

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

**STÖRUNG DER INTERLEUKIN-8-EXPRESSION
NASALER EPITHELZELLEN
BEI GRANULOMATOSE MIT POLYANGIITIS
(EHEMALS WEGENERSCHE GRANULOMATOSE)**

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

vorgelegt von
KATRIN KRUEL geb. BREUCKER
geboren in Herdecke

Kiel, 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Petra Ambrosch
PD Dr. med. Martin Laudien

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Harder

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 07.04.2014

gez.: Prof. Dr. med. dent. Christof Dörfer
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen	3
1 Einleitung	4
1.1 Granulomatose mit Polyangiitis	4
1.1.1 Ätiologie und (multi-)mikrobielle Beteiligung am pathophysiologischen Entstehungsprozess	5
1.2 Zytokine und Chemokine	6
1.2.1 Interleukin-8	7
1.3 Die Bedeutung von Interleukin-8 für die Pathogenese der GPA	7
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	8
2 Patienten und Methoden	10
2.1 Patientenkollektiv	10
2.1.1 GPA-Patienten	10
2.1.2 Normalkontrollen	11
2.2 Biopsien des Nasenepithels	11
2.3 Primäre nasale Epithelzellkulturen	12
2.3.1 Isolierung und Kultivierung primärer nasaler Epithelzellen	12
2.3.2 Zytokeratinmuster der primären nasalen Epithelzellen	13
2.4 Bakterielle Stimulation	14
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.4.2 Homogenisierung der Bakterien	15
2.4.3 Stimulation mit lysiertem <i>S. aureus</i>	15
2.4.4 Überprüfung der Zellviabilität	16
2.5 Quantifizierung von Interleukin-8	16
2.6 Statistische Auswertung	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Charakterisierung der Patientengruppen	20
3.1.1 GPA-Patienten	20
3.1.2 Normalkontrollen	22

3.2	Basale Interleukin-8-Expression primärer nasaler Epithelzellkulturen	23
3.3	Interleukin-8-Expression nasaler Epithelzellen nach Stimulation mit <i>S. aureus</i>	25
4	Diskussion	27
4.1	Charakteristika der analysierten Kohorten	27
4.2	Veränderte basale Interleukin-8-Expression nasaler Epithelzellen bei GPA	28
4.3	Reaktion auf die Stimulation mit <i>S. aureus</i>	31
5	Zusammenfassung	35
6	Literaturverzeichnis	37
7	Veröffentlichung	46
8	Danksagung	55
Anhang		56
	Zustimmung der Ethik-Kommission	56
	Curriculum Vitae	57

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
BVAS	Birmingham Vasculitis Activity Score
C-ANCA	Zytoplasmatische Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper
CK	Zytokeratin
CRP	C-reaktives Protein
DEI	Disease Extend Index
EULAR	European League Against Rheumatism
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
IL-8	Interleukin-8
MW	Mittelwert
n	Stichprobengröße
NK	Normalkontrollen
P-ANCA	Perinukleäre Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PR3	Proteinase 3
R	Spannweite
S.	<i>Staphylococcus</i>
SD	Standardabweichung
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
VDI	Vasculitis Damage Index

1 Einleitung

1.1 Granulomatose mit Polyangiitis

Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), ehemals Wegenersche Granulomatose, ist eine komplexe Autoimmunerkrankung der Gruppe der ANCA-assoziierten primären Vaskulitiden, zu der auch das Churg-Strauss-Syndrom (CSS) und die Mikroskopische Polyangiitis (MPA) gezählt werden (1).

Die Krankheit wurde erstmals 1931 von Heinz Klinger als Variante der Periarteriitis nodosa beschrieben (2) und später nach Friedrich Wegener benannt, der im Jahre 1936 von drei Obduktionsbefunden mit „merkwürdiger granulomatöser Entzündung mit Beteiligung der Blutgefäße“ (3) berichtete. Sie tritt in Europa mit einer Inzidenz von 0,8 pro 100.000 Einwohner auf (4).

Gekennzeichnet ist die GPA durch chronische nekrotisierende Gefäßwandentzündungen vorwiegend der kleinen bis mittelgroßen Gefäße, kombiniert mit der Bildung nicht verkäsender Granulome (5). Die Systemerkrankung weist ein breites Spektrum klinischer Manifestationen auf, wobei die Beteiligung des oberen und unteren Respirationstraktes sowie der Nieren im Vordergrund steht. Darüber hinaus können Haut, Augen, Ohren, Speicheldrüsen, Gelenke und das zentrale Nervensystem betroffen sein (5;6).

In 60-90 % der Fälle kommt es im Verlauf der GPA zur Beteiligung von Nase und Nasennebenhöhlen, welche somit die häufigsten anatomischen Lokalisationen der Krankheitsaktivität darstellen (7-9). Bei etwa einem Drittel dieser Patienten bleibt es bei der ausschließlich sinunasalen Manifestation (7;10;11).

Für die GPA charakteristisch ist zudem der serologische Nachweis hochspezifisch gegen Proteinase 3 (PR3) gerichteter zytoplasmatischer Anti-Neutrophiler zytoplasmatischer Antikörper (C-ANCA) (12). PR3 ist als Serinproteinase in den primären azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten sowie in monozytären Lysosomen gespeichert und zeigt nach Freisetzung proteolytische und antimikrobielle Eigenschaften. Die Expression von PR3 auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten ermöglicht darüber hinaus eine Interaktion mit C-ANCA an dieser Stelle (12;13).

1.1.1 Ätiologie und (multi-)mikrobielle Beteiligung am pathophysiologischen Entstehungsprozess

Die Ätiologie der potentiell tödlich verlaufenden Vaskulitis ist weitgehend ungeklärt. Wie bei den Prototypen der Barrierestörungen Morbus Crohn und Psoriasis wird das komplexe Zusammenspiel genetischer sowie epigenetischer Prädisposition und Umweltfaktoren diskutiert (14-16), wobei die geringe familiäre Häufung (17) auf das Überwiegen der exogenen Aspekte deutet.

Nachdem Mitte der 1990er Jahre erstmals eine erhöhte nasale *Staphylococcus (S.) aureus* Besiedlungsrate bei GPA-Patienten beschrieben wurde (18;19), wurde diese in den letzten 15 Jahren zunehmend als potenter mikrobieller Trigger der Krankheitsaktivität ausgemacht. Darüber hinaus wurde *S. aureus* als unabhängiger Risikofaktor für GPA-Rezidive nachgewiesen (20). Weitere epidemiologische Untersuchungen zeigten auch gegenüber einem Krankheits-Kontrollkollektiv (chronisch polypöse Sinusitis nasi et sinuum) signifikant erhöhte nasale Besiedlungsraten (21).

In aktuellen Untersuchungen wird allerdings eine multimikrobiell orientierte Sichtweise gefordert, die auch Anaerobier und Viren in den pathophysiologischen Entstehungsprozess der GPA mit einbezieht (22).

Kürzlich beschrieben Kain *et al.* bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden wie der GPA ein erhöhtes Vorkommen von Autoantikörpern gegen das lysosomale Membranprotein 2 (LAMP-2). Für das erkannte Epitop dieses Proteins konnte eine 100%ige Homologie zu FimH, einem Adhesin gram-negativer Pathogene wie *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Proteus mirabilis* gezeigt werden. Basierend auf der nachgewiesenen Kreuzreaktion zwischen LAMP-2 und FimH vermuten die Autoren eine FimH-getriggerte Synthese von LAMP-2-Autoantikörpern durch molekulares Mimikri (23;24).

Granulomatöse Entzündungen der nasalen Mukosa sind ein Charakteristikum der GPA. Im Immunglobulin-Genrepertoire dieser Läsionen zeigten Vosswinkel *et al.* das Vorherrschen von VH3+-B-Zellen, die sowohl eine Affinität zu PR3 als auch zu dem *S. aureus* Superantigen SpA aufwiesen. Diese Granulome könnten so als lymphoide Struktur Quelle einer mikrobiell ausgelösten Autoantikörper-Produktion gegen PR3 darstellen (25;26).

Einen weiteren Hinweis auf durch Mikroorganismen hervorgerufene GPA-Antikörperbildung geben Pendergraft *et al.*. Sie zeigten dass GPA-Patienten nicht nur PR3-ANCA, sondern auch

Autoantikörper gegen komplementäre PR3 (cPR3), also gegen ein Peptid, das durch Ablesen des Antisense-DNA-Stranges von PR3 entsteht, aufwies. Es konnte zudem demonstriert werden, dass in Anwesenheit von cPR3 nicht nur anti-cPR3-, sondern auch anti-PR3-Autoantikörper gebildet wurden. Gensequenzen, die potentiell zur Proteinbiosynthese von cPR3 und somit auch zur Expression von anti-PR3-Autoantikörpern führen könnten, wurden in zahlreichen Mikroorganismen gefunden, darunter *S. aureus*, *Entamoeba histolytica* und Ross River Virus (27).

Die dargestellten Ergebnisse lassen auf eine veränderte Zusammensetzung des mikrobiellen Besiedlungsspektrums der Nasenschleimhaut und eine Dysbalance in der Entzündungsantwort als relevante pathogenetische Prozesse der GPA schließen. Jedoch sind die molekularen Mechanismen, die diese Vorgänge vermitteln, größtenteils noch nicht bekannt.

1.2 Zytokine und Chemokine

In der Immunreaktion auf mikrobielle Reize kommt Zytokinen eine essentielle Rolle zu. Als Teil eines komplexen Netzwerks sind sie maßgeblich an der erfolgreichen Regulation der angeborenen Entzündungsantwort beteiligt (28), die die erste Verteidigungslinie gegen mikrobielle Pathogene darstellt (29).

Die Gruppe der chemotaktischen Zytokine, kurz Chemokine, bildet dabei eine eigene Protein-Superfamilie (29). Als bedeutende multifunktionale Mediatoren von Entzündungs- und Immunprozessen sind diese Peptide wesentlich an der Rekrutierung, Aktivierung und Migration von Leukozyten in entzündetes oder verletztes Gewebe beteiligt (30). Sie erfüllen zudem weitere wichtige Funktionen in physiologischen Prozessen wie der Angiogenese, Hämatopoiese und Apoptose (29).

