



Vergleich des Adhäsionsverhaltens von *Staphylococcus aureus*-Stämmen von Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis, chronischer Rhinosinusitis und Normalkontrollen an einer immortalen nasalen Epithelzelllinie

C.Ruhland¹#, K.Rolfs¹#, Prof. R. Podschun², Dipl. Ing. J. Hedderich³, Prof. F. Moosig⁴, PD Dr. med. M. Laudien¹

Einleitung

Sowohl die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), als auch die chronische Rhinosinusitis (CRS) sind chronische Erkrankungen der Nase und der Nasennebenhöhlen. Bei der GPA handelt es sich hierbei um ein autoimmunes Geschehen, welches mit der Bildung von Autoantikörpern einhergehen kann (1). Bei der CRS handelt es sich um eine chronische Entzündung, die über verschiedene Trigger zu einer Aktivierung des angeborenen, sowie des erworbenen Immunsystems führt (2) Die Ätiologien beider Krankheitsbilder scheinen verschieden. Die GPA gehört zu den primären Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA)-assoziierten Vaskulitiden und ist durch nekrotisierende Entzündungen der kleinen bis mittelgroßen Gefäße gekennzeichnet (1;3). In einer Vielzahl der Fälle manifestiert sich die GPA im Kopf-Hals-Bereich und in 60-90% der Fälle sind die Nase und die Nasennebenhöhlen befallen. Auffällig ist darüber hinaus, dass bei 60-70% der GPA-Patienten, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, eine signifikant höhere endonasale Besiedlungsrate mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) nachgewiesen werden konnte (4;5;6).

Bei der CRS handelt es sich um eine chronische Entzündung der Nase und ihrer Nebenhöhlen mit zunehmender nasaler Obstruktion und einer damit verbundenen Ventilations- und Drainagestörung (2). Auch bei der CRS ist *S.aureus* eines der am häufigsten endonasal nachgewiesenen Bakterien (7). Zudem wird diskutiert, ob eine lokale Reaktion auf *Staphylococcus Superantigen* eine Rolle bei der Bildung der Polypen spielt (8;9). Im Fokus der Arbeit steht der Vergleich des Adhäsionsverhaltens verschiedener *S.aureus*-Stämme von Patienten mit GPA, CRS und einer gesunden Kontrollgruppe an einer immortalen nasalen Epithelzelllinie. Hiermit soll der Fragestellung nachgegangen werden, ob die erhöhte Nachweisrate von *S.aureus* auf phänotypischen Eigenschaften der Bakterien beruht.

Material und Methoden

Für den Versuch wurde die nasale Epithelzelllinie RPMI 2650 in BP Falcon 8 Chamber Culture Slides in MEM-Earle-Medium + 10% Fötales Kälberserum bei 37°C im Brutschrank angezüchtet. Bei Erreichen eines präkonfluenten Monolayers wurden die Epithelzellen mit randomisiert ausgewählten Bakterienstämmen der drei Patientengruppen (GPA,CRS, Normalkontrollen) sowie mit Positiv- und Negativkontrollen über eine Stunde bei 37°C kokultiviert. Dabei wurde stets auf eine gleiche Bakterienkonzentration geachtet (1x10⁹/ml). Die Kontrollstämme wurden in Vorversuchen als gut beziehungsweise gering adhätierend bestimmt. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit BacLight Bacterial Viability Kit für 15 Minuten im Dunklen inkubiert und gefärbt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 Minuten bei -20°C mit Methanol fixiert. Um mögliche Kontamination zu detektieren, wurden an jedem Versuchstag auch Versuchsansätze durchgeführt, bei denen lediglich steril angelegte Zellkulturen angefärbt wurden.

