamtbakterien sowie der an Zellen adhärenierten Bakterien.

Um die Wahrscheinlichkeit einer Normalverteilung der Ergebnisse zu prüfen, wurde der Kolmogorov-Smirnov Test angewandt. Da dieser auf Abweichungen einer Normalverteilung hinwies, wurde die Annahme einer Normalverteilung verworfen. Aus diesem Grund erfolgte der Vergleich des Adhäsionsverhaltens der beiden Untersuchungsgruppen mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (nicht parametrisches Verfahren). Um die Stärke verschiedener Zusammenhänge zu berechnen wurde der Spearman Rang-Korrelationskoeffizient verwendet.

Alle Ergebnisse wurden einheitlich als signifikant bewertet, sobald der p-Wert kleiner oder gleich 0,05 war.

2.7. Kultivierung primärer nasaler Epithelzelllinien im Alternativversuch

Neben dem Versuch, ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten der krankheitsspezifischen Bakterienstämme nachzuweisen, wurde ein Versuchsaufbau entwickelt, der das Verhalten von Bakterien an krankheitsspezifischen primären humanen nasalen Epithelzellkulturen vergleichen sollte. Hierdurch lag der zu untersuchende Fokus auf wirtsspezifischen Komponenten.

Zur Gewinnung der Primärkulturen wurden Patienten während Nasennebenhöhlen- oder ästhetischen Naseneingriffen etwa reiskorngroße Nasenschleimhautproben der unteren Muschel entnommen. Alle Patienten wurden am Vortag aufgeklärt und erbrachten schriftliche Einverständniserklärungen zur Teilnahme an der Studie.

Die Schleimhautproben wurden postoperativ in Reagenzröhrchen mit 5 ml „Airway Epithelial Cell Growth“ Nährmedium bis zum weiteren Verfahren auf Eis gelagert.

Zur Gewinnung der Epithelzellen wurden die Schleimhautproben unter sterilen Bedingungen an der Werkbank (Köttermann 8511, Uetze/Hänigsen) aus den Reagenzröhrchen in eine Petrischale überführt und anschließend mit einem Skalpell in kleinere Stücke zerschnitten. Diese Stücke wurden danach wiederum mit 1 ml Dispase-Lösung (2 Einheiten (U)/ml PBS; Invitrogen, Karlsruhe) in ein steriles 10 ml Reagenzröhrchen überführt.

Für eine Stunde erfolgte nun die Inkubation der Probenstücke mit der Dispase-Lösung bei 37 °C im Brutschrank in 5% CO₂-haltiger, wasserdampfgesättigter Atmosphäre

Die Dispase bewirkt eine enzymatische Spaltung des Kollagens der Basalmembran, sodass sich die Epithelzellen von dieser lösen können, dabei aber intakt bleiben.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Reagenzröhrchen (Biopsiestücke und Dispase-Lösung) erneut in eine sterile Petrischale überführt und die Epithelzellen vorsichtig mit einem Skalpell von der Basalmembran abgelöst, sodass sich die Zellen nun in der Dispase-Lösung befanden. 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 zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg). Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das in dem Reagenzröhrchen verbliebene Zellpellet wurde in 7 ml „Airway Epithelial Cell Growth“ Nährmedium 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).

Nach jeweils drei Tagen wurde das Nährmedium gewechselt. Hierfür wurde das alte Nährmedium abpipettiert. Um Rückstände des alten Mediums zu entfernen wurden die Zellen mit 7 ml PBS gewaschen und es wurden erneut 7 ml „Airway Epithelial Cell Growth“ Nährmedium in die Zellkulturflaschen überführt.

Ab dem ersten Mediumwechsel wurde auf eine Weiterführung der Antibiose verzichtet, um eine antimikrobielle Wirkung auf den folgenden Versuch mit den Bakterien zu vermeiden.

Mehrmals wöchentlich wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf ihr Wachstum und mögliche bakterielle Kontaminationen untersucht.

Bei Erreichen eines präkonfluenten Monolayers (nach ca. 14 Tagen), konnten die Zellen passagiert werden. Hierbei erfolgte eine erneute Inkubation der Zellkulturen für ca. 20 Minuten bei 37°C mit Dispase-Lösung (0,66 U/ml PBS), um die Zellen enzymatisch vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Nach erneuter Zugabe des Nährmediums, anschließender

Zentrifugierung für fünf Minuten bei 900 Umdrehungen und Abpipettieren des Überstandes konnten die Zellen in Zellkulturmedium resuspendiert werden.

Alternativ wurde der Versuch mit sterilen Culture Slides (BD Falcon) durchgeführt. Wie oben beschrieben wurden auch hier die Zellen von der Basalmembran gelöst, abzentrifugiert und in 5 ml Nährmedium resuspendiert.

Jede einzelne Kammer wurde nach Resuspension des Zellpellets mit dem „Airway Epithelial Cell Growth“ Medium (mit dem Antibiotikazusatz, siehe oben) mit 0,6 ml des Zell-Mediumgemischs gefüllt und anschließend ebenfalls in wasserdampfgesättigter 5 %iger CO₂-Atmosphäre bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Auch hier wurde in dreitägigen Abständen das Zellkulturmedium gewechselt. Nach Erreichen eines präkonfluenten Monolayers konnte der Adhäsionsversuch wie oben aufgeführt durchgeführt werden.

Dieser Versuch wurde zu einem zweiten Alternativversuch erweitert. Die Zellen wurden nicht initial auf die Culture Slides ausgesät, sondern zuvor wie oben beschrieben in Kulturflaschen angezüchtet. Nach Erreichen eines präkonfluenten Monolayers erfolgte wie oben beschrieben die Ablösung der Zellen mittels Dispase. Im Anschluss wurden die Zellen allerdings nicht in eine neue Zellkulturflasche sondern in die Culture Slides ausgesät. Hier erfolgte das erneute Anzüchten eines präkonfluenten Monolayers. Hiernach konnte der Adhäsionsversuch erfolgen.

Ein dritter alternativer Versuchsansatz bestand in der direkten Anzucht der Zellen auf den Deckgläschen in sechser Well Schalen. Hierfür wurden initial jeweils ein Deckgläschen steril in ein Well der sechser Well Schalen überführt. Im Anschluss wurden die Zellen wieder wie oben beschrieben vorbereitet und in den Schalen ausgesät (1 ml/Well). Im Anschluss wurde weiterhin wie oben beschrieben verfahren, bis ein präkonfluentes Monolayer erreicht wurde. Nach Erreichen eines präkonfluenten Monolayers kann der Adhäsionsversuch wie bei den RPMI 2650 Zellen erfolgen.

Im Falle der Culture Slides konnten nach Durchführung des Adhäsionsversuchs die Wände der Wells abgenommen werden. Der ehemalige Boden der Wells mit den darauf gewachsenen und nun bereits mit Bakterien inkubierten und gefärbten Zellen diente so als Objektträger, es erfolgte die Eindeckelung mittels Deckgläsern.

Im Falle des Versuchsansatz mit den Deckgläschen wurden nach Durchführung des Adhäsionsversuchs die Deckgläschen mit den adhärenierten Zellen und Bakterien aus den sechser Wells genommen und auf die Objektträger aufgebracht, sodass sich die Zellen und Bakterien zwischen Deckgläschen und Objektträger befanden.

3. Ergebnisse

3.1. Statistik zu den Versuchskontrollen

	Median der Gesamtbakterien	Median der adhärnten Bakterien
Positivkontrolle St. 224	16	16
Negativkontrolle St. 155	6	4
Leerkontrolle	0	1
Sterile RPMI 2650- Kontrolle	0	0

Tabelle 2: Statistik zu den Kontrollansätzen

Die in Tabelle 2 dargestellten Werte beschreiben die Versuchskontrollen, es wird jeweils der Median angegeben.

Bei der Positivkontrolle zeigten sich 16 adhärnte Bakterien, bei der Negativkontrolle lediglich 6. Bei der Positivkontrolle hatten alle Bakterien adhärnt, in der Negativkontrolle lediglich 4 von 6. In der Leerkontrolle fiel lediglich ein Bakterium auf. In der Gruppe, in der die RPMI- Zellen steril gehalten wurden war kein Bakterium nachweisbar.

3.2. Statistik zu der Gesamtzellzahl beider Patientengruppen

Maßzahl	Gruppe	n	Min.	Max.	Median	IQR (Q1-Q3)	P-Wert
Min.	Kontr.	9	24	41	32	28-37	0,289
	CRS	8	18	41	27	27-37,5	
Max.	Kontr.	9	73	99	78	75-85	0,027
	CRS	8	50	97	69,5	65-74,5	
Median	Kontr.	9	39,5	69	55	52,5- 58	0,03
	CRS	8	36	54,5	42,25	39,875-49,5	

Tabelle 3: Deskriptive Auswertung zu der Gesamtzellzahl beider Patientengruppen

Kontr.: Kontrollgruppe, Min.: Minimum, Max.: Maximum, IQR: Interquartilsabstand

Tabelle 3 zeigt die Statistik zu der Gesamtzellzahl. Hierfür ergeben sich folgende Median-Werte, die Streuung wurde jeweils vom ersten bis dritten Quartil angegeben.

Das Minimum an Zellen lag in der Kontrollgruppe bei 32 Zellen (Streuung 28-37) pro Gesichtsfeld, bei der CRS Gruppe bei 27 Zellen (Streuung 27-37,5) pro Gesichtsfeld. Ein signifikanter Unterschied lies sich hier nicht nachweisen.

Das Maximum lag bei 78 Zellen (Streuung 75-85) bei der Kontrollgruppe und bei 69,5 Zellen (Streuung 63-74,5) für die CRS- Gruppe. Hieraus ergab sich ein signifikanter Unterschied von 0,027.

Für den Medianwert ergab sich bei der Kontrollgruppe ein Wert von 55 Zellen (Streuung 52,5-58) und für die CRS- Gruppe ein Wert von 42,25 Zellen (Streuung 39,875- 49,5. Der Signifikanzwert (p-Wert) liegt bei 0,03 und unterschreitet damit die Signifikanzschwelle.

Es zeigt sich, dass sowohl das Maximum der Gesamtzellen als auch der Median der Gesamtzellen in der Kontrollgruppe signifikant höher liegen.

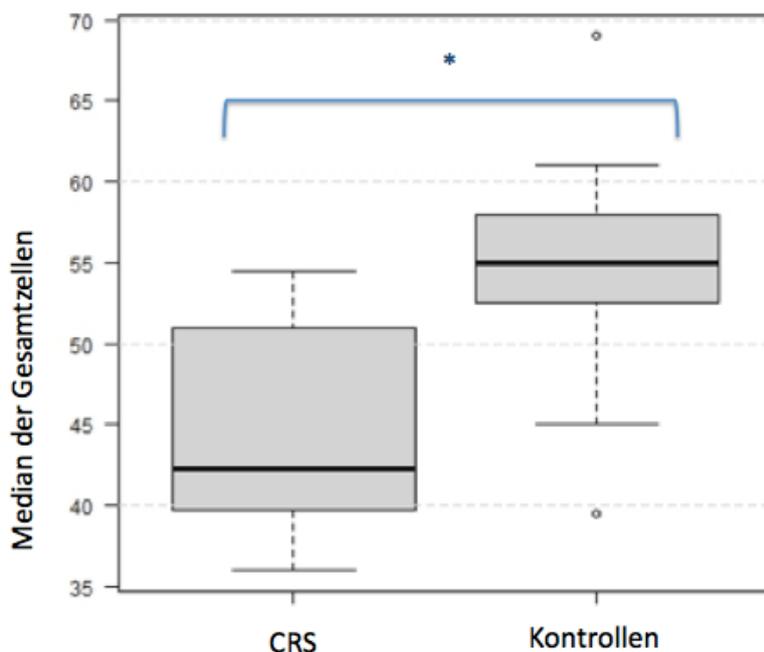


Abbildung 4: Mediane der Gesamtzellzahl beider Gruppen

Abbildung 4 zeigt die in Tabelle 3 dargestellten Mediane der Gesamtzellzahl beider Gruppen. Für die Kontrollgruppe zeigte sich ein Ausreißer sowohl nach oben (69) sowie nach unten (39,5). Der Unterschied zwischen den Gruppen ist signifikant (* signifikant $p=0,03$).