Basierend auf Anzahl und Position konservierter aminoterminaler Zystein-Reste werden die rund 50 bekannten Chemokine in vier Untergruppen eingeteilt, wobei der Großteil den CC- oder CXC-Chemokinen zugeordnet wird (31). Die Gruppe der CXC- oder α -Chemokine lässt sich, je nach Vorkommen der Aminosäure-Sequenz Glutamat-Leucin-Arginin (das sogenannte ELR-Motiv) am Aminoterminus des Proteins, wiederum unterteilen (32). Die CXC-Chemokine, die das ELR-Motiv aufweisen (ELR+ CXC-Chemokine), vereint die

Eigenschaft leistungsstarker Chemotaxis und Aktivierung neutrophiler Granulozyten, wobei Interleukin-8 das potenteste Gruppenmitglied ist (33;34).

1.2.1 Interleukin-8

Interleukin-8, nach Nomenklatur der International Union of Immunological Societies (IUIS) CXC Ligand 8 (CXCL8) genannt (35), ist ein nicht-glykolysiertes Protein von 8 kDa (36), dessen Gen beim Menschen auf Chromosom 4 lokalisiert wurde (37). Das proinflammatorische Chemokin wird auf adäquaten Stimulus, zum Beispiel bei Kontakt mit bakteriellen Pathogenen (38;39), unter anderem von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen exprimiert (40). Wie alle Chemokine übt Interleukin-8 seinen Effekt über die Bindung an spezifische G-Protein-gekoppelte Oberflächenrezeptoren mit sieben Transmembran-Domänen (CXCR1 und CXCR2) aus (41;42).

Interleukin-8 ist in entscheidender Weise an Prozessen der antimikrobiellen Immunabwehr und an Entzündungsantworten beteiligt. Es ist das wichtigste chemotaktische Zytokin neutrophiler Granulozyten (34). Auf inflammatorischen Reiz hin fördert Interleukin-8 nicht nur die Migration der Zellen, es stimuliert darüber hinaus deren Degranulation und die Adhäsion an Endothelzellen (34). So schafft Interleukin-8 am Ort der gestörten Gewebshomöostase eine inflammatorische Mikroumgebung und erhält sie aufrecht, was für den Erfolg antimikrobieller Abwehrmechanismen unabdingbar ist.

Diese Vorgänge sind auch an der nasalen Mukosa von fundamentaler Bedeutung. Nasale Epithelzellen sind aktiv an der Modulation inflammatorischer Reaktionen beteiligt, indem sie Zytokine freisetzen, die wiederum Entzündungszellen, insbesondere Leukozyten, rekrutieren (43). Interleukin-8 wird dabei von den Epithelzellen in mehrfach höherer Konzentration als alle anderen Zytokine exprimiert (44;45). Daher wird dieses Chemokin von einigen Autoren als dominierendes Zytokin des humanen Nasenepithels angesehen (46).

1.3 Die Bedeutung von Interleukin-8 für die Pathogenese der GPA

In der Pathogenese der für die GPA charakteristischen nekrotisierenden Gefäßwandentzündungen ist die PR3-ANCA vermittelte Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten ein zentraler Aspekt (47).

Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl PR3 (48) als auch PR3-ANCA (49) die endotheliale Interleukin-8 Produktion um ein Vielfaches steigern. Als Folge werden vermehrt neutrophile Granulozyten rekrutiert, wodurch der Entzündungsprozess weiter gefördert wird. Auch für Monozyten, deren Vorbehandlung mit TNF- α zur Oberflächen-Translokation von PR3 führt, wurde eine ausgeprägte C-ANCA vermittelte Steigerung der Interleukin-8-Expression nachgewiesen (12).

Korrespondierend dazu führt die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit Interleukin-8, besonders nach vorherigem Kontakt mit TNF- α , zur Translokation von PR3 aus den intrazellulären Granula in die Plasmamembran (50). Dieser Vorgang bildet die Grundlage für eine Interaktion mit PR3-ANCA an der Zelloberfläche, die direkt entzündliche Reaktionen in den neutrophilen Granulozyten aktiviert (51;52).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Die komplexe Autoimmunerkrankung GPA ist durch destruierende Gefäßentzündungen charakterisiert (5). Zudem liegen Hinweise auf eine Dysbalance in der Antwort auf mikrobielle Reize bei GPA-Patienten vor (22). An der erfolgreichen Regulation dieser inflammatorischen Prozesse sind Zytokine in entscheidender Weise beteiligt (28;29). Dabei konnte für Interleukin-8 eine besondere pathophysiologische Bedeutung bei der GPA gezeigt werden (12;48;49). Die pathogenetischen Mechanismen, die zu Entzündung und Autoimmunität führen, sind bislang allerdings größtenteils unbekannt.

Veränderte Zytokinspiegel in Serum oder Plasma (53;54), Monozyten (12;55), T-Zellen (56;57) sowie in granulomatösen Läsionen der Lunge (58;59) und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (60) wurden bei der GPA nachgewiesen. Für Nase und Nasennebenhöhlen als häufigste und teilweise alleinige Orte der GPA-Manifestation (7-9) liegen allerdings keine umfassenden Untersuchungen vor.

Im Fokus dieser Arbeit steht deshalb die Untersuchung der basalen Interleukin-8-Expression primärer nasaler Epithelzellkulturen von GPA-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen. Darüber hinaus wird der Einfluss von *S. aureus* als potenter mikrobieller Trigger der GPA-Aktivität auf die Interleukin-8-Sekretion der nasalen Mikroumgebung analysiert.

Ziel ist dabei insbesondere die Untersuchung folgender Fragestellungen:

- (I) Ist die basale Interleukin-8-Expression primärer nasaler Epithelzellen von GPA-Patienten gegenüber denen von Normalkontrollen auf Proteinebene quantitativ verändert?
- (II) Reagieren nasale Epithelzellen von GPA-Patienten mit einer Änderung der Interleukin-8-Sekretion auf die Stimulation mit *S. aureus*? Unterscheidet sich die Reaktion zu Normalkontrollen?

2 Patienten und Methoden

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

2.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 39 Probanden untersucht. Alle Teilnehmer wurden vor Beginn der Untersuchungen aufgeklärt und erbrachten schriftliche Einverständniserklärungen zu ihrer Teilnahme.

Eine ausführliche und strukturierte Anamnese erfolgte mittels eines Fragebogens zu Allergien, Unverträglichkeiten, Asthma und Infekten der Atemwege, Krankenhausaufenthalten und Medikamenteneinnahmen. Darüber hinaus wurden Leukozytenzahl, C-reaktives Protein sowie Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit als serologische Parameter für systemische Entzündungsvorgänge bestimmt.

Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft, Minderjährigkeit und Blutungsneigung.

2.1.1 GPA-Patienten

Die Untersuchungen und Datenerhebung der Gruppe der GPA-Patienten erfolgten in Kooperation mit Mitgliedern der Arbeitsgruppe und des Klinikums Bad Bramstedt.

Die Diagnose GPA wurde gemäß der von der European League Against Rheumatism (EULAR) vorgeschlagenen Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology (ACR) von 1990 und der Chapel Hill Definitionen gestellt. Anhand der Definitionen der European Vasculitis Study Group (EUVAS) und den aktuellen Empfehlungen der EULAR wurde eine Einordnung in drei GPA-Subgruppen vorgenommen (61). Dabei erfolgte entsprechend der manifesten Symptome eine Einteilung in lokal begrenzte, früh-systemische und generalisierte Vaskulitis. Auch die Klassifizierung der Stadien der Krankheitsaktivität erfolgte entsprechend der EULAR-Richtlinien.

Zur genaueren klinischen Klassifizierung wurden die folgenden weiteren Bewertungssysteme herangezogen. Das organbezogene Ausmaß der GPA wurde durch den Disease Extend Index

(DEI, Maximalwert 20+1) dargestellt, der neben dem Befall von zehn Organsystemen zusätzlich das Auftreten von B-Symptomatik (Gewichtsverlust, Fieber, Fatigue) mit einbezieht (62).

Die Krankheitsaktivität wurde anhand des Birmingham Vasculitis Activity Scores (BVAS) bewertet. Dieses Indexsystem beschreibt zum einen neu aufgetretene Symptome (BVAS-1, Maximalwert 63), zum anderen seit mindestens sechs Monaten bestehende Veränderungen (BVAS-2, Maximalwert 33). Bewertet werden neun Organsysteme, wobei die Höhe des Scores mit der klinische Aktivität der GPA korreliert (63). Die Beurteilung kumulativer Organschäden als Folge granulomatöser Entzündungen und Vaskulitis erfolgte anhand des Vasculitis Damage Index (VDI, Maximalwert 64). Dabei werden elf organbasierte Systeme einbezogen und Schädigungen bewertet, die seit mindestens drei Monaten bestehen (64;65).

Des Weiteren wurden alle Teilnehmer einer standardisierten interdisziplinären Beurteilung (66) unterzogen und von einem Hals-Nasen-Ohrenarzt endoskopisch untersucht, um die endonasale GPA-Aktivität festzustellen (9).

Zusätzlich zu den oben genannten serologischen Parametern wurden in der Gruppe der GPA-Patienten die Titer der Proteinase 3-spezifischen zytoplasmatischen ANCA (C-ANCA) und der Myeloperoxidase-spezifischen perinukleären ANCA (P-ANCA) sowie der Proteinase 3 (PR3) im Serum bestimmt (67).

2.1.2 Normalkontrollen

Die Biopsien der Vergleichspersonen wurden im Rahmen funktioneller Operationen zur Verbesserung der Nasenatmung (Abtragung von Schleimhaut- und Knochenanteilen der Nasenmuscheln, sogenannte Turbinektomien) entnommen.

2.2 Biopsien des Nasenepithels

Die Biopsien der respiratorischen Nasenschleimhaut wurden aus der unteren Nasenmuschel gewonnen. Hierbei wurde ausschließlich Material aus Bereichen entnommen, die keine Anzeichen von Entzündungs- oder Krankheitsaktivität wie zum Beispiel Blutauflagerungen, Krusten, eitriges Sekretion, Ödeme oder Granulome aufwiesen.

Nach Entnahme wurden die Gewebeproben zum Transport in Kulturmedium (Airway Epithelial Cell Growth Medium, PromoCell, Heidelberg) gebracht und umgehend weiter bearbeitet.

2.3 Primäre nasale Epithelzellkulturen

Alle Arbeiten an den Zellkulturen fanden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank (Köttermann 8511, Uetze/Hänigsen) statt. Die verwendeten Reagenzien wurden vor Gebrauch stets auf 37°C aufgewärmt. Es wurden ausschließlich sterile Einwegmaterialien (Sarstedt, Nümbrecht) benutzt.