Jeder Bakterienstamm wurde im Doppelansatz untersucht und die Ergebnisse digital dokumentiert. Pro Kammer wurden 10 Bilder von je 10 unterschiedlichen Gesichtsfeldern gemacht, insgesamt also 20 Bilder pro Bakterienstamm. Für jeden Patientenstamm wurden die Zellen mit adhätierten Bakterien, sowie die Gesamtzellzahl durch bezüglich der Krankheitsgruppen verblindete Untersucher ausgezählt. Ebenso wurden auch die freien und adhätierten Bakterien ermittelt. Die Zahl der Zellen ohne adhätierte Bakterien und die Gesamtbakterienzahl wurden rechnerisch bestimmt.

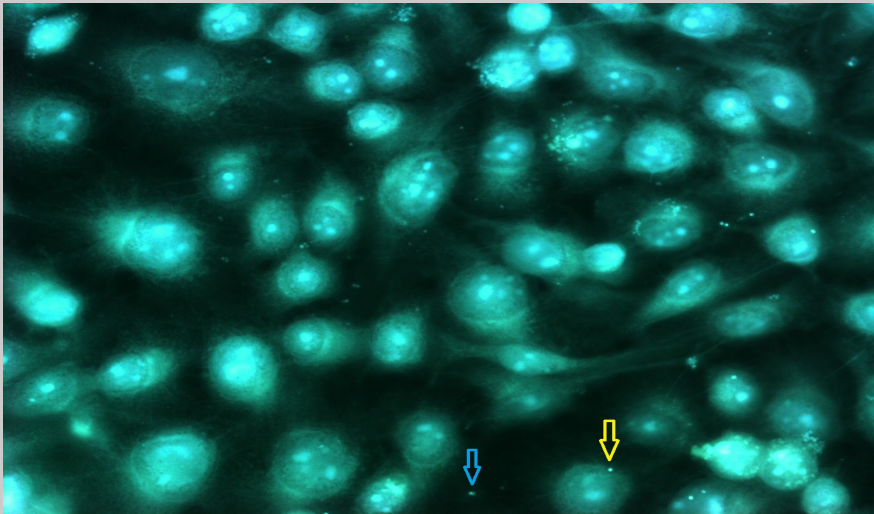


Abb.1: RPMI 2650 Zellen mit adhätierten Bakterien. gelber Pfeil = an RPMI 2650 Zelle adhätiertes Bakterium blauer Pfeil = Bakterium im Interzellularraum

Ergebnisse

Für die GPA-Gruppe wurden 12 Stämme, für die CRS-Gruppe 8 und für die der Normalkontrollen 9 Stämme analysiert. Demnach lagen 12x20 Bilder der GPA- Gruppe, 8x20 Bilder der CRS-Gruppe und 9x20 Bilder der Kontrollgruppe vor. Der Median der adhätierten Bakterien liegt in der GPA Gruppe bei 17,75 adhätierte Bakterien pro Gesichtsfeld, bei der CRS bei 15,75 und bei den Kontrollen bei 31 (siehe Abb.2). Demnach liegt der Anteil der adhätierten Bakterien an der Gesamtbakterienzahl bei der GPA-Gruppe bei 0,83, bei der CRS-Gruppe bei 0,84 und bei den Kontrollen bei 0,95 (siehe Abb.3). Rechnerisch adhätieren bei der GPA-Gruppe 0,42 Bakterien pro Zelle, bei der CRS-Gruppe 0,37 und in der Kontrollgruppe 0,6 Bakterien pro Zelle. Durch die Ergebnisse der Positiv- sowie Negativkontrollen ließ sich ein stabiler Versuchsaufbau nachweisen. Statistisch ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Adhäsionsverhalten zwischen den Gruppen darstellen. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen dem Median der Gesamtzellen und der bakterienbehafteten Zellen nachgewiesen werden.