3.3. Statistik zu den Zellen mit adhärirten Bakterien

Maßzahl	Gruppe	n	Min.	Max.	Median	IQR (Q1-Q3)	p-Wert
Min.	Kontr.	9	1	12	3	2-8	0,175
	CRS	8	1	9	2	2-2	
Max.	Kontr.	9	9	77	13	13-53	0,439
	CRS	8	9	23	14	11,75-17,25	
Median	Kontr.	9	5	41	6	6-19,5	0,732
	CRS	8	6	14	7	6,75-7,625	
Anteil	Kontr.	9	11 %	65 %	15 %	11-35 %	0,923
	CRS	8	12 %	30 %	16 %	14-16 %	

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

Kontr.: Kontrollgruppe, Min: Minimum, Max.: Maximum, IQR: Interquartilsabstand, Anteil: Anteil der mit Bakterien adhärirten Zellen an der Gesamtzellzahl

In Tabelle 4 wird die Statistik zu den Zellen mit adhärirten Bakterien dargestellt. Es ergeben sich folgende Werte, die Streuung wurde jeweils vom ersten bis dritten Quartil angegeben:

Die minimale Anzahl von Zellen mit adhärirten Bakterien lag bei der Kontrollgruppe bei 3 (Streuung 2-8) und bei der CRS Gruppe bei 2 (Streuung 2-2). Maximal konnten bei der Kontrollgruppe 13 (Streuung 13-53) Zellen mit adhärirten Bakterien nachgewiesen werden, in der CRS Gruppe 14 (Streuung 11,75-17,25).

Im Median zeigten sich in der Kontrollgruppe 6 (Streuung 6-19,5) Zellen mit adhärirten Bakterien, in der CRS- Gruppe 7 (Streuung 6,75-7,625).

Der mediane Anteil lag für die Kontrollgruppe bei 15 % (Streuung 11-35 %) und für die CRS-Gruppe bei 16 % (Streuung 14-16 %). Der p-Wert für den Unterschied beträgt hier 0,923 und ist demnach nicht signifikant.

In dieser Gegenüberstellung zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

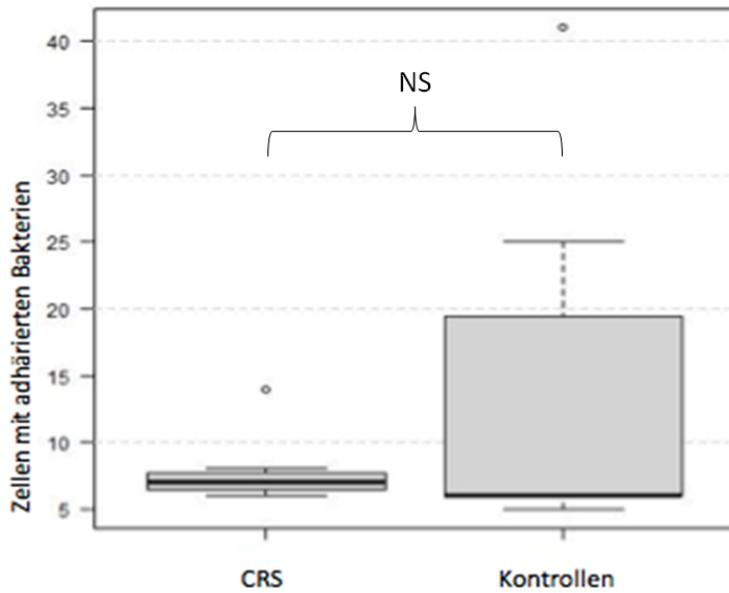


Abbildung 5: Mediane der Zellen mit adhärten Bakterien beider Gruppen

Abbildung 5 zeigt die in Tabelle 4 beschriebenen Mediane der Zahl der Zellen mit adhärten Bakterien. Hierin zeigt sich ein Ausreißer in der Kontrollgruppe nach oben (41) sowie ein Ausreißer in der CRS- Gruppe, ebenfalls nach oben (14). Der Unterschied war nicht signifikant (NS).

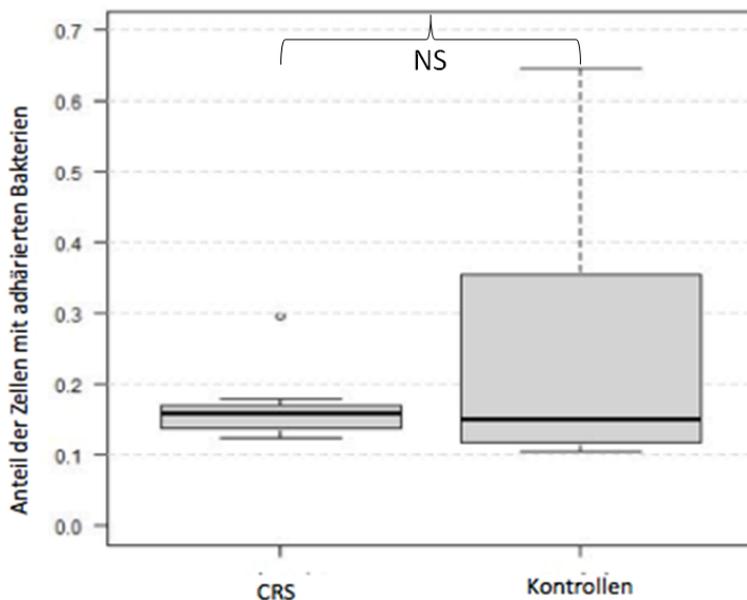


Abbildung 6: Anteil der Zellen mit adhärten Bakterien beider Gruppen

Abbildung 6 zeigt den in Tabelle 4 dargestellten Anteil der Zellen mit adhärenierten Bakterien beider Gruppen in Relation zu der Gesamtzellzahl. Hier lässt sich ein Ausreißer für die CRS-Gruppe nach oben (0,3) feststellen. Auch hier ist der Unterschied nicht signifikant.

Variable a	Variable b	Kontrollen	CRS
Median Gesamtzellen	Median der Zellen mit adhärenierten Bakterien	0,44 (p= 0,235)	0,491 (p= 0,217)

Tabelle 5:

Zusammenhang zwischen Gesamtzellen und bakterienbehafteter Zellen (pro Gesichtsfeld)

Tabelle 5 zeigt die Stärke des Zusammenhangs der Zellen im Bezug auf die Adhäsion. Bei einem Spearman Rang-Korrelationskoeffizienten von 0,44 konnte in der Kontrollgruppe ein nicht signifikanter Zusammenhang (p= 0,235) zwischen dem Median der Gesamtzellen und den bakterienbehafteten Zellen nachgewiesen werden. Auch in der Patientengruppe mit CRS ergab sich bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,491 kein signifikanter Zusammenhang (p= 0,217).

3.4. Statistik zu den Gesamtbakterien beider Patientengruppen

Maßzahl	Gruppe	Anzahl	Min.	Max.	Median	IQR (Q1-Q3)	P-Wert
Min	Kontr.	9	1	25	8	3-13	1
	CRS	8	2	28	6,5	3,75-10,25	
Max	Kontr.	9	29	274	83	56- 159	0,211
	CRS	8	34	81	56,5	44,75-72,5	
Median	Kontr.	9	10	143	33,5	15-49	0,441
	CRS	8	16	44	18,25	17,125-25,5	

Tabelle 6: Deskriptive Auswertung zu der Gesamtbakterienzahl (an Zellen adhärenierte plus nicht adhärenierte Bakterien) beider Patientengruppen

Kontr.: Kontrollgruppe, Min: Minimum, Max.: Maximum, IQR: Interquartilsabstand

Tabelle 6 zeigt die statistische Auswertung zu der Gesamtbakterienzahl. Hierfür ergeben sich folgende Werte, die Streuung wurde jeweils vom ersten bis dritten Quartil angegeben.

Das Minimum liegt in der Kontrollgruppe bei 8 (Streuung 3-13) Bakterien pro Gesichtsfeld, in der CRS- Gruppe bei 6,5 (Streuung 3,75-10,25). Das Maximum liegt in der Kontrollgruppe bei 83 (Streuung 56-159) Bakterien pro Gesichtsfeld, für die CRS- Gruppe bei 56,5 (Streuung 44,75-72,5). Für den Medianwert ergab sich bei der Kontrollgruppe ein Wert von 33,5 Bakterien (Streuung 15-49) und für die CRS- Gruppe ein Wert von 18,25 Bakterien (Streuung 17,125-25,5). Der p-Wert liegt bei 0,441 und zeigt damit keine Signifikanz.

Auch in dieser Gegenüberstellung zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der Gesamtbakterienzahl.

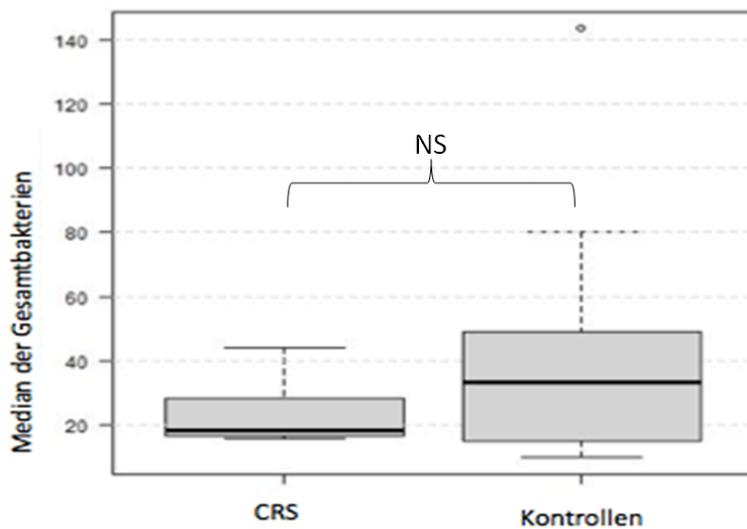


Abbildung 7: Mediane der Gesamtbakterien beider Patientengruppen

Abbildung 7 zeigt die in Tabelle 6 beschriebenen Mediane der Gesamtbakterienzahl beider Patientengruppen. In der Kontrollgruppe zeigt sich ein Ausreißer nach oben (144). Der Unterschied ist nicht signifikant.