2.3.1 Isolierung und Kultivierung primärer nasaler Epithelzellen

Zur schonenden Abtrennung der nasalen Epithelzellen von der Basallamina und dem darunterliegenden Bindegewebe wurden die Biopsien zunächst über Nacht in Dispase-Lösung (2 Einheiten (U)/ml PBS; Invitrogen, Karlsruhe) bei 4°C inkubiert. Die Dispase bewirkt eine enzymatische Spaltung des Kollagens der Basalmembran, die Zellmembranen bleiben dabei intakt (68). Im Anschluss wurden die Epithelzellen vorsichtig mit einem Skalpell von der Basalmembran abgelöst und bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 88 g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg). Die Überstände wurden abpipetiert und verworfen, das entstandene Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Nach Zugabe von 20 U/ml Penicillin und 20 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin) erfolgte die Kultivierung der Epithelzellen in 25 cm²-großen Zellkulturflaschen (Sarstedt Tissue Culture Flask 25 cm², Nümbrecht) in wasserdampfgesättigter 5%iger CO₂-Atmosphäre bei 37°C im Brutschrank (Sanyo CO₂ Incubator, München).

Dreimal wöchentlich wurden die Zellkulturen mit einem Inversmikroskop (Olympus IMT-2, Hamburg) auf ihre epitheliale Morphologie, Wachstum, sowie auf mögliche Kontaminationen überprüft. Beim erstmaligen Feststellen von adhärentem Zellwachstum erfolgte der Wechsel des Zellkulturmediums. Im weiteren Verlauf wurde es alle drei bis vier Tage gewechselt. Dabei erfolgte keine erneute Antibiotikazugabe.

Bei Erreichen eines präkonfluenten (80-90 %) Monolayers wurden die Zellen passagiert. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte auch die immunzytochemische Überprüfung der epithelialen

Herkunft der Zellen durch Untersuchung des Zytokeratinmusters (siehe 2.4.4). Um Rückstände des Mediums zu entfernen, wurden die Zellen zunächst in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 50 Minuten bei 37°C in Dispase-Lösung (0,66 U/ml PBS), um die Zellen enzymatisch vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Durch erneute Zugabe von Zellkulturmedium wurde die Dispase-Reaktion beendet. Die Zellen wurden daraufhin bei 88 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Resuspension in Zellkulturmedium wurden die Epithelzellen in 96-Well-Platten (Sarstedt Tissue Culture Plate 96-Well, Nümbrecht) überführt, wobei pro Vertiefung 300 µl aufgebracht wurden. Unter den oben beschriebenen Bedingungen wurden die Epithelzellen unter regelmäßiger Überprüfung weiter kultiviert, bis sie in den Vertiefungen als adhärent gewachsene konfluente Monolayer vorlagen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte erneut ein Wechsel des Zellkulturmediums.

Zur Analyse der basalen Zytokinkonzentration mittels Bio-Plex™ Zytokin Assay wurden die Überstände nach 24 Stunden mit einer Pipette entnommen und ein weiteres Mal 5 Minuten bei 88 g zentrifugiert. Dadurch wurden etwaige Zellrückstände oder abgestorbenen Zellen eliminiert, die zu Verfälschungen der Messergebnisse hätten führen können. Erneut wurden die Überstände abpipettiert und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

Die Dauer der Kultivierung der nasalen Epithelzellen vor Analyse betrug durchschnittlich 13,3 Tage (Minimum 8, Maximum 19, Standardabweichung 2,536).

2.3.2 Zytokeratinmuster der primären nasalen Epithelzellen

Zytokeratine (CK) bilden die epitheliale Gruppe der Intermediärfilamente des Zytoskeletts. Dabei sind je nach Art des epithelialen Gewebes unterschiedliche Zytokeratin-Kombinationen charakteristisch (69).

Im Vorfeld waren Analysen des Zytokeratinmusters nasaler Epithelzellen durchgeführt worden. Dabei wurden aus Biopsien primäre Zellkulturen angelegt und immunzytochemisch untersucht. Außerdem wurden Paraffinschnitte der genannten Nasenbiopsien immunhistochemisch analysiert. Im Vergleich der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass sich CK 7 und 8/18 als Marker für nasale Epithelzellen verwenden lassen, was früheren Resultaten anderer Autoren entspricht (70;71).

Auf der Grundlage dieser Daten wurde das Vorkommen der Zytokeratine 7 und 8/18 immunzytochemisch untersucht, um so den epithelialen Ursprung der primären Zellkulturen

nachzuweisen. Die Methode basiert auf einer Farbreaktion-gekoppelten Antigen-Antikörper-Bindung. Dabei erfolgt zunächst die Bindung eines primären Antikörpers an das darzustellende Zytokeratin. Anschließend wird ein enzymgekoppelter Detektionsantikörper gegen den Primärantikörper eingesetzt. Ein zugegebenes Substrat wird unter Farbreaktion enzymatisch umgesetzt und zeigt so das Vorhandensein des darzustellenden Zytokeratins an. Die Auswertung des Zytokeratin-Musters erfolgte lichtmikroskopisch (Axioplan, Carl Zeiss, Jena).

Die Verteilung der Zytokeratine 7 und 8/18 bestätigte den epithelialen Ursprung der Zellen, so dass ein Einfluss anderer nasaler Zellen wie Fibroblasten oder Drüsenzellen auf die Untersuchungsergebnisse ausgeschlossen werden kann.

2.4 Bakterielle Stimulation

Zur Untersuchung des Einflusses von *S. aureus* auf die Interleukin-8-Sekretion der nasalen Epithelzellen wurden die Zellkulturen beider Versuchsgruppen für 24 Stunden mit lysierten *S. aureus* Bakterien stimuliert. Daraufhin erfolgte erneut eine Quantifizierung der Interleukin-8-Konzentration in den Überständen mittels Bio-Plex™ Zytokin Assay.

Diese Experimente erfolgten in Kooperation mit dem Institut für Infektionsmedizin der Christian-Albrechts Universität zu Kiel.

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

In West-Europa dominiert in nasalen Isolaten der *S. aureus*-Stamm T190-2 (72). Deshalb wurde dieser Stamm für die Stimulationsexperimente ausgewählt.

Die Bakterien wurden bis zum Erreichen einer Konzentration von etwa 5×10^8 pro ml in Erlenmeyerkolben (Schott Duran, Mainz) in Tryptic Soy Boullion (Sigma-Aldrich, Steinheim) als Übernachtskultur in einem Inkubator (Sanyo CO₂ Incubator, München) unter leichtem Schütteln bei 37°C angezüchtet. Nach Zentrifugation bei 4000 g für 15 Minuten wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Das entstandene Bakteriensediment wurde zur weiteren Verarbeitung in PromoCell-Kulturmedium resuspendiert.

2.4.2 Homogenisierung der Bakterien

Mit dem Ziel, die Bakterien zu homogenisieren, ohne die Proteine zu denaturieren und damit den Stimulus auf Proteinebene zu verändern, wurden die *S. aureus* mittels des MagNA Lyser[®] (Roche Diagnostics, Mannheim) mechanisch aufgeschlossen. Dazu wurden die in Kulturmedium suspendierten Bakterien in verschließbare 2 ml-Röhrchen, die bereits Glasperlen von 0,5 mm Durchmesser enthalten (Precellys[®] Glas-Kits, Peqlab Biotechnologie, Erlangen), überführt. Im MagNA Lyser[®] werden die Röhrchen in Schwingung versetzt, so dass die Zellwände und -membranen der Bakterien durch Kollision mit den Kügelchen aufbrechen. Auf diese Weise entstehen Bakterienlysate aus Zellwand-Bestandteilen und Intrazellulär-Material. Die vorherige Kühlung des Rotor-Elements verhindert dabei eine übermäßige Temperaturzunahme.

Zur Überprüfung des Devitalisierungs-Prozesses wurden Teile der Homogenate auf Columbia Blutagarplatten (Oxoid, Wesel) aufgebracht und bei 37°C über Nacht inkubiert. Ein Wachstum der Bakterien konnte so ausgeschlossen werden.

2.4.3 Stimulation mit lysiertem *S. aureus*

Die Stimulation der primären nasalen Epithelzellen, die bei etwa 90%iger Konfluenz in 96-Well-Platten vorlagen (siehe 2.3.1), erfolgte mit einer Endkonzentration von 10^5 *S. aureus* pro ml Kulturmedium. Dazu wurde das Zellkulturmedium entfernt, pro Well 300 µl der Bakterienlysat-Lösung hinzugefügt (entspricht etwa 3×10^4 Bakterien) und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Zellkulturen in frischem PromoCell-Kulturmedium ohne Bakterien-Überstände dienten als Negativkontrolle.

Nach Ende der Stimulationsperiode wurden die Überstände abgenommen und bei 88 g für 5 Minuten zentrifugiert um eventuell vorhandene Zellrückstände zu eliminieren. Anschließend wurden die Überstände bis zur Analyse mittels Bio-Plex[™] Zytokin Assay bei -80°C eingefroren.

Zur Überprüfung auf bakterielle Kontamination wurden 10 µl des Überstandes auf Columbia Blutagarplatten aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Darüber hinaus erfolgte eine Kontrolle der Zellviabilität.

2.4.4 Überprüfung der Zellviabilität

Die Überprüfung der Viabilität der nasalen Epithelzellen nach Stimulation erfolgte mit Trypanblau. Ausgenutzt wird bei diesem Prinzip, dass abgestorbene Zellen eine veränderte Membranpermeabilität aufweisen. Während der Farbstoff gesunde Zellmembranen nicht passieren kann, wird er von abgestorbenen Zellen aufgenommen und färbt sie selektiv blau. Dazu wurden 10 µl des Überstandes in den Vertiefungen der 96-Well-Platte belassen und mit 10 µl Trypanblau-Originallösung (Biochrom AG, Berlin, 0,5 % in physiologischer Kochsalzlösung) 1:1 verdünnt. Basierend auf der lichtmikroskopischen Auszählung von fünf Sichtfeldern wurde die Zellviabilität als prozentualer Anteil der ungefärbten und somit vitalen Zellen errechnet. Verwendet wurden nur Stimulationsversuche, bei denen dieser Wert mindestens 95 % betrug.