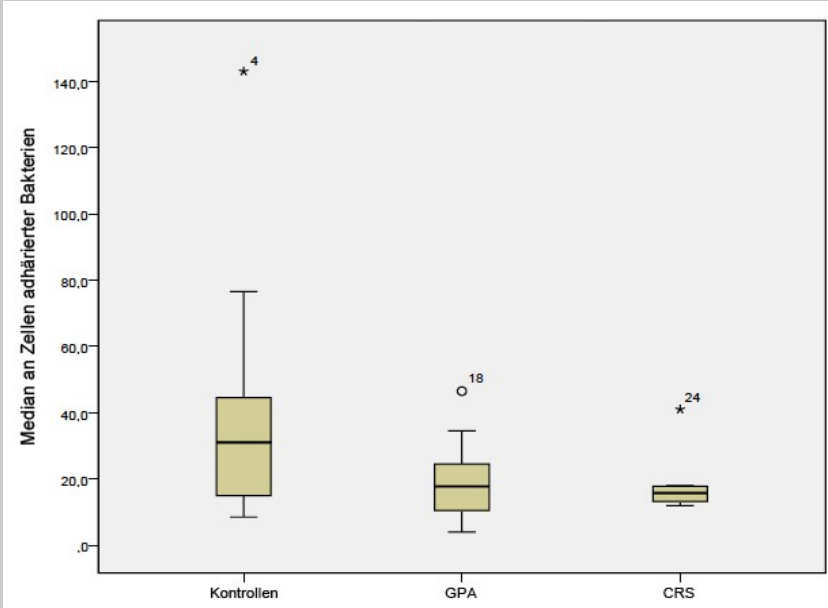


Abb.2: In den drei Patientengruppen weichen die Mediane der an Zellen adhätierten Bakterien nicht signifikant voneinander ab. In der Kontrollgruppe und der CRS-Gruppe findet sich jeweils ein echter Ausreißer nach oben (Kontrollgruppe 76,5, CRS-Gruppe 41). In der GPA liegt ein möglicher Ausreißer nach oben vor (46,5).

both authors contributed equally

¹ Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

² Institut für Infektionsmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

³ Institut für Medizinische Informatik und Statistik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

⁴ Abteilung für Rheumatologie und Immunologie, Klinikum Bad Bramstedt

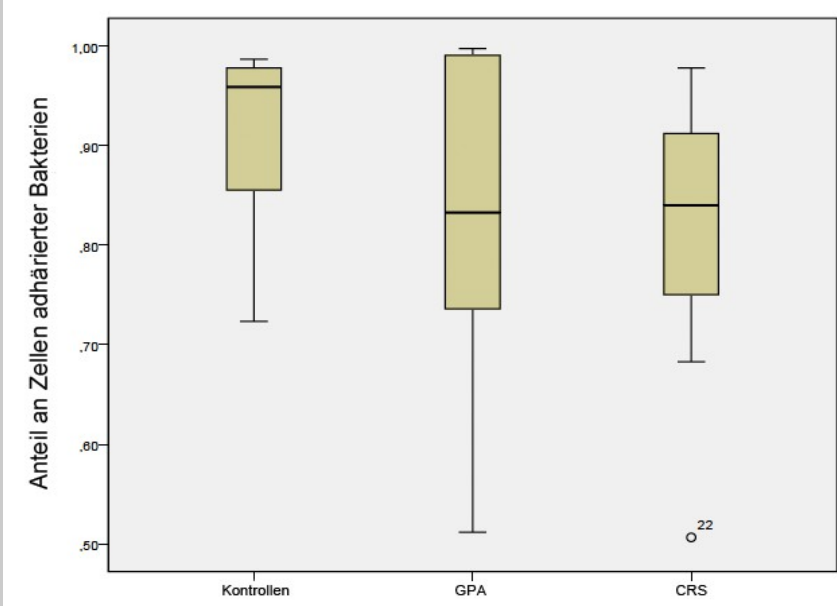


Abb.3: In den drei Patientengruppen weichen die Anteile der an Zellen adhätierten Bakterien nicht signifikant voneinander ab. Bei der Kontrollgruppe liegt der Median des Anteils der adhätierten Bakterien bei 95 %, bei der GPA- Gruppe beträgt der Wert 83 % und bei der CRS-Gruppe 84 %.