3.5. Statistik zu den an Zellen adhärenen Bakterien beider Patientengruppen

Maßzahl	Gruppe	n	Min.	Max.	Median	IQR (Q1-Q3)	P-Wert
Min.	Kontr.	9	1	23	8	3-13	0,409
	CRS	8	2	20	3,5	3-5,25	
Max.	Kontr.	9	20	276	81	51-149	0,149
	CRS	8	31	76	41	32,75-65,75	
Median	Kontr.	9	8,5	143	31	15-44,5	0,194
	CRS	8	12	41	15,75	13,625-17,625	
Anteil	Kontr.	9	0,72	0,99	0,95	0,85-0,98	0,083
	CRS	8	0,51	0,98	0,84	0,78-0,90	

Tabelle 7: Deskriptive Auswertung der an Zellen adhärenen Bakterien pro Gesichtsfeld beider Patientengruppen

Kontr.: Kontrollgruppe, Min: Minimum, Max.: Maximum, IQR: Interquartilsabstand, Anteil: Anteil der adhärenen Bakterien an der Gesamtbakterienzahl

Tabelle 7 stellt die Statistik zu den an Zellen adhärenen Bakterien dar.

Hierfür ergeben sich folgende Werte, die Streuung wurde jeweils vom ersten bis dritten Quartil angegeben. Das Minimum liegt in der Kontrollgruppe bei 8 (Streuung 3-13) adhärenen Bakterien pro Gesichtsfeld, in der CRS Gruppe liegt es bei 3,5 (Streuung 3-5,25). Dieser Unterschied ist bei einem p-Wert von 0,409 nicht signifikant. Das Maximum liegt in der Kontrollgruppe bei 81 (51-149) adhärenen Bakterien pro Gesichtsfeld, bei der CRS-Gruppe bei 41 (Streuung 32,75-65,75). Ein signifikanter Unterschied lässt sich hier bei einem p-Wert von 0,149 nicht zeigen.

Für den Medianwert ergab sich bei der Kontrollgruppe ein Wert von 31 (Streuung 15-44,5) und für die CRS-Gruppe ein Wert von 15,75 (Streuung 13,625-17,625). Der p-Wert lag bei 0,194 und zeigt damit keine Signifikanz für einen Unterschied.

Der Anteil der adhärenen Bakterien an allen Bakterien liegt für die Kontrollgruppe bei 95 % (Streuung 85-98) und für die CRS-Gruppe bei 84 % (Streuung 78-97). Der p-Wert für den Unterschied beträgt hier 0,083 und ist demnach knapp nicht signifikant.

Es zeigt sich zwar bei allen Werten ein geringerer Median für die CRS-Gruppe, allerdings ist kein Unterschied signifikant.

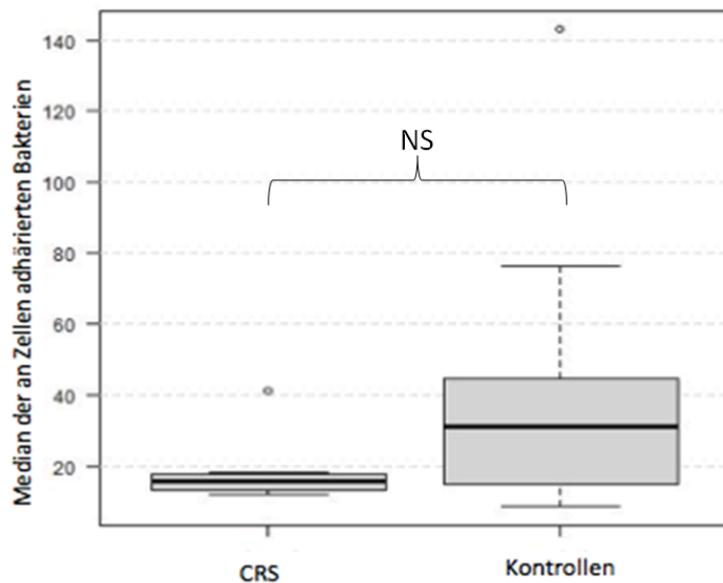


Abbildung 8: Mediane der an Zellen adhärenen Bakterien beider Gruppen

Abbildung 8 zeigt die in Tabelle 7 beschriebenen Mediane der adhärenen Bakterien beider Gruppen. Pro Gruppe zeigte sich hier ein Ausreißer nach oben. Für die CRS beträgt dieser Wert 41 adhärenen Bakterien, für die Kontrollgruppe 143 adhärenen Bakterien. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied.

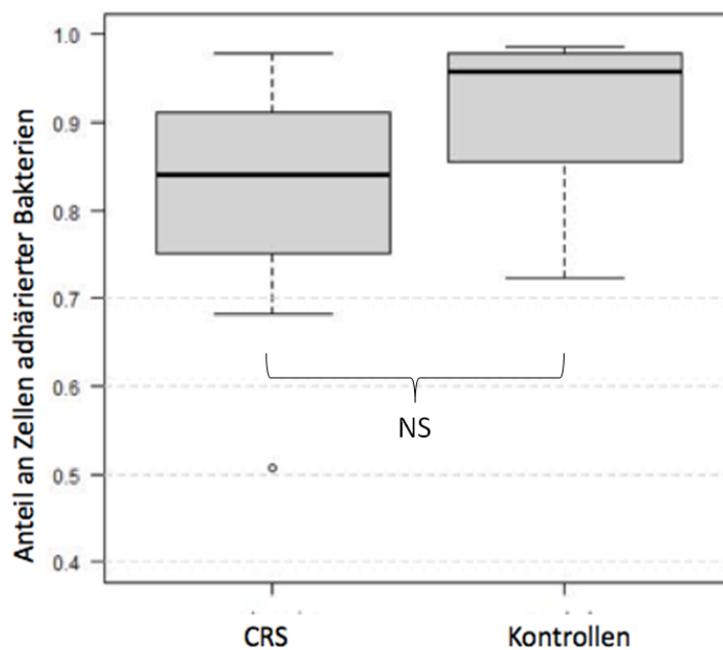


Abbildung 9: Anteil an Zellen adhärenen Bakterien beider Gruppen

Abbildung 9 zeigt die in Tabelle 7 beschriebenen Anteile der adhärenierten Bakterien beider Gruppen. Hier zeigt sich in der CRS Gruppe ein Ausreißer nach unten bei 51 %. Der Unterschied ist nicht signifikant.

Variable a	Variable b	Kontrollen	CRS
Median Gesamtbakterien	Median der adhärenierte Bakterien	0,98 (p< 0,001)	0,443 (p= 0,272)

Tabelle 8:

Zusammenhang zwischen der Gesamtbakterienzahl und der Zahl der an Zellen adhärenierten Bakterien.

Tabelle 8 zeigt die Stärke des Zusammenhangs von Bakterien im Bezug auf die Adhäsion. Hier wird dargestellt, dass in der Kontrollgruppe ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Gesamtbakterien und den adhärenierten Bakterien von $p < 0,001$ besteht. Dieser Zusammenhang ist in der CRS- Gruppe nicht sichtbar (p-Wert= 0,272).

3.6. Erfahrungswerte mit krankheitsspezifischen nasalen Primärkulturen im Alternativversuch

Die Anzucht der RPMI Zellen in den Culture Slides gelang problemlos. Alle Wells wurden gleichmäßig bewachsen.

Versuchsaufbau	Beobachtete Schwierigkeiten
Anzucht in den Zellkulturflaschen	- Limitierte Zellzahlgewinnung aus einer Schleimhautprobe
Primäre Anzucht auf den Culture Slides	- Inhomogene Zellzahl pro Kammer
Passagieren aus den Zellkulturflaschen in die Culture Slides	- Schlechtes Anwachsen der Zellen
Anzucht auf Deckgläschen in sechser Wells	- primäres Wachstum eher an den sechser Wells als auf den Deckgläschen - Ablösen der Zellen beim Herausnehmen der Deckgläschen
Generell	- Kontamination

	<ul style="list-style-type: none"> - Viele Zellverluste bei Wasch- und Färbeprozessen - Heterogenität
--	---

Tabelle 9: Schwierigkeiten bei der Verwendung primärer nasaler Epithelzellen

Tabelle 9 zeigt zusammengefasst die Schwierigkeiten, die sich bei den Alternativversuchen mit primären nasalen Epithelzellen ergaben.

Bei der Anzucht der krankheitsspezifischen nasalen Primärkulturen in den Kulturflaschen zeigte sich ein Wachstum. In jedem Versuchsansatz konnten Zellen nachgewiesen werden, es dauerte 14 Tage bis zum Erreichen eines präkonfluenten Monolayers. pro Zellkulturflasche lies sich das Adhäsionsverhalten eines Bakterienstamms untersuchen. Aus einer Schleimhautprobe ließen sich lediglich genug Zellen für zwei Zellkulturflaschen gewinnen.

Auch in dem Versuch, in dem die Zellen primär in die Culture Slides ausgesät wurden, zeigte sich ein Anhaften und Vermehren der Zellen. Pro Well konnte ein Bakterienstamm untersucht werden. Allerdings dauerte das Erreichen eines präkonfluenten Monolayers pro Well unterschiedlich lange (10-14 Tage). Pro Well konnte ein Bakterienstamm untersucht werden.

Bei der Erweiterung des Versuchs mit dem primären Anzüchten der Zellen in den Kulturflaschen und anschließender Passagierung in die Culture Slides konnte nach einmaliger Passage in den Culture Slides Zellen nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich nach dem Passagieren ein schlechtes Anwachsen der Zellen. In jedem Well der Culture Slides konnte ein Bakterienstamm untersucht werden.

Bei der Anzucht auf den Deckgläschen wuchsen die Zellen nur langsam an, bei den Waschvorgängen gingen Zellen verloren. Zudem wuchsen die Zellen vom Rand der Gläschen aus in die Mitte. Beim Bergen der Deckgläschen aus den Wells (greifen der Zellen mit Pinzetten) brachen teilweise die Gläschen oder es ließen sich im Nachhinein Spuren der Manipulation unter dem Mikroskop erkennen. Pro Well bzw. Deckgläschen konnte ein Bakterienstamm untersucht werden.

Bei allen Versuchen mit primären Epithelzellen kam es häufig zu Kontamination mit Bakterien, aber auch mit Pilzen. Während der Wasch- und Färbeprozesse gingen wiederholt Zellen verloren und das Erreichen eines heterogenen Monolayers gestaltete sich schwierig.

4. Diskussion

4.1. Diskussion zur Verwendung der RPMI- Zelllinie und zum Versuchsaufbau

Zunächst zeigt Tabelle 2 weitgehend kontaminationsfreies Arbeiten, lediglich ein Bakterium wurde in den Leerkontrollen nachgewiesen. Allerdings ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine Verunreinigung nach der Inkubationszeit handelt. *S. aureus* teilt sich alle 15 Minuten [25], sodass bei früherer Kontamination mindestens 16 Bakterien hätten nachweisbar sein sollen. Dementsprechend kann man von einer verschwindend geringen Kontamination ausgehen.

Auch die Wahl der Negativ- und Positivkontrolle zeigte sich als zutreffend. In der Negativkontrolle wurden im Median 6 an Zellen adhärierte Bakterien nachgewiesen. Die Positivkontrolle zeigt im Median 16 an Zellen adhärierte Bakterien, die Kontrollgruppe 31 und die CRS-Gruppe 15,7. Im Vergleich zeigt sich hier eine deutlich niedrigere Adhäsionsrate in der Negativkontrolle, wohingegen die Positivkontrolle in ihrem Adhäsionsverhalten den CRS-Stämmen ähnelt.

Die in Tabelle 3 gezeigten Ergebnisse befassen sich mit der Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld. Hierbei ließ sich sowohl für den Median als auch für das Maximum ein signifikant höherer Wert in der Kontrollgruppe feststellen. In der Kontrollgruppe wurden demnach signifikant mehr Zellen nachgewiesen als in der CRS-Gruppe.

