

Aus dem Institut für Physiologie, physiologische Chemie
und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
angefertigt in der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde der
Universitätsklinik Ulm
(Mentor: Univ.-Prof. Dr. med. Herbert Riechelmann)

Vorstand: Univ.-Professor Dr. M. Stangassinger

Angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

**Untersuchungen zur mikrobiellen Besiedlung
der Nasenhöhle von Patienten mit
chronischer Rhinosinusitis unter besonderer
Berücksichtigung von *Staphylococcus aureus*
und *Staphylococcus aureus* Small Colony
Varianten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Andrea Niederführ

aus Schwäbisch Gmünd

Ulm 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
1. Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Göbel
1. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Straubinger
2. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Köstlin
3. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Korbelt
4. Korreferent:	Prof. Dr. El-Matbouli

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

Meiner Familie

***Phantasie ist wichtiger als Wissen,
denn Wissen ist begrenzt.***

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	10
2.1 Materialliste.....	10
2.2 Zusammensetzung selbst hergestellter Medien.....	16
2.3 Patientenrekrutierung	18
2.4 Probengewinnung.....	18
2.5 Bakterienkultur.....	19
2.5.1 Spikingkontrolle zum Nachweis von SASCV	19
2.5.2 Bakterienkultur aus Biopsieproben.....	20
2.5.3 Bakterienkultur aus der nasalen Lavage.....	20
2.5.4 Identifizierung der Bakterienspezies.....	20
2.6 Sa-spezifische Real-time PCR	22
2.7 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).....	23
2.8 Nachweis von intrazellulärem Sa in humanen Zelllinien.....	26
2.9 Proteinbestimmungen in Zellkulturüberständen	29
2.10 Genexpressionsanalysen mittels Microarray.....	31
2.11 Bestimmung nasaler Zytokinmuster.....	33
2.12 Statistische Auswertung	33
3. Ergebnisse	34
3.1 Patientenpopulation.....	34
3.2 Bakterienkulturen	35
3.2.1 Bakterienkultur aus den Biopsien	35
3.2.2 Bakterienkulturen aus nasalen Lavagen.....	38
3.2.3 Detaildarstellung der Kulturergebnisse von Sa und SASCV	41
3.3 Sa-spezifische Real-time PCR	42
3.4 FISH	43
3.4.1 Ergebnisse der Vorversuche.....	43
3.4.2 Ergebnisse der FISH mit Patientenproben	46
3.5 Nachweis von intrazellulärem Sa in humanen Zellen.....	46
3.5.1 Lyse der Zellen.....	46

3.5.2 Viabilität der Bakterien nach Lysebehandlung der Zellen.....	47
3.5.3 Bestimmung des geeigneten SCV-Bakterienstammes	47
3.5.4 Wachstum von BEAS-2B Zellen	47
3.5.5 Internalisierung in MM6 Zellen	48
3.5.6 Internalisierung in B2B Zellen.....	50
3.6 Proteinbestimmungen.....	51
3.6.1 MM6 Zellen.....	52
3.6.2 B2B Zellen	56
3.7 Genexpressionsanalysen.....	60
3.8 Zytokinmuster in nasalen Lavagen	63
4. Diskussion	65
4.1 Patientenpopulation.....	66
4.2 Probengewinnung.....	67
4.3 Die chronische Rhinosinusitis - eine bakteriell bedingte Erkrankung?	68
4.4 Die Bedeutung von Staphylococcus aureus bei der CRS.....	69
4.5 Nachweismethoden für Sa.....	71
4.6 Die Bedeutung von SASCV bei der CRS	74
4.7 Untersuchungen zur Internalisierung von Sa	74
4.8 Untersuchungen zur immunologischen Bedeutung von Sa.....	77
5. Zusammenfassung.....	85
6. Abstract	87
7. Publikationen.....	89
8. Danksagung.....	90
9. Literatur.....	91

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika
AG	Antigen
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
B2B	Beas-2B Zellen
BHI	Brain-Heart-Infusion (Hirn-Herz-Bouillon)
bp	Basenpaare
Bzw.	beziehungsweise
CF	Zystische Fibrose
cm	Zentimeter
CRS	Chronische Rhinosinusitis
CRSNP ⁺	Chronische Rhinosinusitis mit nasalen Polypen
CRSNP ⁻	Chronische Rhinosinusitis ohne nasale Polypen
CT-NNH	Computertomographie der Nasennebenhöhlen
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol- dihydrochlorid
ECP	Eosinophilic cationic protein = eosinophiles kationisches Protein
evt.	eventuell
FCS	Fetales Kälber Serum (Fetal calf serum)
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FnBP	Fibronectinbindungsprotein
G-CSF	Granulozyten Koloniestimulierender Faktor
h	Stunden
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KBE	Kolonie bildende Einheiten
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
Min	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter

MM6	MonoMac6 Zellen
MOI	Infektionsdosis (Multiplicity of infection)
NaCl	Sterile physiologische Kochsalzlösung (0.9 %)
NNH	Nasennebenhöhlen
NSAID	Nichtsteroidale Antiphlogistika (non steroidal antiinflammatory drug)
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
o.g.	Oben genannten
OP	Operation
OT	Objektträger
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNA	„Peptide nucleic acid“ Sonden
Prot.K	Proteinase K
rpm	„rounds per minute“ = g
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAG	Superantigene
Sa-R	<i>Staphylococcus aureus</i> , Isolat aus Patient R, Elternstamm von SCV-R
SASAG	<i>Staphylococcus aureus</i> positiv für Enterotoxin C
SASCV	<i>Staphylococcus aureus</i> Small Colony Variant
SCV-R	<i>Staphylococcus aureus</i> Small Colony Variant, Isolat aus Patient R
sek	Sekunden
S.epi	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
sh.	siehe
SH	Schleimhaut
spp.	Spezies
SXT	Trimethoprim-Sulfamethoxazol
TGF	Transforming growth factor; transformierender Wachstumsfaktor
T _H 1/T _H 2	T-Helferzellen Typ 1 bzw. 2
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TSB	Tryptase-Soja-Bouillon
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Die chronische Rhinosinusitis (CRS) ist eine häufig vorkommende Erkrankung die bei 5-15 % der Bevölkerung westlicher Industrienationen auftritt. Es handelt sich um eine symptomatische Entzündung der Schleimhaut von Nase und Nasennebenhöhlen von mehr als 12 Wochen Dauer. Zwei bis fünf Prozent der Bevölkerung leiden an CRS mit nasalen Polypen (CRSNP⁺)⁽¹⁾, einer der zwei Unterformen der CRS. Nasenpolypen erscheinen als traubenähnliche Strukturen in der Nasenhöhle die aus lockerem Bindegewebe, ödematöser Schleimhaut (SH) und Entzündungszellen bestehen. Sie gehen vom ostiomeatalen Komplex (Infundibulum ethmoidale) aus, einer funktionellen Einheit der Ostien der Kieferhöhle, der Stirnhöhle und der vorderen Ethmoidalzellen im Hiatus semilunaris. Dieser spielt eine wichtige Rolle bei der Ventilation und Drainage der Nasennebenhöhlen (NNH). Häufiger ist die CRS ohne Ausbildung von Nasenpolypen (CRSNP⁻).

Bei der klinischen Untersuchung zeigt das endoskopische Bild Polypen oder entzündete, ödematös geschwollene Schleimhäute. Die Graduierung von Polypen erfolgt über die endoskopische Untersuchung. Hierbei bewertet man die Polypen nach dem Punktesystem von Malm⁽²⁾: Grad null bedeutet keine sichtbaren Polypen, Grad eins bedeutet Polypen, die nicht über die mittlere Nasenmuschel herausragen und nur mittels Endoskop sichtbar sind, Grad zwei steht für Polypen, die über die mittlere Nasenmuschel herausragen und bereits bei der Betrachtung mittels Nasenspekulum erkennbar sind. Polypen, die die gesamte Nasenhöhle ausfüllen, gehören dem Grad drei an. In der Computertomographie der Nasennebenhöhlen (CT-NNH) werden Veränderungen in Form von Verschattungen sichtbar, deren Ausdehnung mit dem sogenannten Lund und Mackay Punktwert beurteilt wird. Beim modifizierten Lund und Mackay Punktesystem wie es von Weschta und Mitarbeitern⁽³⁾ beschrieben wurde, werden fünf anatomische Regionen je Nasenseite von null bis vier bepunktet. Ein Punktwert von null bedeutet keinerlei Verschattung während ein Punktwert von vier völlig verschattete NNH mit keinerlei Luftgehalt bedeutet.

Für die Patienten stellt die CRS eine wesentliche Beeinträchtigung der Lebensqualität dar, da sie ständig unter Symptomen wie Druck im Gesicht, laufender Nase oder vermindertem Geruchssinn leiden. Die direkten und indirekten Gesundheitskosten die durch die CRS entstehen sind erheblich. So ergab eine Studie in den USA eine Summe von 5,8 Billionen Dollar für die direkten Kosten, die sich aus Arztbesuchen und Behandlungskosten

zusammensetzen. Hinzu kommen indirekte Kosten die durch die Abwesenheit am Arbeitsplatz entstehen⁽⁴⁾. Die Standardtherapie der CRS besteht initial aus der Gabe eines Breitspektrumantibiotikums (AB) sowie systemischen oder intranasalen Steroiden. Bei Versagen der konservativen Therapie ist meist ein operativer Eingriff notwendig⁽⁵⁾.

Die Ätiologie der CRS ist unbekannt⁽¹⁾. Man geht davon aus, dass diese Erkrankung multifaktoriell bedingt ist⁽⁶⁾. Neben einer genetischen Disposition werden insbesondere drei ätiologische Faktoren diskutiert: a) Systemische Wirtsfaktoren wie z.B. Allergie, Immunstörung oder mukoziliare Dysfunktion b) Lokal nasale Anomalien wie sehr häufige anatomische oder sehr seltene neoplastische Veränderungen und c) Infektionen mit Mikroorganismen und andere Umweltfaktoren, wie z.B. chemische Noxen oder Medikamentenanwendung⁽⁷⁾. Die CRS ist häufig mit weiteren Erkrankungen vergesellschaftet. Dies gilt für die Atopie und die CRSNP⁻. Außerdem treten Asthma und Analgetikaintoleranzsyndrom gehäuft bei einer CRSNP⁺ auf⁽⁸⁾. Pathophysiologisch ist die CRSNP⁻ eine T_H1 dominierte Entzündung. In der entzündeten Schleimhaut findet man mononukleäre Zellen und neutrophile Granulozyten⁽¹⁾. Neben erhöhten Interferon- (IFN) γ Werten spielen auch Interleukin (IL) -8 und IL-3 eine wichtige Rolle bei der CRSNP⁻. IL-8 ist chemotaktisch für neutrophile Granulozyten. IL-3 könnte in die lokalen Abwehr- und Reparaturmechanismen der chronisch entzündeten Sinusmukosa eingebunden sein, da es verschiedene Zellpopulationen unterstützt und indirekt zu Fibrose und dauerhafter Mukosaverdickung führen kann⁽⁹⁾. Die CRSNP⁺ ist eine T_H2 dominierte Entzündung, bei der eosinophile Granulozyten zahlreich im Gewebe vorkommen⁽¹⁾. Gewebe und Nasensekret bei CRSNP⁺ zeigen eine erhöhte IL-5 Konzentration, das für Anlocken, Aktivierung und Überleben der eosinophilen Granulozyten wesentlich ist. Ebenso sind die Immunglobulin (Ig) E- Konzentrationen erhöht und das eosinophile kationische Protein (ECP) tritt als Zellprodukt eosinophiler Granulozyten in erhöhter Konzentration auf.

Es wird vermutet, dass Bakterien eine Rolle bei der CRS spielen, die Datenlage hierzu ist jedoch inkonsistent⁽¹⁾. Brook untersuchte das Keimspektrum der verschiedenen NNH⁽¹⁰⁻¹⁵⁾. Als Proben dienten Aspirate aus den entzündeten Sinus, der Referenzmethode für die Probengewinnung aus dem NNH-System. In diesen Studien fand er häufig anaerobe Keime wie *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp. oder *Propionibacterium* spp., sowohl in Reinkultur als auch in Mischkultur mit aeroben Keimen. Dieses häufige Vorkommen von anaeroben Keimen in entzündeten NNH erklärt sich Brook dadurch, dass die ödematös

verdickte Schleimhaut die Ostien der NNH verschließt und somit die Ventilation und Drainage der Nasennebenhöhlen stört. Es kommt initial zu einer Vermehrung der aeroben Keime, was zu einem erhöhten Sauerstoff (O₂)-Verbrauch führt. Da der Sinus gleichzeitig auch schlechter belüftet wird, entstehen anaerobe Bedingungen und das Milieu wird zunehmend sauer. Anaerobe Keime finden sekundär in diesem Milieu optimale Wachstumsbedingungen und sind deswegen bei chronischen Verlaufsformen häufig nachweisbar. Doyle und Mitarbeiter wiederum konnten bei der Untersuchung von Biopsieproben aus dem Sinus ethmoidalis keine Anaerobier nachweisen⁽¹⁶⁾. Von anderen Autoren werden gramnegative Keime als mögliche Ursache der CRS angesehen, da sie diese Keime gehäuft bei CRS Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisen konnten⁽¹⁷⁻²¹⁾. Diese Autoren machen dafür vorangegangene AB-Behandlungen mit dem daraus resultierenden Selektionsdruck für gramnegative Keime, vorangegangene NNH-Operationen mit unvollständiger Entfernung dieser Bakterien, die Anwendung von Verbandsmaterial oder eine temporär gestörte mukoziliare Funktion für die Besiedlung mit gramnegativen Keimen verantwortlich. Sehr häufig wurden in den einzelnen Studien auch Koagulase-negative Staphylokokken wie *Staphylococcus epidermidis* (S.epi) isoliert^(19;20;22;23). Diese Erreger zählen zwar zur physiologischen Nasenflora, sind jedoch oft durch eine hohe Resistenz gegenüber Antibiotika gekennzeichnet⁽¹⁷⁾.

Bisher wurde keine eindeutige Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den einzelnen Studien gefunden. Einerseits wird beschrieben, dass verschiedene Probenentnahmestellen und -techniken hierzu beitragen könnten. Jiang und Mitarbeiter untersuchten Proben aus dem mittleren Nasengang und der Siebbeinhöhle und konnten einen signifikanten Unterschied im kulturellen Bakteriennachweis feststellen⁽²⁴⁾. Nigro et al.⁽²¹⁾ hingegen berichteten von keinem signifikanten Unterschied zwischen verschiedenen Probenentnahmestellen oder verschiedenen Proben, wie Nasensekret- oder Biopsieproben. Doyle und Mitarbeiter⁽¹⁶⁾ sehen geographische Variationen sowie Unterschiede in sozioökonomischen Gruppen als mögliche Ursache für die Vielzahl unterschiedlicher Ergebnisse. Ebenso könnten nicht beachtete Zahnerkrankungen Einfluss auf das Keimspektrum einzelner NNH haben. Jiang et al.⁽²³⁾ weisen auf den möglichen Einfluss der unterschiedlichen bakteriellen Besiedlung bei verschiedenen Individuen hin, die nicht kontrollierte Einnahme von Antibiotika sowie den nicht einheitlichen Transport der Proben und deren Weiterbearbeitung.

Insbesondere sind Ursachen und Mechanismen der Entstehung von Nasenpolypen bei CRS unbekannt und Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion. Als eine mögliche Ursache für die Ausbildung von Nasenpolypen wird eine Infektion oder Besiedelung mit *Staphylococcus aureus* (Sa) angesehen^(1;25). Bei *Staphylococcus aureus* handelt es sich um ubiquitär vorkommende Bakterien, die die Haut und Schleimhäute von gesunden Menschen und Tieren besiedeln⁽²⁶⁾. Von mehreren Autoren wurde beschrieben, dass Enterotoxine von Sa gehäuft bei CRSNP⁺ Patienten nachgewiesen werden konnten^{(27;28) (7;29)}. Diese wirken oft als Superantigene (SAG), was zu einer unspezifischen T-Zell Aktivierung führen kann. SAG von Sa können bei vorbestehender Disposition zu einer Akzentuierung einer T_H2 Polarisation mit entsprechendem Zytokinprofil (IL-4, IL-5, IL-13) führen und eine polyklonale IgE-Produktion sowie eine eosinophile Entzündung bedingen⁽²⁹⁾. Dies erklärt die Attraktivität von Sa als Erklärungsmodell für die Entstehung von Nasenpolypen, bei denen diese pathophysiologischen Veränderungen typischerweise vorliegen⁽²⁸⁾.

Der Nachweis von Sa erfolgt in der Routinediagnostik durch kulturelle Anzucht auf Blutplatten (CASO-Agar). Nach über-Nacht-Bebrütung wachsen Sa auf diesen Platten meist als goldgelb pigmentierte, hämolysierende Kolonien, welche über einfache Nachweisreaktionen wie die Bildung von Katalase sowie dem Nachweis von Protein A, Kapselpolysacchariden und Clumping factor genauer differenziert werden. Im Grampräparat zeigen sich Sa als homogene, in Haufen liegende grampositive Kokken. Die häufigste Lokalisation, an der dieser Keim isoliert werden kann, ist der Nasenvorhof des Menschen. Im Durchschnitt sind etwa 35 % der Gesamtbevölkerung mit Sa besiedelt. Dabei unterscheidet man drei verschiedene Trägertypen: Persistierende Träger, die meistens nur einen Stamm von Sa tragen (10-30 % der Bevölkerung), intermittierende Träger mit immer wechselnden Stämmen (20-75 % der Bevölkerung) sowie 5-50 % der Bevölkerung, die nie Träger von Sa werden. Es ist nicht bekannt, welche Faktoren diese Unterschiede im Trägertum bedingen⁽³⁰⁾.

Die Literaturangaben zur Häufigkeit von Sa bei CRS-Patienten variieren erheblich⁽⁵⁾. Von Bachert und Mitarbeitern wurde eine höhere Inzidenz von Sa bei CRSNP⁺ Patienten im Vergleich zu CRSNP⁻ Patienten ermittelt⁽²⁹⁾. Liu und Mitarbeiter⁽²⁷⁾ fanden Sa in 94,7 % der Biopsieproben von CRS Patienten mit Asthma in und bei CRS Patienten ohne Asthma in 32 % der Proben. Zhang und Mitarbeiter beschrieben das Vorkommen von Sa bei 63,6 % der CRSNP⁺ Patienten im Vergleich zu 27,3 % der CRSNP⁻ Patienten und 33,3 % der gesunden Kontrollen⁽³¹⁾. Nadel und Mitarbeiter hingegen berichteten von keinem signifikanten

Unterschieden in der Häufigkeit von Sa zwischen CRS Patienten und gesunden Kontrollen⁽²⁰⁾, was von Damm und Mitarbeitern⁽³²⁾ bestätigt wurde. Sie fanden keinen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Sa und der Schwere der CRS.

Sa verursacht als extrazelluläres Pathogen in der Regel akute Infektionen und es ist unklar, wie dieser Keim die Chronizität der CRS erklären könnte. In den vergangenen Jahren hat sich in mehreren Studien gezeigt, dass dieser Keim in vitro auch intrazellulär in nicht-professionellen Phagozyten wie Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten und Keratinozyten vorkommt⁽³³⁾. Intrazellulär kann Sa dem Endosom entweichen und sich dann im Wirtszellzytoplasma vermehren⁽³⁴⁾. Abhängig von der Menge des von Sa gebildeten Exotoxins kommt es nach Internalisierung zur Nekrose oder Apoptose der infizierten Zellen. Eine mögliche Erklärung wie Sa intrazellulär ohne Zerstörung der Wirtszelle überdauert, könnte die Ausbildung sogenannter Small Colony Varianten von *Staphylococcus aureus* (SASCV) sein. Diese natürlich vorkommende Form von Sa ist adaptiert an intrazelluläres Überleben und ruft häufig persistierende Infektionen hervor. Sie besitzen atypische morphologische und biochemische Eigenschaften, welche eine genaue Identifizierung als Sa schwierig machen. Morphologisch zeigen sie durch verlangsamtes und vermindertes Wachstum eine Koloniegröße, die etwa einem Zehntel der Größe des normalen Sa entspricht (siehe Abbildung 1). Des Weiteren sind die Kolonien häufig nur wenig pigmentiert und zeigen verminderte Hämolyse und Koagulaseaktivität. Kommerzielle Nachweistests für Sa wie z.B. der Nachweis von Katalase oder der Nachweis von Protein A, Clumping-Factor und Kapselpolysacchariden im Slide-Test bzw. der Tube-Koagulase-Test fallen bei SASCV häufig verzögert positiv oder negativ aus. Es ist deshalb denkbar, dass sich auf Grund dieser Gegebenheiten SASCV dem Nachweis bei Patienten mit CRS bisher entzogen haben, weil die üblichen Bebrütungsbedingungen in mikrobiologischen Untersuchungslaboratorien den Nachweis von SASCV nicht oder nur bedingt zulassen. In der Gramfärbung zeigen sich SASCV als pleomorphe Kokken, die größer sind als der normale Phänotyp. Dieses Phänomen lässt sich durch eine unvollständige Zellteilung erklären⁽³³⁾. Die beste Methode für den Nachweis ist die Kultur der Proben auf Columbia-Blutagar und Sa-ID-Agar. Winzige, unpigmentierte Kolonien die nach 24 bis 78 h Wachstum auftreten sind verdächtig für SASCV und erfordern eine weitere Differenzierung über Gram-Präparate, biochemische Tests sowie ggf. den Nachweis des speziesspezifischen *nuc*- oder *coa*-Gens oder durch Sequenzierung der 16S-rDNA⁽³³⁾.

Abbildung 1 Sa normaler Phänotyp im Vergleich zum SCV-Phänotyp

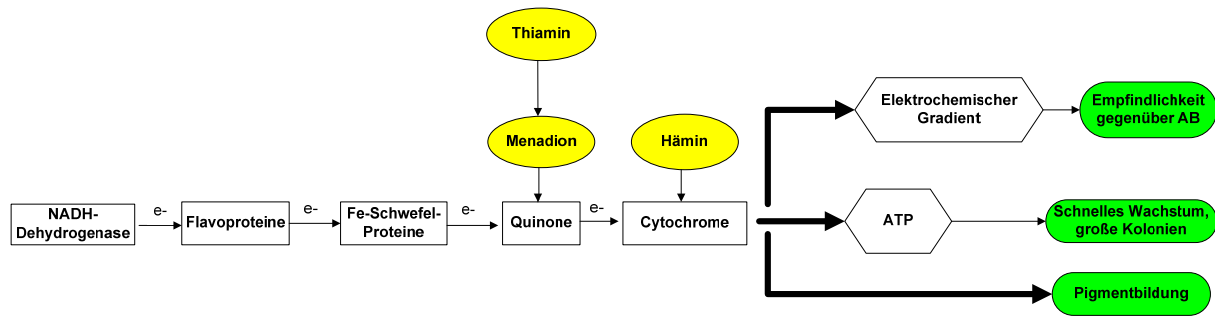
Sa-R normaler Phänotyp

SCV-R

Die Abbildung zeigt eine über-Nacht-Kultur von Sa-R mit dem normalen Phänotyp (linke Seite) und SCV-R (rechte Seite) auf Columbia-Agar. Sa-R und SCV-R sind Patientenisolat eines zystische Fibrose-Patienten, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Kahl, Universität Münster (Foto: Andrea Niederführ).

Man unterscheidet zwei Gruppen von SASCV: Zum einen solche mit Defekten im Elektronentransport, welche einen Auxotrophismus für Menadion, Hämin oder Thiamin aufweisen, und zum anderen solche, die Defekte in der Thymidinbiosynthese aufweisen und somit thymidinauxotroph sind. Durch den Auxotrophismus bei elektronentransportdefizienten SASCV lassen sich einige der atypischen Eigenschaften erklären: Durch Mangel an Menadion, Hämin oder Thiamin kommt es zu einem verminderten Elektronentransport in der Atmungskette der Bakterien. Es wird zum einen vermindert ATP gebildet, was das langsame und geringe Wachstum bedingt und zum anderen kommt es durch verminderte Karotinoidsynthese zur verminderten Pigmentbildung. Auf Grund des verminderten elektrochemischen Gradienten können Antibiotika (AB) wie die Aminoglykoside, die zur Aufnahme in die Bakterienzelle einen solchen Gradienten benötigen, schlechter aufgenommen werden und verlieren so an Wirkung (siehe Abbildung 2). Durch das verlangsamte Wachstum ergibt sich auch eine verminderte Wirkung von zellwandaktiven AB wie den β -Lactamantibiotika⁽³³⁾.

Abbildung 2: Übersicht über die Atmungskette von Bakterien



e⁻= Elektronen Fe= Eisen ATP= Adenosintriphosphat NADH= Nicotinamid-Adenin Dinucleotid
 Bei der Atmungskette werden Elektronen zwischen Elektronendonoren und Elektronenakzeptoren weiter gegeben. Hierbei wird ATP synthetisiert und es entsteht gleichzeitig ein elektrochemischer Gradient. Die Energie in Form von ATP wird zur Carotinoidsynthese und zum Wachstum des Bakteriums benötigt.

Thymidinauxotrophe SASCV treten vor allem bei Patienten nach Langzeitgabe von Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT) auf, z.B. bei Patienten mit zystischer Fibrose (CF). Thymidin ist essentiell für die Synthese der DNA. Die thymidinabhängigen SASCV nehmen extrazelluläres Thymidin auf, welches aus toten Zellen, die sich in den Sekreten von CF-Patienten befinden, mit Hilfe einer bakteriellen DNase freigesetzt wird. Bei den thymidinauxotrophen SASCV unterscheidet man zwei Koloniearten: die Nadelspitzen-Form, welche durch eine winzige Koloniegröße gekennzeichnet ist, sowie die Spiegelei-Form mit durchsichtigen Rändern um ein kleines pigmentiertes Zentrum⁽³³⁾.

SASCV sind adaptiert an das intrazelluläre Überleben und können so, geschützt vor dem Immunsystem und den meisten Antibiotika, persistierende und rezidivierende Infektionen hervorrufen. Die Aufnahme in die Wirtszellen erfolgt über Fibronectinbindungsproteine (FnBP), welche bei dem SCV-Phänotyp vermehrt exprimiert werden. Das intrazelluläre Persistieren wird dadurch begünstigt, dass bei SASCV die Bildung von α -Toxin und Toxischer Schock- Syndrom Toxin vermindert ist⁽³⁵⁻³⁷⁾. Außerdem stellten Schröder und Mitarbeiter fest, dass einige SASCV Stämme in Phagosomen überleben konnten⁽³⁸⁾. SASCV sind häufig instabil und können sich in den normalen Phänotyp zurück wandeln, wenn die Immunantwort des Wirtes abgeklungen ist oder wenn die Antibiotikatherapie beendet wurde⁽³⁷⁾.

Besonders häufig findet man SASCV bei Patienten mit zystischer Fibrose und Osteomyelitis. Es wurden auch schon einzelne Fälle von SASCV-Infektionen bei Implantaten wie Herzschrittmachern⁽³³⁾ berichtet und bei einem Patienten mit Hirnabszess⁽³⁹⁾. Ein

Zusammenhang zwischen dem Auftreten von SASCV und der Gabe von Antibiotika konnte bisher nicht festgestellt werden, da SASCV zwar häufig bei Patienten die AB erhalten haben auftraten, aber andererseits auch bei Patienten die sich keiner AB-Therapie unterzogen hatten. Clement und Mitarbeiter⁽³⁰⁾ beschrieben das intrazelluläre Vorkommen von Sa bei Patienten mit rezidivierender Rhinosinusitis. Sie diagnostizierten die intrazelluläre Lokalisation mittels inverser konfokaler Laser-Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie in intranasalen Biopsie-proben. Plouin-Gaudon et al.⁽⁴⁰⁾ untersuchten ebenfalls die Prävalenz von intrazellulärem Sa in der Nasenschleimhaut von CRS-Patienten und fanden intrazellulär vorkommende Sa mittels Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie. Beide Autoren ziehen als eine mögliche Erklärung für die intrazelluläre Persistenz von Sa die Ausbildung von Small Colony Varianten in Betracht. Möglicherweise werden intrazelluläre Sa aber auch durch Antibiotika induziert⁽²⁹⁾. Ein Nachweis der Small Colony Variante von Sa bei der chronischen Rhinosinusitis wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Insgesamt ist die gegenwärtige Datenlage zur Bedeutung von Mikroorganismen bei der CRS nach wie vor unübersichtlich. Die mögliche Bedeutung aktueller Forschungsentwicklungen über die Rolle von Sa und SASCV ist aufgrund der spärlichen Datenlage nicht abzuschätzen. Es ist auch unklar, ob und welche pathophysiologischen Veränderungen speziell durch Sa bei der CRS und insbesondere bei Zellen des Immunsystems und der Atemwege induziert werden. Es sollte deswegen versucht werden, die Datenlage zu diesen offenen Fragen zu ergänzen.

Im Einzelnen wurden mit dieser Arbeit folgende Ziele verfolgt:

1. Das aerobe und anaerobe Keimspektrum der Nasenhöhle von CRS Patienten sollte untersucht werden und mit dem Keimspektrum von Kontrollpatienten ohne CRS verglichen werden.
2. Die Prävalenz von Sa und SASCV bei Patienten mit CRSNP⁺ und CRSNP⁻ im Vergleich zu gesunden Kontrollen sollte untersucht werden. Hierzu sollten optimale Bebrütungsbedingungen für SASCV angewandt und weitere Nachweismethoden wie Real-time PCR an Schleimhautbiopsien sowie Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Paraffingewebsschnitten durchgeführt werden. Mit diesen zusätzlichen Methoden sollte zum einen die Sensitivität für den Nachweis von Sa und SASCV gesteigert werden, zum anderen

sollte überprüft werden, ob moderne molekularbiologische Verfahren einen sensitiveren und schnelleren Nachweis dieser Keime ermöglichen.

3. Auswirkungen des Sa und SASCV-Nachweises auf nasale immunologische Parameter sollten erfasst werden. Hierzu sollte das nasale Zytokinmuster erhoben werden und explorativ mögliche Unterschiede der Genexpression bei CRSNP⁺ Patienten mit Sa-Nachweis und mit SASCV-Nachweis untersucht werden.