Diskussion

Sowohl bei den Patienten mit GPA, als auch bei den Patienten mit CRS zählt *S. aureus* zu häufig nachgewiesenen endonasalen Mikroorganismen (6;7). Durch Inkubieren einer nasalen Epithelzelllinie mit *S.aureus*-Stämmen von Patienten mit GPA, CRS, sowie von Normalkontrollen wurde die Hypothese untersucht, ob ein Unterschied im Adhäsionsverhalten von *S.aureus* Stämmen der drei Patientengruppen vorliegt. Mit Hilfe von Kontrollansätzen ließ sich eine weitgehende Validität und Kontaminationsfreiheit nachweisen. Ein nicht signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten wurde nachgewiesen und könnte unter anderem bedingt sein durch die Verwendung einer immortalen nasalen Epithelzelllinie. Verglichen mit einer primären Zellkultur bieten diese jedoch bedeutende Vorteile. Die Zellen sind phänotypisch identisch, stabil kultivierbar und immortal (10;11). Die enzymatisch metabolische Barriere der RPMI 2650 Zelllinie ist den Barrieren primärer Zellkulturen sehr ähnlich (12). Durch die Polarisierung der Epithelzellen und deren Verbindung durch interzelluläre Conektine, wie den Tight junctions ZO-1, Occludin, Claudin-1, E-cadherin und β -catenin entsteht auch bei der RPMI 2650 Zelllinie eine parazelluläre Barriere, deren Dichtheit durch den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) beschrieben wird. Sowohl die Expression der Junction-Proteine, als auch der gemessene TEER sind bei beiden genannten Zellkulturen ähnlich (13;14). Merkle et al fassen zusammen, dass sich die RPMI 2650 Zelllinie in Karyotyp, dem Zytokeratin Polypeptidmuster, sowie in dem Vorhandensein einer Mukoidschicht auf den Zelloberflächen, kaum von einer primären Zellkultur unterscheidet (11;15). Überlegungen zu einer zu starken Ungleichheit im Zellaufbau zwischen RPMI Zelllinien und Primärkulturen und einer dadurch verursachten verminderten Adhäsion an der RPMI 2650 Zelllinie werden durch die oben genannten Voraussetzungen abgeschwächt. Zusätzlich wurden durch das Verwenden einer immortalen Zelllinie jegliche Störfaktoren durch spenderspezifische

immunologische Faktoren ausgeschlossen. Demnach war es möglich, isoliert die bakterielle Fähigkeit der Adhäsion zu untersuchen. Ein weiterer Grund für den nicht signifikanten Unterschied im Adhäsionsverhalten könnte die einstündige Inkubationszeit sein. Diese ist gegebenenfalls nicht ausreichend, um benötigte bakterielle Adhäsionsmoleküle in suffizientem Maße zu exprimieren. Allerdings limitieren die durch die Bakterien über die Zeit der Kokultivierung zunehmenden, für die Epithelzellen toxischen Effekte die Versuchszeit (16). Um einen möglicherweise sehr geringen Unterschied im Adhäsionsverhalten abbilden zu können, bedarf es größerer Kohorten. Aufgrund der in diesem Versuchsansatz gewählten Patientenzahlen lässt sich nicht ausschließen, dass die Ergebnisse durch Ausreißer bspw. in der Kontrollgruppe verfälscht wurden. In dem Versuch wird vorwiegend der Frage nachgegangen, ob eine mögliche vermehrte Adhäsion auf differente bakterielle Phänotypen der Untersuchungsgruppen zurückzuführen ist.. In der Literatur sind unterschiedliche Adhäsionsfaktoren für *S. aureus* beschrieben. Hierzu zählen z.B. „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ (MSCRAMMs). Diese Moleküle werden von den Bakterien sezerniert und interagieren mit der Extrazellulärmatrix (17). In dem durchgeführten Versuch befinden sich die Zellen nicht in Interaktion mit dem physiologischen Schleimhautgewebe, wodurch mögliche Einflüsse auf das Adhäsionsverhalten nicht abgebildet werden können.