Da initial in beiden Fällen ein präkonfluentes Monolayer aus Zellen vorlag, ergibt sich hieraus die Frage, ob die verwendete Zelllinie möglicherweise nicht robust genug ist und es dadurch zu einem vermehrten Ablösen gewisser Zellen kam oder die Kultivierbedingungen suboptimal gewählt wurden.

Dabei wurde die Wahl der verwendeten Zelllinie mit Absicht so getroffen, da sich die RPMI Zelllinie gerade durch hohe Stabilität in der Kultur auszeichnet [26]. Bei der RPMI- Zelllinie handelt es sich um eine immortale Zelllinie, die ursprünglich aus einem anaplastischen Squamosa-Zell-Karzinom isoliert wurde und einen diploiden Chromosomensatz mit 46 Chromosomen aufweist [24].

Aktuell wird die RPMI 2650 Zelllinie als die einzig verwendbare immortale Zelllinie zur Untersuchung der CRS angesehen [27].

Die Ähnlichkeit mit primären nasalen Epithelzellen ist groß. So handelt es sich bei den RPMI 2650 Zellen ebenfalls um Zellen mit einem ähnlichen diploiden Karyotyp [26]. Kreft et al. konnten zeigen, dass die RPMI 2650 Zellen ein polarisiertes Epithel ähnlich der nasalen Mukosa bilden [28]. Auch die exprimierten Oberflächenproteine ähneln sich stark [29]. So

konnte bei RPMI 2650 Zellen die Proteine ZO-1, Okkludin, Claudin-1, E- Cadherin, Beta-Catenin und Aktin nachgewiesen werden [28, 30]. Diese Proteine sind unter anderem an der Ausbildung von Tight Junctions beteiligt [31]. Es kann demnach angenommen werden, dass das gebildete Layer ähnliche Zell-Zell-Verbindungen aufweist wie bei primären nasalen Epithelzellen. Hierfür spricht auch der vergleichbare transepitheliale elektrische Widerstand (TEER). Hierbei handelt es sich um einen Ausdruck der Barriere zwischen den Zellen. In der nasalen Mukosa wird ein TEER zwischen 60 bis 180 Ohm cm^2 angegeben [32-34]. Der TEER der RPMI 2650 Zellen liegt mit 70-100 Ohm cm^2 in diesem Bereich [33, 35].

Zudem produzieren beide Zelllinien mucoides Material an ihrer apicalen Seite [24]. So wurden die physiologischen Bedingungen für *S. aureus* ähnlich den in vivo Bedingungen nachgestellt.

Auch aus den Kultivierungsbedingungen der RPMI Zellen ergeben sich Ansätze zur Diskussion. Hierbei handelt es sich zum einen um die Verwendung eines passenden Mediums, zum anderen um die Frage nach den „air-air“ oder „air-liquid“-Wachstumsbedingungen. Kreft et al. stellten einige Untersuchungen zu Kultivierungsbedingungen an. Sie konnten zeigen, dass die Zellen in A-MEM Medium früher Konfluenz erreichten als in normalen MEM Medium und im A-MEM weniger Serum- Zusatz notwendig war. Auf der anderen Seite bildeten die Zellen in MEM-Medium verstärkt Zell-Zell Verbindungen, was zu einem erhöhten TEER führt. Kombinierte man das A-MEM Medium mit der Air-Liquid Wachstumsbedingungen, kam es vermehrt zu Nekrosen der Zellen [28]. Um dies zu vermeiden wurde normales MEM-Medium gewählt. Einer vermehrten Nekroserate, gegebenenfalls als Auslöser der verminderten Zellzahl, wurde so vorgebeugt.

Unter Air-Liquid-Wachstumsbedingungen versteht man ein Grenzflächensystem. Es besteht aus einer flüssigen Phase und einer Luftphase. Bai et al. erarbeiteten, dass die Zellen in der Air-Liquid-Interphase in mehreren Lagen wuchsen, was zu einem höheren TEER führte. Außerdem wurde die Differenzierung stimuliert, sodass die Zellen homogen wuchsen [31]. Eine gleichmäßige Differenzierung ist erstrebenswert. Allerdings wurde, um mit annähernd gleichen Zellen zu arbeiten, bereits die RPMI- Zelllinie primären humanen Epithelzelllinien vorgezogen. Da mit einem präkonfluenten Monolayer gearbeitet wurde, war ein Wachstum in mehreren Schichten nicht gewünscht, weshalb keine Air-Liquid-Bedingungen gewählt wurden.

Für die Stabilität der Monolayer aus RPMI 2650 Zellen herrschten somit optimale Bedingungen und auch die Entscheidung zur Verwendung dieser Zelllinie wird durch die angeführte Literatur gestützt.

Die einzige Veränderung der Versuchsbedingungen war die Verwendung unterschiedlicher Bakterienstämme, nämlich aus der Gruppe der CRS-Patienten und aus der Gruppe eines gesunden Kontrollkollektivs. Eventuell spielen bakterielle Faktoren eine Rolle, die zum Absterben oder Ablösen der Epithelzellen führen, die dann im Zuge des Waschens mit PBS entfernt wurden. Ein Beispiel, in dem *S. aureus* zum Ablösen von Epithelzellen führt ist das „*Staphylococcal* skaled skin syndrom“. Hier führen Exfoliatine durch eine Serinproteaseaktivität zu einer Schädigung von Desmoglein 1 [36]. Hierdurch kommt es zu einem Adhäsionsverlust zwischen den Zellen [37]. Denkbar wäre, dass die Bakterien aus der CRS- Gruppe diesen oder ähnliche Virulenzfaktoren vermehrt exprimieren und hierdurch den Zellverband des Monolayers stören. Folglich könnte es zu einer vermehrten Ablösung von Epithelzellen kommen. In einem künftigen Folgeversuch könnte die verworfene Waschlösung auf RPMI-Zellen untersucht werden.

Wirtsspezifische Faktoren, die zum Ablösen der Zellen führen könnten, wurden durch den gewählten Versuchsaufbau unterbunden. In vivo kommt es zum Beispiel durch ein *S. aureus* spezifisches Peptidoglykan zu einer vermehrten Interleukin 4 (IL 4) Expression [38]. IL 4 wiederum führt zu einer Herabregulierung der Tight Junctions und des TEER [39]. Die interzelluläre Adhäsion wird hierdurch herabgesetzt, was ein Lösen aus dem Zellverbund und somit Verlorengelangen bei der Waschung begünstigen könnte. Da IL 4 allerdings hauptsächlich von Zellen des Immunsystems, vor allem TH2- Zellen, exprimiert wird [40, 41], konnte durch die Verwendung der RPMI 2650 Zelllinie das Vorhandensein von IL 4 oder anderer wirtsspezifischer Faktoren weitgehend ausgeschlossen werden. Eine Beeinträchtigung der Gesamtzellzahl durch wirtseigene Faktoren kann somit weitgehend ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend ist ein toxischer Einfluss der Bakterien auf die Gesamtzellzahl denkbar, es kann sich aber auch um eine zufällige Variation handeln. Dennoch spricht das Gesamtbild dafür, dass die Wahl der RPMI-Zelllinie günstig war.

Tabelle 4 zeigt, dass in beiden Gruppen der Anteil der Zellen, die von den Bakterien als Adhäsionsziel genutzt wurden annähernd gleich war (Kontrollgruppe 15%, CRS-Gruppe 16%). Auch bei den absoluten Zahlen ergibt sich kein signifikanter Unterschied. In beiden Gruppen wurden die Zellen von *S. aureus* als Adhäsionsziele erkannt und genutzt. Die erhaltenen Adhäsionsergebnisse (siehe unten) sind somit valide.

Tabelle 5 zeigt, dass es keinen nachweisbaren Zusammenhang zwischen der Zahl der Gesamtzellen und der Zahl mit Bakterien behafteter Zellen gibt. Dies bedeutet, dass eine erhöhte oder erniedrigte Gesamtzellzahl nicht zu einer erhöhten Vulnerabilität der Zellen gegenüber den Bakterien führt. Trotz der signifikant unterschiedlichen Gesamtzellzahl sind die Ergebnisse somit verwertbar.

Ein Korrelat für diese Überlegungen findet sich bei der CRS in der Polypenbildung. Hier kommt es durch das Gewebsplus zu einer vermehrten Anzahl an Epithelzellen. Zu dem in diesem Versuch dokumentierten Ergebnis passen die Studienergebnisse von Su et al. und Wie et al.. Beide Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass zwischen der CRSwNP und der CRSsNP kein Unterschied in der bakteriellen Besiedlungsrate besteht [42, 43].

Für die Gesamtbakterienzahl (vergleiche Tabelle 6) ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Da alle Versuchsansätze initial mit der gleichen Bakterienkonzentration beimpft worden sind, lässt dies darauf schließen, dass es während der einstündigen Inkubationszeit keinen Unterschied im Hinblick auf das bakterielle Verhalten gegeben hat. So lässt sich zum Beispiel eine schnellere Teilungsrate oder ein vermehrtes Absterben einer Bakteriengruppe ausschließen. Unter gleichen Bedingungen hat demnach keine Gruppe einen Selektionsvorteil. Dies zeigt, dass innerhalb des gewählten Versuchsaufbaus tatsächlich das Adhäsionsverhalten als denkbarer Virulenzfaktor untersucht wurde.

Darüber hinaus zeigt die aktuelle Literatur, dass andere Versuchsbedingungen den hier gewählten nicht überlegen sind:

Hoefnagels-Schuermans et al. untersuchten die bakterielle Konzentration zu Beginn der Inkubationszeit. Die Autoren konnten zeigen, dass bis zu einer Konzentration von 5×10^7 Bakterien pro Well keine quantitativen Unterschiede zwischen den verwendeten *S. aureus* Stämmen nachgewiesen werden konnte [44]. In den hier verwendeten Versuchsansätzen wurde die Bakterienzahl auf 1×10^6 Bakterien im Zellkulturmedium festgelegt. Diese Bedingung wurde somit in dem durchgeführten Versuch berücksichtigt.

Auch bezüglich des Inkubierens mit PBS stellten diese Autoren Versuche an und konnten zeigen, dass sich PBS besonders gut eignet, da die Bakterien hierin weder abstarben noch sich vermehrten. In dem durchgeführten Versuch wurden die Bakterien im Zellkulturmedium inkubiert. Zwar wäre hierdurch eine Vermehrung der Bakterien prinzipiell möglich, die Möglichkeit dazu aber in beiden Gruppen gleich.

Bezüglich der ersten Fragestellung lässt sich, gestützt durch die eigenen Ergebnisse und die aufgeführte Literatur, sagen, dass die verwendete RPMI Zelllinie und der konkrete Versuchsaufbau, zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von *S. aureus* geeignet sind.

4.2. Diskussion des Adhäsionsverhaltens von Bakterien der CRS- und der Kontroll-Gruppe

Tabelle 7 beschreibt die wesentlichen Ergebnisse zur Titelfrage dieser Arbeit. Sie zeigt vergleichend die an Zellen adhärenen Bakterien pro Gesichtsfeld. Zwischen den beiden Gruppen ergibt sich hierin kein signifikanter Unterschied. Somit ist nicht nachweisbar, dass Bakterien aus der CRS- Gruppe mit anderer Häufigkeit adhären als solche aus der Kontrollgruppe.