4. Wie eine Infektion mit Sa bzw. SASCV zelluläre Reaktionen auf Proteinebene beeinflusst und ob Unterschiede zwischen Sa und SACV in der induzierten Zellantwort bestehen, wurde zusätzlich an humanen monozytären MonoMac-6 Zellen (MM6) und an humanen Atemwegsepithelzellen der Zelllinie BEAS-2B (B2B) untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Materialliste

Verbrauchsmaterialien

Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Bad Homburg, Deutschland
Anaer indicator	bioMérieux	Nürtingen, Deutschland
BD Falcon™ Probenbecher 110 ml	Becton Dickinson Labware	Meylan Cedex, Frankreich
Biosphere® Filter Tips 100 µl, 1000 µl	Fa. Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
Chirurgische Einmalskalpelle	BRAUN Aesculap AG&CoKG	Tuttlingen, Deutschland
Dulbecco`s PBS 1x without Ca&Mg	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Falcon® Blue Max™, 50 ml	Becton Dickinson Labware	Meylan Cedex, Frankreich
Falcon® Blue Max™ Jr. 15 ml	Becton Dickinson Labware	Meylan Cedex, Frankreich
GenBox anaer	bioMérieux	Nürtingen, Deutschland
Impfshlingen blau 10 µl	Fa. Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
Impfshlingen weiss 1 µl	Fa. Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	Braun	Melsungen, Deutschland
Menzel-Gläser®, geschnitten, Mattrand	Menzel GmbH+CoKG	Braunschweig, Deutschland
Mikropistillen	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Objektträger, Kanten geschnitten ohne Mattrand	Paul Marienfeld GmbH+CoKG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Petrischale	Fa. Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
Pipette Pasteur Grad., steril	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Simport (Aufbewahrung Cryotube)	MAST Diagnostika	Reinfeld, Deutschland
VIABANK	Abtek Biologicals Ltd	Liverpool, England

Geräte und Software

Aerospray 7320	Wescor	Logan, USA
Anaerobiertopf 2,5 l	Merck	Darmstadt, Deutschland
Biocap TM RNA/DNA	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5417	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
GenePix 4000 B	Axon Instruments	Foster City, USA
Gene Pix pro 4.1 TM Software	Axon Instruments	Foster City, USA
Heraeus Brutschrank BBD 6220	Heraeus Holding	Hanau, Deutschland
Heraeus (Kendro) Function Line	Heraeus Holding	Hanau, Deutschland
Herasafe HSP 12	Heraeus Holding	Hanau, Deutschland
Hybaid Mini 10	MWG-Biotech	Ebersberg, München
Hybridisierungskammer	Operon	Köln, Deutschland
IKA® RET basic	IKA® Werke GmbH und CoKG	Staufen, Deutschland
Küvetten 10x4x45 mm	Fa. Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
LightCycler® 2nd generation	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
LightCycler Software Version 5.32	Roche Diagnostics	Mannheim Deutschland
Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding	Hanau, Deutschland
Mikroskop BX 40	Fa. Olympus	Hamburg, Deutschland
Multi-well Filter Plate Vacuum Manifold	Pall GmbH	Dreieich, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand	Wertheim, Deutschland
Pharmacia LKB Ultrospec III	Pharmacia LKB Biochrom	Cambridge, England
Pipetboy plus	Technomara Integra Biosciences	Wallisellen, Schweiz
Pipetten	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
SmartSpec TM 3000 Photometer	Bio-Rad	München, Deutschland
Tb1 Thermoblock	Biometra	Göttingen, Deutschland
Thermocycler	Biometra	Göttingen, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex RK100H	Fa. Bandelin	Berlin, Deutschland
UV-Lampe 4W, 366nm	Merck	Darmstadt, Deutschland
Varifuge 3.0 R	Heraeus Holding	Hanau, Deutschland
Vortex-Genie 2 TM	Scientific Industries	New York, USA

Zeiss Axioplan II Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Göttingen, Deutschland
---	-------	------------------------

Bakterienkultur

Nährböden

CASO-Blutagar Tryptic Soy BAP	Heipha Dr.Müller GmbH	Eppelheim, Deutschland
Columbia Blutagar	Heipha Dr.Müller GmbH	Eppelheim, Deutschland
Enterokokkenplatte	Heipha Dr.Müller GmbH	Eppelheim, Deutschland
MacConkey Agar	Heipha Dr.Müller GmbH	Eppelheim, Deutschland
Mueller-Hinton-Agar	Heipha Dr.Müller GmbH	Eppelheim, Deutschland
SAID <i>S.aureus</i> ID Agar	bioMérieux	Nürtingen, Deutschland
Schaedler Blutagar	Heipha Dr.Müller GmbH	Eppelheim, Deutschland
Schädler KV Agar + Lysed horse blood + Haemin + Vit. K	Heipha Dr.Müller GmbH	Eppelheim, Deutschland
Schokoladenagar mit Isovit. und Bacitracin	Heipha Dr.Müller GmbH	Eppelheim, Deutschland
SGC2-Agar	bioMérieux	Nürtingen, Deutschland

Differenzierungsreagenzien

Api 20 A	bioMérieux	Nürtingen, Deutschland
Api 20 E	bioMérieux	Nürtingen, Deutschland
Api 20 NE	bioMérieux	Nürtingen, Deutschland
Api Coryne	bioMérieux	Nürtingen, Deutschland
Api ID 32 Staph	bioMérieux	Nürtingen, Deutschland
BBL® DrySlide™ Oxidase Testkit	Krackeler Scientific, Inc.	New York, USA
Katalase-Reagenz	Eigene Herstellung	30%iges Perhydrol 1:10 verdünnt in sterilem A.d.
Opotchin-Scheiben	Oxoid Limited	Hampshire, England
Pastorex® Staph-Plus	Bio-Rad	München, Deutschland
Rapid ID 32A	bioMérieux	Nürtingen, Deutschland
Streptex	Remel Europe	Dartford Kent, England
SV78 Plasma Coagulase (EDTA) (Tube-Koagulase)	Mast Diagnostika GmbH	Reinfeld, Deutschland

PCR

Ethanol absolut puriss.	Riedel-de-Haen	Seelze Deutschland
LightCycler® Capillaries (20µl)	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
LightCycler® Centrifuge Adapters	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
LightCycler®FastStart DNA Master ^{Plus} HybProbe	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
Lysozym	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
Mutanolysin from <i>Streptomyces globisporus</i> ATCC 21553	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Primer Sa442-F, Sa442-R, nuc274F, nuc274R	TibMolBiol	Berlin, Deutschland
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
Sonden Sa442-HP-1, Sa442-HP-2, nuc274FL, nuc 274705	TibMolBiol	Berlin Deutschland

Bakterien

Sa ATCC 29213	Normaler Phänotyp	Positivkontrolle PCR, Amme für Hämophilus, z.T. Zellversuche
Sa RN6390	Normaler Phänotyp	Zellversuche
Sa-R	Normaler Phänotyp, Elternstamm zu SCV-R, Patientenisolat Münster	Zellversuche
SCV-1	SCV-Phänotyp	Isolat eines CF-Patienten (41)
SCV-R	SCV-Phänotyp, Patientenisolat Münster	Zellversuche, Positivkontrolle FISH
S.epi ATCC 12228		Negativkontrolle FISH, Zellversuche

Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Deckgläser	Thermo Life Sciences	Dreieich, Deutschland
0,5M EDTA	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99,8%		

EUB DNA Sonde ⁽⁴²⁾	Thermo Life Sciences	Dreieich, Deutschland
Formamid zur Analyse	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Gene Frame®	Thermo Life Sciences	Dreieich, Deutschland
Methanol	Fluka	Buchs, Schweiz
5M NaCl	Appllichem	Darmstadt, Deutschland
Proteinase K from <i>Tritirachium album</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Sa-DNA Sonde	Thermo Life Sciences	Dreieich, Deutschland
<i>S. aureus</i> PNA FISH™	AdvanDx	Woburn, USA
Sodium Dodecyl Sulfat for microbiology 10%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
SuperFrost® Plus	Menzel GmbH&CoKg	Braunschweig, Deutschland
VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Verschussfolie Parafilm® M, Brand	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Tris HCl	Fa. Usb	Bad Homburg, Deutschland
Xylene	J.T. Baker	Deventer, Holland

Zellkultur

Acrodisc® Syringe Filters with Supor® Membrane	Pall Gelman Laboratory	Dreieich, Deutschland
BBL™ Brain Heart Infusion	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg Deutschland
BD Plastipak™ Sterile Syringe 1ml	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Cell Scraper	Nunc™ Brand Products	Naperville, USA
Costar® Stripette 25ml, 10ml, 5ml	Corning Incorporated	New York, USA
CryoTube™ Vials	Nunc™ Brand Products	Naperville, USA
Dimethyl Sulphoxide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Biotechnology performance certified (DMSO)		

DMEM/Ham`s F12 without L-Glutamine	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Foetal Bovine Serum	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Gentamycin 50 mg/ml	Gibco Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Glasschrott 3 mm	Fa. Scherf	Deutschland
Insulin Solution from bovine pancreas cell culture tested, sterile filtered (10 mg/ml Insulin in 25 mM HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
L-Glutamine (200 mM) LE	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Lystostaphin aseptically filled	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10000 E/10000 µg/ml)	Biochrom AG	Berlin, Detuschland
QIAshredder™ (50)	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNeasy® MiniKit	Qiagen	Hilden, Deutschland
RPMI, 1640 1x, -L-Glutamine	Gibco Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 AA Mix (50x)	PromoCell®	Heidelberg, Deutschland
Sodium dodecyl sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Sodium Pyruvate (100 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Sterican 27G	Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
TrypanBlue Solution (0,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA Solution 0,05 % / 0,02 % (w/v) in PBS	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Tryptone Soya Broth	Fa. Oxoid	Wesel, Deutschland
6-Well Platten	Nunclon™Brand Products	Roskilde, Dänemark
Zellkulturflaschen 25cm ² , 80cm ²	Nunclon™Brand Products	Roskilde, Dänemark

FACS-Untersuchungen

BD FACSFlo TM	Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
BD FACScan Flow Zytometer	Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Calibrite Beads	Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
human T _H 1/T _H 2 11plex flow cytometry kit	Bender MedSystems	Wien, Österreich
Quantikine® Immunoassay-Kit	R&D Systems	Wiesbaden, Deutschland
Sample acquisition tubes	Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
UniCAP 100 Fluoreszenz Enzym-Immunoassays	Phadia	Freiburg, Deutschland

Microarray- Untersuchungen

3DNA Array 350 Kit TM	Genisphere	Hatfield USA
Bovines Serumalbumin	Ambion	Texas, USA
Fast Prep FP 120	MP Biomedicals	Eschwege, Deutschland
LifterSlip	Eric Scientific Company	Portsmouth, USA
Lysing Matrix D tubes	QBIogene	Heidelberg, Deutschland
Millipore Microcon YM-30 Centrifugal Filter Devices TM	Millipore	Billerica, USA
Oligonukleotide	Operon Biotechnologies	Köln, Deutschland
Reverse Transkriptase Superscript-2	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
RNAlater®	Ambion	Texas, USA
RNeasy TM Mini-Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
Sodium Chloride Sodium Citric Acid (SSC)	Fluka	Buchs, Schweiz
Sodium Dodecyl Sulphat (SDS)	Fluka	Buchs, Schweiz
Ultra Gaps II Objektträger	Corning	Schiphol-Rijk, Holland

2.2 Zusammensetzung selbst hergestellter Medien

Porphyrinreagenz:	167,6 mg Delta-Aminolävulinsäure-HCl
	48,16 mg Magnesiumsulfat
	284,24 ml Phosphatpuffer
	pH 6,9

MIO-Röhrchen:	31 g MIO Medium (3 g Bacto Yeast Extract, 10 g Bacto Peptone, 10 g Bacto Tryptone, 5 g Bacto L-Ornithin Hydrochloride, 1 g Bacto Dextrose, 2 g Bacto Agar, 0,02 g Bacto Brom Cresol Purple) 1 l Aqua demin. Kovács-Reagenz pH= 6,5 ± 0,2
Urease-Röhrchen:	11,25 g Agar Nr1 neutral Oxoid L11 75 g Urea Agar base Lösung (29 g Urea Agar base + 100 ml Aqua demin) 675 ml Aqua demin. pH= 6,8 ± 0,1
Kligler-Röhrchen:	55 g Kligler-Eisen-Agar 1 l Aqua demin. pH= 7,4 ± 0,2
Citrat-Röhrchen:	24,2 g Simmons citrate agar 1 l Aqua demin. pH : 6,8 ± 0,2
Vogues-Proskauer- Röhrchen :	15 g MRVP-Medium 1 l Aqua demin. pH : 7,5 ± 0,1
α-Naphthol-Lösung, 5 %:	5 g α-Naphthol in 100 ml absolutem Äthanol lösen
KOH-Lösung, 40 %:	40 g KOH-Plätzchen in 100 ml Aqua demin

Zusammensetzung der Puffer für die FISH mit DNA-Sonden

Hybridisierungspuffer	Waschpuffer
18 ml 5M NaCl	20,4 ml 5M NaCl
2 ml 1M Tris HCl	10 ml 0,5 M EDTA
30 ml Formamid	20 ml 1M TrisHCL
50 ml Aqua bidest	1 ml 10 % SDS
0,1 ml 10 % SDS	

2.3 Patientenrekrutierung

Alle Patienten, die sich zwischen Mai 2006 und Mai 2007 in der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde der Universitätsklinik Ulm wegen nasaler Beschwerden vorstellten, wurden konsekutiv überprüft, ob sie in diese Untersuchung eingeschlossen werden konnten. Eingeschlossen wurden Patienten mit CRS zwischen 18 und 70 Jahren. Die Diagnose CRS erfolgte nach den Kriterien der Europäischen Akademie für Allergie und klinische Immunologie⁽¹⁾: Entzündung der Schleimhaut von Nase und Nasennebenhöhlen mit einer Erkrankungsdauer von mehr als 12 Wochen, klinische Symptome wie nasale Obstruktion, Hypersekretion, Mittelgesichtsdruck oder Hyposmie sowie gleichzeitig entweder endoskopische Befunde wie Polypen oder mukopurulente Sekrete im mittleren Nasengang oder entzündungstypische CT-Veränderungen in Form von Verschattungen der NNH. Patienten mit CRS mussten für den Studieneinschluss eine modifizierte Lund und Mackay CT-Punktzahl von mindestens 15 aufweisen⁽³⁾. Patienten mit bilateralen nasalen Polypen und einem Malm-Punketwert⁽²⁾ von mindestens drei wurden als CRSNP⁺ Patienten klassifiziert. Patienten mit einem Malm-Score von null (endoskopisch keine sichtbaren Polypen) wurden als CRSNP⁻ gruppiert. CRS Patienten, die eine Malm-Punktezahl von eins oder zwei aufwiesen, wurden nicht eingeschlossen, da bei ihnen der CRS-Subtyp nicht eindeutig festgelegt werden konnte. Zu einem Ausschluss der Patienten führte eine Behandlung mit Antibiotika innerhalb der letzten vier Wochen, akute Exazerbation der Symptome, vorangegangene Immuntherapie oder Aspirin-Desensibilisierung, zystische Fibrose oder einseitige NNH-Erkrankungen. Schwangere und stillende Frauen wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Als zusätzliche Parameter wurden unter anderem der Atopiestatus ermittelt, welcher durch einen positiven Haut-Prick-Test auf häufige Inhalationsallergene nachgewiesen wurde, anamnestisch ermittelte oder klinisch diagnostizierte Analgetika-Intoleranz sowie Bronchialasthma. Als Kontrollpatienten wurden Patienten mit Strukturanomalien der Nase ohne anamnestischen oder klinischen Hinweis auf Nasennebenhöhlenentzündung eingeschlossen. Die Studie wurde genehmigt von der Ethikkommission der Universität Ulm (Nr. 243/2005).

2.4 Probengewinnung

Als Probenmaterial dienten eine nasale Lavage (Nasenspülprobe) und Nasenschleimhautbiopsien aus dem vorderen Ethmoid (CRS Patienten) bzw. von der unteren Nasenmuschel in der Nähe des mittleren Nasenganges (Kontrollpatienten). Die nasale Lavage wurde

präoperativ entnommen. Zur Entnahme wurde der Patient aufgefordert, seinen Kopf um 45° zurückzubeugen. Um ein Abfließen der Spülflüssigkeit zu vermeiden, wurde der Patient aufgefordert den Rachen mit dem Gaumensegel durch bilden von K-Lauten zu schließen. Jede Nasenseite wurde mit jeweils 5 ml isotonischer Kochsalzlösung gespült. Nach zehn Sekunden wurde die Spülflüssigkeit in einem sterilem Plastikgefäß aufgefangen⁽⁴³⁾. Direkt nach der Probenentnahme wurde die nasale Lavage bei +4° C gekühlt. Ein Teil der nasalen Lavage wurde bakteriologisch untersucht, der andere Teil wurde für die spätere Bestimmung nasaler Biomarker bei -20° C eingefroren. Die Biopsieproben wurden nach vorangegangener Desinfektion der Nasenhöhle mittels Ethanol intraoperativ gewonnen, in sterile physiologische Kochsalzlösung (NaCl) überführt und gekühlt. Die mikrobiologische Weiterverarbeitung der Proben erfolgte innerhalb von vier Stunden nach der Probenentnahme. Sofern ausreichend Gewebe gewonnen werden konnte, wurde zusätzlich ein im Durchmesser 5 mm großes Gewebstück in RNAlater® überführt und bei -80° C aufbewahrt.

2.5 Bakterienkultur

2.5.1 Spikingkontrolle zum Nachweis von SASCV

Um sicherzustellen, dass die gewählten Versuchsbedingungen geeignet waren, SASCV in Biopsieproben nachzuweisen, wurde eine Spikingkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde Polypengewebe eines nicht in die Studie eingeschlossenen CRSNP⁺ Patienten in acht erbsengroße (etwa 5x5x5 mm) Stücke zerkleinert und in NaCl gegeben. Für die Infektion wurde der SASCV Stamm SCV-R (Patientenisolat eines CF-Patienten, zur Verfügung gestellt von B. Kahl, Universitätsklinikum Münster) verwendet. Aus einer über-Nacht-Kultur in BHI Bouillon wurde eine Stocklösung mit 10⁸ KBE hergestellt. Diese wurde seriell bis zu einer Verdünnung von 10⁻⁹ in 0,9 % NaCl verdünnt und anschließend das Gewebe mit den Verdünnungen ab der Verdünnung 10⁻² infiziert. Es folgte eine Inkubation für 2 Stunden bei 36° C, 5 % CO₂. Die Verdünnungen wurden ebenso für 2 h bebrütet. Als Negativkontrolle wurde NaCl verwendet. Um die Bakterienzahl in den Verdünnungen vor und nach der Inkubationszeit zu bestimmen, wurden von den Verdünnungen jeweils 100 µl vor sowie 100 µl nach der zweistündigen Bebrütungszeit auf Columbia-Agar ausplattiert. Die Gewebesuspension wurde nach der Bebrütungszeit bei 6800 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und im Doppelansatz auf Columbia-Agar ausplattiert. Es folgte ein einmaliges Waschen des Gewebes mit NaCl. Anschließend wurden 400 µl NaCl zu dem Gewebe gegeben und dieses mechanisch mit Hilfe einer Mikropistille zerkleinert. Anschließend wurden je 200 µl der Suspension auf einem Columbia Agar mittels Drei-Ösen-Ausstrich

aufgetragen. Die Nährböden wurden über Nacht bei 36° C, 5 % CO₂ inkubiert und am nächsten Tag wurden die KBE bestimmt.

2.5.2 Bakterienkultur aus Biopsieproben

Das Gewebe wurde zunächst mittels Einmalskalpell in einer Petrischale in zwei erbsengroße Stücke zerschnitten. Beide ca. 5x5x5 mm großen Gewebstücke wurde jeweils in ein Eppendorfreagenzgefäß mit NaCl überführt und mittels einer Mikropistille mechanisch zerkleinert um mögliche intrazelluläre Keime freizusetzen und um eine gleichmäßig auf alle Nährböden verteilbare Gewebssuspension zu erhalten. Eine der beiden Gewebssuspensionen wurde bei 4° C gekühlt und für die DNA-Isolierung für die PCR verwendet. Die zweite Gewebssuspension wurde mit einer Pasteurpipette aufgenommen und jeweils ein Tropfen davon auf die unten beschriebenen Nährböden aufgetragen (siehe Tabelle 1). Anschließend wurde ein Drei-Ösen-Ausstrich durchgeführt. Biopsieproben der linken und rechten Nasenseite wurden getrennt kultiviert. Die Beurteilung der Platten fand täglich statt.

Tabelle 1: Nährböden und Bebrütungsbedingungen

Nährboden	Bebrütungsdauer	Bebrütungsbedingungen
Columbia Blutagar	5 Tage	37° C, 5 % CO ₂
Schädler Blutagar	5 Tage	37° C, 5 % CO ₂
SAID-Agar	5 Tage	37° C, Raumluft
Schädler Blutagar	5 Tage	37° C, anaerob
Schädler KV-Agar	2 Tage	37° C, anaerob
Kochblutagar	2 Tage	37° C, 5 % CO ₂
MacConkey-Agar	1 Tag	37° C, Raumluft

2.5.3 Bakterienkultur aus der nasalen Lavage

Die nasale Lavage wurde semiquantitativ auf verschiedenen Nährböden angelegt (sh. Tabelle 1 mit Ausnahme von Schädler KV-Agar). Hierzu wurden je Platte auf der einen Hälfte 10 µl der unverdünnten Lavage und auf der anderen Hälfte 10 µl einer 1:100 Verdünnung der Lavage in NaCl mittels Einmalöse aufgetragen. Auf den Columbia-Agar wurde auf beide Hälften jeweils ein Optochinplättchen zur Abgrenzung von Pneumokokken gelegt.

2.5.4 Identifizierung der Bakterienspezies

Zur Identifizierung von *Staphylococcus aureus* dienten mehrere Verfahren. Mit der Katalase-Reaktion gelingt die Unterscheidung von Staphylokokken (bilden Katalase) und Streptokokken sowie Enterokokken (bei beiden keine Katalasebildung). Hierzu wurden eine

bis zwei Kolonien der verdächtigen Keime auf einen Objektträger gestrichen und ein Tropfen Katalasereagenz aufgetropft. Schaumbildung wurde als positiv gewertet. Mit dem *Pastorex®-StaphPlus*-Test werden Sa-spezifische Antigene wie Clumping factor, Protein A und Kapselpolysaccharide nachgewiesen. Dieser Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Röhren-Koagulase dient dem Nachweis der von Sa gebildeten Koagulase. Das Reagenz wurde nach Herstellerangaben suspendiert. Die Durchführung und Auswertung des Tests wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Mittels Gram-Präparat können grampositive von gramnegativen Keimen unterschieden werden, sowie die Form und Größe der Bakterien beurteilt werden. Drei bis vier Kolonien der Bakterien wurden in einem Tropfen Phenol-NaCl auf einem Objektträger aufgetragen, hitzefixiert und anschließend mit einem Färbeautomaten gefärbt. Die Präparate wurden bei 1000-facher Vergrößerung beurteilt.

Die Differenzierung von SASCV erfolgte in mehreren Schritten. Verdächtig für SASCV sind alle winzigen, nicht hämolysierenden und nicht pigmentierten Kolonien, die nach 24-78 h wachsen. Von derartigen Kolonien wurde eine Subkultur auf Columbia-Blutagar angelegt um eine Reinkultur zu erhalten. Am nächsten Tag wurden Gram-Präparate angefertigt, sowie die Keime auf Katalase getestet und der *Pastorex®StaphPlus*-Test durchgeführt. Bei grampositiven Kokken im Gram-Präparat und nicht eindeutigen *Pastorex®StaphPlus*-Test wurde der Röhren-Koagulase Test durchgeführt und das Ergebnis nach vier und nach 24 h abgelesen. Bei erneut zweifelhaftem Ergebnis wurde der Api ID 32 Staph durchgeführt.

Die Differenzierung von *Hämophilus* spp. erfolgte bei Keimen, die verdächtig für *Hämophilus* spp. waren. Es wurde auf einem CASO-Blutagar das Ammenphänomen mit Sa ATCC 29213 untersucht. Zusätzlich wurde für die Differenzierung zwischen *H. influenzae* und *H. parainfluenzae* ein Porphyrinrest durchgeführt, bei dem einige Kolonien einer frischen Subkultur in das Porphyrinreagenz eingerieben wurden und anschließend über Nacht bebrütet wurden. Am nächsten Tag wurde mittels einer UV-Lampe die Fluoreszenz untersucht: Eine weiße Färbung der Suspension sprach für *H. influenzae*, eine rosa Färbung für *H. parainfluenzae*.

Die Differenzierung gramnegativer Keime erfolgte mittels Bunter Reihe: Es wurde zunächst eine Bakteriensuspension in NaCl mit einem MacFarland von 0,5 eingestellt. Aus dieser Bakteriensuspension wurden je Röhren 1 µl der Bakteriensuspension mittels Einmalöse entnommen. Im Kligler-Röhren werden die Glukose- und Laktose-Verwertung sowie die

H₂S-Bildung beurteilt. Die Impföse wurde von unten nach oben zick-zack-förmig auf der Oberfläche des Schrägagars ausgestrichen und danach bis zum Boden des Röhrchens einmal senkrecht eingestochen und wieder herausgezogen. Im Citrat-Röhrchen wird die Citrat-Verwertung, im Urease-Röhrchen der Harnstoffabbau und im MIO-Röhrchen die Motilität, Indolbildung und der Ornithinabbau beurteilt. Die Impföse wurde von unten nach oben zick-zack-förmig auf der Oberfläche des Schrägagars ausgestrichen. Zur Auswertung der Indolbildung im MIO-Röhrchen wurden einige Tropfen Kovács Reagenz zugegeben.

Mit dem Vogues Proskauer-Röhrchen wird die Acetoinbildung untersucht. Die Bakteriensuspension wurde in die Bouillon eingerieben. Nach über-Nacht-Bebrütung wurden zur Bouillon 3 ml 5 % α -Naphthol-Lösung und 1 ml 40 % KOH-Lösung zugegeben.

Zusätzlich erfolgte eine Differenzierung mittels kommerzieller biochemischer Tests: Es wurden folgende Api-Testsysteme eingesetzt: Api Coryne, Rapid ID 32A, Api 20 A, Api 20 NE, Api 20 E, Api ID 32 Staph. Diese Tests wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Differenzierung von β -hämolisierenden Streptokokken wurde der Test Streptex zur Gruppenbestimmung der Streptokokken nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.6 Sa-spezifische Real-time PCR

Bevor die Real-time PCR durchgeführt werden konnte, musste aus den zu untersuchenden Biopsieproben DNA isoliert werden. Hierzu wurde das bereits mechanisch zerkleinerte, bei 4° C in NaCl gelagerte Biopsiestück verwendet. Die DNA-Isolierung wurde innerhalb von zwei Tagen nach der Probenentnahme durchgeführt. Die Gewebesuspension wurde bei 6800 x g für 30 sek zentrifugiert und anschließend die überstehende NaCl abgenommen. Die DNA-Isolierung wurde mit dem QIAamp® DNA Mini Kit nach Angaben des Herstellers mit folgenden Abweichungen durchgeführt: Um die Zellwand der grampositiven Keime zu zerstören wurden 20 μ l Proteinase K, 18 μ l Lysozym und 18 μ l Mutanolysin zu 180 μ l ATL-Puffer gegeben, mit AL-Puffer wurde bei 95° C an Stelle von 70° C inkubiert. Die DNA wurde in 50 μ l AE-Puffer eluiert und bis zur Messung bei -20° C aufbewahrt.

Die PCR wurde in einem LightCycler® der zweiten Generation durchgeführt. Es wurden die kürzlich beschriebenen Primer Sa442-F und Sa442-R für die Sa442-Zielsequenz und *nuc247F* und *nuc247R* für die *nuc*-Gen Zielsequenz verwendet^(44;45). Zur Detektion wurden Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Sonden eingesetzt: Für die Sa442-Zielsequenz die Sonden Sa442-HP-1 und Sa442-HP-2 und für die *nuc*-Gen-Zielsequenz die

Sonden *nuc274FL* und *nuc274705*. Die PCR-Ansätze wurden in einem DNA-freien Kabinett hergestellt. Der PCR-Ansatz der Sa442-PCR bestand aus 6 µl Aqua dest. PCR grade, 4 µl LightCycler®FastStart DNA Master^{Plus} HybProbe Reaktionsmix, 2 µl der jeweiligen Sonde (1,5 µM) sowie 1 µl der beiden Primer (10 pmol/µl). Zu 15 µl dieses PCR-Ansatzes wurden 5 µl DNA gegeben. Bei der *nuc*-PCR bestand der PCR-Ansatz aus 7 µl Aqua dest. PCR grade, 4 µl LightCycler®FastStart DNA Master^{Plus} HybProbe Reaktionsmix, 1 µl von jeder Sonde sowie 1 µl von jedem Primer. Auch hier wurden 5 µl DNA zu 15 ml PCR-Ansatz gegeben.

Das PCR-Messprogramm bestand aus einer initialen zehn-minütigen Denaturierung bei 95° C (Sa442-PCR) bzw. 50° C (*nuc*-PCR) gefolgt von 50 Zyklen sich wiederholender Denaturierung (Sa442: 0 s bei 95° C, *nuc*: 10 s bei 95° C), Anlagerung (Annealing, Sa442: 15 s bei 54° C, *nuc*: 10 s bei 50° C) und Polymerisation (Sa442: 10 s bei 72° C, *nuc*: 15 s bei 72° C) gefolgt von einer Schmelzkurvenanalyse. Die Sensitivität der Sa442-PCR betrug 5-50 KBE⁽⁴⁶⁾, die der *nuc*-PCR 1 KBE pro PCR-Reaktion. Als Negativkontrolle wurde bei jedem Probenlauf 5 µl Aqua dest. PCR grade und als Positivkontrolle 5 µl DNA von Sa ATCC 29213 eingesetzt.

Tabelle 2: Übersicht der Primer und Sonden

Name	Sequenz	Länge	GC-Gehalt	Tm ^{a)} (°C)
Sa442-F	5'-GTCGGTACACGATATTCTTCACG-3'	23	47,8 %	62,3
Sa442-R	5'-CTCTCGTATGACCAGCTTCGGTAC-3'	24	54,2 %	65,4
Sa442-HP-1	5'-TACTGAAATCTCATTACGTTGCATCGGAA-F ^{b)} -3'	29	37,9 %	65,6
Sa442-HP-2	5'LC Red705-ATTGTGTTCTGTATGTAAAAGCCGTCTTG-3'	29	37,9 %	65,0
<i>nuc274F</i>	5'-GAT TGA TGG TGA TAC GGT-3'	18	k.A. ^{d)}	k.A.
<i>nuc274R</i>	5'-CAAA GCC TG ACG AAC TA-3'	17	k.A.	k.A.
<i>nuc274FL</i>	5'-GTT TGA CAA AGG TCA AAG AAC TGA TAA AT-F-3'	29	k.A.	k.A.
<i>nuc274705</i>	5'LC Red705-TGGACGTGGCTTACGGTATATTTAT-P ^{c)} -3'	25	k.A.	k.A.

^{a)}Tm= Schmelztemperatur ^{b)}F= Fluoreszein ^{c)}P= Phosphorylation ^{d)}k.A.= keine Angaben

2.7 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Untersucht wurden Paraffingewebsschnitte, die aus dem Biopsiematerial angefertigt wurden. Die Präparate wurden bis zur Entparaffinisierung bei 4° C gelagert. Zur Entparaffinisierung wurden die Schnitte zwei Mal für jeweils 10 Minuten in Xylol gestellt und anschließend für

3 Minuten in 100 %igem Ethanol inkubiert. Entparaffinisierte Objektträger (OT) wurden entweder bei -20° C eingefroren oder direkt weiter behandelt.

Die Behandlung mit Proteinase K diente der Permeabilisierung der Zellmembran. Hierzu wurde zunächst eine absteigende Alkoholreihe angewandt, bei der die Objektträger zur Bewässerung je drei Minuten in 100 %iges, 95 %iges, 70 %iges und 50 %iges Ethanol gestellt wurden. Anschließend folgte eine drei-minütige Inkubation in destilliertem Wasser, danach eine Inkubation in 36° C warmem PBS für 15 Minuten. Nach Lufttrocknen wurden 50 µl Prot. K (25 µg/µl) auf ein 2,4x2,4 cm großes Feld aufgetragen, die Objektträger in einer 36° C warmen feuchten Kammer für 15 Minuten inkubiert und danach sofort zwei Mal für drei Minuten in destilliertes Wasser gestellt. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (je drei Minuten in 50, 70, 95 und 100 %igem Ethanol) mit anschließendem Lufttrocknen.

Zunächst sollten die Sonden an Nativausstrichen von Bakterien getestet werden, um festzustellen, wie sich Sa bzw. SASCV mit den eingesetzten Sonden anfärben lassen. Hierfür wurde eine über-Nacht-Kultur von Sa ATCC 825 und SCV-1⁽⁴¹⁾ angelegt und davon einige Kolonien in NaCl auf einen Objektträger aufgetragen, luftgetrocknet und für 10 Minuten in Methanol fixiert. Des Weiteren wurde als Positivkontrolle Polypengewebe in NaCl mit einer über-Nacht-Kultur von Sa ATCC 825 für 3 h im Brutschrank bei 36° C, CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe mit Formalin fixiert und Paraffingewebsschnitte angefertigt. In Vorversuchen mit DNA-Sonden wurde die Bakterienlyse optimiert. Zunächst folgte eine Lysebehandlung mit den zwei Lysereagenzien Lysozym-Lysostaphin (LL)-Mix bestehend aus 500 µl Lysozym (2 mg/ml), 4 µl Lysostaphin (100 µg/µl) und 1496 µl 10 mM Tris/HCl pH 8 sowie dem Mutanolysin-Lysoym (ML)-Mix bestehend aus 10 µl Mutanolysin (5000 U/ml) und 10 µl Lysozym (50 mg/ml). Es wurden jeweils 50 µl Lysereagenz auf die Objektträger aufgetragen die anschließend in einer feuchten Kammer unterschiedlich lange inkubiert wurden (15 Min bis 40 Min). Nach der Lysebehandlung wurden die OT für 3 Min in 100 % Ethanol gestellt und dann luftgetrocknet. Danach wurden 23 µl Hybridisierungslösung (bestehend aus 20 µl Hybridisierungspuffer 30 % Formamid, 2 µl EUB-Sonde (FITC-markiert), 2 µl spezifische Sonde für Sa (Cy3-markiert)) auf den OT aufgetragen.

Folgende Sonden wurden eingesetzt⁽⁴²⁾: EUB- Sequenz (5'-3'): GCT GCC TCC CGT ACC AGT, SAU- Sequenz (5'-3'): GAA GCA AGC TTC TCG TCC G sowie DAPI als unspezifischer Farbstoff für zelluläre und bakterielle DNA. DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol- dihydrochlorid) gehört zu den aromatischen Diamidinen, die mit großer Affinität

an DNA binden, ohne sich in diese einzulagern⁽⁴⁷⁾. Die Hybridisierung fand für 90 oder 120 Min bei 46° C statt. Danach wurden die OT in Waschpuffer (30 %) gegeben und für 20 Min bei 46° C gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die OT mit einem Eindeckmedium mit DAPI eingedeckt und sofort im Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

In weiteren Vorversuchen wurden mit PNA-Sonden die FISH-Bedingungen optimiert. Bei der FISH mit PNA-Sonden wurde keine Lyse durchgeführt, da diese durch die Bakterienzellwand diffundieren können. Es wurden unterschiedliche Vorbehandlungen durchgeführt. Zunächst wurden methanolfixierte Präparate von Bakterienausstrichen ohne Vorbehandlung untersucht. Gewebsschnitte des gespikten Gewebes wurden entparaffiniert (s.o.) und zum Einen ohne Vorbehandlung, zum Anderen nach Behandlung mit Proteinase K sowie nach Behandlung mit Osmiumtetroxid zur Unterdrückung der Autofluoreszenz untersucht. Hierzu wurden die OT nach der Entparaffinisierung für 1 h in 2 %iges Osmiumtetroxid gestellt und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 80 %, 100 %) für je 3 Min entwässert und anschließend die Proteinase K Behandlung durchgeführt.