Schlussfolgerung

Die Untersuchungen ergaben einen nicht signifikanten Unterschied im Adhäsionsverhalten der *S. aureus* -Stämme der untersuchten Patientengruppen (GPA, CRS, Kontrollen). Dies könnte bedeuten, dass der ursächliche Pathomechanismus nicht auf unterschiedlichen bakteriellen Phänotypen beruht, sondern auf Wirtsebene begründet ist. Zukünftig werden Einflussfaktoren der krankheitsspezifischen Epithelzellen und des Gewebes auf das Adhäsionsverhalten geprüft, um die Bedeutung des Wirts für die bekannte erhöhte endonasale Besiedlungsrate mit *S. aureus* zu analysieren.

Literatur

- (1)Holle, J.U., T. Bley, and W.L. Gross, [Classification and therapy of vasculitis according to recommendations of the European League Against Rheumatism (EULAR)]. Radiologe, 2010. **50**(10): p. 846-54.
- (2)Fokkens, W.J., et al., European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. Rhinol Suppl, 2012(23): p. 3 p preceding table of contents, 1-298.
- (3)Bacon, P.A., The spectrum of Wegener's granulomatosis and disease relapse. N Engl J Med, 2005. **352**(4): p. 330-2.
- (4)Gottschlich, S., et al., [Wegener's granulomatosis in the head and neck region]. HNO, 2004. **52**(10): p. 935-45; quiz 946-7.
- (5)McDonald, T.J. and R.A. DeRemee, Head and neck involvement in Wegener's granulomatosis (WG). Adv Exp Med Biol, 1993. **336**: p. 309-13.
- (6)Laudien, M., et al., Nasal carriage of Staphylococcus aureus and endonasal activity in Wegener's granulomatosis as compared to rheumatoid arthritis and chronic Rhinosinusitis with nasal polyps. Clin Exp Rheumatol, 2010. **28**(1 Suppl 57): p. 51-5.
- (7)Boase, S., et al., The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection. BMC Infect Dis, 2013. **13**: p. 210.
- (8)Huvenne, W. P.W. Hellingens, and C. Bachert, Role of staphylococcal superantigens in airway disease. Int Arch Allergy Immunol, 2013. **161**(4): p. 304-14.
- (9)Bachert, C., et al., Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(4): p. 607-14.
- (10)Wengst, A. and S. Reichl, RPMI 2650 epithelial model and three-dimensional reconstructed human nasal mucosa as in vitro models for nasal permeation studies. Eur J Pharm Biopharm, 2010. **74**(2): p. 290-7.
- (11)Merkle, H.P., et al., In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **29**(1-2): p. 51-79.
- (12)HG, P., Cell culture sheets to study nasal peptide metabolism: The human nasal RPMI 2650 cell line model. ETH Zurich: Switzerland, 1996.
- (13)Bai, S., et al., Evaluation of human nasal RPMI 2650 cells grown at an air-liquid interface as a model for nasal drug transport studies. J Pharm Sci, 2008. **97**(3): p. 1165-78.
- (14)Kreft, M.E., et al., The Characterization of the Human Nasal Epithelial Cell Line RPMI 2650 Under Different Culture Conditions and their Optimization for an Appropriate in vitro Nasal Model. Pharm Res, 2014.
- (15)Moorhead, P.S., Human tumor cell line with a quasi-diploid karyotype (RPMI 2650). Exp Cell Res, 1965. **39**(1): p. 190-6.
- (16)Kramko, N., et al., Early Staphylococcus aureus-induced changes in endothelial barrier function are strain-specific and unrelated to bacterial translocation. Int J Med Microbiol, 2013. **303**(8): p. 635-44.
- (17)Patti, J.M., et al., MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu Rev Microbiol, 1994. **48**: p. 585-617.