Für das Ergebnis gibt es mögliche Erklärungsansätze: Zum Einen ist es möglich, dass kein Unterschied existiert. Dies würde darauf hinweisen, dass das bakterielle Adhäsionsverhalten im Entstehungsprozess der CRS keine entscheidende Rolle spielt. Stattdessen könnten andere bakterielle Faktoren bedeutsam sein. Diese wurden bereits in der Einleitung vorgestellt.

Ebenso ist denkbar, dass in der klinischen Situation eine unterschiedliche Adhäsion durch wirtsspezifische Eigenschaften bedingt sein könnte.

In vivo spielen unterschiedliche Faktoren des Wirts eine Rolle für die Adhäsion von Bakterien. Dazu gehören zum Beispiel Lipide mit antimikrobieller Aktivität [45], sowie antimikrobielle Peptide [46] oder Proteine [47]. Auch die angeborene und erworbene Immunabwehr sind entscheidend bei der Bekämpfung von Bakterien. Diese Punkte wurden im durchgeführten Versuch durch das Verwenden der RPMI-2650 Zelllinie neutralisiert, sodass im Versuch isoliert das bakterielle Adhäsionsverhalten betrachtet werden konnte.

Auch denkbar wäre, dass es ein unterschiedliches bakterielles Adhäsionsverhalten gibt, das durch den Versuch nicht abgebildet werden konnte. Gegen diese Annahme sprechen allerdings einige Aspekte.

Die Adhäsion ist eine Möglichkeit für *S. aureus*, der physikalischen und immunologischen Antwort des Wirts zu entgehen, zum Beispiel der mechanischen Abwehr durch die Zilienfunktion im oberen Respirationstrakt. Über die Jahre wurden in der Literatur viele verschiedene für die Adhäsion wichtige Faktoren beschrieben.

Die Adhäsion von *S. aureus* wird über multiple Proteine vermittelt. Eine wichtige Gruppe sind die „cell wall- anchored“ (CWA) Proteine. Durch Untersuchungen dieser Proteine wurde gezeigt, dass ein einzelnes Protein mehrerer Funktionen erfüllen kann. Hierzu gehören zum

Beispiel die Kolonisation von Wirtsgewebe sowie die Umgehung der wirtseigenen Immunabwehr [48].

CWA Proteine können in vier Gruppen unterteilt werden, eine davon sind die „microbial surface components recognising adhesive matrix molecules“ (MSCRAMMs). Nach Patti et al. sind MSCRAMMs folgendermaßen definiert: Sie müssen sich auf der mikrobiellen Zelloberfläche befinden und makromolekulare Liganden in der Extrazellulärmatrix (EZM) erkennen. Diese Erkennung muss hoch affin und spezifisch sein. Trotzdem kann ein MSCRAMM mehrere Liganden binden oder mehrere verschiedene MSCRAMMs ein und den selben Liganden [49]. Zu den wirtseigenen Liganden gehören Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen, Vitronectin und Laminin [50]. Foster et al schlagen vor, die MSCRAMMs als Gruppe von Proteinen zu definieren, die strukturelle Ähnlichkeiten und ähnliche Mechanismen zur Bindung von Liganden aufweisen, die über zwei IgG-ähnliche Subdomänen vermittelt werden, da nicht alle MSCRAMMs nur die Adhäsion vermitteln. Vielmehr sind die MSCRAMMs eine Subgruppe der CWA Proteine, von denen Studien gezeigt haben, dass ein Protein multiple Funktionen, zum Beispiel Adhäsion und Umgehen der Immunantwort, haben kann [48].

Die drei weiteren Gruppen der CWA Proteine sind die „NEAT motif“ Gruppe, zu der die „iron regulated surface determinant protein“ (Isd) IsdA, IsdB und IsdH gehören, die „Three-helical bundle“ Gruppe und die „G5-E repeat“. Zudem gibt es noch eine Gruppe strukturell uncharakterisierter Proteine, die eine weite Reihe von Funktionen erfüllen [48].

Zu den MSCRAMMs, die an Epithelzellen binden gehören „clumping factor B“ (ClfB), „Serine-aspartate repeat protein C“ (SdrC) und „Serine-aspartate repeat protein D“ (SdrD) [51, 52].

ClfB konnte als Schlüsselprotein bei der nasalen Kolonisation von *S. aureus* nachgewiesen werden [53]. Es ist ein bifunktionales Protein, das zum einen humanes Zytokeratin 10 (K10) und zum anderen Fibrinogen bindet [51]. Es bindet über die Carboxy-terminale Domäne der alpha Kette an das wirtseigene Fibrinogen, dies wiederum führt zu einer Aggregation des Bakteriums an Fibrinogen [54, 55].

Fibrinogen spielt eine entscheidende Rolle in der wirtseigenen Abwehr gegen Bakterien. Es vermindert das Wachstum und das Ausbreiten von Bakterien durch Einschließen der Bakterie. Zudem aktiviert es das wirtseigene Immunsystem [56]. Rubel et al. konnten zeigen, dass neutrophile Granulozyten, die mit humanem Fibrinogen inkubiert wurden, über vermehrtes intrazelluläres Calcium verschiedene Proteine verstärkt (CD11b und CD66b) oder vermindert (FcγRIII) bildeten. Dies wiederum führte zu vermehrter Phagozytose und verminderter

Apoptose [57]. Durch die Adhäsion wird die Funktion von Fibrinogen gestört [58]. So kann *S. aureus* über die Clumping Faktoren zum einen adhären und reduziert gleichzeitig die gegen sich gerichtete Immunreaktion.

Durch die Verwendung der RPMI Zelllinie konnte diese Immunreaktion allerdings unterdrückt werden, da kein Immunsystem, zum Beispiel in Form von Granulozyten, vorhanden war. Es konnte also trotz multifaktorieller Einflüsse *in vivo* hier *in vitro* isoliert die Komponente der Adhäsion untersucht werden.

Für SdrC sind die Liganden auf Wirtsebene bisher nicht ausgemacht, aber auch SdrC ist an der Adhäsion der Bakterien an unverhornten Epithelzellen beteiligt [52]. SdrD bindet an Desmoglein 1 [59]. Für SdrC ist zudem bekannt, dass es die Biofilmbildung induziert [60].

Auch IsdA aus der „NEAT motif“ Gruppe bindet über K10 sowie Loricrin und Involucrin an den Epithelzellen [61]. Darüber hinaus wird mittels IsdA über einen noch nicht identifizierten Liganden ein Überleben in neutrophilen Granulozyten und eine Resistenz gegenüber Lactoferrin ermöglicht [62, 63].

An den Beispielen von ClfB und IsdA zeigt sich erneut der Vorteil des hier gewählten *in vitro* Modells. Durch den zelloberflächengebundenen Rezeptor K10 kann die Adhäsion wie unter *in vivo* Bedingungen beobachtet werden, andere durch diese Faktoren regulierte Virulenzfaktoren werden ausgeschlossen. Eine höhere Anzahl an nachgewiesenen Bakterien auf Grund von besseren Abwehrmechanismen gegenüber der wirtseigenen Immunabwehr kann hiermit ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Adhäsionsweg für *S. aureus* führt über die Bindung von *S. aureus* Protein A an zytoskeletales Aktin [64]. Wie bereits oben erwähnt, ähneln sich die RPMI 2650 Zelllinie sowie primäre nasale Epithelzellen in ihrem zytoskeletalen Aufbau stark. Die Adhäsionsbedingungen wurden demnach im vorliegenden Versuch den *in vivo* Bedingungen nachempfunden. Zudem unterscheiden sich die RPMI Zellen durch ihre Klonalität nicht in ihrem zytoskeletalen Aufbau untereinander. Den Bakterien stand somit an jeder Zelle die gleiche Adhäsionsmöglichkeit zur Verfügung.

Es gibt allerdings auch bakterielle Adhäsionsfaktoren, die nicht an Liganden auf den Epithelzellen sondern an Liganden in der EZM binden. Hierdurch könnte sich eine Erklärung finden, dass *in vivo* ein Unterschied im bakteriellen Adhäsionsverhalten besteht, der im vorliegenden Versuch nicht abgebildet werden konnte, da keine EZM vorhanden war.

„Fibronectin binding protein A“ (FnBPA) und „Fibronectin binding protein B“ (FnBPB) binden an wirtsspezifisches Fibronectin über multiple „fibronectin-binding repeats“ [65]. Fibronectin befindet sich physiologisch in der Basalmembran oder der Lamina propria [66].

Im durchgeführten Versuch wurden die RPMI Zellen bis zu einem präkonfluenten Monolayer kultiviert und auch bei weiterem Wachstum wäre keine Basallamina oder Lamina propria zu erwarten gewesen. Demnach ist auch Fibronectin als Zielstruktur von Adhäsionsfaktoren in diesem Versuch nicht zu erwarten. Darüber hinaus wäre anzunehmen, dass eine etwaige EZM bei den Waschungen der Zellkulturen entfernt worden wäre und somit nicht als Ligand für Bakterien dienen konnte.

Es konnte gezeigt werden, dass mechanische Reize eine Auswirkung auf die bakterielle Adhäsion haben. So lies sich nachweisen, dass bei Dehnung von Fibronectin die bakterielle Adhäsion unterbrochen wird [67].

Ähnliches konnte für weitere Adhäsionsfaktoren nachgewiesen werden. „Collagen adhesin“ (CNA) ist ein zellwandverankertes Protein, das über die N2 Subdomäne der A-Region an Kollagen bindet [68]. Abgesehen von der Oberflächenkolonisation führt CNA auch zu einer Inhibierung des Komplementsystems [69]. Auch für CNA konnte ein Zusammenhang zwischen der mechanischen Beanspruchung des Liganden und der Adhäsion gezeigt werden. So bindet CNA stärker an lockerem als an unter Spannung stehendem Kollagen [70].

Zwar konnten die Bakterien einige Adhäsionswege durch die gegebenen Versuchsbedingungen nicht nutzen. Diese Entscheidung wurde bei der Versuchsplanung getroffen, denn die Abhängigkeit der Adhäsionsfaktoren von mechanischer Beanspruchung hätte im verwendeten Versuch zu weiteren unkontrollierbaren Einflüssen führen können, da das System vor allem durch die wiederholten Waschgänge vermehrt mechanischen Reizen ausgesetzt war. Dies erschien zu störanfällig, sodass diese Adhäsionswege von Anfang an nicht Gegenstand der Untersuchung seien sollten.

Corrigan et al. konnten zudem in einer Arbeit ClfB, IsdA, SdrC und SdrD als wichtige Adhäsionsfaktoren bestätigen. Ein Stamm, dem alle diese Proteine fehlten, konnte nicht adhären [52]. Gerade diese Faktoren binden allerdings wie oben beschrieben an die Epithelzellen. Durch die Verwendung der RPMI 2650 Zelllinie konnten somit die entscheidenden bakteriellen Adhäsionsfaktoren untersucht werden, ohne dass interferierende Faktoren, wie mechanische Einflüsse, das Ergebnis verzerrten.

Auch andere bakterielle Eigenschaften können das Adhäsionsverhalten beeinflussen. So wirkt sich zum Beispiel der pH-Wert des umgebenden Milieus auf das Adhäsionsverhalten von *S. aureus* aus. Es konnte nachgewiesen werden, dass vor allem alkalische pH-Werte hemmend auf die Adhäsion wirken [71]. Für die CRS konnte ein alkalischerer Wert im Milieu des mittleren Nasengangs festgestellt werden [72]. Trotzdem wurde bei der CRS vermehrt *S. aureus* nachgewiesen [15], was für eine Anpassung des Bakteriums an diese Bedingung

spricht. In weiteren Versuchen könnte nun geprüft werden, wie sich das hier verwendete Zell-Bakterien- System bei unterschiedlichen pH-Werten verhält.