2.5 Quantifizierung von Interleukin-8

Die Analyse der Überstände der nasalen Epithelzellkulturen erfolgte mittels Bio-Plex™ Zytokin Assay (Bio-Rad Laboratories, München), der in Kooperation mit VaccineLab Rostock durchgeführt wurde. Dieses Protein Array System kombiniert das Prinzip eines Sandwich-Immunoassays mit einem durchflusszytometrischen Verfahren, wobei in geringem Probenvolumen bis zu 100 verschiedene Proteine simultan quantifiziert werden können. Ermöglicht wird dies durch Verwendung von Polystyrenkügelchen mit einem Durchmesser von 5,6 µm, sogenannte Beads, die durch zwei Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedlich markiert sind. An die Kügelchen sind die für die Bestimmung des jeweiligen Proteins spezifischen Antikörper gekoppelt, so dass jedes Zytokin später über die eindeutig markierten Beads vom Bio-Plex™ Array Reader (Bio-Rad Laboratories, München) identifiziert werden kann. Eine Signalverstärkung wird durch das Zufügen von Streptavidin-Phycoerythrin (PE) erreicht, das an ebenfalls hinzugegebene biotinylierte Detektionsantikörper bindet.

Zur Quantifizierung von Interleukin-8 wurde das Bio-Plex™ Cytokine Broad Range 17-Plex Panel eingesetzt, das neben den Antikörper-konjugierten Beads und den Detektionsantikörpern die Standards zur Zytokinbestimmung als vorgefertigte Reagenzien enthält. Außerdem verwendet wurde das Bio-Plex™ Cytokine Reagent Kit, das sterile

Mikrotiterplatten mit Abdeckfolien, Probenpuffer, Waschpuffer, Verdünnungslösung für die Detektionsantikörper und Streptavidin-PE beinhaltet (Bio-Rad Laboratories, München).

Zur Vorbereitung wurden alle Reagenzien gemäß Herstellerangaben verdünnt. Die Eichung des Bio-Plex™ Array Reader erfolgte mit Hilfe der mitgelieferten Kalibratoren. Die 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl Messpuffer pro Vertiefung angefeuchtet und daraufhin per Vakuumfiltration von der Flüssigkeit gereinigt. Anschließend wurden 50 µl Bead-Lösung in jede verwendete Vertiefung transferiert, und nach kurzer Wartezeit, welche ein leichtes Absinken der Beads ermöglichte, zweimal mit je 100 µl Waschpuffer gewaschen. Währenddessen wurden die Überstände der nasalen Epithelzellkulturen langsam aufgetaut und jeweils 50 µl pro Well neben den entsprechenden Standards auf die Platte pipettiert. Nach initialem 30-sekündigem Aufschütteln bei 1100 rpm wurde die Platte bei 300 rpm für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit auf einem Schüttler (Heidolph Unimax 1010, Schwabach) inkubiert. In diesem Schritt binden die Antikörper-konjugierten Beads an die Zytokine des Überstandes. Im Anschluss wurde erneut dreimal mit je 100 µl Waschpuffer gewaschen, bevor pro Vertiefung 25 µl der gelösten Detektionsantikörper hinzugefügt wurden. Diese biotinylierten Antikörper binden ebenfalls an die zu quantifizierenden Zytokine, allerdings an ein anderes Epitop als die Beads. Die erneute Inkubation und das Waschen fanden wie oben beschrieben statt. Für den letzten Inkubationsschritt wurden pro Well 50 µl Streptavidin-PE-Lösung zugegeben. Die Platte wurde wiederum 30 Sekunden bei 1100 rpm aufgeschüttelt und daraufhin bei 300 rpm für 10 Minuten inkubiert. Streptavidin bindet währenddessen an das an den sekundären Antikörper gekoppelte Biotin und ermöglicht so eine spätere Zytokinquantifizierung. Letztmalig wurden nun drei Waschgänge durchgeführt, um überschüssiges Streptavidin-PE zu entfernen. Nach Zugabe von 125 µl Messpuffer pro Vertiefung wurde die Mikrotiterplatte unmittelbar vor dem Auslesen durch den Bio-Plex™ Array Reader 30 Sekunden bei 1100 rpm aufgeschüttelt.

Die Messungen erfolgen im Durchflusszytometrie-Verfahren. Dabei identifiziert ein roter Laser (635 nm) die Beads anhand ihrer spezifischen Fluoreszenz und kann somit das zu bestimmende Zytokin zuordnen. Simultan detektiert ein zweiter, grüner Laser (532 nm) die Fluoreszenz der chromophoren Gruppe des Phycoerythrins. Die Intensität dieser Fluoreszenz ist proportional zur Zytokinmenge und kann so mit der Bio-Plex™ Manager Software berechnet werden.

In Abbildung 1 ist das Verfahren des Bio-Plex™ Zytokin Assays schematisch verdeutlicht.

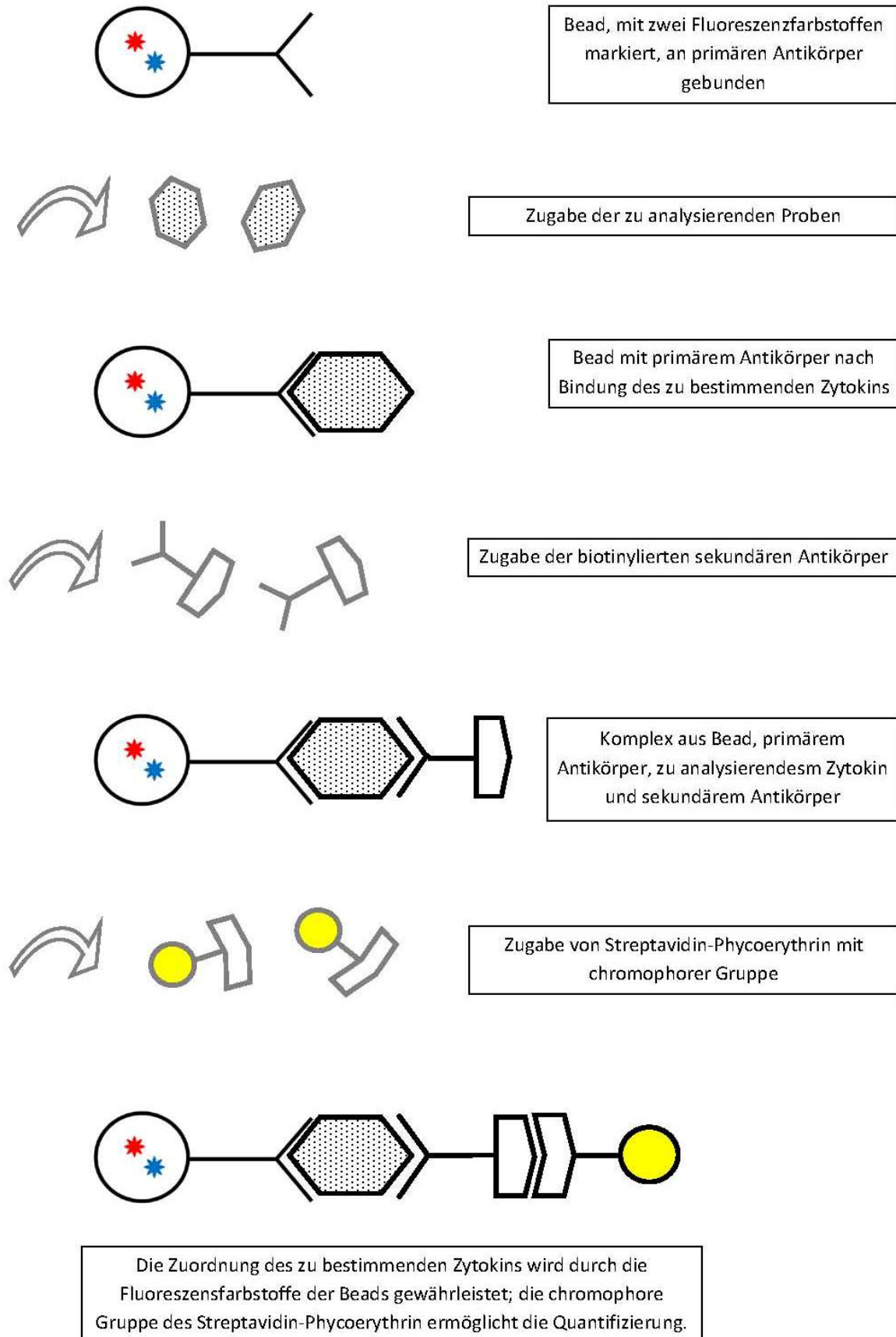


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Bio-Plex™ Zytokin Assays

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Analysesoftware SPSS 18 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Daten wurden durch Stichprobengröße (n), arithmetische Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD), Maximum und Minimum beziehungsweise Median und Spannweite (R) beschrieben. Um zu überprüfen, ob die Verteilung der Ergebnisse des Multiplex Zytokin Assays mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Normalverteilung entspricht, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt, der auch bei Stichproben von unter 40 eingesetzt werden kann. Nach Analyse der resultierenden Werte für extremste Differenzen und asymptotischer Signifikanz wurde die Nullhypothese, dass die Daten normalverteilt sind, verworfen. Aus diesem Grund erfolgte der Vergleich der Zytokinexpression der beiden untersuchten Gruppen (GPA-Patienten und Normalkontrollen) mittels des Mann-Whitney-Wilcoxon-Tests. Dieser nichtparametrische statistische Test dient dem Vergleich stetiger quantitativer Merkmale zweier unabhängiger Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz und setzt keine Normalverteilung voraus. Ausgehend von der Nullhypothese, dass die beiden Verteilungen derselben Grundgesamtheit angehören, werden die Daten der untersuchten Gruppen in einer gemeinsamen Rangliste geordnet und die Rangsummen beider Proben verglichen.

Die Ergebnisse wurden bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Patientengruppen

3.1.1 GPA-Patienten

Die Gruppe der Patienten mit GPA umfasste 20 Personen, zwölf männliche und acht weibliche. Der Mittelwert des Lebensalters betrug 51,6 Jahre, der jüngste Patient war 24 Jahre alt, der älteste 71 (Tabelle 2). Bei 65 % der Patienten (13 von 20) wurde die Diagnose Granulomatose mit Polyangiitis histologisch gesichert. Der Nachweis erfolgte dabei in neun Fällen (45 %) an Nasenbiopsien, bei jeweils zwei weiteren Patienten (10 %) an Biopsien der Lunge oder der Niere. Symptome der Krankheit traten im Median erstmals 3,8 Jahre (Spannweite 0 – 19 Jahre) vor Studienbeginn auf, die Diagnose wurde im Median 1,6 Jahre (Spannweite 0 – 19 Jahre) vor Aufnahme in die Studie gestellt.