Für die Hybridisierung wurde je OT 1 Tropfen Sondenlösung aufgetragen, die Hybridisierungskammer auf den OT geklebt und die Hybridisierung bei verschiedenen Inkubationszeiten bei 55° C durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger für 30 Min bei 56° C mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer gewaschen, luftgetrocknet und sofort mit DAPI eingedeckt. Die Präparate wurden sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Nach dem Abschluss der Vorversuche wurde die FISH mit PNA-Sonden an Patientenproben am Tag der Proteinase K-Behandlung durchgeführt. Zunächst wurde eine Hybridisierungskammer an der Stelle auf den Objektträger aufgeklebt, an der auch die Proteinase K-Behandlung durchgeführt wurde. Anschließend wurde 1 Tropfen Sa-spezifische PNA-Sonde aufgebracht, und die Hybridisierungskammer mit dem Deckglas geschlossen. Um den Objektträger wurde Parafilm gewickelt, um ein Verdampfen der Sonden zu verhindern.

Die Objektträger wurden über Nacht in einem bereits vorgeheizten Hybridisierungsofen bei 56° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 30 Minuten in 56° C warmem Waschpuffer gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Objektträger wurden sofort mit einem Eindeckmedium mit DAPI eingedeckt und anschließend sofort mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (1000-fache Vergrößerung). Je Objektträger wurden 100 Gesichtsfelder durchgemustert. Bei jedem Probenlauf wurde ein methanolfixierter Ausstrich von SCV-R als Positivkontrolle und von S.epi ATCC 12228 als Negativkontrolle verwendet.

2.8 Nachweis von intrazellulärem Sa in humanen Zelllinien

Ein Schwerpunkt dieser Untersuchung war der Nachweis von intrazellulärem Sa bzw. SASCV bei Patienten mit CRS. Deswegen wurde das intrazelluläre Vorkommen von Sa an zwei humanen Zelllinien mit Ähnlichkeiten zu Zellen in den Atemwegen untersucht.

Bei MonoMac-6 Zellen handelt es sich um eine Suspensionszelllinie die ursprünglich aus dem Blut eines Patienten mit monozytärer Leukämie gewonnen wurde. Sie repräsentiert phagozytosefähige Zellen des unspezifischen Immunsystems (Monozyten/Makrophagen). Zur Anzucht und Vermehrung wurden die Zellen in 80 cm² großen Zellkulturflaschen in 15 ml MonoMac-6 Medium (sh. Tabelle 3) bei 36° C im Brutschrank bebrütet. Alle zwei bis drei Tage wurden 15 ml Medium zugegeben. Ein bis zwei Mal wöchentlich, abhängig von der Zellmenge, wurden die Zellen aufgeteilt und das Medium erneuert. Hierzu wurden die Zellen bei 312 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen ein Mal mit 37° C warmen PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml warmem Medium resuspendiert, die Zellsuspension halbiert und in 15 ml Medium ausgesät.

Bei BEAS-2B Zellen handelt es sich um eine adhärent wachsende, humane Bronchialepithelzelllinie. Zur Anzucht und Vermehrung wurden die Zellen in 80 cm² großen Zellkulturflaschen in 15 ml B2B-Medium (sh. Tabelle 3) im Brutschrank bei 36° C bebrütet. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium ersetzt. Ein bis zweimal wöchentlich wurden die Zellen aufgeteilt. Hierzu wurden die Zellen zunächst ein Mal mit 36° C warmem PBS gespült um anschließend die Trypsinierung durchzuführen. Hierzu wurden 3 ml Trypsin EDTA zugegeben und die Zellen für 5 Minuten im Brutschrank bei 36° C inkubiert. Anschließend wurden 8 ml Medium zugegeben, um die Reaktion des Trypsins zu stoppen. Die Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 312 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und die Zellsuspension in neue Flaschen aufgeteilt. Zur Festlegung der Infektionsdosis in späteren Versuchen, musste die Zellzahl bestimmt werden, die nach zweitägiger Bebrütung bis zur Konfluenz in 25 cm² Zellkulturflaschen erreicht wird. Hierzu wurden im Dreifachansatz je 1x10⁶ und 5x10⁶ B2B Zellen in kleine Zellkulturflaschen ausgesät und über zwei Tage bei 5 % CO₂, 36° C bebrütet. Die Zellen wurden anschließend trypsinisiert und mit Trypanblau ausgezählt.

Für die späteren Invasionsversuche, bei denen die Zellen zur Freisetzung intrazellulärer Bakterien lysiert werden mussten, wurden Versuche zur optimalen Lyse der Zellen mit MM6

Zellen durchgeführt. Es wurden jeweils 4×10^6 Zellen eingesetzt. Diese wurden mit Triton X 100 (0,025 %) für 5 Minuten und für 30 Minuten behandelt. Des Weiteren wurde zu einem Ansatz 0,25 % SDS für 10 Minuten zugegeben. Zu einem vierten Ansatz wurde Aqua dest. zugegeben und die Zellen dann 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Außerdem wurde ein Ansatz nach Zugabe von Aqua dest. acht Mal durch eine 0,27G Nadel gezogen. Als Kontrolle wurden unlysierte Zellen eingesetzt. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Um festzustellen, ob die Bakterien durch die Lysebehandlung der Zellen abgetötet werden und somit nicht anzüchtbar wären, wurden Vorversuche zur Viabilität der Bakterien nach Lysebehandlung durchgeführt. Hierzu wurde eine Bakteriensuspension mit einer OD von 0,4 hergestellt und 1 ml entnommen (= 1×10^8 KBE). Diese wurden zentrifugiert und das Pellet anschließend in 1 ml Aqua dest. resuspendiert sowie acht Mal durch eine 0,27G Nadel gezogen. Danach wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und diese auf CASO Blutplatten ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Platten ausgezählt.

Zur Bestimmung des geeigneten SCV-Bakterienstammes lagen zwei Sa-Stämme vor, die jeweils aus einem Patienten mit CF isoliert wurden. Es handelte sich um Sa-B sowie um Sa-R, jeweils mit dem normalen Phänotyp (Elternstamm) und dem zugehörigen SCV-Phänotyp. Um festzustellen welcher dieser beiden Stämme am Besten für die Zellversuche geeignet ist, wurden Vorversuche mit beiden Stämmen durchgeführt. Hierbei wurden 5×10^6 MM6 Zellen für 2 h mit einer MOI von 1:10 im Doppelansatz jeweils mit SCV-B und Sa-B bzw. SCV-R und Sa-R bebrütet und anschließend die Menge an intrazellulären Keimen bestimmt.

Mit den Versuchen zur Invasion von Sa in MM6 Zellen sollte zum einen festgestellt werden, ob Sa dazu fähig ist, aktiv (Invasion) oder passiv (Phagozytose) in MM6 Zellen zu gelangen und ob die Anzahl intrazellulärer Keime abhängig von der Infektionsdosis und der Bebrütungsdauer ist. Zur Bestimmung der geeigneten Infektionsdosis (multiplicity of infection, MOI) sowie der geeigneten Infektionszeit wurden mehrere Versuche mit unterschiedlichen MOI's (MOI 1:5, 1:10, 1:20) und Inkubationszeiten (1 h, 2 h, 3 h, 24 h) durchgeführt. Am Tag des Invasionsversuches wurden die MM6 Zellen ein Mal mit 36°C warmen PBS gewaschen und in Invasionsmedium resuspendiert. Die genaue Zellzahl wurde in der Neubauer Zählkammer mittels Trypanblaufärbung ermittelt. Es wurden 5×10^6 Zellen in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte in Invasionsmedium ausgesät. Die Menge des Invasionsmediums richtete sich nach der Menge der später zugegebenen Bakteriensuspension,

insgesamt wurden 2 ml Invasionsmedium eingesetzt. Von den Bakterien wurde eine über-Nacht-Kultur in TS-Bouillon (Sa normaler Phänotyp, SaSAG, S.epi) bzw. BHI-Bouillon (SCV-R und Elternstamm) angelegt. Diese wurde am Tag des Invasionsversuches ein Mal mit PBS gewaschen und anschließend in Invasionsmedium resuspendiert. Es folgte die Einstellung einer optischen Dichte von 0,4 bei einer Wellenlänge von 650 nm (entspricht ca. 1×10^8 KBE/ml Bakteriensuspension⁽⁴⁸⁾). Vor der Zugabe zu den Zellen wurden die Bakterien für 30 sek im Ultraschallbad vereinzelt.

Nach Zugabe der jeweiligen Bakterienmenge zu den Zellen wurden diese zunächst für 10 Minuten bei $312 \times g$ bei $36^\circ C$ zentrifugiert und anschließend für die jeweilige restliche Bebrütungszeit bei $36^\circ C$ Raumluft im Brutschrank inkubiert. Nach der Bebrütungszeit wurde Gentamycin (100 $\mu g/ml$) bzw. Lysostaphin bei SCV-R (100 $\mu g/\mu l$) zugegeben und für weitere 3 h im Brutschrank bebrütet um die extrazellulären Keime abzutöten. Nach der dreistündigen Inkubationszeit mit Antibiotikum wurden die Zellen für 10 Minuten bei $312 \times g$ zentrifugiert. 200 μl des Überstandes wurden auf CASO-Blutagar bzw. Columbia Blutagar ausplattiert und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in destilliertem Wasser resuspendiert um diese zum Platzen zu bringen und die intrazellulären Keime frei zu setzen. Die Zellsuspension in destilliertem Wasser wurde zur zusätzlichen mechanischen Zerstörung mehrmals durch eine 27G Nadel gepresst. Von dieser Zellsuspension wurde eine Verdünnungsreihe in PBS bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} angefertigt, die jeweils im Doppelansatz auf CASO (Sa normaler Phänotyp) bzw. Columbia (SCV) ausplattiert wurde. Alle Nährböden wurden über Nacht bei $36^\circ C$, 5 % CO_2 inkubiert und am nächsten Tag beurteilt.

Mit den Versuchen zur Invasion von Sa in B2B Zellen sollte zum einen festgestellt werden, ob Sa dazu fähig ist, in B2B Zellen zu gelangen und ob die Anzahl intrazellulärer Keime abhängig von der Infektionsdosis und der Bebrütungsdauer ist. Die Invasionsversuche wurden wie bei MM6 Zellen mit folgenden Abweichungen durchgeführt: Zwei Tage vor dem Invasionsversuch wurden 1×10^6 Zellen in 25 cm^2 große Zellkulturflaschen in 4 ml B2B-Medium ausgesät. Die Zellen wurden dann über zwei Tage bis zur Konfluenz (= ca. 1×10^7 Zellen) bei $36^\circ C$ Raumluft inkubiert. Am Tag des Invasionsversuches wurde die Konfluenz unter dem Mikroskop kontrolliert und es folgte ein Ersatz des normalen B2B-Mediums durch Invasionsmedium nach zweimaligem Waschen mit PBS. Die Zellkulturflaschen wurden nach der Infektion nicht zentrifugiert sondern sofort im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation mit Antibiotikum wurden die Zellen mittels Trypsinieren (sh. Kultur) von der Flasche

abgelöst und anschließend mittels destilliertem Wasser und mechanischer Zerstörung zum Platzen gebracht.

Tabelle 3: Übersicht Zellkulturmedien

	Medium für MM6	Invasionsmedium für MM6	Medium für B2B	Invasionsmedium für B2B
RPMI	435 ml	500 ml	-	-
DMEM/Ham's F12	-	-	500 ml*	500 ml
Aminomix (AA-Mix)	10 ml	10 ml	-	-
Natriumpyruvat	5 ml	5 ml	-	-
L-Glutamin	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Penicillin-Streptomycin	5 ml	-	5 ml	-
FCS	50 ml	-	25 ml	-
Insulinlösung	450 µl	450 µl	-	-

*= nach Zugabe von L-Glutamin und Pen. Strep. zu DMEM/Ham's F12 wurden 25 ml dieser Mischung verworfen und anschließend 25 ml FCS zugegeben

2.9 Proteinbestimmungen in Zellkulturüberständen

Neben dem intrazellulären Nachweis von Sa interessierte auch die Reaktion der untersuchten Zelllinien auf die Exposition gegenüber Sa und SASCV, dem in NNH-Abstrichen häufig vorkommenden Keim *S. epidermidis* sowie gegenüber Silikapartikeln als phagozytierbarer nicht viabler Stimulus. Vor den Zellversuchen mit Silikapartikeln wurden diese auf Sterilität überprüft, indem 10 µl der Partikelsuspension im Drei-Ösen-Ausstrich auf CASO-Blutagar ausgestrichen und über zwei Tage bebrütet wurden. Die Zellen wurden ausgesät wie bereits in den Untersuchungen zum intrazellulären Sa Nachweis beschrieben, d.h. es wurden je Ansatz 5×10^6 MM6 Zellen und 1×10^7 B2B Zellen eingesetzt. Ebenso wurden die Bakterien wie bereits beschrieben behandelt. Als MOI wurde für die Versuche 1:10 festgelegt, als Bebrütungszeit 24 h. Die Menge des Keimmediums betrug insgesamt 2 ml. Es wurden jeweils 3 Ansätze mit SaRN6390, *S. epidermidis*, SASAG, SCV-R, Sa-R (Elternstamm von SCV-R) sowie Silikapartikeln angelegt. Bei SaRN6390 handelt es sich um einen in mehreren Tiermodellen als virulent befundenen Sa-Laborstamm mit normalem Phänotyp⁽⁴⁸⁾. *S. epidermidis* ATCC 12228 stellt einen Vertreter der Koagulase-negativen Staphylokokken dar, die Hauptbestandteil der normalen Mikroflora des Menschen sind. Als Negativkontrollen wurden jeweils drei Ansätze mit Medium ohne Bakterien/Silikapartikeln angelegt. Um sicher zu gehen dass die SASCV den SCV-Phänotyp beibehalten haben, wurden aus den über Nacht Kulturen jeweils 200 µl entnommen und auf Columbia-Blutagar ausplattiert und am

folgenden Tag beurteilt. Nach der Bebrütungszeit mit den Bakterien wurden MM6 Zellen für 10 Minuten bei 312 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und sofort durch einen 0,1 µm porigen Filter filtriert und sofort auf Eis gestellt. Bei B2B Zellen wurde der Überstand direkt abgenommen, filtriert und auf Eis gestellt. Die Überstände wurden aliquotiert zu 500 ml und bei -20° C eingefroren.

Die Proteinbestimmungen im Zellkulturüberstand wurden in einem BD FACScan Durchflusszytometer durchgeführt. Es wurde der Testkit "human T_H1/T_H2 11plex" von Bender MedSystems verwendet. Mit diesem Test wurden folgende Zytokine und Chemokine nachgewiesen: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN-γ, TNF-α und TNF-β. Zunächst wurden die Standards hergestellt, indem zu den lyophilisierten Standards destilliertes Wasser zugegeben wurde. Anschließend wurde eine serielle Verdünnungsreihe der Standards nach Herstellerangaben in Assay-Puffer hergestellt. Es folgte die Präparation der Bead-Mischung nach Herstellerangaben. Danach wurden die Biotin-Konjugat Mischung und die Streptavidin-PE Lösung nach Angaben des Herstellers hergestellt. Der Test wurde in der im Kit enthaltenen 96-Loch Filterplatte durchgeführt. Nach Festlegung der Probenzahl wurden die nicht benötigten Vertiefungen mit einer selbstklebenden Folie abgedeckt. Zur Anfeuchtung der Platte wurde Assay-Puffer verwendet. Danach wurden 25 µl der Standard-Verdünnungen in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. In die leeren Vertiefungen wurde Assay-Puffer pipettiert. Von den Proben wurden ebenfalls 25 µl in die Vertiefungen pipettiert. Darauf folgte die Zugabe von 25 µl Bead-Mischung in alle Vertiefungen. Es wurden 50 µl der Biotin-Konjugat-Mischung zu allen Vertiefungen hinzugegeben. Die Platte wurde anschließend mit selbstklebender Folie verschlossen und unter Lichtausschluss für 2 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln bei 500 rpm inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit mit einer Vakuumpumpe von der Platte entfernt und 100 µl Assay-Puffer in jede Vertiefung pipettiert. Anschließend wurden 50 µl Streptavidin-PE Lösung in jede Vertiefung gegeben und die Platte wieder bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss und ständigem Schütteln bei 500 rpm für 1 h inkubiert. Die Flüssigkeit wurde wieder abgesaugt und die Platte ein Mal mit Assay-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl Assay-Puffer in jede Vertiefung wurde der Inhalt gut gemischt und anschließend in ein separates Durchflusszytometer Reagenzgefäß überführt und auf 500 µl Endvolumen aufgefüllt. Die Untersuchung am Durchflusszytometer fand am selben Tag statt. Die Einstellungen am Durchflusszytometer wurden genau nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Tabelle 4: Sensitivität des FlowCytomix human T_H1/T_H2 11plex Kits

Protein	Sensitivität (pg/ml)
IL-1 β	5,2
IL-2	20,0
IL-4	15,7
IL-5	10,0
IL-6	0,8
IL-8	7,9
IL-10	1,5
IL-12 p70	11,6
IFN- γ	2,2
TNF- α	5,0
TNF- β	3,1

Quelle: Produktinformation und Handbuch zum FlowCytomix human T_H1 /T_H2 11plex Kit

2.10 Genexpressionsanalysen mittels Microarray

Eine aktuelle wissenschaftliche Diskussion ist, ob insbesondere bei Patienten mit CRSNP⁺ die intrazelluläre Persistenz von Sa bzw. SASCV die therapeutischen Schwierigkeiten und die Rezidivhäufigkeit bei dieser Erkrankung erklärt. Außerdem wird diskutiert, dass Sa-Superantigene ganz wesentlich zum T_H2-Bias dieser Erkrankung beitragen. Dabei ist über das spezifische Reaktionsmuster der humanen Atemwegsschleimhaut auf eine Infektion mit Sa oder SASCV nur wenig bekannt. Um Einblicke in die Bedeutung von Sa in vivo auf Genebene zu gewinnen, wurden Microarrayanalysen durchgeführt. Verwendet wurden Biopsieproben von drei CRSNP⁺ Patienten die kulturell positiv für Sa waren sowie drei CRSNP⁺ Patienten bei denen kulturell kein Sa nachgewiesen wurde. Es wurden drei Microarrays durchgeführt bei denen jeweils eine Probe eines Sa positiven Patienten gegen eine Probe eines Sa negativen Patienten aufgetragen wurde.

Hierzu wurden 70mer-cDNA Oligonukleotide für 1232 humane Gene auf Ultra Gaps II beschichtete Objektträger mit einem OmniGrid 100TM aufgetragen. Als Spikingkontrolle wurden nicht humane Oligonukleotide von *Arabidopsis thaliana* und *Sinorhizobium meliloti* Genen aufgetragen. Des Weiteren befanden sich auf dem OT sogenannte „Empties“ (Leerstellen) auf die nur der Spottingpuffer aufgetragen wurde sowie 17 zufällige Negativkontrollen (randomized negative controls, RNC). Nach dem Spotten wurden die Objektträger bei 80° C für 10 Minuten inkubiert und anschließend fand durch UV-

Kreuzvernetzung in einem Stratalinker 2400TM die Immobilisation der Oligonukleotide statt.⁽⁴⁹⁾

Das intraoperativ gewonnene und in RNAlater® zwischenfixierte Polypengewebe wurde zunächst mittels Skalpell in kleine Stückchen geschnitten und anschließend mit Hilfe des Fast Prep FP 120 und der „Lysing Matrix D tubes“ von QBIogene weiter zerkleinert.

Die Extraktion der RNA wurde mittels dem RNeasyTM Mini-Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde in 8,5 µl DEPC-Wasser suspendiert. Die RNA-Konzentration wurde mit einem SmartSpecTM 3000 Photometer bei 260 nm bestimmt. Bis zur Microarraydurchführung wurde die RNA bei -80° C gelagert.

Die reverse Transkription wurde mittels der reversen Transkriptase Superscript-2 innerhalb des 3DNA Array 350 KitsTM, durchgeführt. Die Fluoreszenz-Markierung der cDNA wurde mittels des 3DNA Array 350KitTM nach Herstellerangaben durchgeführt: 5 µg der RNA der Sa positiven Biopsien wurden mit einem Oligo dT Primer mit einer cDNA-capture Sequenz für den Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 5 (Cy5) gefärbt und die RNA der Sa negativen Biopsien mit einer Capture-Sequenz für Cyanin 3 (Cy3). Die cDNA wurde mittels Millipore Microcon XM-30 Centrifugal Filter DevicesTM gereinigt und konzentriert.

Vor der Hybridisierung wurden die Microarray-Objektträger für 30 Min bei 50° C in Prä-hybridisierungspuffer (0,1 % bovines Serumalbumin, 5x Sodium Chlorid Sodium Citric Acid (SSC), 0,1 % Sodium Dodecyl Sulphat (SDS)) inkubiert. Danach wurden die Objektträger in 2x SSC und 0,2x SSC für jeweils 3 Minuten gewaschen. Die Hybridisierung wurde nach Angaben des Herstellers (3DNA Array 350 KitTM) durchgeführt. Für die Hybridisierung wurde 2x SDS Hybridisierungspuffer verwendet. 40 µl der Hybridisierungsmischung wurde auf den Microarrayobjektträger aufgetragen und mit einem 25x42 mm „LifterSlip“ Deckglas eingedeckt. Die Hybridisierung fand über Nacht (16 h) in einer Hybridisierungskammer bei 57° C statt. Das 3DNA Capture-Reagenz wurde für 3 h bei 59° C nach Zugabe von „Anti-Fade“-Reagenz in einer Hybridisierungskammer inkubiert.

Die Microarrayobjektträger wurden nach der abgeschlossenen Hybridisierung mit einem Dual-Laser Microarray Scanner gescannt und mit der GenePix pro 4.1TM Software analysiert.

2.11 Bestimmung nasaler Zytokinmuster

Um die immunmodulatorischen Eigenschaften einer Sa-Infektion bei der CRS außer auf Genebene auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurde das nasale Zytokinmuster in der nasalen Lavage untersucht.

Vor der Untersuchung wurde die nasale Lavage bei -20° C gelagert. Humanes IFN- γ , humanes IL-5, G-CSF (Granulozyten Koloniestimulierender Faktor) und Eotaxin wurden mittels dem Quantikine® Immunoassay-Kit nach Angaben des Herstellers mit folgenden Abweichungen untersucht: Die Platten wurden mit Standard, Probe oder Kontrolle über Nacht anstelle von 2 h inkubiert. Eosinophiles kationisches Protein (ECP) und Gesamt-IgE wurden mittels UniCAP 100 Fluoreszenz Enzymimmunoassays nach Herstellerangaben gemessen. Die Nachweisgrenzen waren 2 μ g/l für ECP, 2 kU/l für Gesamt-IgE, 3 ng/l für IL-5 und 8 ng/l für IFN- γ , 20 pg/ml für G-CSF und 5 pg/ml für Eotaxin.

2.12 Statistische Auswertung

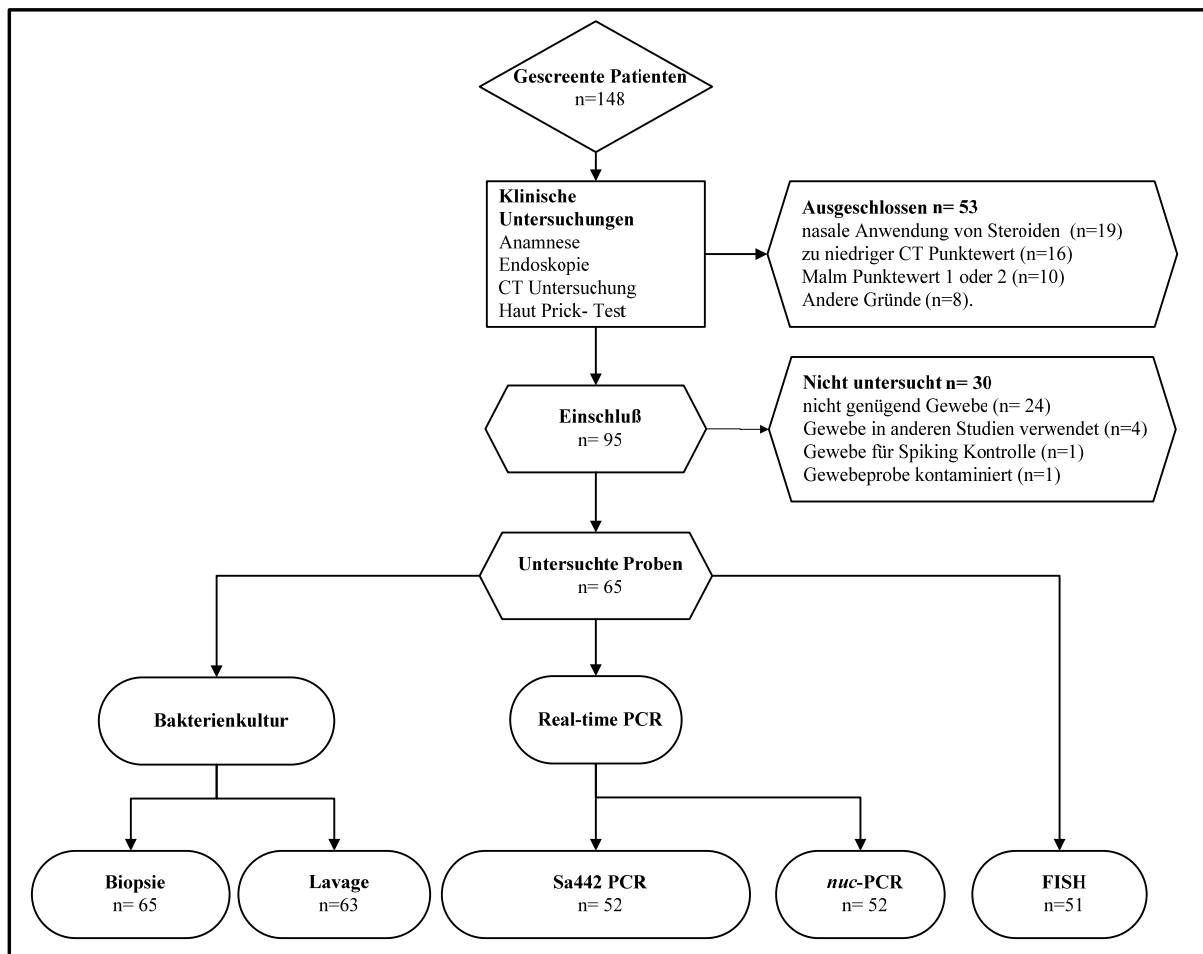
Die Signifikanz der Unterschiede in der Bakterienisolierung bei den verschiedenen Patientengruppen wurde mittels Fisher's Exact Test ermittelt. Der Zusammenhang zwischen Sa-Nachweis und den einzelnen Probandengruppen wurde mittels Chi-Square-Test ermittelt. Ebenso wurde dieser Test verwendet um die Zusammenhänge zwischen dem Nachweis von Sa und den unterschiedlichen Parametern wie Asthma, Atopie und ASS-Intoleranz zu untersuchen. Bei den Zellkulturuntersuchungen sowie der Proteinbestimmungen aus den Zellkulturüberständen und in der nasalen Lavage wurden die Grafiken und die Berechnung des Medians mittels der Software Systat 10.2 ermittelt und erstellt. Die Berechnung der Signifikanz der Unterschiede zwischen den Proteinen nach Stimulation und den Negativkontrollen wurde mittels dem Kruskal-Wallis-Test bzw. dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Auswertung der Microarrays wurde mit dem im Internet zur Verfügung gestellten Programm „WebGestalt“ durchgeführt (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>).

3. Ergebnisse

3.1 Patientenpopulation

Insgesamt wurden für diese Studie 148 Patienten konsekutiv überprüft. Davon genügten 95 Patienten den Einschlusskriterien und von 65 Patienten konnte ausreichend Material für die geplanten Untersuchungen gewonnen werden.

Abbildung 3: Studienübersicht



Die nicht eingeschlossenen Patienten hatten nasale Steroide innerhalb der letzten 4 Wochen (n=19) eingenommen, hatten einen zu geringen CT-Punktwert (n=16), einen Malm-Punktwert von eins oder zwei (n=10) oder wurden aus anderen Gründen nicht in die Studie eingeschlossen. Von den 95 Patienten, die den Ein- und Ausschlusskriterien genügten, wurde bei 24 Patienten ungenügend Gewebe entnommen, bei vier Patienten wurde das Gewebe für andere Studien verwendet, das Gewebe von einem Patienten wurde für die Spikingkontrolle

verwendet und eine Biopsieprobe wurde bei deren Entnahme verunreinigt. Genaue Studienübersicht sh. Abbildung 3. Von den 65 verbleibenden protokollgemäß auswertbaren Patienten litten 31 Patienten an CRSNP⁺, 13 an CRSNP⁻ und 21 Patienten hatten eine nasale Gerüststenose ohne Sinusitis (Kontrollen). Demographische und erkrankungsbezogene Charakteristika können der Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5: Demographische und erkrankungsbezogene Charakteristika der Patientenpopulation

	Kontrolle	CRSNP ⁺	CRSNP ⁻	Gesamt	p=
n=	21	31	13	65	
Alter ^{a)}	34+/-10	44+/-11	49+/-14	43+/-13.6	0,001
Männlich/weiblich	16/5	20/11	9/4	45/20	0,6
Asthma	2	11	2	15	0,06
ASS-Intoleranz	0	2	0	2	0,2
Atopie	5	7	4	16	0,8
Raucher	7	6	4	17	0,5
Malm-Punktezahl ^{b)}	0 (0 bis 0)	4 (4 bis 5)	0 (0 bis 0)	0 (0 bis 4)	<0,001
CT-Punktezahl ^{b)}	5 (0 bis 6.5)	26 (19.5 bis 34.5)	18 (17 bis 19)	20.5 (17 bis 28.5)	<0,001

a) Jahre, Mittelwert +/- Standardabweichung

b) Median und Interquartilbereich

3.2 Bakterienkulturen

Die Bakterienkultur wird als Referenzmethode zum mikrobiologischen Keimnachweis bei CRS angesehen. Es wurden bei den Patienten Nasenschleimhautbiopsien und nasale Lavagen mittels kultureller Anzucht der Bakterien untersucht.

3.2.1 Bakterienkultur aus den Biopsien

Bei allen 65 Patienten wurde die aerobe und anaerobe Bakterienkultur aus Biopsieproben durchgeführt. Bei 63 der 65 untersuchten Proben (97 %) konnten Keime ein- oder beiderseits nachgewiesen werden. Bei zwei CRSNP⁺ Patienten konnte in den Biopsieproben kein Keimwachstum festgestellt werden. 82 % der Biopsieproben zeigten Wachstum von aeroben und anaeroben Keimen gleichzeitig, in 8 (12 %) Biopsien wurden ausschließlich aerobe und

fakultativ anaerobe Keime nachgewiesen und bei 3 % der Biopsien wuchsen nur anaerobe Keime. Bei 55 der 65 untersuchten Patienten lagen Biopsien von beiden Nasenseiten vor. Davon waren 50 (91 %) beiderseits kulturell positiv in der Bakterienkultur, bei einer Probe (1,8 %) war nur die linke Seite positiv und bei zwei Proben nur die rechte Seite (3,6 %). Bei 14 Patienten (28 %) konnte beiderseits das gleiche Keimspektrum nachgewiesen werden. Bei den restlichen 36 Patienten (72 %) unterschied sich das Keimspektrum im Median um zwei Spezies.

Das Keimspektrum das in den Biopsien ermittelt wurde, kann Tabelle 7 bis Tabelle 10 entnommen werden. Die häufigsten aeroben Spezies, die bei den drei Patientengruppen nachgewiesen wurden, waren Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) und *Corynebacterium* spp. Dabei zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen (Tabelle 8 und Tabelle 9). Anaerobe Keime wurden bei 74 % der Proben von CRSNP⁺ Patienten, 100 % der CRSNP⁻ Patienten sowie 90 % der Kontrollpatienten gefunden. Hierbei war die häufigste Spezies bei allen drei Patientengruppen *Propionibacterium* spp. (Tabelle 10). Bei einem Kontrollpatienten (5 %) sowie bei einem CRSNP⁺ Patienten (3 %) konnte der gramnegative anaerobe Keim *Prevotella intermedia* nachgewiesen werden.

Bei den untersuchten Biopsien wurden häufig Mischkulturen diagnostiziert. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der verschiedenen Spezies zwischen den drei Patientengruppen festgestellt werden (siehe Tabelle 11). Der Median der Anzahl der isolierten Spezies je Patient war bei allen drei Patientengruppen drei Bakterienspezies.