Ein weiterer Faktor, der auf Seiten der Bakterien das Adhäsionsverhalten beeinflusst, ist die Wachstumsphase der Bakterien. Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase adhären vermehrt gegenüber denen in der stationären Phase [73]. Da alle Bakterien nach gleichem Schema angezchtet wurden (gleiche Wachstumszeiten) ist anzunehmen, dass sie sich in gleichen Wachstumsphasen befanden und somit gut vergleichbar waren. Auch das Vorhandensein einer Polysaccharidkapsel vom Typ 5 und 8, was in einer gesteigerten Adhäsion resultiert, spielt eine Rolle [73]. Hier könnte in einem Folgeversuch untersucht werden, ob gewisse Stämme diese vermehrt aufweisen.

Allerdings können nicht nur bakterielle Faktoren zu dem Ergebnis beigetragen haben, Auch Aspekte des mikrobiologischen Verfahrens sind zu bedenken. Nicht auszuschließen ist, dass die Bakterienstämme im Rahmen der Kultivierung die Fähigkeit zur Bildung von Adhäsionsfaktoren verlieren, da unter mikrobiologischen Bedingungen (Anzüchten auf nährstoffhaltigem Agar) kein Selektionsdruck mehr zur Bindung an Epithelzellen und dadurch zur Bildung von Adhäsionsfaktoren besteht.

Weiterhin könnten mechanische Faktoren bei der Gewinnung der Stämme aus den Patienten eine Vorselektion hin zu weniger gut adhärenenden Bakterien bedingen, da bei den Abstrichen möglicherweise stark adhärenierte Bakterien nicht entnommen werden konnten.

Ebenso wird durch Verwendung der Monokultur mit *S. aureus* nicht untersucht, welche Einflüsse durch andere Organismen (Mischkulturen) auf die Adhäsion bestehen [74].

Tabelle 8 zeigt den Zusammenhang zwischen der Gesamtbakterienzahl und der Zahl der an Zellen adhärenierten Bakterien. Dieser konnte in der Kontrollgruppe als signifikant nachgewiesen werden. Dies besagt, dass sich die Zahl der adhärenierten Bakterien in der Kontrollgruppe und die Gesamtzahl der Bakterien dieser Gruppe konkordant verhalten. Je mehr Bakterien also vorhanden sind, desto mehr Bakterien adhärenieren. Da gezeigt werden konnte, dass der größte Anteil der vorhandenen Bakterien adhäreniert, ist dies das zu erwartende Ergebnis. Allerdings konnte dieser Zusammenhang für die CRS-Gruppe nicht nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass eine erhöhte Bakterienzahl nicht unbedingt zu einer erhöhten Zahl adhärenierender Bakterien führt. Dies wiederum hieße, dass mehr nicht-adhärenierende Bakterien zu erwarten wären, die die Zahl der Gesamtbakterien erhöhen. Dies kann in Zusammenhang zu den in Tabelle 3 dargestellten Werten stehen. In der CRS-Gruppe waren signifikant weniger Zellen nachweisbar, was zu einer größeren zellfreien Fläche führt. Auf dieser größeren Fläche können sich bei der CRS mehr nicht an Zellen adhärenierte Bakterien

befinden. Wang et al. konnten zeigen, dass bei der CRS deutlich häufiger bakterielle Biofilme nachgewiesen werden konnten [75]. In diesen Biofilmen schützen sich Bakterien durch eine selbst produzierte polymere Matrix vor antimikrobiellen Einflüssen. Die Biofilme können dabei an lebenden oder inerte Oberflächen adhären [76]. Denkbar wäre, dass die Bakterien aus der CRS-Gruppe sowohl an die Zellen als auch an die inerte Oberfläche der Culture Slides adhären, ohne dass eine Aussage über die Präferenz gemacht werden kann.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass unter Sicherstellung der Hauptadhäsionswege und unter Ausschluss verzerrender Faktoren keine vermehrte Adhäsion von Bakterien der CRS- Gruppe an die RPMI-Zellen festgestellt werden konnte. Ob eine erhöhte Adhäsion in vivo durch Adhäsion an andere Strukturen (zum Beispiel in der EZM), durch begünstigende physikalische oder biochemische Gegebenheiten (zum Beispiel der pH-Wert) oder auf Grund von wirtsspezifischen Faktoren nachweisbar ist, ließe sich in Folgeversuchen untersuchen. Verschiedene mögliche Ansätze ergeben sich aus den oben erwähnten Punkten. So könnte der Versuch zum Beispiel bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt werden. oder es könnte zusätzlich eine Kollagenbeschichtung verwendet werden.

4.3. Alternativversuch mit primären nasalen Epithelzellen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde in einem weiteren Versuch probiert, das Adhäsionsverhalten von Bakterien an krankheitsspezifischen nasalen Epithelzellkulturen zu testen. Dieser Versuch bildet die Überlegung ab, dass der Grund für eine erhöhte Adhäsionsrate auf Seiten des Wirts zu finden ist. Hierbei ergaben sich allerdings die bereits in Tabelle 9 zusammengefassten Schwierigkeiten.

Es sollten 20 verschiedene Bakterienstämme pro Schleimhautprobe auf ihr Adhäsionsverhalten überprüft werden. Hierfür ergab sich vor allem für die Anzucht in Kulturfalschen eine deutliche Limitation. Die hierfür nötige Menge primärer Epithelzellen lies sich nicht aus einer einzigen Schleimhautprobe isolieren und auf 20 Kulturflaschen aufteilen. Lediglich auf zwei Kulturflaschen ließen sich die Zellen einer Schleimhautprobe aufteilen, wenn ein präkonfluentes Monolayer nach ca. 14 Tagen erreicht werden sollte. Die Untersuchung der geplanten 20 Bakterienstämme hätte somit an Zellen von unterschiedlichen Patienten vorgenommen werden müssen, dies hätte die Reproduzierbarkeit des Versuchs verhindert.

Im zweiten Alternativversuch (Anzucht der Zellen auf den Culture Slides) ergab sich das Problem, dass die Zellen einer Schleimhautprobe primär auf die Culture Slides aufgeteilt wurden. Hieraus ergab sich eine ungleichmäßige Verteilung der primären Zellzahl in den

Culture Slides. Folglich resultierte eine unterschiedlich lange Zeit bis zum Erreichen eines präkonfluenten Monolayers. Da die einzelnen Wells der Culture Slides nicht isoliert für den Adhäsionsversuch genutzt werden konnten musste mit den verschiedenen stark bewachsenen Wells gearbeitet werden. Somit bestanden aber keine gleichen Ausgangsbedingungen für den Adhäsionsversuch.

Das Anzüchten der Zellen in Kulturflaschen und das Passagieren in die Culture Slides, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in den acht Kammern zu gewährleisten, stellte sich schwierig dar. Die passagierten Zellen zeigten nach der Passagierung ein vermindertes Anwachsen in den Culture Slides, woraus sich ein ähnliches Problem wie oben beschrieben ergab.

Auch das Anzüchten auf Deckgläschen in den sechser Well Schalen zeigte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Die Zellen adhärten kaum an den Deckgläschen, sondern vielmehr an den Kammerböden. Ein weiteres Problem stellte das Ablösen der Deckgläschen nach dem Adhäsionsversuch mit den Bakterien aus den Kammern dar. Hierbei wurden Zellen zerstört oder lösten sich vollständig. Außerdem ließen sich pro Schleimhautprobe zu wenige Zellen isolieren, um 20 der 1x1 cm großen Deckgläschen bewachsen zu lassen.

Insgesamt zeigten sich die primären nasalen Epithelzellkulturen *in vitro* nicht als ausreichend robust. Es war kaum möglich, in den einzelnen Kammern der Culture- Slides gleichmäßiges Zellwachstum zu etablieren. Die Zeit bis zum Erreichen eines präkonfluenten Monolayers betrug mindestens 14 Tage. Zudem gingen im Wasch- und Färbeprozess immer wieder auffallend viele Zellen verloren. Nicht zuletzt kommt es bei primären Zellkulturen zu einer nicht zu unterschätzenden Heterogenität sowohl in und zwischen den Kulturen [28]. Hinzu kommt, dass es durch die Gewinnung aus nicht sterilem Gewebe quasi immer zu einer Kontamination mit Bakterien oder Pilzen kam. Um dies zu vermeiden, mussten die Kulturen initial für drei Tage mit einem Antibiotikum beimpft werden. Für verschiedene Antibiotika konnten Effekte auf Epithel- und andere Zellarten gezeigt werden. Cefazolin führt zu einem Schrumpfen und Ablösen von Epithelzellen vom Untergrund. Gentamycin inhibiert die Migration [77]. Penicillin beeinflusst die Differenzierung von humanen Zellen [78], für Tetracycline konnte nachgewiesen werden, dass sie die Zellmorphologie veränderten [79]. Zwar gibt es zu der Auswirkung von Penicillin auf primäre nasale Epithelzellen bisher keine Studien, bei vielfach nachgewiesenen Effekten von Antibiotika auf verschiedene Zelltypen ist hier eine Auswirkung allerdings nicht ausgeschlossen. Möglicherweise besteht hierin eine Erklärung, wieso im Laufe des Versuchs wiederholt viele Zellen verloren gingen.

Für Amoxicillin konnte zudem eine Akkumulation in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden [80]. Durch Wahl des Antibiotikums Penicillin konnte eine möglichst geringe Auswirkung auf die im folgenden verwendeten *S. aureus* Bakterien angenommen werden. Ton-That konnte zeigen, dass Penicillin, im Gegensatz zu anderen Antibiotika, weniger Auswirkung auf *S. aureus* hat [81]. Nichts desto trotz ist eine Anreicherung in den Zellen und spätere Auswirkung auf *S. aureus* und damit den Adhäsionsversuch nicht ausgeschlossen. Bei der sterilen RPMI 2650 Zellkultur entfällt dieser Schritt.

Zudem ist die Adhäsion von *S. aureus* an Epithelzellen abhängig von deren Differenzierungsgrad, je höher das Keratinisierungsstadium, desto höher die Adhäsion [82]. In einer Kultur aus primären nasalen Epithelzellen kann nicht für den gleichen Differenzierungsgrad garantiert werden. Aber nicht nur die Unterschiede innerhalb der Epithelzellen, auch die Zusammensetzung des Epithels spielt eine Rolle. Gerade Becherzellen spielen für die Permeabilität von Gewebe eine Rolle. Carson et al. konnten nachweisen, dass Becherzellen zu einer Fehlstellung der Tight Junctions führen können [83]. Somit wäre die Permeabilität des Zelllayers in Abhängigkeit von der Anzahl der mitkultivierten Becherzellen unterschiedlich. Eine Mitkultivierung von Becherzellen ist bei der Kultivierung von primären nasalen Epithelzellen allerdings nicht auszuschließen.

Alle oben genannten Bedingungen hätten dazu führen können, dass die Versuchsbedingungen nicht reproduzierbar und einheitlich hätten durchgeführt werden können.