Entsprechend der Klassifikation der EULAR zur Einteilung der Aktivität befanden sich sechs Patienten in Remission. Bei zwölf Patienten (60 %) trat erneut eine Krankheitsaktivität auf, wovon eine Gruppe von vier Patienten (20 %) potentiell organschädigende bis lebensbedrohliche Symptome zeigte und somit als Majorrezidiv beschrieben wurde; die acht weiteren (40 %) wurden als Minorrezidiv klassifiziert. Bei einem Patienten wurde die Persistenz von Minorsymptomen wie zum Beispiel Arthralgie oder Myalgie beschrieben, bei einem weiteren wurde die GPA-Aktivität als refraktär eingestuft. Nach den von der EULAR vorgeschlagenen GPA-Subgruppen wurde das Krankheitsstadium bei 14 Patienten (70 %) als generalisiert klassifiziert, bei weiteren fünf (25 %) als früh-systemisch, bei einem GPA-Patienten als lokal begrenzt.

Der Median des zur Beurteilung des Krankheitsausmaßes verwendeten DEI betrug 2,0 (Spannweite 0 - 5). Der BVAS-1 zeigte bei einer Spannweite von 0 - 13 einen Median von 3. In der Beurteilung nach BVAS-2 hatte die Mehrheit der Patienten (18 bzw. 90 %) einen Score von 0, jeweils ein weiterer einen Score von 1 und respektive 4. Der Median des VDI zur Beurteilung kumulativer Organschäden betrug 0,5 (Spannweite 0 – 3).

In der endoskopischen Untersuchung konnte bei zwölf Patienten (60 %) keine endonasale GPA-Aktivität festgestellt werden, sieben (35 %) zeigten milde Zeichen, ein Teilnehmer konnte nicht beurteilt werden. Einzelheiten sind in Tabelle 1a dargestellt.

Tabelle 1a: Patientencharakteristik der GPA-Kohorte

Granulomatose mit Polyangiitis		n	%
EULAR Krankheitsstadien	generalisiert	14	70
	früh-systemisch	5	25
	lokalisiert	1	5
EULAR Aktivitätsstadien	Remission	6	30
	Therapie-Ansprechen	0	0
	Majorrezidiv	4	20
	Minorrezidiv	8	40
	Refraktäre Erkrankung	1	5
	Persistente Erkrankung	1	5
Endonasale Aktivität	keine	12	60
	mild	7	35
	nicht bewertet	1	5
Bewertungsscores		Median (Spannweite)	
	DEI	2 (0-5)	
	BVAS-1	3 (0-13)	
	BVAS-2	0 (0-4)	
	VDI	0,5 (0-3)	

Die Mehrzahl der GPA-Patienten, 19 von 20, erhielten eine Prednisolon-Behandlung. Zehn Probanden wurden darüber hinaus mit Methotrexat behandelt, jeweils zwei mit Azathioprin oder Leflunomid, ein Patient mit Mycophenolat Mofetil. Drei Patienten bekamen dauerhaft Cyclophosphamid, zwei weitere erhielten dieses Medikament als Bolustherapie. Der Mittelwert der kumulativen Gesamtdosis an Cyclophosphamid betrug 45,17 g. Eine Übersicht der immunmodulierenden Medikamente sowie Angaben zu den Dosierungen zeigt Tabelle 1b.

Tabelle 1b: Immunmodulierende Therapie der GPA-Patienten

Immunmodulierende Medikamente	Mittelwert (mg/Tag)	n	%
Prednisolon	12,89	19	95
Methotrexat	22,25	10	50
Cyclophosphamid dauerhaft	133,33	3	15
Cyclophosphamid Bolustherapie	1000,00	2	10
Azathioprin	125,00	2	10
Leflunomid	25,00	2	10
Mycophenolat mofetil	2000,00	1	5

Die Bestimmung der ANCA- und PR3-Titer ergab folgende Mediane: PR3-spezifische C-ANCA 1 : 60 (Spannweite 1:0 – 1:2560); MPO-spezifische P-ANCA 1 : 0 (Spannweite 1:0 – 1:640); PR3 1 : 0 (Spannweite 1:0 – 1:200). Die Mittelwerte der Leukozytenzahl (8,22 Zellen/nl, Standardabweichung 2,82) und des CRPs (1,6 mg/dl, Standardabweichung 2,12) waren im Normbereich. Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit lag mit einem Mittelwert von 33 mm in der ersten Stunde (Standardabweichung 27,60) oberhalb des Referenzbereiches (Tabelle 2).

Basierend auf Eigen- und Fremdanamnese konnten Allergien und Asthma bei allen teilnehmenden GPA-Patienten ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend betrachtet weisen sowohl die klinischen Bewertungssysteme als auch die serologischen Untersuchungen eine geringe GPA-Aktivität der analysierten Kohorte nach.

3.1.2 Normalkontrollen

Die Gruppe der Normalkontrollen bestand aus 19 Probanden, 15 männliche und vier weibliche. Der Mittelwert des Lebensalters betrug 39,5 Jahre, der jüngste Patient war 18 Jahre alt, der älteste 76 (Tabelle2). Die Vergleichspersonen zeigten weder anamnestisch noch in der körperlichen Untersuchung Zeichen einer akuten oder chronischen Rhinosinusitis. Insgesamt wurden keine Hinweise auf inflammatorisch- oder autoimmunbedingte Nasenschleimhautveränderungen festgestellt.

Die Mittelwerte der serologischen Entzündungsparameter betragen bei der Leukozytenzahl 6,74/nl (Standardabweichung 1,55), dem CRP 1,76 mg/dl (Standardabweichung 1,37), und der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit 8,14 mm in der ersten Stunde (Standardabweichung 3,94) und lagen somit im Normbereich (Tabelle 2).

Keiner der Vergleichspersonen wurde mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt.

Allergien und Asthma konnten auch in dieser Gruppe eigen- und fremdanamnestisch ausgeschlossen werden.

Tabelle 2: Patientencharakteristik beider Gruppen

	Normalkontrollen (n = 19)		GPA (n = 20)	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Alter (Jahre, MW und SD)	39,50 (18-76)		51,55 (24-71)	
Geschlecht	11 männlich, 8 weiblich		12 männlich, 8 weiblich	
Serologische Parameter	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Leukozyten (Zellen/nl)	6,74	1,55	8,22	2,82
CRP (mg/dl)	1,76	1,37	1,60	2,12
BSG 1. Std (mm)	8,14	3,94	33,00	27,60
			Median	R
C-ANCA-Titer (1:)			80	0 – 2560
P-ANCA-Titer (1:)			0	0 – 640
PR3-Titer (1:)			0	0 – 200

3.2 Basale Interleukin-8-Expression primärer nasaler Epithelzellkulturen

In der Gruppe der GPA-Patienten betrug der Mittelwert der basalen Interleukin-8-Konzentration in den Kulturüberständen primärer nasaler Epithelzellkulturen 747,27 pg/ml (Standardabweichung 852,48, Minimum 1,00, Maximum 3.708,72; Werte in [pg/ml]). Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen endonasaler GPA-Aktivität zum Zeitpunkt der Probenentnahme und Interleukin-8-Expression der korrespondierenden Epithelzellen konnte nicht dargestellt werden ($p = 0,684$). Sechs der 20 untersuchten GPA-Patienten zeigten im zeitlichen Verlauf nie, drei immer endonasale Krankheitsaktivität. Auch der Vergleich dieser beiden Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,796$).

Der Einfluss der immunsuppressiven Medikation auf die Interleukin-8-Expression wurde exemplarisch an der Prednisolon-Dosis untersucht. Ein Zusammenhang konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 2).

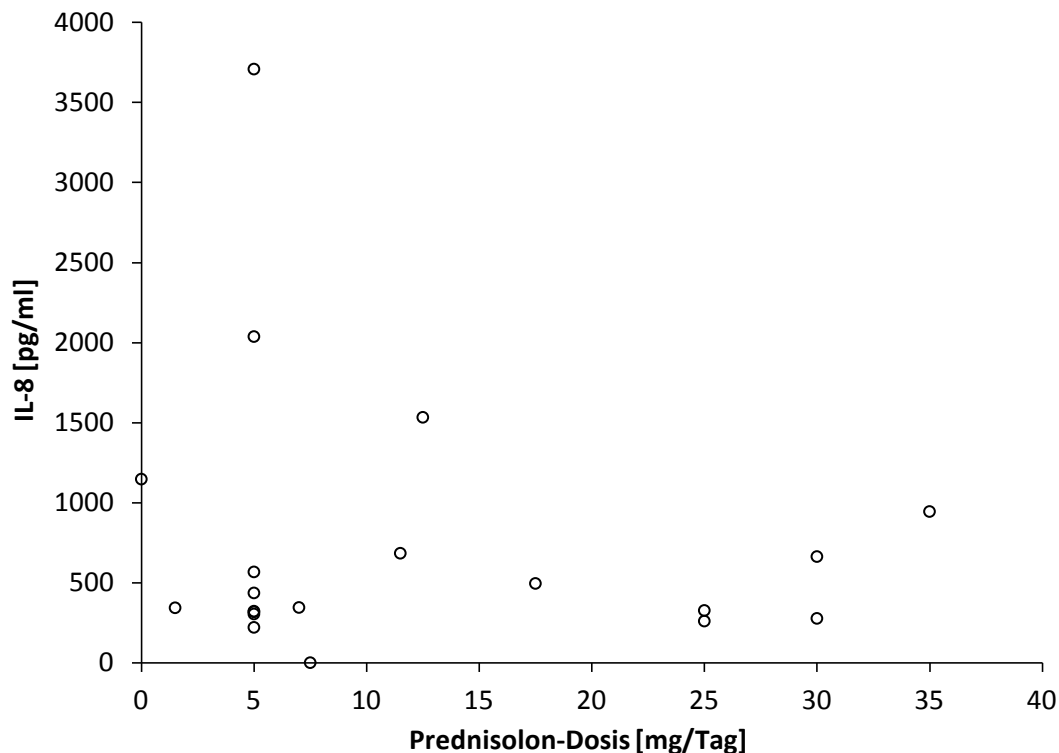


Abbildung 2. Einfluss der Prednisolon-Dosis auf die basale Interleukin-8-Expression korrespondierender nasaler Epithelzellen.

In der Gruppe der Normalkontrollen betrug der Mittelwert der basalen Interleukin-8-Konzentration 1.891,45 pg/ml (Standardabweichung 1.674,41, Minimum 1,00, Maximum 5.188,14; Werte in [pg/ml]). Eine Gegenüberstellung der Messwerte findet sich in Tabelle 3. Der Vergleich beider Gruppen zeigt eine deutlich geringere basale Interleukin-8-Expression nasaler Epithelzellen bei GPA-Patienten. Mit einem p-Wert von 0,009 ist das Ergebnis hoch signifikant. Abbildung 3 veranschaulicht die beschriebenen Daten.