Pathogene Bakterien kamen bei 15 (48 %) CRSNP⁺ Patienten, bei vier (31 %) der CRSNP⁻ Patienten und bei 10 (48 %) der Kontrollen gemeinsam mit Keimen der physiologischen Nasenflora vor. Bei einem Polypenpatienten (1,5 %) wurden nur pathogene Keime isoliert. Bei den übrigen Patienten konnten nur apathogene Keime isoliert werden. Betrachtet man die pathogenen Spezies *Sa*, *Enterobacteriaceae* und *Haemophilus influenzae*, so traten diese in 16 Biopsieproben von CRSNP⁺ Patienten (52 %), in vier Biopsien von CRSNP⁻ Patienten (31 %) und in 10 Biopsieproben von Kontrollpatienten (48 %) auf. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p > 0,05$). Bei 53 % der kulturell positiven Proben hatte sich der Patient bereits einer Nasen- oder NNH-OP unterzogen, bei 47 % nicht. Zwischen dem Nachweis von Enterobakterien in Biopsieproben und/oder nasaler Lavage und einer vorangegangenen OP konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Zur Definition apathogener und pathogener Keime sh. Tabelle 6.

Tabelle 6: Nachgewiesene Keime, aufgeschlüsselt nach Pathogenität

Apathogene/fakultativ pathogene Keime	Pathogene Keime
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.
Koagulase-negative Staphylokokken	<i>Enterobacter</i> spp.
<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Ewingella americana</i>
<i>Gemella</i> spp.	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Neisseria</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	
<i>Prevotella intermedia</i>	
<i>Propionibacterium</i> spp.	
<i>Rothia</i> spp.	
α -hämolisierende Streptokokken	
β -hämolisierende Streptokokken Gruppe C	

Tabelle 7: Übersicht über das Keimspektrum in den Biopsien bei den Patientengruppen (Anzahl (%))

Keimspektrum	Kontrolle (n=21)	CRSNP ⁺ (n= 31)	CRSNP ⁻ (n=13)
Aerob und anaerob	18 (86%)	22 (71%)	13 (100%)
Nur aerob	2 (10%)	6 (19%)	0
Nur anaerob	1 (5%)	1 (3%)	0
Kein Keimwachstum	0	2 (6%)	0

Tabelle 8: Aerobe und fakultativ anaerobe grampositive Keime in den Biopsieproben

Spezies	Anzahl (%) kulturell positive Proben		
	Kontrolle (n=21)	CRSNP ⁺ (n=31)	CRSNP ⁻ (n=13)
<i>Bacillus</i> spp.	1 (5%)	0	0
Koagulase-negative Staphylokokken	20 (95%)	23 (74%)	12 (92%)
<i>Corynebacterium</i> spp.	7 (33%)	10 (32%)	3 (23%)
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0	3 (10%)	1 (8%)
<i>Corynebacterium macginleyi</i>	0	1 (3%)	0
<i>Corynebacterium propinquum</i>	1 (5%)	0	0
<i>Gemella</i> spp.	1 (5%)	1 (3%)	0
<i>Micrococcus luteus</i>	1 (5%)	1 (8%)	0
<i>Rothia</i> spp.	1 (5%)	1 (3%)	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 (29%)	7 (23%)	1 (8%)
α -hämolisierende Streptokokken	4 (19%)	7 (22%)	2 (15%)
β -hämolisierende Streptokokken Gruppe C	1 (5%)	2 (6%)	0
Patienten gesamt	20 (95%)	26 (84%)	12 (92%)

Tabelle 9: Aerobe und fakultativ anaerobe gramnegative Keime in den Biopsieproben

Spezies	Anzahl (%) kulturell positiver Patienten		
	Kontrolle (n=21)	CRSNP ⁺ (n=31)	CRSNP ⁻ (n=13)
<i>Citrobacter</i> spp.	2 (10%)	0	0
<i>Enterobacter</i> spp.	1 (5%)	2 (6%)	0
<i>Escherichia coli</i>	0	4 (13%)	1 (8%)
<i>Ewingella americana</i>	0	1 (3%)	0
<i>Haemophilus influenzae</i>	1 (5%)	4 (13%)	4 (31%)
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0	0	1 (8%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	2 (6%)	0
<i>Neisseria</i> spp.	1 (5%)	0	1 (8%)
<i>Proteus mirabilis</i>	0	1 (3%)	0
Patienten gesamt	4 (19%)	12 (39%)	5 (38%)

Tabelle 10: Anaerobe grampositive Keime in den Biopsieproben

Spezies	Anzahl (%) kulturell positiver Patienten		
	Kontrolle (n=21)	CRSNP ⁺ (n=31)	CRSNP ⁻ (n=13)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	7 (33%)	6 (19%)	5 (39%)
<i>Propionibacterium</i> spp.	15 (71%)	22 (71%)	11 (85%)
<i>Propionibacterium acnes</i>	2 (10%)	2 (6%)	1 (8%)
<i>Propionibacterium avidum</i>	0	2 (6%)	0
<i>Propionibacterium granulosum</i>	2 (10%)	3 (10%)	4 (31%)
Patienten gesamt	19 (90%)	23 (74%)	13 (100%)

Tabelle 11: Anzahl verschiedener Bakterienisolate aus den Biopsieproben

Anzahl Bakterienspezies	0	1	2	3	4	5	>6
Kontrollpatienten	0	0	5	6	7	2	1
CRSNP⁺ Patienten	2	3	5	7	8	5	1
CRSNP⁻ Patienten	0	0	3	4	4	1	1

3.2.2 Bakterienkulturen aus nasalen Lavagen

Die nasalen Lavagen von 63 Patienten wurden untersucht. In einer der 63 untersuchten Proben (1,5 %) wurden keine Keime nachgewiesen. Anaerobe Kulturen wurden bei 35 Proben durchgeführt. Eine Übersicht über die Kulturergebnisse der Lavage-Proben findet sich in Tabelle 13 bis Tabelle 15. Der größte Teil der Bakterienspezies die in den Biopsieproben gefunden wurden konnte auch in der nasalen Lavage nachgewiesen werden.

Haemophilus influenzae konnte in der korrespondierenden Lavage bei 25 % der CRSNP⁻ Patienten bzw. 75 % der CRSNP⁺ Patienten und bei 100 % der Kontrollpatienten nachgewiesen werden. Anaerobe Keime wurden seltener in der Lavage als in der Biopsie nachgewiesen. Die Lavage wurde zur Auswertung quantitativ angelegt. Dies erlaubt neben Aussagen über das Keimspektrum auch Aussagen zur Keimmenge. Bei den Keimzahlen zeigten sich jedoch ebenfalls keine relevanten Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen. Die Anzahl der in der Lavage nachgewiesenen KBE von *Sa*, *Hämophilus influenzae* und Enterobakterien betrug 10^2 - 10^4 KBE/ml bei CRSNP⁺ Patienten, 10^2 KBE/ml bei CRSNP⁻ Patienten, und 10^2 - 10^4 KBE/ml bei den Kontrollpatienten. Ob die beim gleichen Patienten durchgeführten Biopsieproben positiv waren oder nicht, hatte keinen Einfluss auf die KBE in der nasalen Lavage (Tabelle 16).

Tabelle 12: Häufigkeit des Keimnachweises in nasalen Lavagen. Die Werte in Klammern geben an, in wie viel Prozent der in den Biopsieproben gesicherte Keimnachweis auch in der Lavage gelang.

Keimspektrum	Kontrolle (n=10)	CRSNP ⁺ (n= 17)	CRSNP ⁻ (n=8)
Aerob und anaerob	7 (70%)	10 (59%)	5 (63%)
Nur aerob	2 (20%)	6 (35%)	2 (25%)
Nur anaerob	1 (10%)	1 (6%)	0
Kein Keimwachstum	0	0	1 (13%)

Tabelle 13: Aerobe und fakultativ anaerobe grampositive Keime in den Lavage- Proben. In Klammern ist angegeben, in wie viel Prozent einer positiven Biopsie auch eine positive Lavage gefunden wurde.

Spezies	Kontrolle (n=20)	CRSNP+ (n=30)	CRSNP- (n=13)
<i>Bacillus</i> spp.	1 (100%)	0	0
<i>Corynebacterium</i> spp.	4 (57%)	11 (85%)	2 (50%)
Koagulase-negative Staphylokokken	15 (88%)	21 (95%)	11 (92%)
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	1 (100%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 (100%)	7 (100%)	1 (100%)
α-hämolysierende Streptokokken	3 (75%)	5 (71%)	0
β-hämolysierende Streptokokken Gruppe C	0	1 (50%)	0
Patienten gesamt	19 (100%)	25 (100%)	12 (92%)

Tabelle 14: Aerobe und fakultativ anaerobe gramnegative Keime in den Lavageproben. In Klammern ist angegeben, in wie viel Prozent einer positiven Biopsie auch eine positive Lavage gefunden wurde.

Spezies	Kontrolle (n=20)	CRSNP ⁺ (n=30)	CRSNP ⁻ (n=13)
<i>Citrobacter</i> spp.	2 (100%)	0	0
<i>Enterobacter</i> spp.	1 (100%)	1 (50%)	0
<i>Escherichia coli</i>	0	1 (25%)	1 (100%)
<i>Haemophilus influenzae</i>	1 (100%)	3 (75%)	1 (25%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	2 (100%)	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	1 (100%)	0
Patienten gesamt	4 (100%)	9 (75%)	2 (40%)

Tabelle 15: Anaerobe grampositive Keime in den Lavageproben. In Klammern ist angegeben, in wie viel Prozent einer positiven Biopsie auch eine positive Lavage gefunden wurde.

Spezies	Kontrolle (n=10)	CRSNP ⁺ (n=17)	CRSNP ⁻ (n=8)
<i>Peptostreptokokkus</i> spp.	1 (20%)	1 (25%)	1 (50%)
<i>Propionibacterium</i> spp.	8 (80%)	11 (73%)	5 (63%)
Patienten gesamt	8 (80%)	11 (73%)	5 (63%)

Tabelle 16: Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) je ml pathogener Keime in der nasalen Lavage bei positivem Biopsienachweis für den gleichen Keim (Lavage+/Biopsie+) und bei negativem Biopsienachweis (Lavage+/Biopsie-)

	Kontrolle		CRSNP ⁺		CRSNP ⁻	
	Lavage+/ Biopsie+	Lavage+/ Biopsie-	Lavage+/ Biopsie+	Lavage+/ Biopsie-	Lavage+/ Biopsie+	Lavage+/ Biopsie-
<i>S. aureus</i>	10 ² -10 ³ (n=6)	10 ² -10 ⁴ (n=4)	10 ² -10 ⁴ (n=7)	10 ³ -10 ⁴ (n=3)	10 ² (n=1)	0
<i>H. influenzae</i>	10 ⁴ (n=1)	10 ² -10 ³ (n=3)	10 ² -10 ³ (n=3)	10 ² (n=2)	10 ² (n=1)	10 ² (n=1)
<i>E. coli</i>	0	0	10 ³ (n=1)	10 ² (n=1)	10 ² (n=1)	0
<i>Enterobacter</i> spp.	10 ² (n=1)	0	10 ² (n=1)	0	0	0
<i>Citrobacter</i> spp.	10 ² (n=2)	0	0	10 ² (n=1)	0	0
<i>Klebsiella</i> <i>oxytoca</i>	0	0	10 ² -10 ³ (n=2)	10 ² (n=2)	0	0
<i>Proteus</i> spp.	0	0	10 ³ (n=1)	0	0	0

3.2.3 Detaildarstellung der Kulturergebnisse von Sa und SASCV

Die Spikingkontrollen zeigten, dass der Nachweis von SASCV gelingt. In Überstand und Gewebe zusammen konnten etwa $2,5 \times 10^5$ von den 5×10^6 eingesetzten Keimen wieder gefunden werden, wobei hiervon die Hälfte im Überstand und die andere Hälfte im Gewebe lokalisiert war. Die eingesetzten Bakterien behielten den SCV Phänotyp. Es zeigte sich keine wesentliche Keimvermehrung während der 2-stündigen Bebrütungszeit. Sowohl vor als auch nach der Inkubationszeit befanden sich etwa 5×10^6 KBE in der Bakteriensuspension der eingesetzten Verdünnungen.

Der Nachweis von Sa und SASCV in der Bakterienkultur erfolgte an Biopsieproben und in nasalen Lavagen. Betrachtet man Sa, der in den Biopsieproben nachgewiesen wurde, ließen sich keine Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen feststellen ($p=0,348$). Bei den in der Kultur der Biopsie positiven Patienten ($n=14$) wurden von 13 Patienten beiderseits Biopsieproben entnommen, so dass ein Vergleich des Vorkommens von Sa zwischen den beiden Nasenseiten möglich war. Bei neun der 13 Patienten (69 %) wurde Sa beiderseits nachgewiesen. SASCV wurden in keiner der untersuchten Biopsieproben nachgewiesen.

Bezogen auf Sa, der in der Lavage isoliert wurde, gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0,042$, Chi-Square-Test). Der Fisher's Exact Test ergibt bei einem Vergleich von Sa positiven Kontrollpatienten mit CRSNP⁻ Patienten einen signifikanten Unterschied ($p=0,027$) mit weniger Sa positiven Proben bei CRSNP⁻ Patienten. SASCV wurden in keiner der untersuchten Lavagen nachgewiesen.

Sa konnte bei insgesamt 21 Patienten (32 %) mittels Bakterienkultur nachgewiesen werden, wobei im Detail bei 10 Kontrollpatienten (48 %), bei 10 CRSNP⁺ Patienten (32%) und bei 1 CRSNP⁻ Patienten (8 %) Sa isoliert werden konnte.

Sa trat entweder isoliert in der nasalen Lavage auf oder gleichzeitig in Lavage und Biopsie. Bei keinem der untersuchten Patienten trat Sa nur in der Biopsie auf.

Das Auftreten von Asthma, ASS-Intoleranz und Atopie stand nicht im Zusammenhang mit dem Vorkommen von Sa ($p>0,05$).

3.3 Sa-spezifische Real-time PCR

Neben der kulturellen Anzucht der Keime bieten molekularbiologische Methoden wie die Real-time PCR eine sensitive und spezifische Nachweismethode für Sa. Es wurden zwei verschiedene PCRs mit unterschiedlichen Genzielsequenzen (Sa442-Gen und *nuc*-Gen) verwendet.

Die Sa442-PCR sowie die *nuc*-PCR wurden mit 52 der 65 untersuchten Proben durchgeführt. Bei den restlichen 13 Proben reichte die Gewebemenge nicht. Bei den Proben handelte es sich um 20 Proben von Kontrollpatienten, 11 von CRSNP⁻ Patienten und 21 von CRSNP⁺ Patienten.

Von den 52 Proben, die mittels PCR untersucht wurden, waren 12 Proben in der Biopsie kulturell positiv. Die Sa442-PCR war insgesamt bei 9 Patienten positiv: Sieben Proben waren sowohl in der Kultur der Biopsie als auch in der Sa442-PCR positiv, bei zwei Proben die in der Sa442-PCR positiv waren, zeigte die Kultur der Biopsien ein negatives Ergebnis. Die Sensitivität der Sa442-PCR im Vergleich zu der Bakterienkultur der Biopsie betrug in dieser Studie 58 %, die Spezifität 95 %. Bei der *nuc*-PCR gab es 10 positive Proben. Sieben davon waren auch in der Kultur der Biopsie positiv. Drei der *nuc*-PCR positiven Proben waren negativ in der Kultur. Die Sensitivität der *nuc*-PCR unter unseren Versuchsbedingungen betrug 58 %, die Spezifität 93 %. Zum Vergleich der beiden PCR`s siehe Tabelle 17.

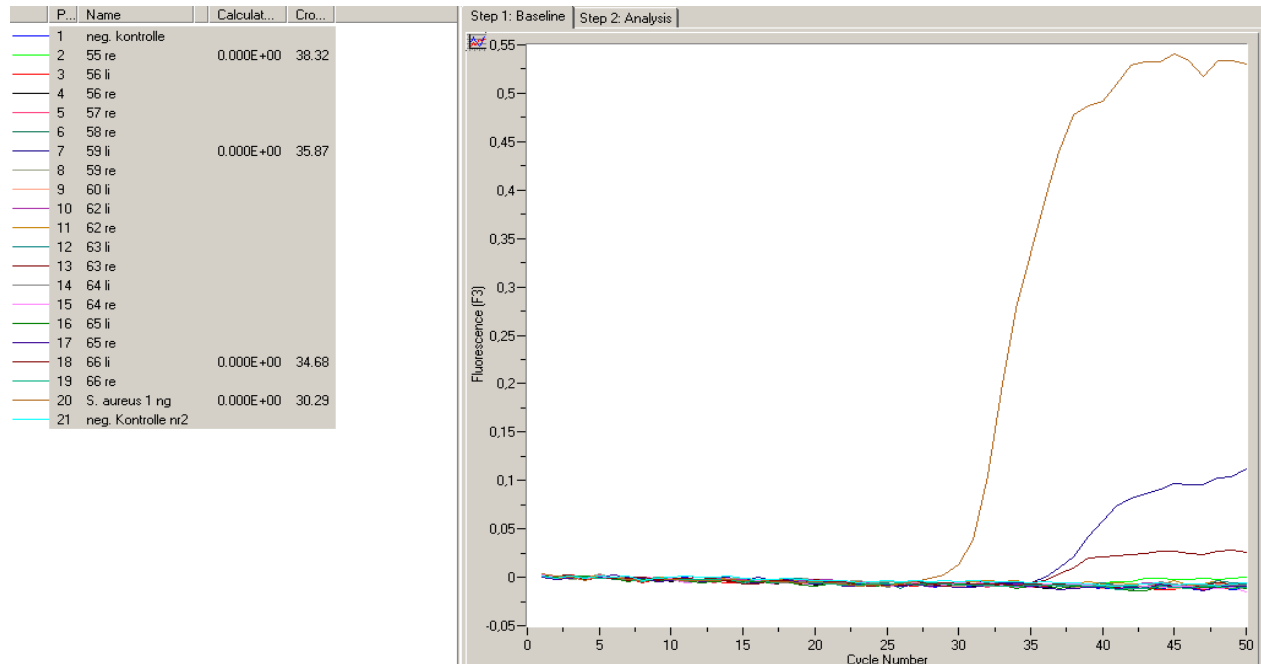
Tabelle 17: Vergleich von *nuc*-PCR und Sa442-PCR

	Sa442-PCR positiv	Sa442-PCR negativ	Summe
<i>nuc</i> -PCR positiv	4	6	10
<i>nuc</i> -PCR negativ	5	37	42
Summe	9	43	52

Fasst man beide PCRs zusammen und betrachtet diese als positiv, wenn mindestens eine der beiden PCRs positiv war, so beträgt die Sensitivität der PCR im Vergleich zur Bakterienkultur aus den Biopsien 83 % und die Spezifität 88 %. Details hierzu sh. Tabelle 18.

Tabelle 18: Vergleich der PCR gesamt mit der Kultur

	PCR gesamt positiv	PCR gesamt negativ	Summe
Kultur positiv	10	2	12
Kultur negativ	5	35	40
Summe	15	37	52

Abbildung 4: *nuc*-PCR der Proben 56-66

Die Grafik zeigt die Stärke des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der Zyklenzahl. Die braune Kurve stellt die Positivkontrolle dar. Die Negativkontrollen zeigen kein Fluoreszenzsignal. Als positiv gelten die Probe 59 links sowie 66 links.

3.4 FISH

Mit der FISH sollte eine weitere schnelle und spezifische Nachweismethode für Sa direkt aus dem Gewebe untersucht werden. Zunächst wurden Vorversuche mit herkömmlichen DNA-Sonden durchgeführt, bei denen u.a. verschiedene Lysereagenzien und Inkubationsbedingungen untersucht wurden. Anschließend wurden Versuche mit PNA-Sonden, die ein besseres Penetrationsverhalten in die Bakterien aufweisen, durchgeführt.

3.4.1 Ergebnisse der Vorversuche

Die Vorversuche wurden an Nativausstrichen von Sa bzw. SASCV sowie an Paraffingewebsschnitten von Polypengewebe, welches mit Sa infiziert wurde, durchgeführt. Es wurde eine Nachweisrate von 100 % erwartet. Mit dem unspezifischen Marker DAPI waren die Proben in 100 % positiv. Mit den Sa-spezifischen DNA-Sonden ließen sich der normale Phänotyp von Sa und SASCV nur unregelmäßig anfärben. Bei der Lyse mit dem Lysostaphin-Lysozym-Mix wurde Sa mit normalem Phänotyp 30-100 % angefärbt, SCV bis max. 40 %.

Mit der Mutanolysin-Lysozym-Lyse wurden bei Sa mit normalem Phänotyp keine konstanten Ergebnisse (10-80 % Anfärbung) erzielt, bei SCV wurden mit der ML-Lyse eine Anfärbung von 40-70 % erreicht. Die Hybridisierungszeit hatte keinen Einfluss auf die Menge der

angefärbten Bakterien. Somit konnten mit DNA-Sonden keine einheitlichen Ergebnisse mit Sa und SASCV erreicht werden, so dass beschlossen wurde die FISH mit PNA-Sonden zu testen, da diese leichter in Bakterien eindringen. Die genauen Ergebnisse der Vorversuche mit DNA-Sonden können der Tabelle 19 entnommen werden.

Tabelle 19: Ergebnisse der Vorversuche zur FISH mit DNA-Sonden

Datum	Lyse	T _L ¹	T _{Hyb} ²	Eubakterielle (EUB) Sonde (%) ³		Sa-spezif. Sonde (%) ³	
				Sa 825	SCV-1	Sa 825	SCV-1
30.5.	LL ⁴	15	90	30	10-20	30	10-20
1.6.	LL	20	90	30-50	5-10	30-50	5-10
1.6.	LL	20	120	30-50	5-10	30-50	5-10
8.6.	LL	20	90	50	5-10	50	5-10
1.6.	LL	25	90	80	5-10	80	5-10
1.6.	LL	25	120	70-80	5-10	70-80	5-10
8.6.	LL	30	90	90-100	20	90-100	20
8.6.	LL	40	90	50-60	40	50-60	40
8.6.	ML ⁵	20	90	10-20	60	10-20	60
8.6.	ML	20	90	80	70	80	70
14.6.	ML	20	90	80	70	80	70
14.6.	ML	20	90	10-30	50	10-30	50
1.6.	ML	30	90	20	50-70	20	50-70
1.6.	ML	30	120	10	40	10	40

¹ T_L= Lysezeit in Min

² T_{Hyb}= Hybridisierungszeit in Min

³ die Zahlen entsprechen jeweils den % an angefärbten Bakterien im Vergleich zu DAPI (100 %)

⁴ LL= Lysozym-Lysostaphin-Mix

⁵ ML= Mutanolysin-Lysozym-Mix

Direktausstriche von Sa mit normalem Phänotyp und SASCV ergaben mit den Sa spezifischen PNA Sonden eine Anfärbung von 60-80 %. Versuche mit Paraffinschnitten von mit Sa gespicktem Gewebe erzielten eine Anfärbung von 50-60 % nach Lyse des Gewebes mit Proteinase K sowie Bebrütung über Nacht. Bei den Versuchen mit Gewebe wurde zum Teil eine starke Autofluoreszenz in den dichten Gewebsbereichen festgestellt. Objektträger, die zur Unterdrückung der Autofluoreszenz mit Osmiumtetroxid vorbehandelt wurden, zeigten eine Anfärbung von 10-20 % der Bakterien. Die Ergebnisse der Vorversuche mit PNA-Sonden können der Tabelle 20 entnommen werden.

Tabelle 20: Ergebnisse der Vorversuche zur FISH mit PNA-Sonden

Datum	Probe	Vorbehandlung	T _H ¹	Sa-PNA (%) ²		Bemerkungen
				Sa 825	SCV	
23.6	BK ³	Keine	90	70	80	
	BK	Keine	90	60	60	
26.6.	G ⁴	Prot.K	ü.N. ⁵	0	k.P. ⁶	
	G	Prot.K	ü.N.	20-30	k.P.	
29.6.	G	Keine	90	40	k.P.	starke AF ⁷
	G	Keine	90	20	k.P.	starke AF
	G	Prot.K	90	30	k.P.	starke AF
	G	Prot.K	90	10	k.P.	starke AF
3.7.	G	Prot.K	90	50-60	k.P.	
	G	Prot.K	ü.N.	50-60	k.P.	
	G	Prot.K+ Osm. ⁸	90	10	k.P.	Schwache Leuchtkraft der Sonden
	G	Prot.K+ Osm	ü.N.	20	k.P.	Schwache Leuchtkraft der Sonden

¹ T_H = Hybridisierungszeit in Min

² die Zahlen entsprechen jeweils den % an angefärbten Bakterien im Vergleich zu DAPI (100 %)

³ BK = methanolfixierte Ausstriche von Bakterienkolonien

⁴ G = Entparaffinisierte Gewebsschnitte von mit Sa gespiktem Gewebe

⁵ ü.N.= über Nacht Inkubation (ca. 18 h)

⁶ k.P.= keine Präparate mit Gewebe und SCV untersucht

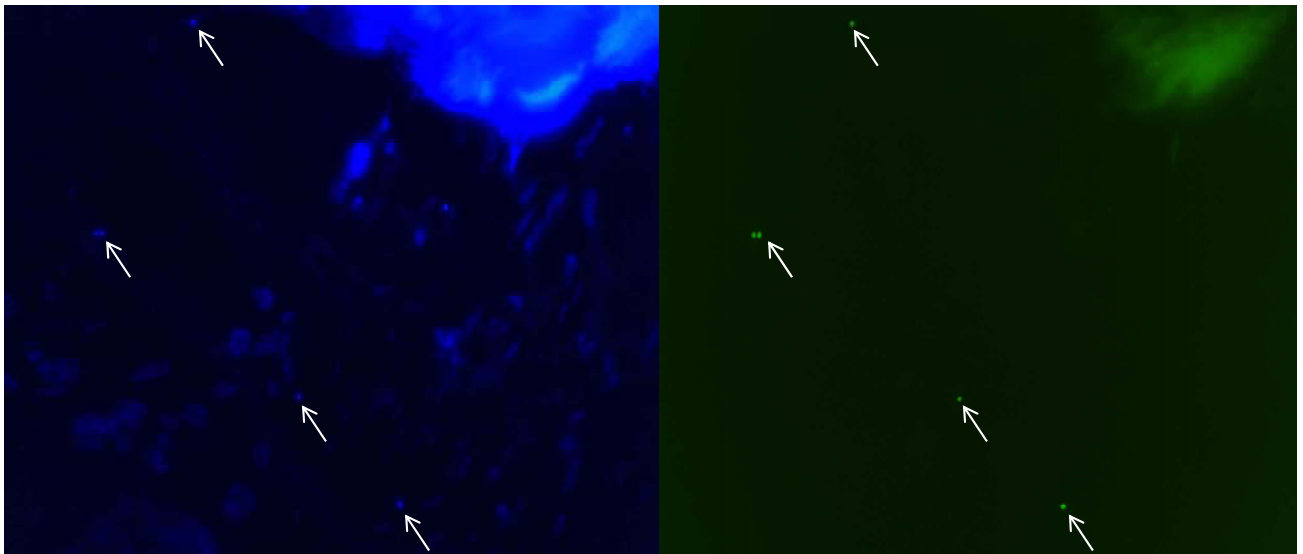
⁷ AF = Autofluoreszenz des Gewebes

⁸ Osm.= Behandlung mit Osmiumtetroxid

3.4.2 Ergebnisse der FISH mit Patientenproben

Insgesamt wurden Paraffinschnitte von 51 Patienten mit der FISH untersucht. Es wurden die PNA-Sonden verwendet. Von diesen 51 Patienten waren 10 in der Kultur der Biopsie positiv. Eine der untersuchten Proben war in der FISH positiv. Diese Probe war kulturell in der Lavage positiv und in der Biopsie negativ. Ein Bild der positiven Probe ist in Abbildung 5 dargestellt. Es kann nicht festgestellt werden, ob die Keime intrazellulär oder extrazellulär liegen.

Abbildung 5: Positive Probe in der FISH



Die linke Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines mit DAPI gefärbten Gewebsschnittes, die rechte Abbildung zeigt denselben Ausschnitt mit der Sa-spezifischen Sonde. Die Pfeile zeigen auf Sa.

3.5 Nachweis von intrazellulärem Sa in humanen Zellen

3.5.1 Lyse der Zellen

Zunächst wurden einige Verfahren zur Lyse der Zellen untersucht, damit die intrazellulären Bakterien angezüchtet werden konnten. Bei der Zugabe von Triton X 100, unabhängig von der Inkubationszeit, sowie der Zugabe von SDS kam es zur Bildung eines Zellklumpens, der nicht pipettierbar war. Nach der Zugabe von Aqua dest. waren auf dem Objektträger wenige Zellen erkennbar, von denen die meisten noch intakt waren. Auch hier kam es zur Ausbildung eines Zellklumpens, so dass nur wenige Zellen auf den Objektträger aufgebracht werden konnten. Bei der Lyse der Zellen mit Aqua dest. und anschließender mechanischer Lyse der Zellen durch Aspiration der Suspension durch eine 27G Nadel zeigte sich keine Koagelbildung und auf dem Objektträger waren fast alle Zellen mit Trypanblau angefärbt,

also lysiert (ermittelte Zellzahl nach Lyse mit Aqua dest. und Nadel $1,7 \times 10^6$ Zellen von ursprünglich 4×10^6 Zellen).

3.5.2 Viabilität der Bakterien nach Lysebehandlung der Zellen

Da die Zellen zur Freisetzung der Bakterien lysiert werden mussten, wurden Versuche durchgeführt um festzustellen, ob die Lysebehandlung mit Aqua dest. und anschließender mechanischer Lyse mittels Nadelaspiration die Bakterien abtötet. Nach der Lysebehandlung konnten 2×10^9 KBE von etwa 1×10^8 ursprünglich eingesetzten Bakterien nachgewiesen werden. Die Bakterien wurden nicht abgetötet. Somit erwies sich die Lysebehandlung mit Aqua dest. und anschließender mechanischer Lyse sowohl hinsichtlich der Lyseeffizienz als auch hinsichtlich Viabilitätserhalt der untersuchten Keime als überlegen und wurde in den Folgeversuchen eingesetzt.

3.5.3 Bestimmung des geeigneten SCV-Bakterienstammes

Für die Zellkulturversuche standen zwei Sa-Stämme zur Verfügung, die jeweils einen Elternstamm mit normalem Phänotyp und einen SCV-Phänotyp umfassten. Sie waren von einem CF-Patienten isoliert worden. Bei SCV-B handelt es sich um den SCV-Phänotyp des Elternstammes Sa-B mit normalem Phänotyp, ebenso ist SCV-R der zugehörige SCV-Stamm von Sa-R. Nach der Infektion von MM6 Zellen mit SCV-B und Sa-B konnten nach zweistündiger Inkubationszeit, Abtötung der extrazellulären Bakterien mit einem nicht-membrangängigen Antibiotikum und anschließender Lyse der Zellen etwa 6×10^6 KBE SCV-B und 4×10^7 KBE Sa-B nachgewiesen werden. Bei SCV-R waren 7×10^6 KBE und bei Sa-R 2×10^6 KBE intrazellulär nachweisbar. Da bei Sa-R und SCV-R das Invasionsvermögen annähernd gleich war, erwies sich der Stamm Sa-R mit zugehörigem SCV-R als geeigneter für die folgenden Untersuchungen.

3.5.4 Wachstum von BEAS-2B Zellen

Um die Anzahl von Zellen nach zweitägiger Bebrütung feststellen zu können, und aus dieser Zellzahl dann die benötigte Bakterienzahl bestimmen zu können, wurde ein Vorversuch zum Wachstum von B2B Zellen durchgeführt. Die Beurteilung der Zellen unter dem Mikroskop nach zweitägiger Bebrütung ergab bei allen Flaschen mit einer Ausgangszellmenge von 1×10^6 einen konfluenten Zellrasen mit spindelförmigen Zellen. Eine Auszählung dieser Flaschen ergab im Durchschnitt $1,8 \times 10^6$ Zellen je Flasche. Bei der Inkubation von 5×10^6 Zellen für zwei Tage waren auch diese konfluent und zeigten eine eher kugelige Form und lagen dichter beisammen. Das Auszählen ergab eine durchschnittliche Zellzahl von etwa 1×10^7 . Somit

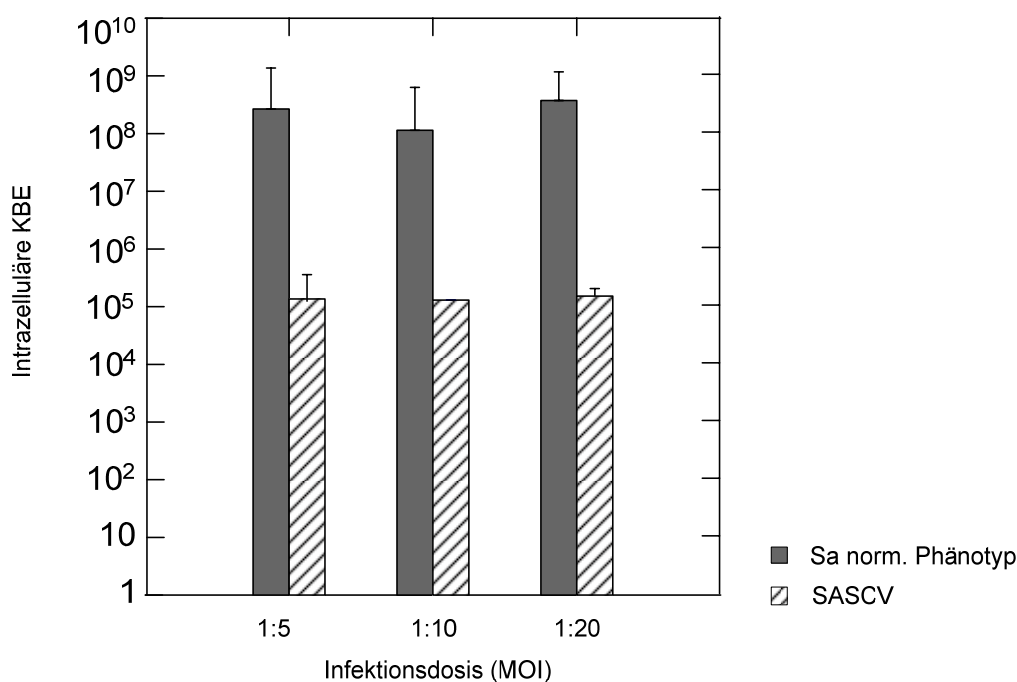
erwies sich eine Zellzahl von 1×10^6 als günstiger und wurde in den Folgeversuchen eingesetzt.