Um diese Schwierigkeiten in einem Folgeversuch zu umgehen, finden sich in der Literatur mögliche weitere Alternativen zu primären nasalen Epithelzellen. Wohlers et al. befassten sich mit der Generierung transformierter nasaler Epithelzellen. Diese Zellen zeigten eine deutlich längere Überlebenszeit und waren über mehrere Passagen stabil. Somit könnte eine relativ hohe Zellzahl zur Verfügung gestellt werden. Zudem haben sie im Vergleich zu Primärkulturen keine geno- oder phänotypischen Schwankungen [84].

Zusammenfassend waren die RPMI-Zellen deutlich anspruchsloser und somit für den Versuch besser geeignet. Sie ließen sich ohne Weiteres passagieren und bildeten innerhalb von 2-3 Tagen ein präkonfluentes Monolayer, das unempfindlich gegenüber Waschen und Färben während des Adhäsionsversuchs war. Dies könnte daran liegen, dass es sich bei den RPMI-Zellen um Karzinomzellen handelt, die auch in vivo dadurch gekennzeichnet sind, aggressiv und ohne Berücksichtigung physiologischer Strukturen zu wachsen und auch fähig sind, ohne Zellverbund zu überleben und sogar (in Form von Metastasen) in anderen Gewebearten zu wachsen [85].

Bezüglich der Verwendung von primären nasalen Epithelzellen ergaben sich Anhaltspunkte, die in künftigen Versuchen mit diesen Zellen zu beachten wären.

5. Zusammenfassung

Die CRS ist eine chronische Entzündung der Nase und ihrer Nebenhöhlen. Sie äußert sich in Nasenatmungsbehinderung, Kopfschmerzen, Druckgefühl im Gesicht, Riechstörung und Allgemeinsymptomen wie mangelnde Belastbarkeit und Erschöpfung [1, 5-7].

Die Pathogenese der CRS ist bislang ungeklärt. Man nimmt an, dass sie durch langsam progrediente Obstruktion und gleichzeitiger Entzündungsreaktionen in der Schleimhaut bedingt ist [1]. Die Gründe für diese Vorgänge sind allerdings noch weitgehend unklar, man geht jedoch von einem multifaktoriellen Geschehen aus. In diesem Zusammenhang wird die Rolle des Bakteriums *S. aureus* diskutiert. *S. aureus* ist eines der am häufigsten nachgewiesenen Bakterien bei CRS-Patienten [17] und scheint über direkte und indirekte Wege die Entzündung der Schleimhaut zu beeinflussen [18-22].

In der hier durchgeführten Studie wurde das Adhäsionsverhalten von *S. aureus* untersucht. Vergleichend wurden Bakterien von Patienten mit CRS und Bakterien von einem gesunden Kontrollkollektiv untersucht. Hierzu wurde die Zelllinie RPMI 2650 mit verschiedenen *S. aureus* Stämmen inkubiert und beide mittels Fluoreszenzfärbung angefärbt. Unter dem Mikroskop wurden die Anzahlen von Zellen und Bakterien bestimmt, anschließend statistisch aufgearbeitet und die Ergebnisse verglichen.

Der Versuch zeigte keinen signifikanten Unterschied im Adhäsionsverhalten von Bakterien beider Gruppen. Denkbar ist, dass es keinen Unterschied in der Adhäsion gibt, oder dass eine erhöhte Adhäsionsrate nicht durch den bakteriellen Phänotyp begründet ist, sondern von wirtsspezifischen Faktoren beeinflusst wird.

Um dieser Frage weiter nachzugehen, wurden erste Versuche unternommen, bei denen das Adhäsionsverhalten an krankheitsspezifischen Epithelzellen geprüft wurde. Hierzu wurden primäre nasale Epithelzellen von CRS-Patienten und einem gesunden Kontrollkollektiv mit gleichen Bakterien inkubiert, um zusehen, ob eine unterschiedliche Adhäsion gezeigt werden kann. Jedoch wäre eine Weiterentwicklung dieses Versuchsansatzes auf Grund festgestellter technischer Probleme ein Projekt für die Zukunft.

Literaturverzeichnis

1. Struck, B.A., U. Popert, and e. al. *Rhinosinusitis S2k-Leitlinien AWMF-Register-Nr. 017(049 und 053-021)*. 2017 [cited 2018 27.05.2018]; Available from: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/017-049_und_053-012l_S2k_Rhinosinusitis_2017-12.pdf.
2. Stuck, B.A., et al., [Guideline for "rhinosinusitis"-long version : S2k guideline of the German College of General Practitioners and Family Physicians and the German Society for Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery]. *HNO*, 2018. **66**(1): p. 38-74.
3. Fokkens, W.J., et al., *European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012*. *Rhinol Suppl*, 2012(23): p. 3 p preceding table of contents, 1-298.
4. Meltzer, E.O. and D.L. Hamilos, *Rhinosinusitis diagnosis and management for the clinician: a synopsis of recent consensus guidelines*. *Mayo Clin Proc*, 2011. **86**(5): p. 427-43.
5. Chester, A.C., et al., *Fatigue improvement following endoscopic sinus surgery: a systematic review and meta-analysis*. *Laryngoscope*, 2008. **118**(4): p. 730-9.
6. Chester, A.C., et al., *Systematic review of change in bodily pain after sinus surgery*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2008. **139**(6): p. 759-65.
7. Ling, F.T. and S.E. Kountakis, *Important clinical symptoms in patients undergoing functional endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis*. *Laryngoscope*, 2007. **117**(6): p. 1090-3.
8. Shah, A., *Allergic rhinitis, chronic rhinosinusitis and nasal polyposis in Asia Pacific: impact on quality of life and sleep*. *Asia Pac Allergy*, 2014. **4**(3): p. 131-3.
9. Beule, A., *Epidemiology of chronic rhinosinusitis, selected risk factors, comorbidities, and economic burden*. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2015. **14**: p. Doc11.
10. Hastan, D., et al., *Chronic rhinosinusitis in Europe--an underestimated disease. A GA(2)LEN study*. *Allergy*, 2011. **66**(9): p. 1216-23.
11. Koennecke, M., et al., *Subtyping of polyposis nasi: phenotypes, endotypes and comorbidities*. *Allergo J Int*, 2018. **27**(2): p. 56-65.
12. Dennis, S.K., K. Lam, and A. Luong, *A Review of Classification Schemes for Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis Endotypes*. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 2016. **1**(5): p. 130-134.
13. Lee, S. and A.P. Lane, *Chronic rhinosinusitis as a multifactorial inflammatory disorder*. *Curr Infect Dis Rep*, 2011. **13**(2): p. 159-68.
14. Zhang, N., et al., *An update on the impact of Staphylococcus aureus enterotoxins in chronic sinusitis with nasal polyposis*. *Rhinology*, 2005. **43**(3): p. 162-8.
15. Boase, S., et al., *The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection*. *BMC Infect Dis*, 2013. **13**: p. 210.
16. Benninger, M., et al., *Bacterial interference in upper respiratory tract infections: a systematic review*. *Am J Rhinol Allergy*, 2011. **25**(2): p. 82-8.
17. Larson, D.A. and J.K. Han, *Microbiology of sinusitis: does allergy or endoscopic sinus surgery affect the microbiologic flora?* *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2011. **19**(3): p. 199-203.

18. Huvenne, W., P.W. Hellings, and C. Bachert, *Role of staphylococcal superantigens in airway disease*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2013. **161**(4): p. 304-14.
19. Bachert, C., et al., *Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **107**(4): p. 607-14.
20. Patou, J., et al., *Staphylococcus aureus enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **121**(1): p. 110-5.
21. Huvenne, W., et al., *Staphylococcus aureus enterotoxin B augments granulocyte migration and survival via airway epithelial cell activation*. *Allergy*, 2010. **65**(8): p. 1013-20.
22. Thienhaus, M.L., et al., *Antimicrobial peptides in nasal secretion and mucosa with respect to Staphylococcus aureus colonization in chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. *Rhinology*, 2011. **49**(5): p. 554-61.
23. Sachse, F., et al., *Staphylococcus aureus invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells in vitro*. *Allergy*, 2010. **65**(11): p. 1430-7.
24. Moore, G.E. and A.A. Sandberg, *Studies of a Human Tumor Cell Line with a Diploid Karyotype*. *Cancer*, 1964. **17**: p. 170-5.
25. Schmidt, K., *untersuchung zum invitro Wachstumsverhalten ausgesuchter MRSA Stämme*, in *Medizinische Fakultät*. 2010, Julius-Maximilian-Universität Würzburg: Würzburg. p.
26. Moorhead, P.S., *Human tumor cell line with a quasi-diploid karyotype (RPMI 2650)*. *Exp Cell Res*, 1965. **39**(1): p. 190-6.
27. Ball, S.L., et al., *How reliable are sino-nasal cell lines for studying the pathophysiology of chronic rhinosinusitis?* *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2015. **124**(6): p. 437-42.
28. 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*, 2015. **32**(2): p. 665-79.
29. Moll, R., R. Krepler, and W.W. Franke, *Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas*. *Differentiation*, 1983. **23**(3): p. 256-69.
30. Kurti, L., et al., *Retinoic acid and hydrocortisone strengthen the barrier function of human RPMI 2650 cells, a model for nasal epithelial permeability*. *Cytotechnology*, 2013. **65**(3): p. 395-406.
31. 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.
32. Boucher, R.C., et al., *Cell culture approaches to the investigation of human airway ion transport*. *Eur J Respir Dis Suppl*, 1987. **153**: p. 59-67.
33. 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.
34. Dolberg, A.M. and S. Reichl, *Expression of P-glycoprotein in excised human nasal mucosa and optimized models of RPMI 2650 cells*. *Int J Pharm*, 2016. **508**(1-2): p. 22-33.
35. Goncalves, V.S.S., et al., *Application of RPMI 2650 as a cell model to evaluate solid formulations for intranasal delivery of drugs*. *Int J Pharm*, 2016. **515**(1-2): p. 1-10.

36. Hanakawa, Y., et al., *Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome*. J Clin Invest, 2002. **110**(1): p. 53-60.
37. Hubiche, T., et al., *Mild staphylococcal scalded skin syndrome: an underdiagnosed clinical disorder*. Br J Dermatol, 2012. **166**(1): p. 213-5.
38. Matsui, K., M. Wirotasangthong, and A. Nishikawa, *Peptidoglycan from Staphylococcus aureus induces IL-4 production from murine spleen cells via an IL-18-dependent mechanism*. Int Arch Allergy Immunol, 2008. **146**(3): p. 262-6.
39. Wise, S.K., et al., *Interleukin-4 and interleukin-13 compromise the sinonasal epithelial barrier and perturb intercellular junction protein expression*. Int Forum Allergy Rhinol, 2014. **4**(5): p. 361-70.
40. Bradding, P., et al., *Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells*. J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1381-6.
41. Del Prete, G., E. Maggi, and S. Romagnani, *Human Th1 and Th2 cells: functional properties, mechanisms of regulation, and role in disease*. Lab Invest, 1994. **70**(3): p. 299-306.
42. Su, W. and Y. Jiang, *[Bacterial culture analysis for patients with chronic rhinosinusitis with or without polyps]*. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2015. **40**(11): p. 1253-7.
43. Wei, H.Z., et al., *The microbiology of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2018. **275**(6): p. 1439-1447.
44. 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.
45. Wille, J.J. and A. Kydonieus, *Palmitoleic acid isomer (C16:1delta6) in human skin sebum is effective against gram-positive bacteria*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2003. **16**(3): p. 176-87.
46. Yamasaki, K. and R.L. Gallo, *Antimicrobial peptides in human skin disease*. Eur J Dermatol, 2008. **18**(1): p. 11-21.
47. Wiesner, J. and A. Vilcinskas, *Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system*. Virulence, 2010. **1**(5): p. 440-64.
48. Foster, T.J., et al., *Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(1): p. 49-62.
49. Patti, J.M., et al., *MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues*. Annu Rev Microbiol, 1994. **48**: p. 585-617.
50. Foster, T.J. and D. McDevitt, *Surface-associated proteins of Staphylococcus aureus: their possible roles in virulence*. FEMS Microbiol Lett, 1994. **118**(3): p. 199-205.
51. Ganesh, V.K., et al., *Structural and biochemical characterization of Staphylococcus aureus clumping factor B/ligand interactions*. J Biol Chem, 2011. **286**(29): p. 25963-72.
52. Corrigan, R.M., H. Miajlovic, and T.J. Foster, *Surface proteins that promote adherence of Staphylococcus aureus to human desquamated nasal epithelial cells*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 22.
53. Mulcahy, M.E., et al., *Nasal colonisation by Staphylococcus aureus depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin*. PLoS Pathog, 2012. **8**(12): p. e1003092.