Tabelle 3. Basale Interleukin-8-Konzentration (Werte in [pg/ml])

	Normalkontrollen n = 19	GPA n = 20
Mittelwert	1.891,45	747,27
Standardabweichung	1.674,41	852,48
Minimum	1,00	1,00
Maximum	5.188,14	3.708,72

3.3 Interleukin-8-Expression nasaler Epithelzellen nach Stimulation mit *S. aureus*

Nach 24-stündiger Stimulation mit lysiertem *S. aureus* betrug der Mittelwert der Interleukin-8-Konzentration bei GPA-Patienten 791,72 pg/ml (Standardabweichung 881,86, Minimum 98,81, Maximum 3.465,94; Werte in [pg/ml]), bei der Gruppe der Vergleichspersonen 1.725,80 pg/ml (Standardabweichung 1.708,90, Minimum 45,19, Maximum 7.219,55; Werte in [pg/ml]). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Interleukin-8-Expression der nasalen Epithelzellen nach bakterieller Stimulation ist somit bei GPA-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen signifikant geringer ($p = 0,024$).

Der Vergleich der Interleukin-8-Konzentration basal und nach Stimulation innerhalb der einzelnen Gruppen zeigt allerdings keinen signifikanten Unterschied (NC: $p = 0,857$; WG: $p = 0,992$). Dementsprechend lässt sich weder für die Gruppe der GPA-Patienten noch für die der Normalkontrollen auf Ebene der Interleukin-8-Proteinexpression eine deutliche Reaktion auf den *S. aureus*-Stimulus feststellen.

Abbildung 3 beinhaltet eine Gegenüberstellung der Messergebnisse zur grafischen Verdeutlichung.

Tabelle 4. Interleukin-8-Konzentration nach Stimulation mit *S. aureus* (Werte in [pg/ml])

	Normalkontrollen n = 19	GPA n = 20
Mittelwert	1.725,80	791,72
Standardabweichung	1.708,90	881,86
Minimum	45,19	98,81
Maximum	7.219,55	3.465,94

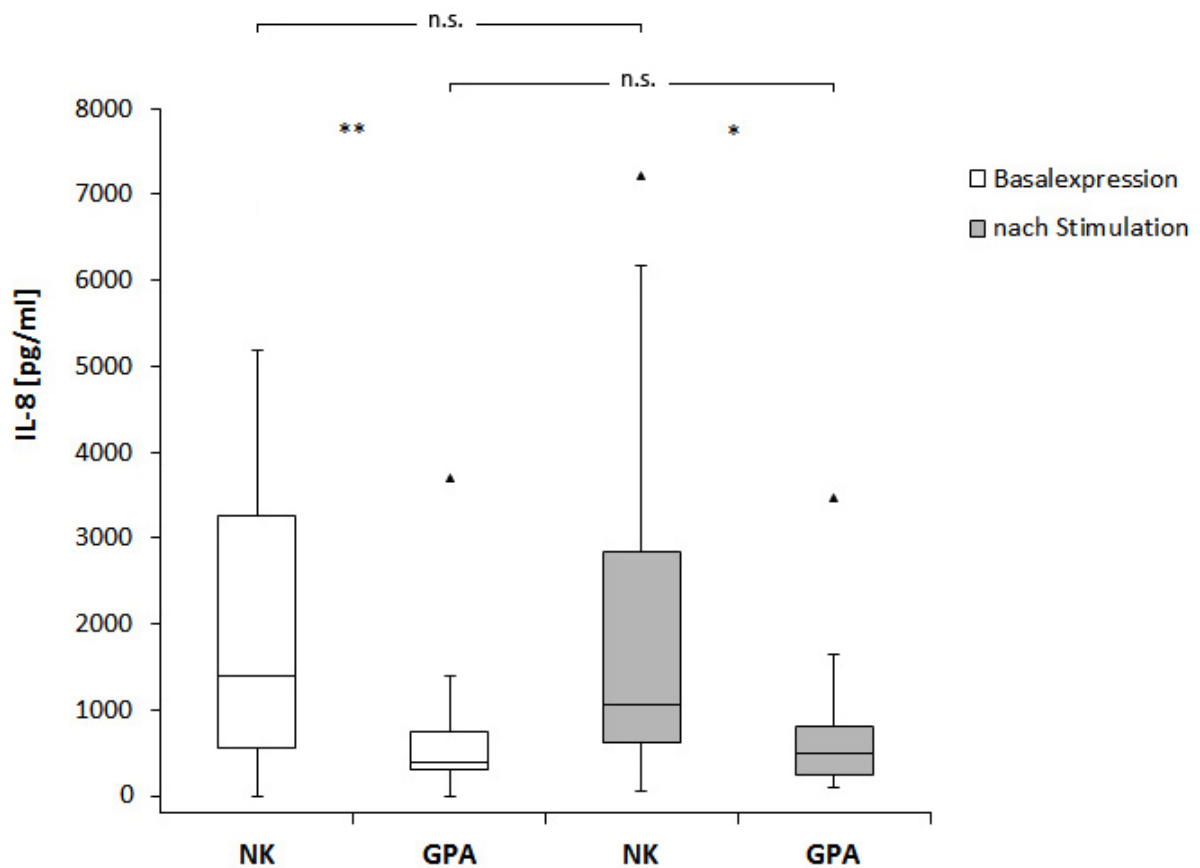


Abbildung 3. Interleukin-8-Expression nasaler Epithelzellen basal und nach Stimulation mit *S. aureus* bei GPA-Patienten (GPA) und Normalkontrollen (NK); dargestellt sind jeweils der Median, das obere und untere Quartil sowie die Extremwerte und Ausreißer.

** : $p = 0,009$; * : $p = 0,024$; n.s. = nicht signifikant

4 Diskussion

Für die Integrität eines Organismus ist die erfolgreiche Abwehr potenziell pathogener Mikroorganismen essentiell. Fremde Strukturbestandteile müssen erkannt werden, damit daraufhin eine koordinierte Reaktion zur Elimination eingeleitet werden kann. Die Unterscheidung zu körpereigenem Gewebe verhindert dabei eine pathologische Autoimmunreaktion (73;74). Auch die Beendigung der inflammatorischen Vorgänge ist von Bedeutung, da sonst resultierende chronische Entzündungsprozesse dem Wirtsorganismus irreversible Schäden zufügen können (75). Diese Aufgaben erfüllt unter anderem die angeborene Immunabwehr, ein mehr als zwei Millionen Jahre altes hochkonserviertes System, das nach wie vor eine der ersten Verteidigungslinien gegen pathogene Mikroorganismen darstellt (76).

Einen unverzichtbaren Bestandteil dieses Systems bilden die Zytokine. Als lösliche Botenstoffe ermöglichen sie auto-, para- und endokrine zelluläre Kommunikation und bilden so die fundamentale Basis für eine gezielte Immunreaktion. Nur der koordinierte Ablauf der einzelnen Signalwege ermöglicht eine abgestimmte Immunantwort auf Entzündungsreize und somit die erfolgreiche Abwehr pathogener Mikroorganismen (34;77).

Interleukin-8 nimmt dabei besonders im Nasenepithel eine Schlüsselfunktion ein. Das proinflammatorische Chemokin wird dort in mehrfach höherer Konzentration als alle anderen Zytokine exprimiert (44;45). Es ist maßgeblich an den lokalen Prozessen der antimikrobiellen Immunabwehr und Entzündungsreaktionen beteiligt und bildet so einen existenziellen Bestandteil der nasalen Barriere.

4.1 Charakteristika der analysierten Kohorten

Um nicht akute Entzündungsprozesse, sondern (epi-)genetische Veränderungen der nasalen Epithelzellen bei der GPA zu analysieren, wurde für diese Studie eine Patientenkohorte mit vergleichsweise geringer Krankheitsaktivität gewählt. Sowohl die klinischen Bewertungssysteme als auch die größtenteils normwertigen serologischen Parameter weisen dies nach. Der leicht über den Referenzbereich erhöhte Mittelwert der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit stellt bei der GPA eine häufig assoziierte Laborveränderung dar und lässt nicht auf erhöhte Krankheitsaktivität schließen (10).

Das im Vergleich zu den meisten anderen Studien deutlich breiter gefächerte Spektrum angewendeter klinischer Bewertungssysteme ermöglicht eine weitaus differenziertere Bewertung der Krankheitsaktivität. Basierend auf der regelmäßigen Erhebung dieser Daten im Langzeitverlauf kann untersucht werden, ob sich eine Veränderung der GPA-Aktivität auch auf Ebene der Interleukin-8-Expression manifestiert. Ebenso könnte die vergleichende Analyse einer GPA-Kohorte mit deutlich höherer Krankheitsaktivität Hinweise auf eine potentielle Korrelation von GPA-Aktivität und Zytokinexpression geben.

Auch in der Gruppe der Normalkontrollen lagen die serologischen Werte im Normbereich, so dass akute oder chronische Entzündungsaktivität weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Altersstruktur und Geschlechterverteilung sowie der anamnestische Ausschluss von Allergien oder Asthma ermöglichten darüber hinaus eine gute Vergleichbarkeit zwischen den analysierten Kohorten.

4.2 Veränderte basale Interleukin-8-Expression nasaler Epithelzellen bei GPA

Der Mensch atmet täglich 10.000 bis 20.000 l Umgebungsluft ein, die die Luftwege kontinuierlich potentiell pathogenen Faktoren wie Schadstoffen oder Mikroorganismen aussetzen (78). Das Nasenepithel fungiert dabei als wichtige physikalische Barriere gegenüber äußeren Eindringlingen (79;80). Wird diese Barriere verletzt oder durch pathogene Mikroorganismen angegriffen, reagiert das angeborene Immunsystem durch Initiierung einer Entzündungsreaktion zur Verteidigung des involvierten Gewebes. Einer der potentesten chemotaktischen Wirtsfaktoren ist Interleukin-8 (81), das durch einen lokal aufgebauten Gradienten die zielgerichtete Migration neutrophiler Granulozyten zu den nasalen Epithelzellen steuert und darüber hinaus deren Aktivierung fördert. Es wird vermutet, dass Interleukin-8 von nasalen Epithelzellen auch unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich exprimiert wird, um die Mukosa mit Hilfe von neutrophilen Granulozyten gegen bakterielle und virale Infektionen zu schützen (44;82).