3.5.5 Internalisierung in MM6 Zellen

Um das Invasionsvermögen von Sa und SASCV in MM6 Zellen zu charakterisieren, wurde die intrazelluläre Keimzahl bei verschiedenen Infektionsdosen (1:5, 1:10 und 1:20) nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden sowie unterschiedliche Inkubationszeiten (1 h, 2 h, 3 h und 24 h) bei einer Infektionsdosis von 1:10 untersucht. Extrazelluläre Keime wurden nach der Inkubationszeit durch Zugabe des rein extrazellulär wirksamen Antibiotikums Gentamycin bei Sa bzw. Lysostaphin bei SCV abgetötet. Die Überprüfung der Wirksamkeit des Antibiotikums ergab in allen Versuchen eine Abtötung der extrazellulären Keime von 99,8 %. Das bedeutet, dass nach Abtötung der extrazellulären Keime und anschließender Zellyse tatsächlich nur die zum Zeitpunkt der Antibiotikazugabe intrazellulär gelegenen Keime erfasst wurden.

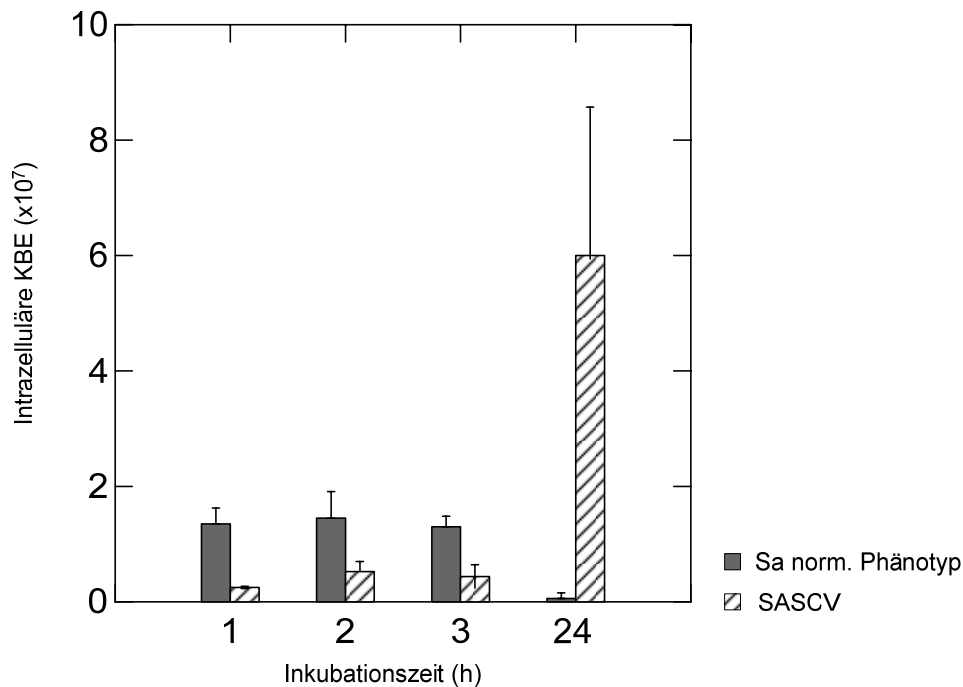
Die Menge intrazellulärer Keime war im untersuchten Dosisbereich unabhängig von der Infektionsdosis (Abbildung 6). Nach der für diese Versuche gewählten Inkubationszeit von 2 h war der normale Sa Phänotyp in sehr viel höherer Anzahl intrazellulär nachweisbar als der SCV-Phänotyp ($p < 0,001$).

Abbildung 6: Ergebnisse der Vorversuche mit MM6 Zellen mit unterschiedlichen Infektionsdosen, abgebildet ist die Anzahl intrazellulärer KBE sowie der Standardfehler, Inkubationszeit: 2 h



Die Inkubationszeit hatte sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Anzahl intrazellulärer Keime, je nachdem ob es sich um Sa oder um SASCV handelte. War nach 1 h, 2 h und 3 h jeweils mehr Sa (ca. $1,5 \times 10^7$ KBE) intrazellulär nachweisbar als SASCV (ca. $0,4 \times 10^7$ KBE), kehrte sich diese Relation nach 24 h Bebrütung um (Abbildung 7). Nach 24 h war Sa in sehr geringer Menge (ca. 6×10^5 KBE) intrazellulär nachweisbar, dafür eine vergleichsweise sehr hohe Zahl von 6×10^7 KBE des SCV-Phänotyps. Bei Sa zeigten zusätzliche Versuche, dass dieser bereits nach 30 min intrazellulär nachweisbar war.

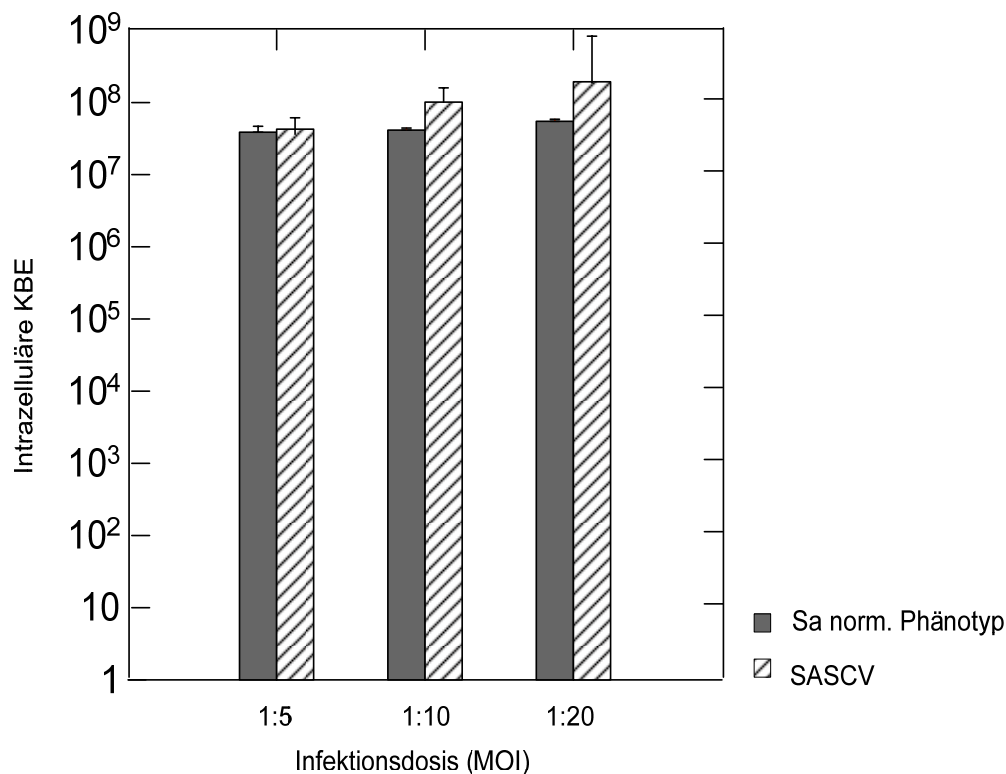
Abbildung 7: Ergebnisse der Vorversuche mit MM6 Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten, abgebildet ist die Anzahl intrazellulärer KBE sowie der Standardfehler, MOI: 1:10



3.5.6 Internalisierung in B2B Zellen

Um das Internalisierungsverhalten von Sa und SASCV in B2B Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene Infektionsdosen und unterschiedliche Inkubationszeiten angewandt. Auch hier wurde nach der Inkubation das Antibiotikum Gentamycin (normaler Phänotyp von Sa) bzw. Lysostaphin bei SASCV zur Abtötung der extrazellulären Bakterien angewendet. Bei den Invasionsversuchen mit B2B Zellen wurden nach Zugabe des Antibiotikums 99,8 % der extrazellulären Keime abgetötet. Versuche zum Einfluss der eingesetzten Infektionsdosis auf die Menge intrazellulärer Bakterien ergaben, dass die Menge intrazellulärer Keime bei SASCV und bei dem normalen Phänotyp von Sa unabhängig von der MOI ist. Es konnten in etwa gleich viele SASCV wie Sa mit normalem Phänotyp intrazellulär nachgewiesen werden (sh. Abbildung 8).

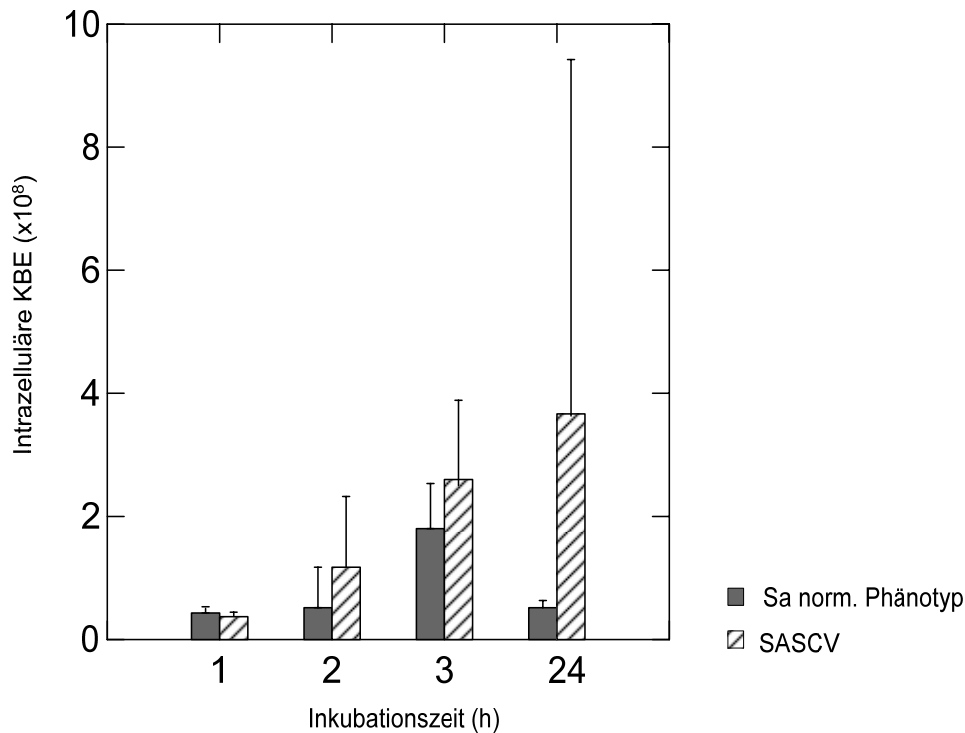
Abbildung 8: Ergebnisse der Vorversuche mit B2B Zellen zur Bestimmung der MOI, abgebildet sind die Menge intrazellulärer KBE sowie der Standardfehler



Hinsichtlich der Inkubationszeiten zeigte sich eine ähnliche Kinetik wie bei MM6 Zellen. Bei dem normalen Phänotyp von Sa wurden nach 24 h weniger intrazelluläre Keime nachgewiesen ($5,2 \times 10^7$ KBE) als nach 3 h ($1,9 \times 10^8$ KBE). Die Anzahl von Sa war nach 1 h etwas höher als die von SASCV, nach 2 h, 3 h und 24 h lag die Anzahl intrazellulärer SASCV deutlich höher als die Anzahl intrazellulärer Sa vom normalen Phänotyp (Abbildung 9). Nach

24 h Bebrütung wurden in etwa gleich viele KBE von SASCV nachgewiesen wie nach 3 h Bebrütung ($3,7 \times 10^8$ KBE nach 24 h gegenüber $2,6 \times 10^8$ KBE nach 3 h Bebrütung).

Abbildung 9: Ergebnisse der Vorversuche mit B2B Zellen zur Bestimmung der Inkubationszeit, abgebildet sind die Menge intrazellulärer KBE sowie der Standardfehler



3.6 Proteinbestimmungen

Um die zellulären Wirkungen einer Sa-Infektion näher zu untersuchen, wurden MM6 Zellen und B2B Zellen mit unterschiedlichen Stämmen von Sa und SASCV sowie mit dem apathogenen Keim S.epi und Silikapartikeln als avitalen Stimulus infiziert. Bei der Kontrolle wurden die Zellen gleich lang bebrütet wie bei den Infektionsversuchen. Die Kontrolle mit Silikapartikeln diente dazu, die zelluläre Reaktion auf einen abiotischen Phagozytosestimulus zu untersuchen. Nach der Inkubationszeit von 24 h wurde der Zellkulturüberstand gewonnen und in diesem elf verschiedene Zytokine bestimmt.

3.6.1 MM6 Zellen

Nach einbringen von Silikapartikeln kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einem Anstieg von IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ und TNF- α . (Tabelle 21)

Tabelle 21: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von MM6 Zellen nach Exposition mit Silikapartikeln. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt

	Kontrolle(n=12)	Silikapartikel (n=6)	p=
IL-1β	2,0 (0-18,7)	113,3 (8,7-114,5)	0,002
IL-2	21,4 (0-31,4)	24,1 (17,7-51,2)	0,223
IL-4	0 (0-6,6)	0 (0-63,9)	0,149
IL-5	6,8 (0-13,7)	11,06 (6,0-26,5)	0,073
IL-6	0 (0-15,2)	53,4 (35,2-63,6)	0
IL-8	2458,2 (564,4-5885,6)	6989,1 (2409,2-10412,5)	0,031
IL-10	20,8 (18,6-32,9)	20,6 (20,3-23,9)	0,888
IL-12	0 (0-0)	0 (0-16,4)	0,157
IFN-γ	30,0 (0-42,2)	34,0 (31,6-44,8)	0,009
TNF-α	16,3 (15,0-18,2)	17,5 (16,7-21,1)	0,021
TNF-β	0 (0-12,4)	0 (0-0)	0,480

Nach Infektion mit S.epi. kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einem Anstieg von IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α und TNF- β (Tabelle 22).

Tabelle 22: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von MM6 Zellen nach Infektion mit S.epi. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt

	Kontrolle (n=12)	S.epi (n=6)	p=
IL-1β	2,0 (0-18,7)	14155,0 (12454,3-18929,0)	0,001
IL-2	21,4 (0-31,4)	20,7 (13,6-28,5)	0,851
IL-4	0 (0-6,6)	3,3 (0-19,7)	0,039
IL-5	6,8 (0-13,7)	12,9 (10,4-18,4)	0,003
IL-6	0 (0-15,2)	4177,3 (1980,2-8192,9)	0
IL-8	2458,2 (564,4-5885,6)	4340,2 (3594,8-4546,1)	0,055
IL-10	20,8 (18,6-32,9)	45,8 (29,1-148,2)	0,001
IL-12	0 (0-0)	0 (0-2,2)	0,157
IFN-γ	30,0 (0-42,2)	29,5 (0-34,2)	0,925
TNF-α	16,3 (15,0-18,2)	11832,3 (2567,8-30092,2)	0,001
TNF-β	0 (0-12,4)	34,9 (25-41,1)	0

Eine Infektion von MM6 Zellen mit dem normalen Phänotyp von Sa führte zu einem Anstieg aller Zytokine (Tabelle 23).

Tabelle 23: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von MM6 Zellen nach Infektion mit dem normalen Phänotyp von Sa. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt

	Kontrolle (n=12)	Sa norm. Phänotyp (n=6)	p=
IL-1β	2,0 (0-18,7)	7472,2 (6064,8-14741,2)	0,001
IL-2	21,4 (0-31,4)	173,6 (96,2-212,8)	0,001
IL-4	0 (0-6,6)	95,74 (52,9-113,7)	0
IL-5	6,8 (0-13,7)	32,4 (23,5-34,4)	0,001
IL-6	0 (0-15,2)	16283,2 (11420,0-21686,3)	0
IL-8	2458,2 (564,4-5885,6)	16926,9 (11006,1-22219,4)	0,001
IL-10	20,8 (18,6-32,9)	148,9 (91,5-276,7)	0,001
IL-12	0 (0-0)	20 (10,3-25,2)	0
IFN-γ	30,0 (0-42,2)	528,4 (266,4-678,9)	0,001
TNF-α	16,3 (15,0-18,2)	10336,1 (7873,2-25730,0)	0,001
TNF-β	0 (0-12,4)	822,4 (466,9-1134,9)	0

Eine Infektion von MM6 Zellen mit Sa positiv für Enterotoxin C (SASAG) führte zu einer vermehrten Ausschüttung aller Zytokine außer IL-10 (Tabelle 24).

Tabelle 24: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von MM6 Zellen nach Infektion mit superantigen bildendem Sa. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt

	Kontrolle (n=12)	SASAG (n=6)	p=
IL-1β	2,0 (0-18,7)	14150,6 (10463,0-16979,6)	0,001
IL-2	21,4 (0-31,4)	127,7 (104,6-143,5)	0,001
IL-4	0 (0-6,6)	51,1 (24,6-61,7)	0
IL-5	6,8 (0-13,7)	32,0 (20,2-35,2)	0,001
IL-6	0 (0-15,2)	2004,3 (833,6-5461,7)	0
IL-8	2458,2 (564,4-5885,6)	11919,9 (10628,6-13605,7)	0,001
IFN-γ	30,0 (0-42,2)	267,1 (226,6-298,7)	0,001
IL-10	20,8 (18,6-32,9)	21,1 (20,3-22,9)	0,779
IL-12	0 (0-0)	19,8 (13,7-22,7)	0
TNF-α	16,3 (15,0-18,2)	25252,5 (7447,5-35509,8)	0,001
TNF-β	0 (0-12,4)	158,1 (139,5-172,6)	0

Nach Infektion mit SASCV konnte ein Anstieg aller gemessenen Zytokine detektiert werden (Tabelle 25).

Tabelle 25: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von MM6 Zellen nach Infektion mit SASCV. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt

	Kontrolle (n=12)	SASCV (n=6)	p=
IL-1β	2,0 (0-18,7)	13178,9 (10135,0-15771,6)	0,001
IL-2	21,4 (0-31,4)	99,1 (70,8-114,1)	0,001
IL-4	0 (0-6,6)	48,9 (36,0-88,4)	0
IL-5	6,8 (0-13,7)	24,6 (17,7-34,4)	0,001
IL-6	0 (0-15,2)	16158,9 (13908,0-36579,2)	0
IL-8	2458,2 (564,4-5885,6)	8131,4 (7127,4-9999,4)	0,001
IL-10	20,8 (18,6-32,9)	128,5 (50,5-164,9)	0,001
IL-12	0 (0-0)	14,3 (4,3-29,2)	0
IFN-γ	30,0 (0-42,2)	216,8 (136,0-324,8)	0,001
TNF-α	16,3 (15,0-18,2)	2438,0 (1240,1-5013,3)	0,001
TNF-β	0 (0-12,4)	344,53 (126,6-474,6)	0

Die Infektion mit dem Elternstamm Sa-R führte zu einer vermehrten Ausschüttung aller gemessenen Zytokine (Tabelle 26).

Tabelle 26: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von MM6 Zellen nach Infektion mit Sa Elternstamm. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt

	Kontrolle (n=12)	Sa Elternstamm (n=6)	p=
IL-1β	2,0 (0-18,7)	16183,9 (13960,0-17829,4)	0,001
IL-2	21,4 (0-31,4)	226,2 (205,8-240,1)	0,001
IL-4	0 (0-6,6)	153,6 (134,1-164,5)	0
IL-5	6,8 (0-13,7)	377,8 (33,6-49,5)	0,001
IL-6	0 (0-15,2)	3201,2 (1380,3-7298,5)	< 0,001
IL-8	2458,2 (564,4-5885,6)	18224,4 (16190,0-23952,7)	0,001
IL-10	20,8 (18,6-32,9)	28,2 (24,3-33,6)	0,009
IL-12	0 (0-0)	38,1 (27,0-42,2)	0
IFN-γ	30,0 (0-42,2)	654,5 (598,6-780,2)	0,001
TNF-α	16,3 (15,0-18,2)	28792,1 (21625,61-50507,3)	0,001
TNF-β	0 (0-12,4)	975,5 (792,9-1147,9)	0

Vergleicht man die Zytokinausschüttung von MM6 Zellen die mit SASCV oder dem Elternstamm infiziert wurden, so wird nach SCV-Infektion mehr IL-6 und IL-10 ausgeschüttet, nach Infektion mit dem Elternstamm werden IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-12, TNF- α und TNF- β vermehrt gebildet (Tabelle 27).

Tabelle 27: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von MM6 Zellen nach Infektion mit SASCV im Vergleich zu dem Elternstamm mit normalem Phänotyp. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt

	Sa Elternstamm (n=6)	SASCV (n=6)	p=
IL-1β	16183,9 (13960,0-17829,4)	13178,9 (10135,0-15771,6)	0,008
IL-2	226,2 (205,8-240,1)	99,1 (70,8-114,1)	0,004
IL-4	153,6 (134,1-164,5)	48,9 (36,0-88,4)	0,004
IL-5	377,8 (33,6-49,5)	24,6 (17,7-34,4)	0,008
IL-6	3201,2 (1380,3-7298,5)	16158,9 (13908,0-36579,2)	0,004
IL-8	18224,4 (16190,0-23952,7)	8131,4 (7127,4-9999,4)	0,004
IL-10	28,2 (24,3-33,6)	128,5 (50,5-164,9)	0,004
IL-12	38,1 (27,0-42,2)	14,3 (4,3-29,2)	0,006
IFN-γ	654,5 (598,6-780,2)	216,8 (136,0-324,8)	0,004
TNF-α	28792,1 (21625,61-50507,3)	2438,0 (1240,1-5013,3)	0,004
TNF-β	975,5 (792,9-1147,9)	344,53 (126,6-474,6)	0,004

Eine Infektion mit allen Sa-Stämmen löste sowohl die Bildung von T_H1 als auch von T_H2 Zytokinen aus, so dass keine Polarisation beobachtet werden konnte.

3.6.2 B2B Zellen

Nach der Stimulation von B2B Zellen mit Silikapartikeln wurden alle hier gemessenen Zytokine außer IL-10 und TNF- β vermehrt ausgeschüttet (Tabelle 28).

Tabelle 28: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von B2B Zellen nach Stimulation mit Silikapartikeln. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt

	Kontrolle (n=12)	Silikapartikel (n=6)	p=
IL-1β	0 (0-0)	0 (0-2,5)	0,040
IL-2	0 (0-25,7)	44,9 (34,7-74,8)	0
IL-4	0 (0-25,0)	40,1 (0-62,9)	0,005
IL-5	0 (0-0)	4,3 (0-14,1)	0,002
IL-6	16,9 (0,2-102,3)	343,9 (9,3-433,9)	0,011
IL-8	124,7 (54,2-386,8)	751,2 (82,1-1204,6)	0,015
IL-10	0 (0-0)	0 (0-2,21)	0,157
IL-12	0 (0-0)	12,5 (0-21,3)	0
IFN-γ	0 (0-8,5)	18,5 (0-42,0)	0,006
TNF-α	0 (0-0)	0,4 (0-8,3)	0,009
TNF-β	0 (0-0)	0 (0-0)	1

Eine Infektion mit S.epi führte zu einem Anstieg von IL-1 β , IL-6 und IL-8 (Tabelle 29).

Tabelle 29: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von B2B Zellen nach Infektion mit S.epi. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt

	Kontrolle (n=12)	S.epi (n=6)	p=
IL-1β	0 (0-0)	154,7 (95,6-217,5)	0
IL-2	0 (0-25,7)	16,6 (0-25,7)	0,074
IL-4	0 (0-25,0)	0 (0-26,2)	1
IL-5	0 (0-0)	0 (0-0)	1
IL-6	16,9 (0,2-102,3)	124,8 (75,1-208,4)	0,001
IL-8	124,7 (54,2-386,8)	541,2 (329,3-969,9)	0,002
IL-10	0 (0-0)	0 (0-0)	1
IL-12	0 (0-0)	0 (0-0)	1
IFN-γ	0 (0-8,5)	0 (0-0)	0,48
TNF-α	0 (0-0)	0 (0-0)	1
TNF-β	0 (0-0)	0 (0-0)	1

Im Vergleich zu den Negativkontrollen führte eine Infektion mit dem normalen Phänotyp von Sa zu einem Anstieg von allen Zytokinen außer IL-10 (Tabelle 30)

Tabelle 30: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von B2B Zellen nach Infektion mit Sa mit normalem Phänotyp. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt

	Kontrolle (n=12)	Sa norm. Phänotyp (n=6)	p=
IL-1β	0 (0-0)	8,6 (1,6-13,9)	0
IL-2	0 (0-25,7)	87,1 (74,3-101,3)	0
IL-4	0 (0-25,0)	51,3 (48,6-63,4)	0
IL-5	0 (0-0)	24,2 (9,7-39,1)	0
IL-6	16,9 (0,2-102,3)	1188,8 (56,3-1470,2)	0,001
IL-8	124,7 (54,2-386,8)	7695,1 (4450,4-13312,6)	0,001
IL-10	0 (0-0)	0 (0-1)	0,157
IL-12	0 (0-0)	30,2 (25,8-58,3)	0
IFN-γ	0 (0-8,5)	220,1 (180,2-258,4)	0
TNF-α	0 (0-0)	46,2 (37,0-73,7)	0
TNF-β	0 (0-0)	219,1 (169,7-502,5)	0

Die Infektion von B2B Zellen mit superantigen bildendem Sa führte zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ sowie TNF- α und - β (Tabelle 31).

Tabelle 31: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von B2B Zellen nach Infektion mit superantigenbildendem Sa. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt

	Kontrolle (n=12)	SASAG (n=6)	p=
IL-1β	0 (0-0)	76,4 (62,7-86,6)	0
IL-2	0 (0-25,7)	35,3 (0-53,6)	0,003
IL-4	0 (0-25,0)	22,2 (0-22,6)	0,421
IL-5	0 (0-0)	0 (0-0)	1
IL-6	16,9 (0,2-102,3)	118,2 (90,0-139,9)	0,001
IL-8	124,7 (54,2-386,8)	1328,3 (1040,0-1596,1)	0,001
IL-10	0 (0-0)	0 (0-0)	1
IL-12	0 (0-0)	0 (0-0)	1
IFN-γ	0 (0-8,5)	46,7 (19,7-74,6)	0
TNF-α	0 (0-0)	6,2 (1,3-13,2)	0
TNF-β	0 (0-0)	0,6 (0-15,9)	0,009

Ein Anstieg aller Zytokine außer IL-10 konnte nach Infektion mit SASCV gemessen werden (Tabelle 32).

Tabelle 32: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von B2B Zellen nach Infektion mit SASCV. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt

	Kontrolle (n=12)	SASCV (n=6)	p=
IL-1β	0 (0-0)	7,2 (0-21,8)	0,009
IL-2	0 (0-25,7)	82,9 (50,4-116,4)	0
IL-4	0 (0-25,0)	34,4 (22,6-39,9)	0,002
IL-5	0 (0-0)	0,3 (0-8,8)	0,009
IL-6	16,9 (0,2-102,3)	470,6 (138,2-709,9)	0,001
IL-8	124,7 (54,2-386,8)	6456,6 (2625,4-9548,0)	0,001
IL-10	0 (0-0)	0 (0-0)	1
IL-12	0 (0-0)	12,8 (0-28,9)	0,002
IFN-γ	0 (0-8,5)	162,9 (115,1-379,5)	0
TNF-α	0 (0-0)	52,6 (19,1-95,2)	0
TNF-β	0 (0-0)	226,9 (94,8-527,0)	0

Auch nach Infektion mit dem Elternstamm von SASCV wurden alle Zytokine bis auf IL-10 vermehrt ausgeschüttet.

Tabelle 33: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von B2B Zellen nach Infektion mit dem Elternstamm von SASCV mit normalem Phänotyp. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt

	Kontrolle (n=12)	Sa Elternstamm (n=6)	p=
IL-1β	0 (0-0)	35,0 (25,0-64,1)	0
IL-2	0 (0-25,7)	114,2 (65,0-132,2)	0
IL-4	0 (0-25,0)	3,2 (29,9-39,9)	0
IL-5	0 (0-0)	3,9 (0-7)	0,002
IL-6	16,9 (0,2-102,3)	89,2 (55,3-118,2)	0,004
IL-8	124,7 (54,2-386,8)	3534,2 (3262,2-3915,7)	0,001
IL-10	0 (0-0)	0 (0-0)	1
IL-12	0 (0-0)	23,5 (0-45,4)	0
IFN-γ	0 (0-8,5)	214,2 (161,3-263,6)	0
TNF-α	0 (0-0)	90,2 (52,9-92,7)	0
TNF-β	0 (0-0)	180,1 (135,0-209,0)	0

Vergleicht man die Zytokinausschüttung von B2B Zellen nach Infektion mit SASCV bzw. dessen Elternstamm, so wird nach Infektion mit dem Elternstamm vermehrt IL-1 β und nach Infektion mit SASCV im Vergleich zum Elternstamm vermehrt IL-6 gebildet.

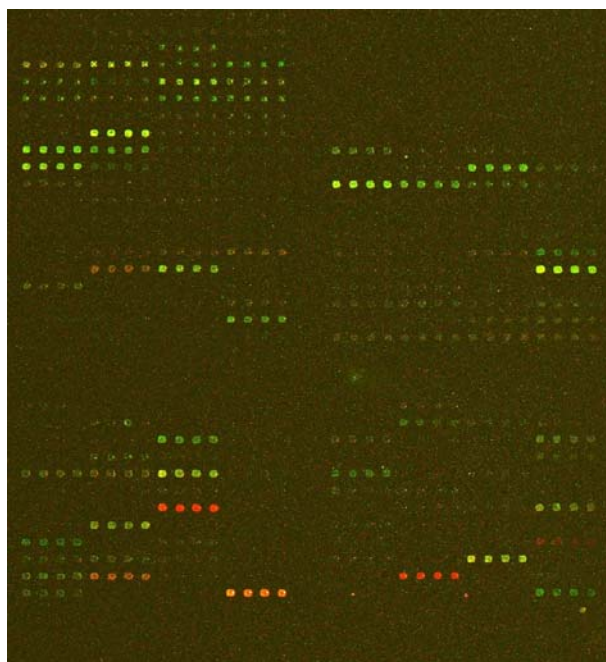
Tabelle 34: Konzentrationen der Zytokine in pg/ml im Zellkulturüberstand von B2B Zellen nach Infektion mit SASCV im Vergleich zu dem Elternstamm mit normalem Phänotyp. Angegeben sind der Median sowie Minimum und Maximum, der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt.

	Sa Elternstamm (n=6)	SASCV (n=6)	p=
IL-1β	35,0 (25,0-64,1)	7,2 (0-21,8)	0,004
IL-2	114,2 (65,0-132,2)	82,9 (50,4-116,4)	0,149
IL-4	3,2 (29,9-39,9)	34,4 (22,6-39,9)	1
IL-5	3,9 (0-7)	0,3 (0-8,8)	0,406
IL-6	89,2 (55,3-118,2)	470,6 (138,2-709,9)	0,004
IL-8	3534,2 (3262,2-3915,7)	6456,6 (2625,4-9548,0)	0,262
IL-10	0 (0-0)	0 (0-0)	1
IL-12	23,5 (0-45,4)	12,8 (0-28,9)	0,259
IFN-γ	214,2 (161,3-263,6)	162,9 (115,1-379,5)	0,262
TNF-α	90,2 (52,9-92,7)	52,6 (19,1-95,2)	0,172
TNF-β	180,1 (135,0-209,0)	226,9 (94,8-527,0)	1

3.7 Genexpressionsanalysen

Zur weiteren Untersuchung der Bedeutung von Sa bei der CRSNP⁺, wurden Genexpressionsanalysen aus Biopsieproben von Patienten durchgeführt. Es wurde jeweils ein Patient mit kulturellem Nachweis von Sa mit einem Patienten ohne kulturellen Sa-Nachweis verglichen.