54. McDevitt, D., et al., *Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 1994. **11**(2): p. 237-48.
55. Ni Eidhin, D., et al., *Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 1998. **30**(2): p. 245-57.
56. Ko, Y.P. and M.J. Flick, *Fibrinogen Is at the Interface of Host Defense and Pathogen Virulence in Staphylococcus aureus Infection*. Semin Thromb Hemost, 2016. **42**(4): p. 408-21.
57. Rubel, C., et al., *Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 2002-10.
58. 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.
59. Askarian, F., et al., *The interaction between Staphylococcus aureus SdrD and desmoglein 1 is important for adhesion to host cells*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22134.
60. Barbu, E.M., et al., *SdrC induces staphylococcal biofilm formation through a homophilic interaction*. Mol Microbiol, 2014. **94**(1): p. 172-85.
61. Clarke, S.R., et al., *Iron-regulated surface determinant protein A mediates adhesion of Staphylococcus aureus to human corneocyte envelope proteins*. Infect Immun, 2009. **77**(6): p. 2408-16.
62. Clarke, S.R., et al., *The Staphylococcus aureus surface protein IsdA mediates resistance to innate defenses of human skin*. Cell Host Microbe, 2007. **1**(3): p. 199-212.
63. Clarke, S.R. and S.J. Foster, *IsdA protects Staphylococcus aureus against the bactericidal protease activity of apolactoferrin*. Infect Immun, 2008. **76**(4): p. 1518-26.
64. Jung, K.Y., et al., *Involvement of staphylococcal protein A and cytoskeletal actin in Staphylococcus aureus invasion of cultured human oral epithelial cells*. J Med Microbiol, 2001. **50**(1): p. 35-41.
65. Schwarz-Linek, U., M. Hook, and J.R. Potts, *The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells*. Mol Microbiol, 2004. **52**(3): p. 631-41.
66. Kolachala, V.L., et al., *Epithelial-derived fibronectin expression, signaling, and function in intestinal inflammation*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 32965-73.
67. Chabria, M., et al., *Stretching fibronectin fibres disrupts binding of bacterial adhesins by physically destroying an epitope*. Nat Commun, 2010. **1**: p. 135.
68. Patti, J.M., J.O. Boles, and M. Hook, *Identification and biochemical characterization of the ligand binding domain of the collagen adhesin from Staphylococcus aureus*. Biochemistry, 1993. **32**(42): p. 11428-35.
69. 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.
70. Madani, A., K. Garakani, and M.R.K. Mofrad, *Molecular mechanics of Staphylococcus aureus adhesin, CNA, and the inhibition of bacterial adhesion by stretching collagen*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0179601.
71. Nostro, A., et al., *Effect of alkaline pH on staphylococcal biofilm formation*. APMIS, 2012. **120**(9): p. 733-42.

72. Bhawana, G.S., S. Kumar, and A. Kumar, *Alkaline pH in middle meatus in cases of chronic rhinosinusitis*. Am J Otolaryngol, 2014. **35**(4): p. 496-9.
73. 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.
74. Johannessen, M., J.E. Sollid, and A.M. Hanssen, *Host- and microbe determinants that may influence the success of S. aureus colonization*. Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 56.
75. Wang, X., J. Du, and C. Zhao, *Bacterial biofilms are associated with inflammatory cells infiltration and the innate immunity in chronic rhinosinusitis with or without nasal polyps*. Inflammation, 2014. **37**(3): p. 871-9.
76. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
77. Hendrix, D.V., D.A. Ward, and M.A. Barnhill, *Effects of antibiotics on morphologic characteristics and migration of canine corneal epithelial cells in tissue culture*. Am J Vet Res, 2001. **62**(10): p. 1664-9.
78. Skubis, A., et al., *Impact of Antibiotics on the Proliferation and Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(12).
79. Kim, H.Y., K.T. Kim, and S.D. Kim, *Biochemical effects of veterinary antibiotics on proliferation and cell cycle arrest of human HEK293 cells*. Bull Environ Contam Toxicol, 2012. **89**(2): p. 234-9.
80. Fujiwara, K., *[Distribution and accumulation of antibiotics in cells and tissues and toxicity studies by immunocytochemistry]*. Yakugaku Zasshi, 2011. **131**(6): p. 949-60.
81. Ton-That, H. and O. Schneewind, *Anchor structure of staphylococcal surface proteins. IV. Inhibitors of the cell wall sorting reaction*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24316-20.
82. Bibel, D.J., et al., *Importance of the keratinized epithelial cell in bacterial adherence*. J Invest Dermatol, 1982. **79**(4): p. 250-3.
83. Zhang, J., et al., *Mechanism study of cellular uptake and tight junction opening mediated by goblet cell-specific trimethyl chitosan nanoparticles*. Mol Pharm, 2014. **11**(5): p. 1520-32.
84. Wohlers, J., *Barrierestörung der nasalen Mukosa bei Granulomatose mit Polyangiitis (Wegner)*. 2012, CAU Kiel.
85. Cooper, G., *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Development and Cause of Cancer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>.*

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Achter Well Culture Slide a)	7
Abbildung 2: Achter Well Culture Slide b).....	7
Abbildung 3: Foto der RPMI Zellen mit adhärerten und nicht adhärerten Bakterien	8
Abbildung 4: Mediane der Gesamtzellzahl beider Gruppen.....	14
Abbildung 5: Mediane der Zellen mit adhärerten Bakterien beider Gruppen	16
Abbildung 6: Anteil der Zellen mit adhärerten Bakterien beider Gruppen	16
Abbildung 7: Mediane der Gesamtbakterien beider Patientengruppen.....	18
Abbildung 8: Mediane der an Zellen adhärerten Bakterien beider Gruppen	20
Abbildung 9: Anteil an Zellen adhärterer Bakterien beider Gruppen	20
Tabelle 1: Zusammenfassung der numerischen Daten (hellgrau hinterlegt) zu den aggregierten Daten (dunkelgrau hinterlegt)	9
Tabelle 2: Statistik zu den Kontrollansätzen.....	13
Tabelle 3: Deskriptive Auswertung zu der Gesamtzellzahl beider Patientengruppen.....	13
Tabelle 4: Deskriptive Auswertung zu den Zellen mit adhärerten Bakterien beider Patientengruppen.....	15
Tabelle 5: Zusammenhang zwischen Gesamtzellen und bakterienbehafteter Zellen (pro Gesichtsfeld).....	17
Tabelle 6: Deskriptive Auswertung zu der Gesamtbakterienzahl (an Zellen adhärerte und nicht adhärerte Bakterien) beider Patientengruppen	17
Tabelle 7: Deskriptive Auswertung der an Zellen adhärerten Bakterien pro Gesichtsfeld beider Patientengruppen.....	19
Tabelle 8: Zusammenhang zwischen der Gesamtbakterienzahl und der Zahl der an Zellen adhärerten Bakterien.....	21
Tabelle 9: Schwierigkeiten bei der Verwendung primärer nasaler Epithelzellen.....	21-22

Danksagung

Eine Dissertation ist niemals nur die Arbeit einer Person, deshalb möchte ich mich bei allen bedanken, die mir dies ermöglicht haben.

Zuerst möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Petra Ambrosch, Direktorin der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian Albrecht Universität zu Kiel für die Möglichkeit der Dissertation in ihrer Klinik bedanken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt darüber hinaus Herrn PD. Dr. Martin Laudien für die tatkräftige Unterstützung vom Anfang bis zum Ende, die konstruktiven Vorschläge, sein weitergegebenes Wissen und den immer sehr netten Umgang!

Für die Einführung in das experimentelle Arbeiten danke ich Herrn PD. Dr. Tibor Görögh, der allzeit mit viel Tatkraft, guten Ratschlägen und unheimlich viel Erfahrung jede praktische Hürde zu nehmen wusste.

Bei Herrn Prof. Dr. Rainer Podschun und Frau Sylvia Voss bedanke ich mich für die theoretische sowie sehr praktische Hilfe zu allem, was die verwendeten Bakterien und weitere mikrobiologische Fragen betraf.

Vielen Dank auch an Herrn Dipl. Inform. Jürgen Hedderich für die große Hilfe und noch größere Geduld im Hinblick auf die Statistik dieser Arbeit.

Für die Betreuung und die große praktische Hilfe, vor allem am Anfang, möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Hannes Petersen bedanken.

Hervorheben möchte ich zudem meine Freundin und Mitdotorandin Dr. med. Kari Rolfs. Du hast mit mir nicht nur unzählige Stunden im Labor verbracht, sondern mich in allen Bereichen tatkräftig unterstützt! Du hast mich rekrutiert und bis zum Ende begleitet. Du wirst für immer meine Verbündete im Kampf gegen Kontamination, fehlgeschlagene Versuche und den Endgegner „Bakterienzählen“ bleiben.

Danke Eugen, dass du an meiner Seite warst!

Nicht zuletzt möchte ich die wunderbare Unterstützung meiner Eltern, Sylvia und Dr. Dr. Axel Ruhland sowie meine Schwester Naima Ruhland hervorheben, die mich vom Anfang bis zum Ende unterstützt und motiviert haben!

Akademischer Lebenslauf und Veröffentlichungen

Persönliche Angaben:

Name: Charis Letkemann, geb. Ruhland

Geburtstag: 12.09.1989

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung:

01/2017-heute Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik 2 des SLK .
Klinikums am Gesundbrunnen, Heilbronn

06/2016 Approbation als Ärztin

05/2016 Bestandene Ärztliche Prüfung mit der Note gut -2,0-

04/2012-05/2016: klinischer Studienabschnitt Humanmedizin an der
Christian-Albrecht-Universität zu Kiel

05/2015-04/2016: Praktisches Jahr

09/2009-03/2012: vorklinischer Studienabschnitt Humanmedizin an der .
Philipps Universität Marburg

08/2000-06/2009: Städtisches Gymnasium Wermelskirchen

1996-2000: Gemeinschaftsgrundschule Tente

Dissertation:

Experimentelle Doktorarbeit in der Klinik für Hals- Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian Albrecht Universität zu Kiel

„Adhäsionsverhalten von *Staphylokokkus aureus* Stämmen von Patienten mit Chronischer Rhinosinusitis und Normalkontrollen an einer immortalen nasalen Epithelzelllinie“

Veröffentlichung:

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:10.3205/15hnod62

2