In der vorliegenden Untersuchung konnte bei GPA-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen erstmals eine hoch signifikant verminderte basale Interleukin-8-Sekretion primärer nasaler Epithelzellen gezeigt werden.

Dabei wurde durch die verwendete Kulturmethode, engmaschige Kontrollen der Zellmorphologie während der Kulturperiode und zusätzlicher Analyse des

Zytokeratinmusters gewährleistet, dass es sich bei den kultivierten Zellen um nasale Epithelzellen handelte. Eine Beeinflussung der Messergebnisse durch andere Zellarten wie zum Beispiel Fibroblasten konnte somit sicher ausgeschlossen werden. Des Weiteren ermöglichte eine kontrolliert konstant gehaltene Zellzahl, die durch das Vorliegen präkonfluenter Monolayer auf definierter Fläche der Vertiefungen der 96-Well-Platten erreicht wurde, die Vergleichbarkeit der analysierten Proben. Entsprechend des Fokus auf die (epi-)genetischen Veränderungen der nasalen Epithelzellen wurden die Biopsien aus Arealen entnommen, die makroskopisch keine Anzeichen von Entzündungs- oder GPA-Krankheitsaktivität aufwiesen. Der Vergleich mit hoch aktiven Regionen wäre ein interessanter Gegenstand zukünftiger Untersuchungen, um Rückschlüsse auf die lokale Variabilität der Interleukin-8-Expression im Zusammenhang mit der GPA-Aktivität zu ziehen. Die gemessenen Werte der basalen Interleukin-8-Konzentration in der Kontrollgruppe werden durch die Ergebnisse von ELISA-Untersuchungen anderer Autoren (44;45) verhältnismäßig bestätigt. Resultate einer Untersuchung der basalen Interleukin-8-Expression der nasalen epithelialen Barriere von GPA-Patienten liegen in der deutsch- und englischsprachigen Literatur bislang nicht vor. Zwar beschrieben Balding *et al.* bei immunhistochemischen Analysen nasaler Biopsien von GPA-Patienten ein verändertes Th2-Zytokinmuster (83), Interleukin-8 wurde allerdings nicht untersucht.

Neben der Nase ist die Lunge ein weiteres Organ, das häufig lokale GPA-Aktivität aufweist. In Untersuchungen granulomatöser Läsionen (59;84) und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (60) konnte bei GPA-Patienten ein verändertes Zytokinmuster festgestellt werden, doch auch in diesen Arbeiten wurde Interleukin-8 nicht analysiert. In Bezug auf Zytokinkonzentrationen in Plasma oder Serum liegen deutlich mehr Hinweise auf eine bei der GPA veränderte Expression vor. Hinsichtlich der basalen Konzentration stimmen die meisten Autoren in einer generellen Erhöhung der Interleukin-8-Werte bei GPA-Patienten überein (54;85-87). Dies steht vordergründig im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Für diese Diskrepanz kommen folgende Erklärungsansätze in Betracht. Zunächst ist die Untersuchung der Zytokinexpression auf lokaler im Gegensatz zu systemischer Ebene zu nennen. Eine Vielzahl an Zellen ist in der Lage, auf diverse Stimuli mit einer Zytokinfreisetzung zu reagieren. Dies geschieht in einem komplexen Netzwerk von Interaktionen (88). Ein Vergleich der in der vorliegenden Studie bewusst möglichst

kontrollierbar gehaltenen Untersuchungen an nasalen Epithelzellen mit systemischen Zytokinkonzentrationen ist somit schwierig. Darüber hinaus besteht bei den genannten Untersuchungen der systemischen Interleukin-8-Konzentrationen eine stärkere Beeinflussung durch Faktoren wie die Einnahme immunmodulierender Medikamente und Reaktionen auf akutes Entzündungsgeschehen. Zwar erhielten auch die in der vorliegenden Studie untersuchten GPA-Patienten unterschiedliche Kombinationen diverser immunmodulierender Medikamente, von denen für einige negative Einflüsse auf die Interleukin-8-Expression beschrieben wurden (89;90). Diese wurden jedoch durch die durchschnittlich 13,3-tägige Kultivierung der Zellen vor Versuchsdurchführung minimiert. Zudem konnte kein Zusammenhang zwischen der Prednisolon-Dosis und der Zytokin-Konzentration gezeigt werden.

Im Gegensatz zu den Resultaten systemisch erhöhter Interleukin-8-Konzentration vermuteten Lamprecht *et al.* im Verlauf der GPA eine Herabregulation der monozytären Interleukin-8-Produktion (55), was den Ergebnissen dieser Arbeit tendenziell entspricht.

Die veränderte Interleukin-8-Regulation auf lokaler Ebene liefert wichtige Hinweise auf eine beeinträchtigte nasale Barriere bei GPA-Patienten. Eine verringerte basale Interleukin-8-Konzentration könnte eine verminderte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bedeuten und so eine Einschränkung des antimikrobiellen Schutzmechanismus des Nasenepithels begünstigen. *In vitro* wurde gezeigt, dass PR3-ANCA-haltiges Serum von GPA-Patienten die mikrobizide Aktivität neutrophiler Granulozyten einschränkt (91;92), was die Mechanismen der Immunabwehr zusätzlich negativ beeinflussen und somit zur Exazerbation der GPA beitragen kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können zur Grundlage für neue therapeutische Angriffspunkte beitragen. Da die Nasenschleimhaut äußerlich problemlos zugänglich ist und viele der erwähnten Studien zeigten, dass nasale Epithelzellen durch externe Reize sensibel beeinflussbar sind, ist eine gute Grundlage für topische Therapiemaßnahmen vorhanden. Durch gezielte Stimulation könnte versucht werden, das Zytokin-Gleichgewicht in Richtung Interleukin-8 zu verschieben. Ein möglicher Ansatz ist die lokale Applikation von rekombinantem humanem Interleukin-8, für das *in vitro* gezeigt werden konnte, dass es funktionelle Defekte neutrophiler Granulozyten bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom beheben kann (93). Weiterhin könnte das Einbringen nicht-pathogener

Bakterienbestandteile, die direkt oder über vermutete Mechanismen der interbakteriellen Interferenz Einfluss auf die Zytokinexpression ausüben (94;95), genutzt werden.

4.3 Reaktion auf die Stimulation mit *S. aureus*

Auf Stimulation durch diverse Reize können Zellen mit bis zu 100-facher Steigerung ihrer basalen Interleukin-8-Expressionsrate antworten, wohingegen andere Stimuli zu einer moderateren fünf- bis zehnfachen Steigerung führen (96). Die Feinregulierung der Variation der systemischen und lokalen Interleukin-8-Konzentrationen wird über die graduierte Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege erreicht (96-98). Dabei spielen die zytosolischen Signalmoleküle p38 MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase), PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) und vermutlich auch ERK1/2 (extrazelluläre Signal-regulierte Kinase) bei der durch *S. aureus*-Serinproteasen induzierten Signaltransduktion eine herausragende Rolle. NF- κ B fungiert wahrscheinlich als ein für die Interleukin-8-Expression erforderlicher Schlüssel-Transkriptionsfaktor (99).

Mit der Stimulation primärer nasaler Epithelzellkulturen mit *S. aureus* wurde in der vorliegenden Untersuchung der Frage einer möglichen funktionellen Störung der Interleukin-8-Sekretion nachgegangen. Stimulationsexperimente mit *S. aureus*, die eine lokale oder systemische Interleukin-8-Expression bei GPA-Patienten untersuchen, liegen in der deutsch- und englischsprachigen Literatur bislang nicht vor.

S. aureus stellt bei der GPA einen besonderen pathogenetischen Faktor der potentiell multimikrobiellen exogenen Trigger der Krankheitsaktivität dar. Das Bakterium wurde als potenter Induktor der Interleukin-8-Synthese nasaler Epithelzellen beschrieben (44;99;100). Mit der hier durchgeführten Stimulation konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Weder in den Kulturüberständen nasaler Epithelzellen der GPA-Patienten noch in denen der Normalkontrollen wurden nach 24-stündiger Stimulation mit lysiertem *S. aureus* in einer Konzentration von 10^5 pro ml signifikante Änderungen der Interleukin-8-Konzentration nachgewiesen.

Das humane Nasensekret enthält durchschnittlich 10^6 bis 10^8 Mikroorganismen pro ml (101). Dabei setzt sich die nasale Mikroflora aus einer Vielzahl unterschiedlicher Aerobier und Anaerobier zusammen, von denen *S. aureus* nur einen Teil bildet (102). Basierend auf diesen Daten sowie auf Ergebnissen quantitativer Untersuchungen der Nasenflora (103-105) wurde

die Stimulation mit einer Endkonzentration von 10^5 Bakterien pro ml Kulturmedium durchgeführt. Als Stimulanz wurde der in Nord-Europa in nasalen Abstrichen dominierende *S. aureus* Stamm T190-2 gewählt. Damit unterscheidet sich dieser Ansatz von zuvor durchgeführten Untersuchungen, in denen mit Kulturüberständen anderer *S. aureus* Stämme sowie ihrer *hemB* Mutanten (99) oder mit den *S. aureus* Enterotoxinen SEA (100) und SEB (44;100) stimuliert wurde.

Jedoch erkennen Wirtszellen in den Organismus eindringende Mikroorganismen über mustererkennende Rezeptoren (pattern-recognition receptors, PRRs), die bei Kontakt mit mikrobiellen Komponenten, sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), intrazelluläre Signalkaskaden induzieren und so über selektive Genexpression eine Immunantwort einleiten. Eine wichtige Untergruppe der PRRs bilden die Toll-like-Rezeptoren, die außer von unterschiedlichen Immunzellen auch von Epithelzellen exprimiert werden und maßgeblich an der Erkennung bakterieller PAMPs beteiligt sind (106). Sowohl für die zellwandständige Lipoteichonsäure (LTA) als auch für das Hüllpolymer Peptidoglykan - beides essentielle Bestandteile von *S. aureus*, die als PAMP fungieren - konnte bei Wirtszellen die Steigerung der Interleukin-8-Synthese und die Induktion einer inflammatorischen Antwort nachgewiesen werden (107). Auch für bakterielle DNA, die ebenfalls über Toll-like-Rezeptoren erkannt wird (106), wurden entzündungsfördernde Eigenschaften beschrieben (108). Diese wandständigen und intrazellulären Bakterienkomponenten waren Bestandteil des in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Stimulans. Die Voraussetzungen für eine Stimulation der Interleukin-8-Expression waren somit erfüllt.