Abbildung 10: Ausschnitt aus einem cDNA- Microarray eines Sa-positiven und eines Sa-negativen CRSNP⁺ Patienten



Grüne Spots:

Gene die bei der Sa negativen Probe im Vergleich zur Sa positiven Probe vermehrt exprimiert wurden

Rote Spots:

Gene die bei der Sa positiven Probe im Vergleich zur Sa negativen Probe vermehrt exprimiert wurden

Gelbe Spots:

Gene die sowohl bei der Sa negativen als auch bei Sa positiven Probe exprimiert wurden

Die Microarrayanalysen ergaben, dass bei Patienten mit Sa im Vergleich zu Patienten ohne Sa 29 Gene aufreguliert (2 %) und 31 Gene abreguliert (2 %) waren (Tabelle 35 und Tabelle 36).

Die Einteilung der Gene erfolgte nach Gene Ontology-Domänen, welche drei Hauptgruppen umfassen: „biological process“, „molecular function“ und „cell component“. In der Kategorie „biological process“ kamen aufregulierte Gene signifikant häufig in der Kategorie „antigen processing and presentation“ vor. In der Kategorie „molecular function“ waren Gene signifikant in der Kategorie „MHC class I receptor activity“ aufreguliert. Abregulierte Gene waren überrepräsentiert in der GO-Kategorie „response to unfolded protein“ und „glutathione transferase activity“. Die Einteilung der differentiell regulierten Gene kann der Abbildung 11 entnommen werden.

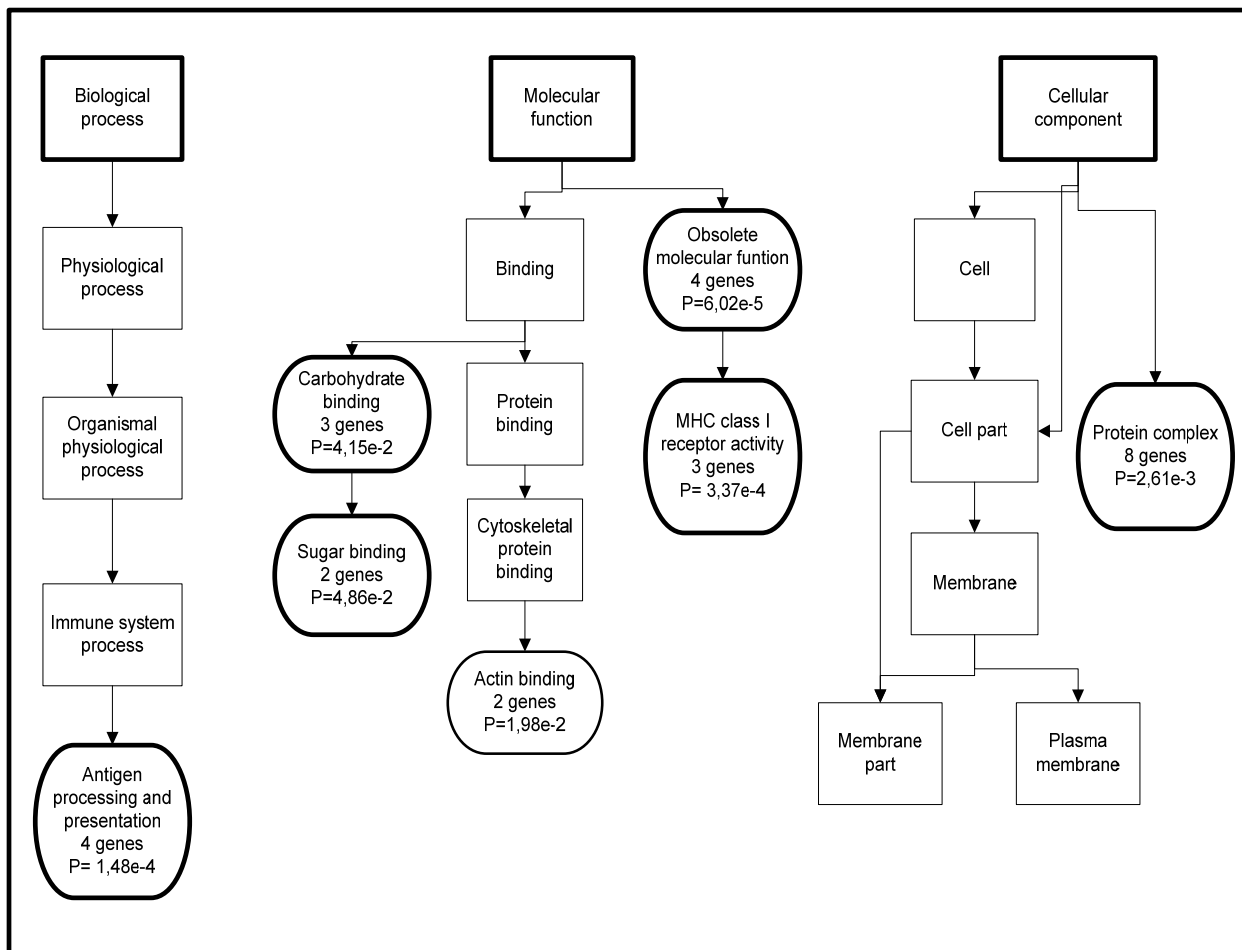
Tabelle 35: Liste der aufregulierten Gene bei CRSNP⁺ Patienten mit positivem Sa- Nachweis. Angegeben sind auch das Gensymbol und der log₂-Wert des Multiplikationsfaktors.

Gen Name	Symbol	Input Value
Fc fragment of IgG binding protein	FCGBP	3.476
major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	HLA-DPA1	1.848
ribosomal protein L32	RPL32	1.762
chemokine (C-C motif) ligand 13	CCL13	1.629
major histocompatibility complex, class I, A	HLA-A	1.61
thymosin, beta 4, X-linked	TMSB4X	1.567
ribosomal protein L37a	RPL37A	1.561
major histocompatibility complex, class I, F	HLA-F	1.549
scavenger receptor class B, member 1	SCARB1	1.401
cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage)	CSTo3	1.397
tumor protein, translationally-controlled 1	TPT1	1.332
lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	LGALS1	1.199
profilin 1	PFN1	1.16
eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	EEF1G	1.016
collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	COL3A1	.974
integrin, beta 5	ITGB5	.954
reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain	RCN1	.925
FK506 binding protein 1A, 12kDa	FKBP1A	.895
major histocompatibility complex, class I, E	HLA-E	.869
cyclin I	CCNI	.81
insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	.8
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2 (Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; beta polypeptide)	MS4A2	.784
fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)	FGFR1	.768
chemokine (C-X-C motif) ligand 1 pseudogene	CXCL1P	.727
calnexin	CANX	.703
S100 calcium binding protein A9	S100A9	.63
histamine N-methyltransferase	HNMT	.618

Tabelle 36: Liste der abregulierten Gene bei CRSNP⁺ Patienten mit positivem Sa-Nachweis. Angegeben sind auch das Gensymbol und der log₂-Wert des Multiplikationsfaktors.

Gen Name	Symbol	Input Value
retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	RARRES3	-.374
TNFRSF1A-associated via death domain	TRADD	-.377
v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT1	-.381
Sorcin	SRI	-.453
cold shock domain protein A	CSDA	-.489
growth hormone releasing hormone	GHRH	-.495
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3	PSMB3	-.537
cysteine-rich protein 1 (intestinal)	CRIP1	-.544
neuroepithelial cell transforming gene 1	NET1	-.548
integral membrane protein 2C	ITM2C	-.552
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2	PSMD2	-.606
glutathione S-transferase M4	GSTM4	-.628
keratin 7	KRT7	-.631
calpain, small subunit 1	CAPNS1	-.703
N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)	NAT1	-.774
programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	PDCD4	-.807
keratin 17	KRT17	-.856
heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	HSPE1	-.876
superoxide dismutase 2, mitochondrial	SOD2	-.878
cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	CDKN2B	-.895
high-mobility group box 2	HMGB2	-.916
CD68 molecule	CD68	-.975
glutathione S-transferase M2 (muscle)	GSTM2	-1.027
glutathione S-transferase M1	GSTM1	-1.131
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	DNAJA1	-1.135
keratin 4	KRT4	-1.236
heat shock 105kDa/110kDa protein 1	HSPH1	-1.454
glutathione S-transferase A2	GSTA2	-1.613
mucin 4, cell surface associated	MUC4	-1.619
anti-Mullerian hormone receptor, type II	AMHR2	-1.652

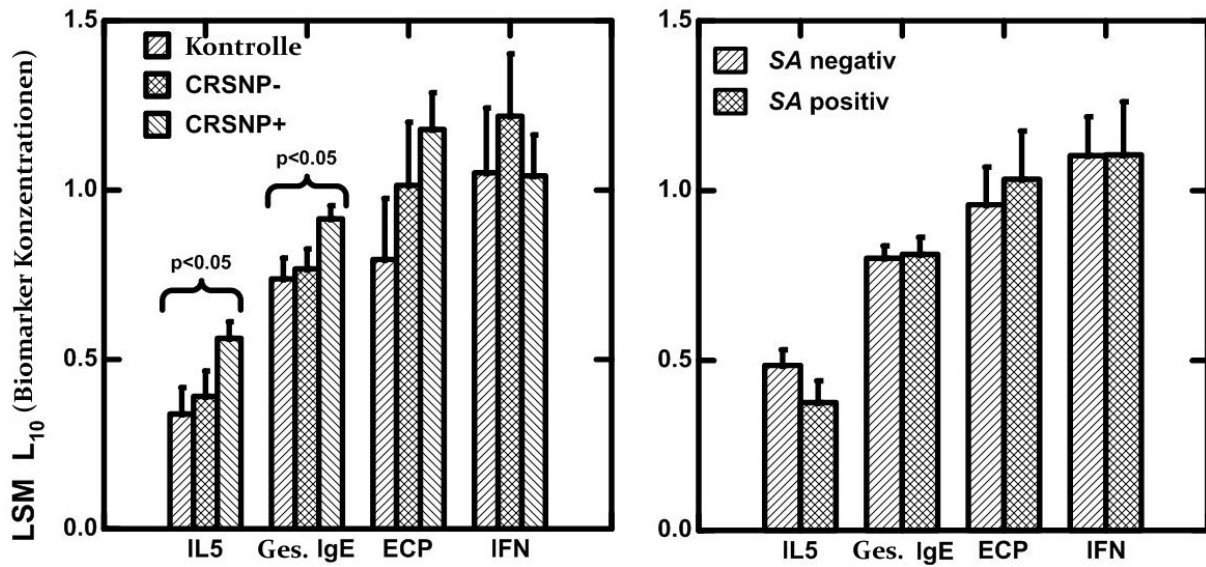
Abbildung 11: Differenziell regulierte Gene nach GO-Einteilung



3.8 Zytokinmuster in nasalen Lavagen

Die IL-5 Konzentration war bei CRSNP⁺ Patienten ($3,72 \pm 1,15$ ng/l) höher als bei CRSNP⁻ Patienten ($2,69 \pm 1,17$ ng/l) und Kontrollpatienten ($2,24 \pm 1,15$ ng/l, $p = 0,03$). Gesamt IgE zeigte ebenso erhöhte Konzentrationen bei CRSNP⁺ Patienten ($8,13 \pm 1,12$ kU/l) im Vergleich zu CRSNP⁻ ($5,75 \pm 1,05$ kU/l) und Kontrollpatienten ($5,5 \pm 1,02$ kU/l, $p = 0,02$). Es gab keine relevanten Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen bei ECP und IFN- γ ($p > 0,15$, Abbildung 12 linke Abbildung). Die Konzentrationen von G-CSF waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen Kontrollen (324 ± 1357 pg/ml) und CRSNP⁺ Patienten ($66,5 \pm 754$ pg/ml, $p = 0,10$) und CRSNP⁻ Patienten (57 ± 210 pg/ml, $p = 0,14$). Eotaxin wurde in der gleichen Konzentration bei CRS Patienten und Kontrollpatienten nachgewiesen (Kontrollen: $13 \pm 14,3$, CRSNP⁺: $8 \pm 16,0$, CRSNP⁻: $11 \pm 11,4$ pg/ml). Eine Infektion mit Sa hatte keinen Einfluss auf die Konzentration der Biomarker in den nasalen Lavagen ($p > 0,15$ bei allen Zytokinen, Abbildung 12 rechte Abbildung).

Abbildung 12 : Biomarkerkonzentrationen in nasalen Lavagen bei Patienten mit CRS und Kontrollen (linke Abbildung), und bei SA positiven und SA negativen Patienten (rechte Abbildung), LSM = least significant means, natürlicher Logarithmus der Biomarkerkonzentrationen von IL-5 [ng/l], IFN γ [ng/l], ECP [mg/l] und Gesamt- IgE [kU/l].



4. Diskussion

Die CRS ist eine häufige Erkrankung des Menschen, über deren Ätiologie trotz zahlreicher Untersuchungen noch viele Unklarheiten bestehen⁽¹⁾. Neben systemischen Wirtsfaktoren wie Allergien oder mukoziliarer Dysfunktion wird auch einer Infektion mit Mikroorganismen eine mögliche pathogenetische Rolle zugeschrieben. Neben Untersuchungen zum allgemeinen Keimspektrum der Nasenhöhle von Patienten mit CRS wurden Studien speziell zur Rolle des grampositiven Erregers *Staphylococcus aureus* und seiner Exotoxine bei der CRS durchgeführt. Es wurde geschildert, dass insbesondere Sa-Superantigene eine für die CRSNP⁺ typische T_H2- Polarisation verursachen. Es wurde darüber hinaus berichtet, dass ein intrazelluläres Reservoir dieses normalerweise extrazellulär vorkommenden Keimes für die Chronizität der Erkrankung verantwortlich sein könnte^(29;30;40). Spezialisiert auf intrazelluläres Überleben ist der Small Colony Variant Phänotyp von Sa⁽³³⁾. Eine Rolle dieser natürlich vorkommenden Variante von Sa bei der CRS wäre somit denkbar.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, aktuelle Daten zum Keimspektrum der CRS bei Patienten der Ulmer Universitätsklinik zu ermitteln. Darüber hinaus sollte speziell die Bedeutung von Sa und SASCV bei CRSNP⁺ und CRSNP⁻ Patienten untersucht werden. Als Proben dienten nasale Schleimhautbiopsien aus dem vorderen Ethmoid bei CRS Patienten bzw. von der unteren Nasenmuschel bei Patienten mit nasaler Gerüststenose ohne CRS sowie eine nasale Lavage. Die Proben wurden mit unterschiedlichen mikrobiologischen Methoden untersucht, um einen möglichst sensitiven Nachweis von Sa zu ermöglichen. Außerdem konnten so Anhaltspunkte für Sensitivität und Spezifität der eingesetzten mikrobiologischen Nachweisverfahren ermittelt werden. Die Bakterienkultur wurde hierbei als Referenzmethode zum Nachweis von Sa und SASCV herangezogen. Zusätzlich wurden mit der aus den Biopsieproben isolierten DNA zwei Real-time PCRs mit unterschiedlichen Genzielsequenzen von Sa durchgeführt. Außerdem wurde eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Paraffingewebschnitten der Biopsieproben durchgeführt, um mögliche intrazelluläre Keime nachzuweisen. Um die Zellreaktionen von mit Sa infizierten Patienten zu untersuchen, wurden cDNA- Microarrayanalysen aus Gewebe von CRSNP⁺ Patienten mit und ohne Sa durchgeführt und die unterschiedliche Genexpression zwischen diesen beiden Gruppen untersucht. Zusätzlich wurden in den nasalen Lavagen Biomarkerkonzentrationen untersucht.

Des Weiteren wurden *in vitro* Zellversuche durchgeführt, um zum einen die Invasion von Sa im Vergleich zu SASCV bei monozytären Zellen und bei Atemwegsepithelzellen zu untersuchen, aber auch um zelluläre Reaktionen auf Proteinebene zu untersuchen.

4.1 Patientenpopulation

Die Studienpopulation wurde über eine strukturierte klinische Anamnese sowie mehrere klinische Untersuchungen einschließlich Endoskopie, CT und Haut-Pricktest sorgfältig ausgewählt und gut charakterisiert. Außerdem konnten mögliche systemische Verzerrungsfaktoren wie die Einnahme von Steroiden oder Antibiotika innerhalb der letzten vier Wochen vor Studieneinschluss eliminiert werden. Ein Zeitraum von vier Wochen wurde hierbei für ausreichend erachtet und entspricht dem Vorgehen in zahlreichen Untersuchungen zum Keimpektrum der CRS^(16;21;22). Die drei Patientengruppen waren unterschiedlich stark besetzt. Es genügten im Untersuchungszeitraum mehr CRSNP⁺ (n=31) und Kontrollpatienten (n=21) als CRSNP⁻ Patienten (n=13) den Ein- und Ausschlusskriterien. Dies liegt einerseits an der kaum zu beeinflussenden Verteilung der drei Krankheitsgruppen bei den Patienten, die der Universitäts-HNO-Klinik Ulm in diesem Zeitraum zugewiesen wurden. In der Gesamtbevölkerung ist die CRSNP⁻ wesentlich häufiger als die CRSNP⁺; Patienten mit CRSNP⁻ werden aber nicht so häufig stationär behandelt wie CRSNP⁺ Patienten. Darüber hinaus mussten die CRS-Patienten für den Studieneinschluss einen Mindestwert bei den Symptomscores und den CT-Scores aufweisen, was auf Grund der krankheitstypisch etwas höheren Score-Werte bei den CRSNP⁺ Patienten öfter eintrat als bei den CRSNP⁻ Patienten. Die klinischen Charakteristika wie Alter, Geschlecht und Begleiterkrankungen der drei Patientengruppen sind recht charakteristisch für die jeweiligen Patienten in westlichen Industrienationen⁽¹⁾. Insgesamt führte die Patientenauswahl auf Basis der verwendeten Ein- und Ausschlusskriterien zu dem gewünschten Ergebnis, zwei möglichst homogene Patientengruppen zu identifizieren, die sich im wesentlichen im Diagnosemerkmal CRSNP⁺ und CRSNP⁻ unterschieden sowie eine dritte Gruppe ohne CRS. Der Preis für die vergleichsweise homogenen Patientengruppen ist ein Selektionsbias im Hinblick auf die CRS allgemein. So wurden CRSNP⁻ Patienten nur eingeschlossen, wenn sie vergleichsweise hohe CT-Punktwerte aufwiesen. Außerdem fehlt die Gruppe von Patienten, bei denen auf Grund eines niedrigen Malm-Punktwertes eine ausreichend klare klinische Zuordnung zu CRSNP⁺ und CRSNP⁻ nicht durchführbar war. Es wurde demnach zu Gunsten der Merkmalshomogenität die Repräsentativität etwas eingeschränkt. Es wird aber hierdurch keine relevante Ergebnisverfälschung erwartet, weil hinsichtlich der mikrobiologischen

Zielkriterien der Studie zwischen CRSNP⁺ und CRSNP⁻ keine relevanten Unterschiede gefunden wurden. Es ist deshalb eher unwahrscheinlich, dass bei den gemäß Studienprotokoll nicht erfassten Übergangsformen ein relevant unterschiedliches Ergebnis festgestellt worden wäre.

4.2 Probengewinnung

Es wurden gemäß Studienprotokoll bei allen Patienten präoperativ eine nasale Lavage entnommen und intraoperativ Nasenschleimhautbiopsien gewonnen, die bei CRS-Patienten aus dem vorderen Ethmoid und bei Kontrollpatienten von der unteren Nasenmuschel in unmittelbarer Nachbarschaft zum Ethmoidsystem stammten. Die Lavage wurde verwendet um die Bakterien quantitativ nachweisen zu können und um einen Überblick über das Keimspektrum der Nase und NNH zu erhalten. Die Entnahme von Lavagen ist eine einfache, den Patienten nicht belastende Methode, die als semiquantitative Alternative zum intranasalen Abstrich angewendet werden kann⁽⁴³⁾. Die Spülflüssigkeit der nasalen Lavage kommt in Kontakt mit annähernd der gesamten Schleimhaut des Naseninneren und erfasst auch die wesentlichen Sekretstraßen aus dem NNH-System⁽⁵⁰⁾. Sie ist insofern grundsätzlich in der Lage, das nasale Keimspektrum umfassender zu repräsentieren als Abstriche oder Tupferproben^(18;20;23;24), die nur das Keimspektrum einer begrenzten Region repräsentieren. Als Referenzmethode diente in dieser Untersuchung die Schleimhautbiopsie, die als zuverlässigste Probengewinnungsmethode gilt. Sie erlaubt neben dem Keimnachweis direkt aus der pathophysiologisch relevanten erkrankten Region den Nachweis intrazellulärer Bakterien wie z.B. SASCV, an dem in dieser Untersuchung ein besonderes Interesse bestand.

Bei der Mehrzahl der Keime war die nasale Lavage nicht ausreichend sensitiv. So wurden überwiegend niemals mehr als $\frac{3}{4}$ der Keime in der nasalen Lavage nachgewiesen, deren tatsächliches Vorkommen durch intraoperative Biopsieentnahme gesichert war (Tabelle 12). Insbesondere der Nachweis anaerober Keime gelang aus der nasalen Lavage schlecht. Obwohl die nasale Lavageflüssigkeit Kontakt zu weiten Bereichen der inneren Nase hat, kann sie anscheinend das Keimspektrum in den Nasennebenhöhlen und das anaerobe Spektrum nicht adäquat abbilden. Eine Besonderheit zeigte sich bei Sa. Hier betrug die Sensitivität der nasalen Lavage 100 %. Auf eine formale Darstellung der Sensitivität und Spezifität der nasalen Lavage wurde wegen der unmittelbar erkennbar unzureichenden Sensitivität verzichtet.

Unterschiedliche Techniken der Probengewinnung erklären wahrscheinlich zum Teil die inkonsistenten Ergebnisse zahlreicher mikrobiologischer Studien zur CRS⁽²³⁾, wobei die Meinung hierzu nicht einhellig ist⁽⁵¹⁾. Zu den gebräuchlichen Probengewinnungstechniken zählen Aspirate aus der punktierten Kieferhöhle⁽⁵²⁾, Tupferproben aus der Nase mit und ohne endoskopische Kontrolle^(23;24) bis hin zu Biopsieproben der Nasenschleimhaut^(16;23), die an unterschiedlichen Lokalisationen wie den einzelnen NNH einschließlich des vorderen Ethmoids, dem mittleren Nasengang sowie dem Nasenvorhof entnommen wurden^(11;12;16;18;22-24). In den letzten Jahren hat sich die endoskopisch kontrollierte Abstrichuntersuchung vom mittleren Nasengang mehr und mehr durchgesetzt⁽⁵³⁾.

4.3 Die chronische Rhinosinusitis - eine bakteriell bedingte Erkrankung?

Die in dieser Studie durchgeführten Nachweismethoden zum kulturellen Keimnachweis sind Standardmethoden, die einen sicheren Nachweis der in der Nasenhöhle zu erwartenden Keime ermöglichen. In den Biopsien der untersuchten Proben wurden meist sowohl aerobe als auch anaerobe Keime nachgewiesen. Die häufigsten aeroben Keime, die aus den Proben isoliert wurden waren Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) (81 % der Biopsien, 85 % der nasalen Lavageproben), *Corynebacterium* spp., und α -hämolyisierende Streptokokken. Obwohl diese Keime häufig auftraten, bleibt ihre pathogenetische Rolle bei der CRS fraglich, da sie zur physiologischen Nasenflora gehören. Insgesamt unterschieden sich Keimspektrum und Keimmenge bei den drei untersuchten Patientengruppen nicht wesentlich. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren^(17;22;51). Die Vermutung, die CRS sei eine bakteriell bedingte Erkrankung, wird dadurch in Frage gestellt.

Von manchen Autoren wurden bei der CRS überwiegend anaerobe Keime nachgewiesen und als pathogenetisch relevant eingestuft⁽¹⁰⁻¹⁵⁾. In dieser Studie traten Anaerobier ebenso in ca. 90 % der Isolate auf, aber nicht so häufig in Reinkultur wie bei Brook und Frasier⁽⁵²⁾. Die Aspiration von Brook und Frasier stammten aus chronisch entzündeten Kieferhöhlen, in denen sich leichter ein mikroaerophiles Milieu ausbildet als im vorderen Ethmoid. So fanden Doyle und Mitarbeiter⁽¹⁶⁾ in ihren Untersuchungen von Schleimhautproben des vorderen Ethmoids keine Anaerobier. Ebenso konnten Busaba et al. sowie Araujo und Mitarbeiter Anaerobier nur in einer geringen Anzahl bei CRS Patienten nachweisen^(22;54). Es ist möglich, dass oberflächliche Gewebeproben oder Abstriche aus dem mittleren Nasengang direkt vor dem Ethmoid das anaerobe Keimpektrum nur unvollständig abbilden, während die überwiegend tief aus dem Ethmoid entnommenen Proben dieser Untersuchung oder die

Kieferhöhlenaspirate von Brook und Mitarbeitern einen höheren Nachweis anaerober Keime bringen. In den letztgenannten Untersuchungen können auch verzögertes Ausstreichen der Proben oder inadäquate Kulturbedingungen dazu beigetragen haben, dass keine anaeroben Keime wuchsen. Die Nährböden wurden bei Busaba und Doyle nur über zwei Tage bebrütet. In unseren Proben wuchsen anaerobe Keime häufig erst nach drei Tagen. Doyle und Woodham vermuteten, dass bei ihrer Untersuchung eine präoperative Behandlung die die Drainage von möglichem purulenten Material begünstigt hat, zu einer besseren Nebenhöhlenventilation und Sauerstoffzufuhr im Ethmoid geführt hat. Dies könnte eine mögliche Erklärung bei CRS Patienten mit purulentem Nasenausfluss sein, aber da in dieser Untersuchung auch bei gesunden Kontrollpatienten in 90 % der Proben Anaerobier gefunden wurden, ist es durchaus möglich, dass Anaerobier zur physiologischen Flora des Sinus ethmoidalis gehören. Die häufigsten anaeroben Keime, die in dieser Studie nachgewiesen wurden, waren *Propionibacterium* spp. und *Peptostreptococcus* spp. Dies ist konform mit den Untersuchungen von Brook et al. und Busaba et al.^(22;52). *Propionibacterium* spp. wurde sowohl in der Lavage als auch in der Biopsie nachgewiesen, *Peptostreptococcus* spp. hingegen wurde in der Mehrzahl der Fälle nur in der Biopsie nachgewiesen. Dies könnte ein Hinweis sein, dass *Peptostreptococcus* spp. sensitiver gegenüber aerobe Bedingungen in der Nasenhöhle reagiert als *Propionibacterium* spp.

Betrachtet man die pathogenen Spezies Sa, *Haemophilus influenzae* sowie die verschiedenen *Enterobacteriaceae* so konnten diese Keime sowohl bei CRS Patienten als auch bei Kontrollpatienten nachgewiesen werden. Doyle und Woodham⁽¹⁶⁾ beschrieben in ihrer Untersuchung von Nasenschleimhaut aus dem vorderen Ethmoid das häufige Vorkommen von Sa und Enterobakterien und schlossen daraus auf eine mögliche pathogenetische Rolle. Da in der o.g. Studie aber keine Kontrollen zum Vergleich untersucht wurden, kann dieser Rückschluss nicht gemacht werden. Hier wurden pathogene Keime in fast gleicher Menge bei CRSNP⁺ (52 %) und Kontrollen (48 %) nachgewiesen und in noch geringerer Menge (23 %) bei CRSNP⁻ Patienten. Diese Tatsache sowie das häufige Vorkommen dieser Keime in Mischkultur mit apathogenen Bakterien lässt eher vermuten, dass ihnen keine pathogenetische Rolle bei der CRS zugeschrieben werden kann.

4.4 Die Bedeutung von *Staphylococcus aureus* bei der CRS

Staphylococcus aureus wurde bei 32 % der untersuchten Proben mittels Bakterienkultur nachgewiesen. Diese Zahl entspricht der durchschnittlichen Besiedlung der Bevölkerung mit

diesem Keim^(30;55). Die Datenlage hinsichtlich der Häufigkeit von Sa bei der CRS ist inkonsistent und Nachweisraten bis annähernd 100 % wurden berichtet⁽²⁷⁾. Trotz der kleinen Fallzahlen liefert diese Untersuchung Hinweise auf die Sa-Besiedlung bei den einzelnen Patientengruppen. Die Tatsache, dass Sa bei CRSNP⁺ (32 %) und bei Kontrollpatienten (48 %) nicht signifikant unterschiedlich auftrat, und bei CRSNP⁻ Patienten (8 %) sogar in noch geringeren Mengen, stellt die pathogenetische Rolle dieses Keimes bei der CRS in Frage. Einige Autoren^(54;56) fanden mehr Sa bei gesunden Kontrollpatienten als bei CRS Patienten. Auch Kremer und Mitarbeiter⁽⁵¹⁾ konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen CRS Patienten und gesunden Kontrollpatienten in der Häufigkeit von Sa feststellen und stellten dessen Bedeutung bei der CRS in Frage. Doyle und Mitarbeiter⁽¹⁶⁾ fanden bei der Untersuchung von Nasenschleimhaut des Ethmoids bei 32 % der Proben Sa. Eine ähnliche Häufigkeit fanden auch Damm et al. bei ihren Untersuchungen von Nasenabstrichen bei CRS Patienten und gesunden Kontrollpatienten⁽³²⁾. Sie beschreiben, dass die Kolonisation der Nase mit Sa keinen Einfluss auf den Schweregrad und die Ausdehnung der CRS hatte. In ihrer Übersichtsarbeit zu Sa und CRS kommen Lin und Busaba⁽⁵⁾ zu der Schlussfolgerung, dass Sa zwar häufig bei CRS Patienten nachweisbar ist, dies sei aber häufig auf einfache Kolonisation der Nase zurückzuführen. Die pathogenetische Rolle erscheine eher von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Unterschiedlich häufiger Sa-Nachweis kann durch soziale oder geographische Unterschiede der untersuchten Populationen bedingt sein. Eine Rolle spielen wahrscheinlich auch unterschiedliche Ein- und Ausschlusskriterien, z.B. von Patienten nach AB Einnahme. Erlaubte Intervalle zwischen letzter AB-Einnahme und Studieneinschluss reichen von einer Woche⁽²²⁾ bis zu vier Wochen⁽²¹⁾. In dieser Untersuchung wurde ein AB freier Zeitraum von vier Wochen gewählt. Es wird davon ausgegangen, dass die bakterielle Flora hierbei ausreichend Zeit hatte, sich zu „regenerieren“ um aussagekräftige Ergebnisse zu ermöglichen. Eine Rolle spielt wohl auch, welche Antibiotika üblicherweise eingesetzt werden. Ein weiteres Erklärungsmodell für die von unterschiedlichen Autoren beschriebenen Unterschiede ist, dass die Proben an unterschiedlichen Lokalisationen entnommen wurden. Proben aus dem Nasenvorhof sind vermutlich durch die Exposition zur Umwelt deutlich häufiger mit Keimen besiedelt als Proben aus den NNH⁽²³⁾. Hierfür spricht, dass in dieser Untersuchung die nasale Lavage, die sowohl zu den Schleimhäuten des Ethmoids als auch zum Nasenvorhof Kontakt hat, häufiger Sa aufwies als die Biopsien (32 % vs. 18 %). Bei den verschiedenen Entnahmetechniken bestehen außerdem verschiedene Risiken einer Kontamination. Auch der

unterschiedliche Transport der Proben kann einen Einfluss auf die Ergebnisse der Kultur haben⁽²³⁾.

Die besondere Bedeutung von Sa in der aktuellen Diskussion zur Pathogenese der CRS^(7;29) beruht auf zwei Aspekten: Sa und seine Exotoxine könnten den ungewöhnlichen T_H2 Bias der Entzündungsreaktion bei der CRSNP⁺ erklären. Bei Personen mit einer vorbestehenden Tendenz zur T_H2 geprägten Entzündungsreaktion können Sa Enterotoxine als Superantigene die T_H2-Polarisierung verstärken und eine polyklonale IgE- Aktivierung bewirken^(57;58). Beides sind charakteristische Kennzeichen der CRSNP⁺. Seiberling und Mitarbeiter fanden bei CRSNP⁺-Patienten signifikant mehr Sa Enterotoxine als bei CRSNP⁻ und Kontrollpatienten⁽²⁸⁾. Allerdings stellte diese Arbeitsgruppe auch fest, dass SASAG ubiquitär vorkommen und somit ein Großteil der Bevölkerung diesen Antigenen ausgesetzt ist. Der zweite Aspekt ist, dass Sa besondere natürlich vorkommende Varianten ausbilden kann, die intrazelluläres Vorkommen ermöglichen und die Chronizität der CRS durch ständige endogene Reinfektion und erhöhte Antibiotikaresistenz bedingen könnten⁽³³⁾.

4.5 Nachweismethoden für Sa

Da sich intrazellulärer Sa dem herkömmlichen Nachweismethoden oft entzieht, wurde eine Vielfalt unterschiedlicher mikrobiologischer Nachweismethoden für Sa eingesetzt. Die üblichen Kulturmethoden wurden erweitert und modifiziert. Anstelle der üblichen zweitägigen Bebrütung von normalem CASO-Blutagar zum Nachweis von Sa wurden in dieser Studie verlängerte Bebrütungszeiten von fünf Tagen sowie die Anzucht auf Columbia-Agar und *Staphylococcus aureus*-ID Agar verwendet. Hiermit sollte gewährleistet werden, dass auch die langsam wachsenden SASCV nachgewiesen werden können⁽³³⁾. Die Spikingkontrolle von Polypengewebe mit SASCV die im Vorfeld der Untersuchungen durchgeführt wurde ergab, dass mit der hier verwendeten Probenverarbeitung und den Kulturbedingungen der Nachweis von SASCV möglich war. Der kulturelle Nachweis war den anderen in dieser Untersuchung eingesetzten Methoden weit überlegen und ist derzeit trotz dessen Zeit- und Arbeitsintensität nach wie vor die einzige zuverlässige klinische Methode zum Sa-Nachweis.

Neben der Bakterienkultur wurde in dieser Studie auch die Real-time PCR zum Nachweis von Sa verwendet. Die Anwendung der herkömmlichen mikrobiologischen Anzucht und Differenzierung von Sa beansprucht zwei bis drei Tage. Die Verwendung der Real-time PCR

verkürzt die Zeit einer konventionellen PCR auf etwa eine Stunde. Mit der PCR besteht außerdem die Möglichkeit, außer lebenden Keimen auch die DNA toter Keime nachzuweisen⁽⁵⁰⁾. Des Weiteren könnten auch kulturell schwer nachweisbare Keime wie SASCV mittels der PCR ermittelt werden. Martineau und Mitarbeiter⁽⁵⁹⁾ beschrieben erstmals ein 442 Basenpaare (bp) großes DNA-Fragment, welches spezifisch für Sa ist. Dieses nutzten sie, um Primer und Hybridisierungssonden zur Detektion des DNA-Fragments für die PCR zu synthetisieren. Shrestha et al. sowie Reischl und Mitarbeiter stellten eine 100 %ige Sensitivität und Spezifität der Sa442 Sonden und Primer bei der Untersuchung von positiven Blutkulturen fest^(45;60). Es gibt jedoch Berichte über das sporadische Auftreten von Sa Stämmen, die das Sa442 Gen nicht besitzen und somit negativ in dieser PCR sind^(61;62). Deshalb wird dazu geraten, zusätzlich die PCR auf eine andere Zielsequenz von Sa durchzuführen. Ein weiteres Gen, das als Zielsequenz für die Real-time PCR auf Sa eingesetzt wird, ist das *nuc*-Gen⁽⁴⁴⁾. Diese PCR hat laut Costa et al. eine Sensitivität und Spezifität von 100 % für den Nachweis von Sa. Beide PCR-Methoden wurden in dieser Studie verwendet. Sensitivität und Spezifität wurden formal berechnet, wobei das Kulturergebnis als Referenzmethode diente. Die Sensitivität der Sa442-PCR betrug 58 %, die Spezifität 95 %, die Sensitivität der *nuc*-PCR ebenfalls 58 % und die Spezifität 93 %. Betrachtet man beide PCRs zusammen, wurde eine Sensitivität von 83 % und eine Spezifität von 88 % erreicht.

In der Kultur reicht theoretisch ein lebendes Bakterium aus, um dieses anzuzüchten. Diese Sensitivität wird von einer PCR nicht erreicht, da z.B. durch die zur Auflösung der grampositiven Bakterienzellwand oder zur Aufarbeitung der Gewebeproben erforderlichen Lysevorgänge DNA zerstört werden kann⁽⁵⁰⁾. Ferner ist die Extraktion von bakterieller DNA aus Gewebe nicht vollständig, was zu einer eingeschränkten Sensitivität führen kann. Fasst man beide PCRs zusammen, so ergaben sie bei vier der 52 untersuchten Proben ein positives Ergebnis trotz einer negativen Bakterienkultur. Dies ist vermutlich auf die bereits beschriebene Möglichkeit des Nachweises von DNA toter Keime zurückzuführen. Zudem weisen die PCR-Ergebnisse darauf hin, dass intrazellulärer Sa nicht übersehen wurde. Sonst wären höhere Zahlen an positiven PCR-Ergebnissen bei gleichzeitig negativer Kultur zu erwarten gewesen. Mit der Durchführung der PCR konnte also die Sensitivität und Spezifität des Sa-Nachweises im Vergleich zur Kultur nicht erhöht werden, sie stellt aber, wenn sie gleichzeitig mit der Kultur angewandt wird, eine schnelle Nachweismethode dar, die erste Hinweise auf eine Infektion liefert. Diese sollten aber noch kulturell bestätigt werden.

Als weitere Methode für den Sa-Nachweis aus dem Probenmaterial wurde die Fluoreszenz in situ Hybridisierung eingesetzt. Diese basiert auf dem Nachweis von viablen Bakterien über die Bindung von fluoreszenzmarkierten Sonden an die 16S rRNA. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das Target nicht amplifiziert werden muss, da die Bakterienzellen eine große Menge an 16S rRNA in ihren Ribosomen besitzen. Die 16S rRNA besteht einerseits aus hoch konservierten Abschnitten, die bei allen Eubakterien vorkommen und zum anderen aus sehr spezifischen Abschnitten, die die Differenzierung der einzelnen Spezies ermöglichen⁽⁶³⁾. Es können nur vitale Bakterien nachgewiesen werden, allerdings auch bei intrazellulärer Lokalisation⁽⁶³⁾. Hogardt et al. untersuchten Sputumproben von Patienten mit zystischer Fibrose u.a. auf Sa und stellten eine Spezifität der Sonden von 100 % sowie eine Sensitivität von 71 % gegenüber der konventionellen Bakterienkultur fest⁽⁶⁴⁾. Die im Vergleich zur Kultur niedrigere Sensitivität schreiben die Autoren einer starken Hintergrundfluoreszenz zu.

Bei der FISH an Paraffingewebschnitten wird die Entparaffinisierung mittels Xylol sowie die enzymatische Behandlung mit Proteinase K empfohlen, um die Durchgängigkeit der Sonden durch die Zellmembran zu gewährleisten und unspezifische Bindungen zu reduzieren⁽⁴⁷⁾. Hier wurden zunächst Vorversuche mit Sa-spezifischen DNA-Sonden⁽⁶⁴⁾ an Direktausstrichen von Bakterien durchgeführt. Es wurden verschiedene Lysesubstanzen, verschiedene Lysezeiten und unterschiedliche Hybridisierungszeiten getestet, um ein optimales Eindringen der Sonden in die Bakterien zu erreichen. Es zeigte sich, dass sich Sa mit dem normalen Phänotyp und SASCV unterschiedlich gut darstellen ließen. Weil sich nie beide Keime gleich gut anfärben ließen, wurde die FISH mit PNA-Sonden etabliert. Diese Sonden sind künstlich synthetisierte ungeladene Pseudopeptide. Ihre Hydrophobie ermöglicht es die Zellwand von Bakterien leichter zu durchdringen und somit ist eine Lyse der Bakterien nicht nötig⁽⁶⁵⁾. Mit den PNA-Sonden ließen sich Direktausstriche von beiden Keimen zu 60-80 % anfärben. Die Versuche an Paraffinschnitten ergaben eine Anfärbung der Keime zu 50-60 %. Ein Problem, das bei der FISH an Paraffingewebschnitten auftrat, war die teilweise starke Autofluoreszenz. Diese konnte trotz unterschiedlichen Lysebehandlungen des Gewebes sowie einer Behandlung mit Osmiumtetroxid nicht völlig unterdrückt werden. Auf Grund der Vorversuche wurde entschieden, dass die FISH an Paraffingewebschnitten die mittels Xylol entparaffiniert wurden, mit PNA-Sonden bei über Nacht Bebrütung und vorangegangener Lyse des Gewebes mit Proteinase K durchgeführt werden sollte.

Trotz der über die Vorversuche optimierten Bedingungen für die FISH führte diese Methode zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Keine der in der Kultur positiven Biopsien war positiv in der FISH. Die einzige FISH-positive Probe war negativ in der Biopsie aber positiv in der Lavage. Möglicherweise könnten weiterführende Versuche an Paraffingewebsschnitten zur Unterdrückung der Autofluoreszenz und besseren Anfärbbarkeit der Bakterien die Ergebnisse verbessern. Außerdem ist anzumerken, dass selbst wenn intrazellulärer Sa nachweisbar gewesen wäre, eine Unterscheidung zwischen normalem Phänotyp und SCV Phänotyp nur über die Bakterienkultur möglich gewesen wäre.

4.6 Die Bedeutung von SASCV bei der CRS

SASCV wurde wiederholt bei chronisch entzündlichen Erkrankungen identifiziert. Ihre Fähigkeit des intrazellulären Überlebens und die hierdurch bedingten Resistenz gegen viele Antibiotika werden mit der Chronifizierung SASCV-bedingter Erkrankungen in Zusammenhang gebracht⁽³³⁾. Es liegt nahe zu vermuten, dass SASCV bei der CRS eine Rolle spielen könnten, zumal ja bereits von zwei Autoren intrazellulärer Sa beschrieben wurde^(30;40). In diesen Arbeiten wurde allerdings keine Differenzierung zwischen intrazellulärem Sa-Normaltyp und SASCV durchgeführt. In keiner der in dieser Studie untersuchten Biopsieproben konnten SASCV nachgewiesen werden. Dabei waren für SASCV optimal geeignete Bebrütungsbedingungen geschaffen: Es wurden an Stelle des üblicherweise für die Sa Diagnostik verwendeten CASO-Blutagars die besser für SASCV geeigneten Platten Columbia- und SAID-Agar verwendet⁽³³⁾ und diese wurden statt der üblichen 24 h über fünf Tage bebrütet. Dieses Vorgehen sowie der positive Nachweis in den Spiking-Experimenten spricht dafür, dass diese Methoden für den SASCV-Nachweis geeignet waren. Der fehlende SASCV-Nachweis ist also nicht auf methodische Mängel zurückzuführen, sondern SASCV spielte bei dem hier untersuchten Kollektiv keine Rolle. Auch in zeitgleich durchgeführten Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen gelang kein SASCV-Nachweis bei der CRS (F. Sachse, Universität Münster, und C. Bachert, Universität Ghent, persönliche Mitteilung).

4.7 Untersuchungen zur Internalisierung von Sa

Die Untersuchungen zur Internalisierung von Sa wurden parallel zur klinischen Untersuchung durchgeführt, um die Beobachtungen anderer Autoren über das intrazelluläre Vorkommen von Sa bei der CRS besser interpretieren zu können^(30;40). Es wurden Zellkulturuntersuchungen mit professionellen Phagozyten (MM6 Zellen) und Atemwegsepithelzellen (B2B Zellen) durchgeführt. Beide Zelltypen kommen in den oberen

Atemwegen vor, wobei Epithelzellen vorrangig eine Barrierefunktion ausüben und Monozyten/Makrophagen Aufgaben der angeborenen und erworbenen Immunität erfüllen. Die Fragestellung war, ob beide Zelltypen nach Infektion sowohl Sa mit normalem Phänotyp als auch SASCV intrazellulär aufweisen. Intrazelluläres Auftreten von Sa war vorbeschrieben^(34;48;66;67). Einerseits wird Sa über unterschiedliche Rezeptoren des angeborenen Immunsystems wie z.B. den Toll-like Rezeptor 2 über eine Bindung an z.B. Peptidoglykane phagozytiert. In Phagolysosomen werden Sa destruiert und dann antigene Peptide über MHC-II Rezeptoren an T-Zellen präsentiert⁽⁶⁸⁾. Zur Internalisierung via Phagozytose sind vor allem Phagozyten und antigenpräsentierende Zellen befähigt, aber in geringerem Maße auch Epithelzellen⁽⁶⁹⁾. Eine Internalisierung von Sa erfolgt aber auch über Fibronektin und dessen Bindung an membranständige Fibronektinrezeptoren in das Zytosol, ein Vorgang der unter dem Begriff Invasion formiert. Die Mechanismen der zytosolischen Destruktion von Sa sind nicht gut bekannt. Das zytosolische Auftreten von Sa führt zu einer Antigenpräsentation über MHC-I Rezeptoren^(30;70).

Versuche zur Sa-Internalisierung von MM6 bzw. B2B Zellen sowie der direkte Vergleich von Sa und SASCV waren bisher noch nicht durchgeführt worden. Außerdem waren die Ergebnisse der beschriebenen Untersuchungen inkonsistent. Da Silva und Mitarbeiter⁽⁶⁶⁾ stellten bei ihren Untersuchungen mit Atemwegsepithelzellen nach 1 h keinen intrazellulären sondern nur adhärenen Sa fest, wohingegen Kahl und Mitarbeiter⁽⁴⁸⁾ bereits nach 5 Min intrazellulär Sa nachweisen konnten. Des Weiteren waren bei da Silva et al. nach 24 h Inkubation die meisten Zellen v.a. durch Nekrose zerstört, während es bei Kahl et al. nach 24 h zur Apoptose der Zellen nach intrazellulärer Vermehrung der Keime kam. Bei der Studie von Matussek und Mitarbeitern überlebte Sa intrazellulär über zwei Tage, ohne dass eine Apoptose oder Nekrose der Zellen statt fand⁽⁷¹⁾. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Studien erklären da Silva und Mitarbeiter durch Unterschiede im Versuchsaufbau wie z.B. unterschiedliche Zelllinien und Bakterienstämme oder Fehlen bzw. Durchführen der extrazellulären Abtötung von Keimen⁽⁶⁶⁾.

Das Grundprinzip zum Nachweis intrazellulärer Keime ist einfach: Man tötet nach Infektion der Kultur extrazellulär gelegene Keime durch ein nicht-membrangängiges Antibiotikum ab, wäscht das Antibiotikum ab und führt dann eine Lyse der Zellen herbei. Die dann nachweisbaren Keime müssen intrazellulär gelegen haben. Voraussetzung für einen Keimnachweis nach Lyse ist, dass die Lyse die intrazellulären Keime nicht ebenfalls abtötet.

Deswegen wurden Vorversuche zur Lyse der Zellen und zur Viabilität der Bakterien nach der Lysebehandlung durchgeführt. Als beste Methode zeigte sich die Zellyse mittels Aqua dest. und mechanischer Zerstörung durch eine 27G Nadel⁽⁷²⁾. Von den beiden uns zur Verfügung stehenden Sa-Paaren (jeweils SCV und Elternstamm mit normalem Phänotyp) zeigte der Stamm SCV-R mit zugehörigem Sa-R ein gutes Invasionsvermögen, so dass in den Versuchen dieser Stamm verwendet wurde. In den Vorversuchen zum Wachstum von B2B wurde zudem die Zellzahl nach zweitägiger Bebrütung zur Konfluenz ermittelt, um die entsprechenden Bakterienmengen berechnen zu können.

In den darauf folgenden Versuchen sollte ermittelt werden, ob die verwendete Infektionsdosis einen Einfluss auf die intrazellulär vorhandenen KBE hat. Wie sich zeigte, war die Zahl intrazellulärer KBE nach zweistündiger Inkubation in dieser Untersuchung bei beiden Zelltypen unabhängig von der Infektionsdosis. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Bayles und Mitarbeitern⁽³⁵⁾ sowie Wesson et al.⁽⁷³⁾, die mit zunehmender Infektionsdosis auch mehr intrazelluläre KBE fanden. Die Unterschiede zu den beschriebenen Studien könnten durch die Verwendung anderer Zellen sowie anderer Sa- Stämme bedingt sein. Möglicherweise war aber die niedrigste eingesetzte MOI in dieser Untersuchung schon so hoch, dass alle Rezeptoren zur Aufnahme der Bakterien auf der Zelloberfläche besetzt waren, die Aufnahmekapazität also schon gesättigt war.

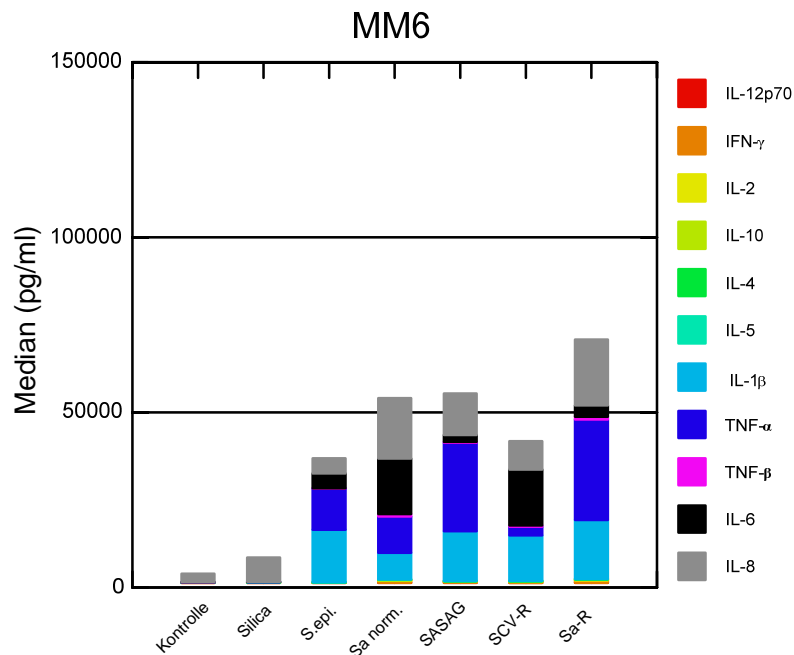
Nach zweistündiger Inkubation fanden sich unabhängig von der MOI in MM6 Zellen deutlich mehr Sa vom normalen Phänotyp als vom SASCV-Phänotyp (Abbildung 6). In B2B Zellen lag die Anzahl intrazellulärer Keime um etwa eine Zehnerpotenz niedriger, allerdings wurden in B2B Zellen beide Phänotypen ungefähr gleich häufig angetroffen (Abbildung 8), die Anzahl intrazellulärer SASCV lag sogar etwas höher. Es ist bekannt, dass SASCV vermehrt Bindungsstellen für Fibronectin exprimiert⁽³³⁾. Es ist demnach denkbar, dass die hohe Internalisierung von SASCV in B2B Zellen vorrangig über Fibronectin und Fibronectin-bindende Rezeptoren erfolgte. Das Ergebnis zum Einfluss der MOI deckt sich mit dem Ergebnis zum Zeitpunkt 2 h bei den Untersuchungen zur Zeitkinetik des intrazellulären Sa Nachweises. Auch hier war bei den MM6 Zellen mehr intrazellulärer Normaltyp nachweisbar, während bei den B2B Zellen mehr SASCV intrazellulär nachweisbar war (Abbildung 7 und Abbildung 9). Die Untersuchungen zur Zeitkinetik zeigen darüber hinaus, dass intrazellulärer Normaltyp in beiden Zelllinien vor allem in den ersten Stunden nachweisbar war, nach 24 h jedoch kaum mehr. Entweder sind nach 24 h die intrazellulären Sa mit normalem Phänotyp in

Phagolysosomen weitgehend abgetötet worden oder die Zellen haben die Normaltyp-Infektion keine 24 h überlebt⁽⁶⁶⁾. Anders bei den SASCV infizierten Zellen. Hier ist in beiden Zelllinien die intrazelluläre SASCV Anzahl über den Beobachtungszeitraum von 24 h substantiell angestiegen. Dies spricht dafür, dass SASCV intrazellulär überlebt, sich anscheinend sogar vermehrt und gleichzeitig die Zellen erhalten bleiben.

4.8 Untersuchungen zur immunologischen Bedeutung von Sa

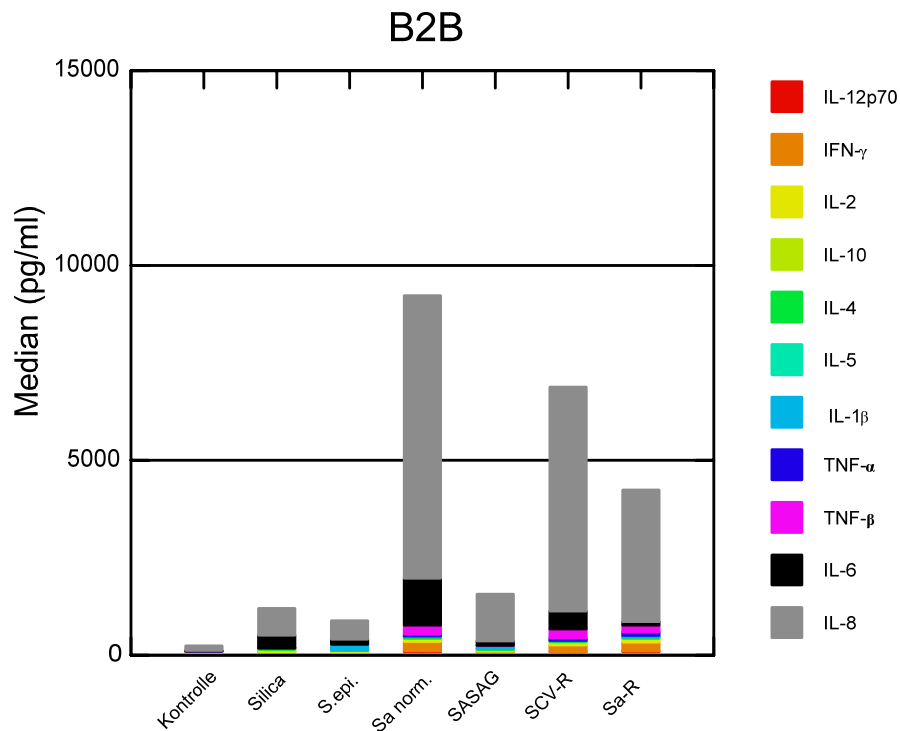
Die CRSNP⁺ und die CRSNP⁻ unterscheiden sich unter anderem in ihren Zytokinmustern. Bei der CRSNP⁻ handelt es sich um eine T_H1 dominierte Entzündungsform mit überwiegender Expression von IFN- γ , wohingegen man bei der CRSNP⁺ eine T_H2 dominierte Entzündung mit hohen IL-5-Konzentrationen findet⁽¹⁾. Es sollte untersucht werden, ob eine Sa-Infektion von B2B und MM6 Zellen das Zytokinprofil in Richtung T_H1 oder T_H2 polarisiert^(7;27-29). Es interessiert auch, ob es Unterschiede in der Zytokinmenge und im Zytokinmuster nach Infektion der Zellen mit SASCV oder dem normalen Sa-Phänotyp gibt. Für die Proteinbestimmungen wurde eine MOI von 1:10 gewählt sowie eine Bebrütungszeit von 24 h, um den Zellen ausreichend Zeit zur Bildung der Zytokine zu geben. Matussek et al. beschrieben, dass die Expression von Proteinen nach 18 h stärker war als nach 8 h⁽⁷¹⁾. Die Zellen wurden mit einem Sa Stamm mit normalem Phänotyp, einem SASCV Stamm und zugehörigem Elternstamm sowie einem Enterotoxin C, also einen Sa-Superantigen produzierenden Sa Stamm infiziert. Um festzustellen, ob die ausgeschütteten Zytokine spezifisch auf eine Infektion mit Sa gebildet wurden oder unspezifisch als Reaktion auf einen phagozytierbaren Stimulus, wurden die Zellen zusätzlich mit dem apathogenen Stamm S.epi sowie mit dem avitalen Stimulus Silikapartikel infiziert.

Abbildung 13: Stacked-Bar Grafik der von MM6-Zellen freigesetzten Zytokine in Abhängigkeit des eingesetzten Stimulus



Die basale Zytokinsekretion, ermittelt an den im Zellkulturüberstand gemessenen Zytokinkonzentrationen 24 h nach alleiniger Zugabe von Medium, war bei MM6 Zellen höher als bei B2B Zellen (Abbildung 13 und Abbildung 14). Beide Zelllinien sezernierten spontan IL-8 in relevanten Mengen. Eine Exposition von MM6 Zellen mit Silikapartikeln führte zu einer erhöhten Freisetzung von IL-6 und IL-8. Die Sekretion von IL-1 β nahm im Vergleich zu den Negativkontrollen geringfügig zu ($p \leq 0,05$). Bei den B2B Zellen wurden nach Silikaexposition ebenfalls vermehrt IL-6 und IL-8 gebildet. Außerdem nahm die IL-2 und IL-4 Sekretion zu und es wurden geringe Mengen IL-12 gebildet. Die Erkennung und Internalisierung von Silikapartikeln erfolgt insbesondere über Scavenger-Rezeptoren, die eine zelluläre Immunantwort induzieren können^(74;75). Es war deswegen nicht erstaunlich, dass allein schon die Exposition gegenüber einem avitalen, nicht-infektiösen phagozytierbaren Stimulus die Freisetzung unterschiedlicher Zytokine beobachtet wurde. Dabei scheinen insbesondere B2B Zellen über ein erstaunlich differenziertes Zytokinspektrum zu verfügen, das auch Zytokine umfasst, die wie IL-2 typischerweise von T-Zellen sezerniert werden. Dass Epithelzellen zahlreiche Zytokine sezernieren können ist aus anderen Untersuchungen bekannt und stützt die Auffassung, dass sie neben ihrer Barrierefunktion durchaus auch differenzierte immunologische Aufgaben wahrnehmen können⁽⁷⁶⁾.

Abbildung 14: Stacked-Bar Grafik der von B2B-Zellen freigesetzten Zytokine (Median (pg/ml) in Abhängigkeit des eingesetzten Stimulus



Staphylococcus epidermidis führte bei MM6 Zellen zu einer deutlich höheren Zytokinsekretion als Silikapartikel, wobei insbesondere IL-1 β , TNF- α , TNF- β und in geringerem Maße IL-6 aufreguliert wurden. B2B-Zellen zeigten eine bemerkenswert schwache Reaktion auf S.epi., insbesondere die bei Silikapartikeln beobachtete Sekretion von IL-4 zeigte sich bei Infektion mit S.epi. nicht. Dafür wurde deutlich mehr IL-1 β sezerniert.

Eine Infektion von MM6 Zellen mit allen Sa-Stämmen führte zu einer vehementen Zytokin-freisetzung. Es wurde das gesamte untersuchte Zytokinspektrum sezerniert, mengenmäßig überwogen IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α (sh. Abbildung 13). SCV führte in MM6 zu einer deutlich geringeren Zytokininduktion als die anderen Sa-Stämme, wobei sich insbesondere die Konzentrationen von IL-6 und TNF- α unterschieden, deren Relation sich annähernd umkehrte. Bei den B2B Zellen kam es nach Infektion mit allen Sa-Stämmen ebenfalls zu einer kräftigen Reaktion, wobei insbesondere die Zytokine IL-6, IL-8, IFN- γ und TNF- β sezerniert wurden. Der Enterotoxin-C (Superantigen) bildende Keim führte zu einer ungewöhnlich schwachen Reaktion der B2B Zellen (sh. Abbildung 14).

Durch Logarithmieren der Zytokinspiegel können auch die Zytokine differenziert betrachtet werden, die in geringeren Mengen sezerniert wurden. Außerdem waren die Zytokine in allen

bisher von uns durchgeführten Untersuchungen log-normalverteilt, so dass trotz Verzerrung der Verteilung durch Bodeneffekte bei einigen Zytokinen eine parametrische Darstellung bei den logarithmierten Daten gerechtfertigt erscheint (Abbildung 15 und Abbildung 16). Bei der detaillierten Ergebnisbetrachtung der Zytokinspiegel in den Zellkulturüberständen erscheinen weitere Befunde erwähnenswert.

Hierbei zeigte sich, dass MM6-Zellen basal ein differenzierteres Zytokinspektrum sezernierten als B2B-Zellen. Betrachtet man bei den MM6 Zellen die Relation von T_H1/T_H2 – Zytokinen (Abbildung 15), so war $IFN-\gamma$ in allen MM6-Zellkulturüberständen nachweisbar und wurde durch alle pathogenen Keime, jedoch nicht durch Silika und S.epi. aufreguliert. IL-12, das bei der Antigenpräsentation den T_H1 - Phänotyp repräsentiert, wurde bis auf die Kontrollen und die Infektion mit S.epi bei allen Stimuli aufreguliert. Die Freisetzung von IL-10, das über die Induktion regulatorischer T-Zellen eine immunmodulierende Wirkung ausübt und in einigen Untersuchungen eine T_H2 -Präferenz bewirkt, wurde durch die eingesetzten Stimuli nur unwesentlich beeinflusst. Das gilt genauso für IL-4. Bei IL-5 führten die pathogenen Keime, nicht jedoch Silika und S.epi zu einer allerdings nur geringfügigen Erhöhung der Freisetzung. Insgesamt ließ sich bei den Zytokinspiegeln in MM6-Zellkulturüberständen erwartungsgemäß eher eine diskrete T_H1 - Präferenz ablesen.

Betrachtet man die T_H1/T_H2 Polarisierung bei B2B Zellen, zeigen sich in etwa gleichsinnige Effekte wie bei den MM6 Zellen. Die T_H1 -Polarisierung nach Infektion mit pathogenen Sa-Stämmen ist hier etwas deutlicher sichtbar.

Abbildung 15: Stacked-Bar Grafik der von MM6 Zellen freigesetzten Zytokine (Mittelwert in pg/ml, logarithmiert) in Abhängigkeit des eingesetzten Stimulus. Die Ordinate ist logarithmiert, was die Darstellung von Mittelwert statt Median erlaubt sowie die Darstellung von Unterschieden auch bei Zytokinen, die in geringen Mengen sezerniert wurden.

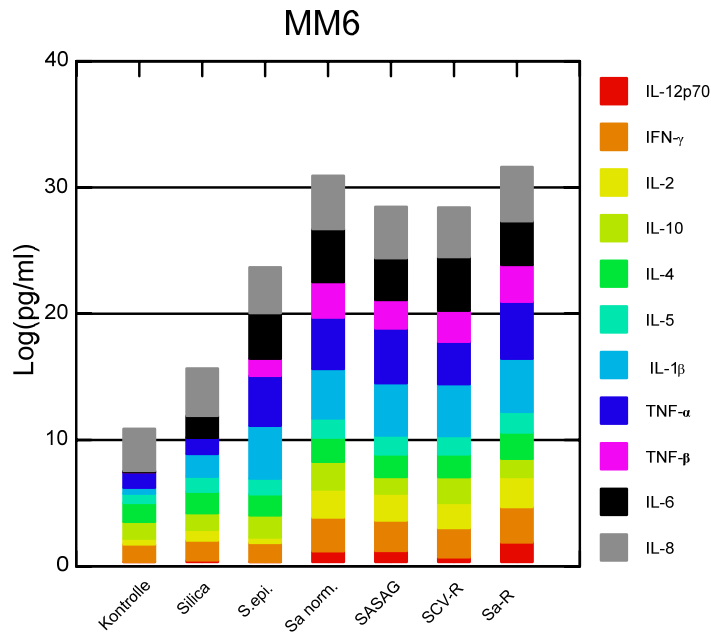
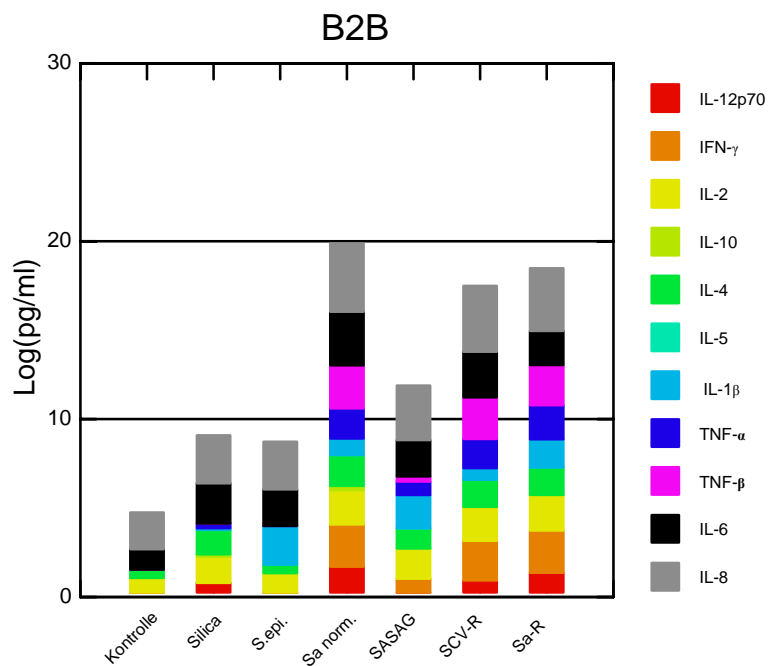


Abbildung 16: Stacked-Bar Grafik der von B2B Zellen freigesetzten Zytokine (Mittelwert in pg/ml, logarithmiert) in Abhängigkeit des eingesetzten Stimulus. Die Ordinate ist logarithmiert, was die Darstellung von Mittelwert statt Median erlaubt sowie die Darstellung von Unterschieden auch bei Zytokinen, die in geringen Mengen sezerniert wurden.



Von einer vermehrten Bildung von IL-1 β , IL-6 und / oder IL-8 nach Stimulation von Atemwegsepithel- oder Endothelzellen mit Sa wird von mehreren Autoren berichtet⁽⁷⁷⁻⁷⁹⁾. TNF- α ist ein Zytokin das von Makrophagen als Reaktion auf bakterielle Bestandteile gebildet wird und proinflammatorisch wirkt. Daher ist dessen vermehrte Bildung als Reaktion auf externe Stimuli nicht verwunderlich. Eine vermehrte Bildung von TNF- α nach Infektion von Korneaepithelzellen bzw. Keratinozyten mit Sa bzw. Sa Protein A konnten auch Kumar und Mitarbeiter⁽⁸⁰⁾ sowie Aufiero et al.⁽⁸¹⁾ feststellen. Auch Nakagawa und Mitarbeiter stellten eine Induktion der Bildung von IL-1, IL-6 und TNF- α nach Infektion von MM6-Zellen mit Sa fest⁽⁸²⁾. Untersuchungen an Endothelzellen von humanen Nabelvenen zeigten, dass die Stärke der Expression verschiedener Zytokine sich bei verschiedenen Sa-Isolaten unterscheidet⁽⁸³⁾. Söderquist und Mitarbeiter beobachteten, dass unterschiedliche Stämme von Sa verschiedene Zytokine induzieren⁽⁸⁴⁾. Sie stellten fest, dass die Zytokinproduktion auch abhängig davon ist, ob das Isolat Enterotoxine bildet oder nicht.

Neben in vitro Untersuchungen zu zellulären Effekten von Sa auf Proteinebene sollten in dieser Studie auch dessen Effekte auf Genebene untersucht werden. Eine Methode zur Bestimmung von differentiell regulierten Genen stellt der cDNA Microarray dar. Hierbei wird zunächst aus den zu untersuchenden Proben mRNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wird dann auf Microarrayobjektträger aufgetragen, die mit Oligonukleotiden von interessierenden Genen bestückt sind. Bei Vorhandensein des der cDNA entsprechenden Genes bindet diese an das Gen. In die cDNA wird bei der Transkription eine sogenannte Capture-Sequenz eingebaut. An diese Capture-Sequenz kann ein fluoreszenzmarkiertes Reagenz binden. Ungebundene cDNA wird abgewaschen und das Fluoreszenzsignal der gebundenen cDNA wird mittels eines Lasers detektiert. Boldrick und Mitarbeiter stellten fest, dass eine Infektion mit unterschiedlichen Bakterien zu Unterschieden in der Genexpression führt, vermutlich bedingt durch unterschiedliche Virulenzfaktoren. Sie fanden eine Gruppe von Genen die bei allen Bakterien differentiell reguliert wurden und eine weitere Gruppe die abhängig vom Bakterium differentiell reguliert wurden⁽⁸⁵⁾. Beim Vergleich von Sa-positiven CRSNP⁺ Patienten mit Sa-negativen CRSNP⁺ Patienten waren 2 % der untersuchten ca. 1200 Gene aufreguliert und 2 % abreguliert. Die Interpretation der biologischen Zusammenhänge der aus dem Microarray gewonnenen Daten kann mit Hilfe des „Gene Ontology Consortiums“⁽⁸⁶⁾ durchgeführt werden. Programme wie das auf dem Internet basierende System „WebGestalt“ ermöglichen eine Identifikation von auf- und abregulierten Genen innerhalb der Gene Ontology-Kategorien⁽⁸⁷⁾.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen von Sa-positiven und Sa-negativen CRSNP⁺ Patienten waren Gene der Kategorie „antigen processing and presentation“ über MHC I Moleküle aufreguliert. Eine Aufregulierung von MHC I Molekülen wurde auch bei Sa infizierten humanen Nabelvenen-Endothelzellen festgestellt⁽⁷¹⁾. Da Sa primär als extrazellulärer Pathogen gilt, würde man eher eine Aufregulierung von MHC II Genen erwarten. MHC I Moleküle präsentieren Pathogene, die im Zytoplasma der Zelle leben, wie z.B. Viren oder intrazellulär überlebende Bakterien. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Sa in vivo auch intrazellulär vorkommt, was ja bereits von einigen Autoren berichtet wurde^(30;40). Hierbei wird Sa nicht über Toll-like Rezeptoren in die Zelle aufgenommen und via MHC-II Moleküle präsentiert, sondern über bakterielle Fibronectin-Bindungsmoleküle, z.B. über $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor, um dann über MHC-I Rezeptoren präsentiert zu werden. Die Befunde der Gen-Expressionsanalysen können ein Hinweis darauf sein, dass die Aufnahme über Fibronectin-Rezeptoren und MHC-I Präsentation bei Sa-positiven CRSNP⁺-Patienten einen pathophysiologisch relevanten Vorgang darstellt.

Moreilhon und Mitarbeiter⁽⁷⁸⁾ inkubierten Epithelzellen mit lebendem Sa sowie Kulturüberständen von Sa. Sie stellten eine Aufregulierung verschiedener Gene die an einer Entzündungsantwort beteiligt waren fest, einschließlich der Gene für IL-1 β , IL-6 und IL-8. Sie fanden außerdem, dass eine Inkubation mit Bakterienüberstand zu stärkeren Zellreaktionen führte als lebende Bakterien selbst. In den hier durchgeführten Genexpressionsanalysen waren diese Gene bei Sa-positiven CRSNP⁺ Patienten im Vergleich zu Sa-negativen CRSNP⁺ Patienten nicht aufreguliert. Es ist möglich dass diese Gene bereits durch die chronische Entzündung aufreguliert waren und das zusätzliche Auftreten von Sa im entzündeten Gewebe ihre Transkription nicht weiter erhöhen konnte. Dies könnte auch für verschiedene Gene für T_H2 Zytokine zutreffen wie IL-4, IL-5, IL-13 und GM-CSF, die mittels des Microarrays untersucht wurden. Es konnte jedenfalls auf der durch cDNA-Microarrays erfassten mRNA-Ebene bei Sa-positiven im Vergleich zu Sa-negativen CRSNP⁺ Patienten keine Polarisation in Richtung T_H2 festgestellt werden.

Um weitere immunmodulatorische Eigenschaften einer Sa-Infektion bei CRS Patienten zu untersuchen, wurden die Biomarker IL-5, IFN- γ , ECP, Eotaxin, G-CSF und Gesamt-IgE in nasalen Lavagen untersucht. Dies sollte dazu dienen, einen möglichen T_H2 -Shift bei Sa-positiven Patienten auf Proteinebene nachzuweisen. Wie bereits von Riechelmann und Mitarbeitern beschrieben wurde⁽⁸⁸⁾, waren die IL-5 und Gesamt- IgE Konzentrationen bei CRSNP⁺ Patienten höher als bei CRSNP⁻ Patienten und Kontrollpatienten. Die Konzentration

der in der nasalen Lavage gemessenen Zytokine wurde jedoch durch den Nachweis von Sa nicht beeinflusst ($p > 0,13$ bei allen Zytokinen). Es fanden sich also wie auf mRNA-Ebene auch auf Proteinebene keine Hinweise darauf, dass Sa in vivo die T_H1/T_H2 - Balance bei CRSNP⁺ beeinflusst. Dies unterscheidet sich von Ergebnissen bei der allergischen Rhinitis, wo der Nachweis von Sa zu einer Verstärkung der T_H2 - Polarisation geführt hatte⁽⁴³⁾. Die Konzentrationen von ECP, Eotaxin und IFN- γ unterschieden sich in dieser Untersuchung nicht zwischen den drei Patientengruppen. Dies steht im Unterschied zu anderen Studien^(1;58). Diese Unterschiede können durch die Verwendung unterschiedlicher Proben erklärt werden, da in dieser Studie nasale Lavagen anstelle von Gewebehomogenisaten wie bei Bachert und Mitarbeitern⁽⁵⁸⁾ verwendet wurden. Ein T_H2 Shift nach Sa-Infektion konnte in vivo bei dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden und unterstreicht so die Ergebnisse der Zellkulturversuche.

5. Zusammenfassung

In der hier durchgeführten Studie „Untersuchungen zur mikrobiellen Besiedlung der Nasenhöhle von Patienten mit chronischer Rhinosinusitis unter besonderer Berücksichtigung von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus aureus* Small Colony Varianten“ sollte das Keimspektrum der chronischen Rhinosinusitis (CRS) beim Menschen, mit Schwerpunkt auf *Staphylococcus aureus* (Sa) und seinem Small Colony Variant (SCV) -Phänotyp, untersucht werden. Die chronische Rhinosinusitis (CRS) ist eine häufig vorkommende Erkrankung die bei etwa 5-15 % der Bevölkerung westlicher Industrienationen auftritt. Ihre Ätiologie ist noch unbekannt, allerdings wird als mögliche Ursache eine Infektion mit Bakterien diskutiert. Unter den Bakterien wird dem grampositiven Keim *Staphylococcus aureus* eine große Bedeutung bei dieser Erkrankung zugeschrieben.

In dieser Studie wurden Nasenschleimhautbiopsien und Nasenspülproben von 31 Patienten mit CRS und nasalen Polypen (CRSNP⁺), 13 Patienten mit CRS ohne nasale Polypen (CRSNP⁻) und 21 Kontrollpatienten mit verschiedenen mikrobiologischen Methoden untersucht. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie stellen eine bakteriologische Ursache für die chronische Rhinosinusitis in Frage. Es wird deutlich, dass der normale Phänotyp von Sa keine wesentliche Rolle bei der CRS spielt, da dieser Keim sowohl bei erkrankten als auch bei gesunden Probanden etwa gleich häufig auftrat, bei CRSNP⁻ Patienten sogar in noch geringerer Menge als bei den anderen beiden Gruppen. In keiner der untersuchten Proben konnten SASCV nachgewiesen werden, so dass deren Rolle bei der CRS untergeordnet erscheint. Auf Grund der kleinen Fallzahlen kann von dieser Studie zwar nicht auf die Gesamtbevölkerung geschlossen werden, aber die Ergebnisse geben dennoch Hinweise auf die tatsächliche Situation. Auch bei der Untersuchung der übrigen in den Proben vorkommenden gram-positiven und gram-negativen, aeroben und anaeroben Bakterien konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Beim Vergleich der hier angewandten mikrobiologischen Nachweismethoden, stellte sich heraus, dass die Bakterienkultur im Vergleich zur Real-time PCR und der Fluoreszenz in situ Hybridisierung die sensitivste Methode war. Die PCR hat allerdings den Vorteil dass auch DNA toter Bakterien nachgewiesen werden kann, und dass sie erheblich schneller durchzuführen ist als die Bakterienkultur. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Paraffingewebsschnitten scheint nach den hier vorliegenden Ergebnissen nicht geeignet zu sein, Sa im Gewebe nachzuweisen. Auf diesem Gebiet besteht also noch Bedarf an weiterer Optimierung der Methode an Paraffinschnitten.

Neben bakteriologischen Untersuchungen von Patientenproben sollten Auswirkungen des Sa und SASCV- Nachweises auf nasale immunologische Parameter erfasst werden. Hierzu sollte das nasale Zytokinmuster erhoben werden und mögliche Unterschiede der Genexpression bei CRSNP⁺ Patienten mit Sa- Nachweis untersucht werden. Wie eine Infektion mit Sa bzw. SASCV zelluläre Reaktionen auf Proteinebene beeinflusst und ob Unterschiede zwischen Sa und SASCV in der induzierten Zellantwort bestehen, wurde zusätzlich an humanen monozytären MonoMac-6 Zellen (MM6) und an humanen Atemwegsepithelzellen der Zelllinie BEAS-2B (B2B) untersucht. Eine in vitro Infektion dieser beiden Zelltypen mit verschiedenen Sa- Stämmen führte zu einer unspezifischen Stimulierung der Sekretion aller untersuchten Proteine. Eine Polarisation in Richtung T_H1 bzw. T_H2, also in Richtung CRSNP⁻ bzw. CRSNP⁺ konnte nicht festgestellt werden. Auch die Microarrayanalysen von Sa-positiven und Sa-negativen Biopsien von CRSNP⁺ Patienten zeigen keine vermehrte Expression von Genen für Zytokine die für T_H1 oder T_H2 polarisieren. Ebenso wurde die Konzentration der in der nasalen Lavage gemessenen Zytokine durch eine Infektion mit Sa nicht beeinflusst und ein T_H2 Shift war nicht erkennbar.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass bei der CRS vermutlich zunächst eine Entzündung vorliegt, die dann ggf. die bakterielle Besiedlung fördert, als dass diese Entzündung initial durch eine bakterielle Infektion induziert wird. Es sei aber nochmals darauf hingewiesen, dass hier nur kleine Fallzahlen untersucht wurden. Klarheit könnte eine groß angelegte Studie mit möglichst hohen Patientenzahlen und einer gut charakterisierten Patientenpopulation sowie ggf. die Verwendung molekularer Verfahren zum Nachweis bakterieller Erreger bringen. Diese Studie zeigt, dass eine bakterielle Ursache der CRS unwahrscheinlich ist.

6. Abstract

Aim of the study “Analysis of the microbial colonization of the nose of patients with chronic rhinosinusitis with special interest on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants” was to evaluate the bacterial flora of the nose of patients with chronic rhinosinusitis (CRS) in humans, with special interest on *Staphylococcus aureus* (Sa) and its Small Colony Variant phenotype (SCV).

CRS is a common disease affecting about 5-15 % of the population in western industrial countries. Its etiology is still unknown, however, an infection with bacteria is discussed. The gram positive germ *Staphylococcus aureus* is said to play an important role in this disease. In this study, biopsy specimens of nasal mucosa as well as nasal lavages of 31 patients with CRS and nasal polyps (CRSNP⁺), 13 patients with CRS without nasal polyps (CRSNP⁻) and 21 controlpatients were examined using different microbiological detection methods. According to the results of this study, it is questionable if CRS is caused by bacteria. Sa could be detected in almost the same amount in CRSNP⁺ patients and controls, CRSNP⁻ patients were even less infected with Sa. Its role in CRS is therefore more than questionable. In none of the examined samples SASCV could be detected, suggesting that they play a minor role in CRS. However, one has to consider the small patient group examined, so that one can not conclude to the whole human population, but nevertheless this study gives evidence to the actual situation. There were also no significant differences in the detection rate of the other bacteria detected in the samples. Comparing the different detection methods, bacterial culture was the most sensitive one compared to Real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. Anyhow, the advantage of the PCR is the possibility to detect also dead bacteria and that this method is much faster than culture. Fluorescence in situ hybridization does not seem to be suitable for Sa detection in tissue samples. This method still has to be optimized in further studies.

Besides the microbiological examination of patient samples, the influence of Sa and SASCV on nasal immunological parameters should be evaluated. Nasal biomarker concentrations in nasal lavages were measured and gene expression analyses in CRSNP⁺ patients positive for Sa were examined. The influence of an infection with Sa or SASCV on cells on protein level as well as possible differences in cell reactions to Sa were studied with the human monocytic cell line MonoMac-6 (MM6) and the human respiratory epithelial cell line BEAS-2B (B2B). The infection of these two cell lines with different Sa strains lead to an unspecific secretion of all examined cytokines. A T_H1 or T_H2-shift could not be observed. Microarray data did not

show differences in gene expression polarising for T_H1 or T_H2 when comparing Sa positive with Sa negative CRSNP⁺ patients. The concentrations of nasal biomarkers also did not show significant differences between Sa positive and Sa negative patients and no T_H2 shift could be observed.

Altogether, it is likely that the initial event in the development of CRS is an inflammation which possibly advances bacterial colonization, rather than an initial bacterial infection. Again, it has to be pointed out, that only a small study population was examined.

For a better understanding of the role bacteria play in CRS, further studies with large study populations should be done, added by molecular detection methods for pathogenic bacteria. But this study shows, that it is unlikely that bacteria play a major role in CRS.

7. Publikationen

1. Niederfuhr A., Kirsche H., Deutschle T., Poppert S., Riechelmann H., Wellinghausen N.
“Staphylococcus aureus in nasal lavage and biopsy of patients with chronic rhinosinusitis”, Allergy, Vol 63, Issue 10, S. 1359 ff.
2. Niederfuhr A., Kirsche H., Riechelmann H., Wellinghausen N.
“The Bacteriology of Chronic Rhinosinusitis with and without Nasal Polyps”, Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, angenommen zur Publikation, Veröffentlichung steht noch aus
3. Poster zum Thema: **“Sensitivity and specificity of nasal lavages to detect middle meatal colonization with *Staphylococcus aureus* in patients with chronic rhinosinusitis”**, The XXVI EAACI Congress, Göteborg, Schweden, Juni 2007
4. Poster zum Thema: **“Bacteriology of biopsy specimens of nasal mucosa and nasal lavages of patients with Chronic Rhinosinusitis”**, Kongress der DGHM in Göttingen, 30.9.-4.10.2007

8. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Riechelmann für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit an der Universitäts-HNO-Klinik in Ulm, für das interessante Thema auf dem ich promovieren konnte sowie für die vielen Ideen und Vorschläge.

Danke an Herrn Professor Dr. Göbel für die Betreuung und Annahme meiner Dissertation an der LMU.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Professor Dr. Wellinghausen dafür bedanken, dass sie meine Tätigkeit im mikrobiologischen Labor betreut hat, und mich immer mit Rat und Tat unterstützt hat. Danke für die tolle Zusammenarbeit! Danke an Herrn Professor Marre und Herrn Professor Stenger, dass ich in den mikrobiologischen Laboratorien der medizinischen Mikrobiologie der Uniklinik Ulm arbeiten durfte. Ein ganz großer Dank geht auch an alle Mitarbeiter des HNO-Labors der Uniklinik Ulm sowie der medizinischen Mikrobiologie der Uniklinik Ulm- ohne Eure Hilfe wäre diese Arbeit nicht entstanden! Vielen Dank an Beate Wirths für die Einweisung in die mikrobiologischen Untersuchungen, an Monika Jerg und Olga Pagel für die Einweisung in die Durchführung von Zellversuchen sowie die Hilfe bei den Microarray- und FACS-Analysen. Danke an Tom Deutsche, für die vielen Tips zum Thema Statistik und Microarray und die Hilfe bei den FACS- und ELISA-Analysen. Ich danke auch Dr. Hanspeter Kirsche und Christine Fuchs für die Patientenrekrutierung, die sehr viel Zeit in Anspruch genommen hat! Danke auch an Dr. Rudi Reiter, der mir die Auswertung der Microarraydaten gezeigt hat. Ein ganz großer Dank geht auch an die Mitarbeiter der Pathologie der Uniklinik Ulm, die meine Schnitte für die FISH angefertigt haben. Danke auch an Frau Franz und Frau Verheyen, die bei Organisatorischem immer ein offenes Ohr hatten! Meiner Mutter und meiner Großmutter danke ich herzlich dafür, dass sie mir dies alles möglich gemacht haben, und mich immer uneingeschränkt unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich noch meinem Verlobten Thomas Nücker dafür danken, dass er mir bei allen Computerproblemen immer zur Seite stand, und auch immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte. Danke dass es Dich gibt!

9. Literatur

- (1) Fokkens W, Lund V, Mullol J. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. *Rhinology* 2007; 45(Suppl. 20):1-139.
- (2) Malm L. Assessment and staging of nasal polyposis. *Acta Otolaryngol* 1997; 117(4):465-7.
- (3) Weschta M, Rimek D, Formanek M, Polzehl D, Podbielski A, Riechelmann H. Topical antifungal treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a randomized, double-blind clinical trial. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(6):1122-8.
- (4) Lund VJ. Impact of chronic rhinosinusitis on quality of life and health care expenditure. *Clin Allergy Immunol* 2007; 20:15-24.
- (5) Lin A, Busaba NY. Staphylococcus aureus and endoscopic sinus surgery. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 14(1):19-22.
- (6) Bachert C, Wagenmann M, Rudack C, Hopken K, Hillebrandt M, Wang D et al. The role of cytokines in infectious sinusitis and nasal polyposis. *Allergy* 1998; 53(1):2-13.
- (7) Bernstein JM, Kansal R. Superantigen hypothesis for the early development of chronic hyperplastic sinusitis with massive nasal polyposis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 13(1):39-44.
- (8) Bachert C, van Zele T, Gevaert P, De Schrijver L, van Cauwenberge P. Superantigens and nasal polyps. *Curr Allergy Asthma Rep* 2003; 3(6):523-31.
- (9) van Cauwenberge P, Van Hoecke H, Bachert C. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006; 6(6):487-94.
- (10) Brook I. Bacteriology of chronic maxillary sinusitis in adults. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989; 98(6):426-8.
- (11) Brook I. Bacteriology of acute and chronic sphenoid sinusitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111(11):1002-4.
- (12) Brook I. Bacteriology of acute and chronic frontal sinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128(5):583-5.
- (13) Brook I. Bacteriology of acute and chronic ethmoid sinusitis. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7):3479-80.
- (14) Brook I. Bacteriology of chronic sinusitis and acute exacerbation of chronic sinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 132(10):1099-101.

-
- (15) Brook I. Acute and chronic bacterial sinusitis. *Infect Dis Clin North Am* 2007; 21(2):427-48, vii.
 - (16) Doyle PW, Woodham JD. Evaluation of the microbiology of chronic ethmoid sinusitis. *J Clin Microbiol* 1991; 29(11):2396-400.
 - (17) Bhattacharyya N. Bacterial infection in chronic rhinosinusitis: a controlled paired analysis. *Am J Rhinol* 2005; 19(6):544-8.
 - (18) Gluck U, Gebbers JO. The nose as bacterial reservoir: important differences between the vestibule and cavity. *Laryngoscope* 2000; 110(3 Pt 1):426-8.
 - (19) Jiang RS, Lin JF, Hsu CY. Correlation between bacteriology of the middle meatus and ethmoid sinus in chronic sinusitis. *J Laryngol Otol* 2002; 116(6):443-6.
 - (20) Nadel DM, Lanza DC, Kennedy DW. Endoscopically guided cultures in chronic sinusitis. *Am J Rhinol* 1998; 12(4):233-41.
 - (21) Nigro JF, Nigro CE, Marone SA, Voegels RL. [Microbiology of the maxillary and ethmoid sinuses in patients with chronic rhinosinusitis submitted to functional endoscopic sinus surgery]. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)* 2006; 72(2):217-22.
 - (22) Busaba NY, Siegel NS, Salman SD. Microbiology of chronic ethmoid sinusitis: is this a bacterial disease? *Am J Otolaryngol* 2004; 25(6):379-84.
 - (23) Jiang RS, Hsu CY, Jang JW. Bacteriology of the maxillary and ethmoid sinuses in chronic sinusitis. *J Laryngol Otol* 1998; 112(9):845-8.
 - (24) Jiang RS, Su MC, Liao CY, Lin JF. Bacteriology of chronic sinusitis in relation to middle meatal secretion. *Am J Rhinol* 2006; 20(2):173-6.
 - (25) Bachert C, Zhang N, van Zele T, Gevaert P, Patou J, van Cauwenberge P. Staphylococcus aureus enterotoxins as immune stimulants in chronic rhinosinusitis. *Clin Allergy Immunol* 2007; 20:163-75.
 - (26) Kluytmans JA, Wertheim HF. Nasal carriage of Staphylococcus aureus and prevention of nosocomial infections. *Infection* 2005; 33(1):3-8.
 - (27) Liu T, Wang BQ, Yang PC. A possible link between sinusitis and lower airway hypersensitivity: the role of Staphylococcal enterotoxin B. *Clin Mol Allergy* 2006; 4:7.
 - (28) Seiberling KA, Conley DB, Tripathi A, Grammer LC, Shuh L, Haines GK, III et al. Superantigens and chronic rhinosinusitis: detection of staphylococcal exotoxins in nasal polyps. *Laryngoscope* 2005; 115(9):1580-5.
 - (29) Bachert C, Gevaert P, Zhang N, van Zele T, Perez-Novo C. Role of staphylococcal superantigens in airway disease. *Chem Immunol Allergy* 2007; 93:214-36.

-
- (30) Clement S, Vaudaux P, Francois P, Schrenzel J, Huggler E, Kampf S et al. Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J Infect Dis* 2005; 192(6):1023-8.
- (31) Zhang N, Gevaert P, van Zele T, Perez-Novo C, Patou J, Holtappels G et al. An update on the impact of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in chronic sinusitis with nasal polyposis. *Rhinology* 2005; 43(3):162-8.
- (32) Damm M, Quante G, Jurk T, Sauer JA. Nasal colonization with *Staphylococcus aureus* is not associated with the severity of symptoms or the extent of the disease in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 131(3):200-6.
- (33) Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(4):295-305.
- (34) Qazi SN, Harrison SE, Self T, Williams P, Hill PJ. Real-time monitoring of intracellular *Staphylococcus aureus* replication. *J Bacteriol* 2004; 186(4):1065-77.
- (35) Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA, Trumble WR. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* 1998; 66(1):336-42.
- (36) Kintarak S, Nair SP, Speight PM, Whawell SA. A recombinant fragment of the fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus* inhibits keratinocyte migration. *Arch Dermatol Res* 2004; 296(6):250-7.
- (37) Proctor RA, Peters G. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Infect Dis* 1998; 27(3):419-22.
- (38) Schroder A, Kland R, Peschel A, von Eiff C, Aepfelbacher M. Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2006.
- (39) Kipp F, Ziebuhr W, Becker K, Krimmer V, Hobeta N, Peters G et al. Detection of *Staphylococcus aureus* by 16S rRNA directed in situ hybridisation in a patient with a brain abscess caused by small colony variants. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74(7):1000-2.
- (40) Plouin-Gaudon I, Clement S, Huggler E, Chaponnier C, Francois P, Lew D et al. Intracellular residency is frequently associated with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *Rhinology* 2006; 44(4):249-54.
- (41) Kahl BC, Belling G, Becker P, Chatterjee I, Wardecki K, Hilgert K et al. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. *Infect Immun* 2005; 73(7):4119-26.

-
- (42) Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2):830-8.
- (43) Riechelmann H, Essig A, Deutschle T, Rau A, Rothermel B, Weschta M. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in house dust mite allergic patients and healthy controls. *Allergy* 2005; 60(11):1418-23.
- (44) Costa AM, Kay I, Palladino S. Rapid detection of *mecA* and *nuc* genes in staphylococci by real-time multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51(1):13-7.
- (45) Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeier B, Lehn N. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38(6):2429-33.
- (46) Reischl U, Linde HJ, Leppmeier B, Lehn N. Duplex LightCycler PCR Assay for the Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Simultaneous Species Confirmation. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, editors. *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications*. Springer Verlag, 2001: 93-105.
- (47) Moter A, Gobel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 2000; 41(2):85-112.
- (48) Kahl BC, Goulian M, van Wamel W, Herrmann M, Simon SM, Kaplan G et al. *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect Immun* 2000; 68(9):5385-92.
- (49) Riechelmann H, Deutschle T, Grabow A, Heinzow B, Butte W, Reiter R. Differential Response of Mono Mac 6, BEAS-2B, and Jurkat Cells to Indoor Dust. *Environ Health Perspect* 2007; 115(9):1325-32.
- (50) Polzehl D, Weschta M, Podbielski A, Riechelmann H, Rimek D. Fungus culture and PCR in nasal lavage samples of patients with chronic rhinosinusitis. *J Med Microbiol* 2005; 54(Pt 1):31-7.
- (51) Kremer B, Jacobs JA, Soudijn ER, van der Ven AJ. Clinical value of bacteriological examinations of nasal and paranasal mucosa in patients with chronic sinusitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001; 258(5):220-5.
- (52) Brook I, Frazier EH. Bacteriology of chronic maxillary sinusitis associated with nasal polyposis. *J Med Microbiol* 2005; 54(Pt 6):595-7.
- (53) Dubin MG, Ebert CS, Coffey CS, Melroy CT, Sonnenburg RE, Senior BA. Concordance of middle meatal swab and maxillary sinus aspirate in acute and chronic sinusitis: a meta-analysis. *Am J Rhinol* 2005; 19(5):462-70.
- (54) Araujo E, Palombini BC, Cantarelli V, Pereira A, Mariante A. Microbiology of middle meatus in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2003; 17(1):9-15.

-
- (55) Ulrich M, Herbert S, Berger J, Bellon G, Louis D, Munker G et al. Localization of *Staphylococcus aureus* in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of *S. aureus* adherence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19(1):83-91.
- (56) Damm M, Quante G, Rosenbohm J, Rieckmann R. Proinflammatory effects of *Staphylococcus aureus* exotoxin B on nasal epithelial cells. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 134(2):245-9.
- (57) Heaton T, Mallon D, Venaille T, Holt P. Staphylococcal enterotoxin induced IL-5 stimulation as a cofactor in the pathogenesis of atopic disease: the hygiene hypothesis in reverse? *Allergy* 2003; 58(3):252-6.
- (58) Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, van Cauwenberge P. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(4):607-14.
- (59) Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1998; 36(3):618-23.
- (60) Shrestha NK, Tuohy MJ, Hall GS, Isada CM, Procop GW. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* and the *mecA* gene from BacT/ALERT blood culture bottles by using the LightCycler system. *J Clin Microbiol* 2002; 40(7):2659-61.
- (61) Klaassen CH, de Valk HA, Horrevorts AM. Clinical *Staphylococcus aureus* isolate negative for the Sa442 fragment. *J Clin Microbiol* 2003; 41(9):4493.
- (62) Sutterlin K, Englert R, Schmidt-Wieland T, Schmitt J, Reischl U, Lehn N. Sporadic cases of *Staphylococcus aureus* organisms negative for a species-specific 442-base pair chromosomal fragment. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7):3449.
- (63) Krimmer V, Merkert H, von Eiff C, Frosch M, Eulert J, Lohr JF et al. Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 1999; 37(8):2667-73.
- (64) Hogardt M, Trebesius K, Geiger AM, Hornef M, Rosenecker J, Heesemann J. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2):818-25.
- (65) Oliveira K, Procop GW, Wilson D, Coull J, Stender H. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 2002; 40(1):247-51.
- (66) da Silva MC, Zahm JM, Gras D, Bajolet O, Abely M, Hinnrasky J et al. Dynamic interaction between airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287(3):L543-L551.

-
- (67) Kintarak S, Whawell SA, Speight PM, Packer S, Nair SP. Internalization of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infect Immun* 2004; 72(10):5668-75.
- (68) Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(3):521-40.
- (69) Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 2004; 23(2):327-33.
- (70) Hauck CR, Ohlsen K. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9(1):5-11.
- (71) Matussek A, Strindhall J, Stark L, Rohde M, Geffers R, Buer J et al. Infection of human endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces transcription of genes encoding an innate immunity response. *Scand J Immunol* 2005; 61(6):536-44.
- (72) Haggar A, Hussain M, Lonnie H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock JI. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun* 2003; 71(5):2310-7.
- (73) Wesson CA, Liou LE, Todd KM, Bohach GA, Trumble WR, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect Immun* 1998; 66(11):5238-43.
- (74) Jiang Y, Oliver P, Davies KE, Platt N. Identification and characterization of murine SCARA5, a novel class A scavenger receptor that is expressed by populations of epithelial cells. *J Biol Chem* 2006; 281(17):11834-45.
- (75) Thakur SA, Hamilton RF, Jr., Holian A. Role of scavenger receptor a family in lung inflammation from exposure to environmental particles. *J Immunotoxicol* 2008; 5(2):151-7.
- (76) Oei E, Kalb T, Beuria P, Allez M, Nakazawa A, Azuma M et al. Accessory cell function of airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287(2):L318-L331.
- (77) Escotte S, Al Alam D, Le Naour R, Puchelle E, Guenounou M, Gangloff SC. T cell chemotaxis and chemokine release after *Staphylococcus aureus* interaction with polarized airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34(3):348-54.
- (78) Moreillon C, Gras D, Hologne C, Bajolet O, Cottrez F, Magnone V et al. Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells. *Physiol Genomics* 2005; 20(3):244-55.
- (79) Yao L, Bengualid V, Lowy FD, Gibbons JJ, Hatcher VB, Berman JW. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect Immun* 1995; 63(5):1835-9.

-
- (80) Kumar A, Tassopoulos AM, Li Q, Yu FS. Staphylococcus aureus protein A induced inflammatory response in human corneal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354(4):955-61.
- (81) Aufiero B, Guo M, Young C, Duanmu Z, Talwar H, Lee HK et al. Staphylococcus aureus induces the expression of tumor necrosis factor-alpha in primary human keratinocytes. *Int J Dermatol* 2007; 46(7):687-94.
- (82) Nakagawa Y, Maeda H, Murai T. Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(3):588-97.
- (83) Strindhall J, Lindgren PE, Lofgren S, Kihlstrom E. Clinical isolates of Staphylococcus aureus vary in ability to stimulate cytokine expression in human endothelial cells. *Scand J Immunol* 2005; 61(1):57-62.
- (84) Soderquist B, Kallman J, Holmberg H, Vikerfors T, Kihlstrom E. Secretion of IL-6, IL-8 and G-CSF by human endothelial cells in vitro in response to Staphylococcus aureus and staphylococcal exotoxins. *APMIS* 1998; 106(12):1157-64.
- (85) Boldrick JC, Alizadeh AA, Diehn M, Dudoit S, Liu CL, Belcher CE et al. Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(2):972-7.
- (86) Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology (GO) project in 2006. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(Database issue):D322-D326.
- (87) Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(Web Server issue):W741-W748.
- (88) Riechelmann H, Deutschle T, Rozsasi A, Keck T, Polzehl D, Burner H. Nasal biomarker profiles in acute and chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(9):1186-91.