Ein Grund für die ausbleibende Reaktion der nasalen Epithelzellen könnte eine zu geringe Dosis des Stimulus sein. Die gewählte Anzahl von 3×10^4 Bakterien pro 300 μ l Kulturmedium entspricht bei durchschnittlich 13.000 Epithelzellen pro Well einem effektiven Stimulations-Verhältnis von etwa drei Bakterien pro Zelle. Zwar beschrieben Manuzak *et. al.* einen Ansatz mit fünf Enterobakterien pro Monozyt oder dendritischer Zelle (109), der Vergleich zur einer Stimulation einer anderen Zellpopulation mit unterschiedlichen Bakterien ist allerdings wenig aussagekräftig.

Des Weiteren könnten Sekundäreffekte der vor der Stimulation durchgeführten Prozessierung der Bakterien eine wirksame Stimulation verhindert haben. Mit dem Ziel, den Einfluss der bakteriellen Sekretionsprodukte in den Hintergrund zu rücken, um die

Bedeutung der Zellwand und der intrazellulären Bestandteile analysieren zu können, wurden die Bakterien aufgeschlossen. Hierfür können chemische, enzymatische oder physikalische Verfahren angewendet werden. Zur Vermeidung von Protein-Denaturierungen wurde ein mechanisches Lyseverfahren gewählt. Um eine Erwärmung der suspendierten Bakterien durch Temperaturentwicklung während der Oszillation zu verhindern, wurde der Rotor des verwendeten MagNA Lyser[®] vor Betrieb heruntergekühlt. Allerdings könnte die Kollision mit den Keramikkügelchen die Oberflächenstrukturen der Bakterien so verändert haben, dass die Erkennung über PRRs der Epithelzellen und somit die Interleukin-8-Antwort negativ beeinflusst wurde.

Doch lässt sich das vorliegende Ergebnis der ausbleibenden Reaktion der nasalen Epithelzellen auf bakterielle Stimulation auch in einem anderen Kontext interpretieren. Neue Untersuchungen geben Hinweise auf eine „immunmodulatorische“ Fähigkeit von *S. aureus*. Obwohl das Bakterium bei bis zu 25% der Bevölkerung den oberen Respirationstrakt als asymptomatischer Kommensale besiedelt, kann es als pathogener Organismus beispielsweise das potentiell tödlich verlaufende Toxic Shock Syndrome (TSS) auslösen (110;111). Diese Reaktion wird über eine Oberflächeninteraktion mit *S. aureus*-Exotoxinen, den sogenannten Superantigenen, vermittelt. Es resultiert eine überschießende Immunreaktion, die unter anderem zur gesteigerten Expression des proinflammatorischen Interleukin-8 führt (112). Peres *et. al.* postulieren die Fähigkeit von *S. aureus*, seine eigene Pathogenität zu regulieren. So sollen Zellwandfaktoren des Bakteriums bei der Interaktion mit den Wirtszellen, vermittelt über eine alternative Konfiguration an Ko-Rezeptoren, unter anderem zur gesteigerten Expression des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin-10 führen. Dies resultiere in einer deutlichen Herabregulation der inflammatorischen Zytokinantwort (112), zu der auch Interleukin-8 zählt. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit den Daten der vorliegenden Arbeit.

Basierend auf Vorversuchen, die im Vergleich zu Stimulationsperioden von acht, zwölf und 16 Stunden eine deutlich höhere Interleukin-8-Expression nach 24-stündiger Stimulation zeigten, wurde in der vorliegenden Arbeit dieser Messzeitpunkt gewählt. Der Versuchsaufbau lässt so allerdings keine Beurteilung möglicher zeitabhängiger Änderungen des Zytokinlevels insbesondere bei noch längerer Stimulationsdauer zu, wie es für tracheobronchiale Epithelzellen nach 48-stündiger Stimulation gezeigt wurde (113).

So sind zusätzliche Stimulationsexperimente zur Untersuchung des konzentrations- und zeitabhängigen Einflusses von *S. aureus* auf nasale Epithelzellen denkbar, um die Störung der nasalen Barriere bei der GPA weitergehend funktionell zu charakterisieren.

5 Zusammenfassung

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), ehemals Wegenersche Granulomatose, ist eine komplexe Autoimmunerkrankung der Gruppe der ANCA-assoziierten primären Vaskulitiden. Charakteristisch für die GPA sind chronische nekrotisierende Gefäßwandentzündungen vorwiegend der kleinen bis mittelgroßen Gefäße sowie nicht verkäsende Granulome. In 60-90 % der Fälle ist im Krankheitsverlauf die Schleimhaut von Nase und Nasennebenhöhlen betroffen. Diese stellt somit die häufigste anatomische Lokalisation der GPA-Aktivität dar. Größtenteils ungeklärt ist die Ätiologie der GPA. Als relevanter pathogenetischer Prozess wird eine Dysbalance in der Entzündungsantwort auf mikrobielle Reize diskutiert.

Als wichtigstes chemotaktisches Zytokin für neutrophile Granulozyten kommt Interleukin-8 ein besonderer Stellenwert in der Abwehrreaktion gegen mikrobielle Pathogene zu. Interleukin-8 wird von nasalen Epithelzellen in mehrfach höherer Konzentration als alle anderen Zytokine exprimiert und ist darüber hinaus in entscheidender Weise an der Pathogenese der GPA beteiligt.

Um die funktionell gestörte nasale Barriere bei GPA-Patienten weitergehend zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie erstmals das lokale Interleukin-8-Expressions-musters des Nasenepithels in Bezug auf Prozesse der antimikrobiellen Immunabwehr bei der GPA erforscht.

Zunächst erfolgte die Quantifizierung der basalen Interleukin-8-Expression primärer nasaler Epithelzellkulturen von GPA-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen auf Proteinebene. Darüber hinaus wurde untersucht, welchen Einfluss *Staphylococcus (S.) aureus* als potenter mikrobieller Trigger der GPA-Aktivität auf die Interleukin-8-Sekretion der nasalen Mikroumgebung ausübt.

Die Untersuchungen zeigten eine hoch signifikant verminderte basale Interleukin-8-Sekretion des nasalen Epithels bei GPA-Patienten. Ein Zusammenhang zu endonasaler Krankheitsaktivität und immunmodulierender Medikation mit Prednisolon wurde nicht nachgewiesen. Auf Stimulation mit mechanisch lysiertem *S. aureus* wurde keine quantitative Veränderung der Interleukin-8-Sekretion festgestellt.

Die gestörte Interleukin-8-Regulation auf lokaler Ebene kann eine veränderte Zusammensetzung des mikrobiellen Besiedlungsspektrums der Nasenschleimhaut

begünstigen, und eine Dysbalance der inflammatorischen Antwort auf mikrobielle Reize fördern.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die pathophysiologische Bedeutung dieser Aspekte besser zu verstehen, und so die Basis für zukünftige therapeutische Ansätze auszubauen.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Holle JU, Bley T, Gross WL. [Classification and therapy of vasculitis according to recommendations of the European League Against Rheumatism (EULAR)]. *Radiologe* 2010; 50(10):846-854.
- (2) Klinger H. Grenzformen der Periarteriitis nodosa. *Frankfurter Zeitschrift für Pathologie* 1931; 42:455-480.
- (3) Wegener F. Über generalisierte septische Gefäßerkrankung. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1936; 29:202-210.
- (4) De Groot K, Reinhold-Keller E. [Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis]. *Z Rheumatol* 2009; 68(1):49-63.
- (5) Bacon PA. The spectrum of Wegener's granulomatosis and disease relapse. *N Engl J Med* 2005; 352(4):330-332.
- (6) Laudien M, Ambrosch P, Till A, Podschun R, Lamprecht P. [Diagnosis, therapy and current research aspects of selected chronic inflammatory diseases with head and neck involvement]. *Z Rheumatol* 2008; 67(5):397-406.
- (7) McDonald TJ, DeRemee RA. Head and neck involvement in Wegener's granulomatosis (WG). *Adv Exp Med Biol* 1993; 336:309-313.
- (8) Gubbels SP, Barkhuizen A, Hwang PH. Head and neck manifestations of Wegener's granulomatosis. *Otolaryngol Clin North Am* 2003; 36(4):685-705.
- (9) Paulsen J, Reinhold-Keller E, Rudert H. Klinische Erscheinungsformen und diagnostische Aspekte der Wegenerschen Granulomatose auf dem Gebiet der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde - Eine Auswertung vor 125 Patienten. *Mitteilungen der Nordostdeutschen Gesellschaft für Otorhinolaryngologie und zervikofaziale Chirurgie* 2008;37-39.
- (10) Fauci AS, Haynes BF, Katz P, Wolff SM. Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years. *Ann Intern Med* 1983; 98(1):76-85.
- (11) Lehmann H, Kiefer B. Clinical manifestations of Wegener's granulomatosis. *APMIS Suppl* 1990; 19:19-20.
- (12) Ralston DR, Marsh CB, Lowe MP, Wewers MD. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3, alpha1-antitrypsin, and Fc gamma receptors. *J Clin Invest* 1997; 100(6):1416-1424.
- (13) Schilder AM. Wegener's Granulomatosis vasculitis and granuloma. *Autoimmun Rev* 2010; 9(7):483-487.

- (14) Jagiello P, Gross WL, Epplen JT. Complex genetics of Wegener granulomatosis. *Autoimmun Rev* 2005; 4(1):42-47.
- (15) Tervaert JW, Popa ER, Bos NA. The role of superantigens in vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11(1):24-33.
- (16) Hamidou MA, Audrain M, Ninin E, Robillard N, Muller JY, Bonneville M. Staphylococcus aureus, T-cell repertoire, and Wegener's granulomatosis. *Joint Bone Spine* 2001; 68(5):373-377.
- (17) Wieczorek S, Holle JU, Epplen JT. Recent progress in the genetics of Wegener's granulomatosis and Churg-Strauss syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2010; 22(1):8-14.
- (18) Stegeman CA, Tervaert JW, De Jong PE, Kallenberg CG. Trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. Dutch Co-Trimoxazole Wegener Study Group. *N Engl J Med* 1996; 335(1):16-20.
- (19) Stegeman CA, Tervaert JW, Sluiter WJ, Manson WL, De Jong PE, Kallenberg CG. Association of chronic nasal carriage of Staphylococcus aureus and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 1994; 120(1):12-17.
- (20) Zycinska K, Wardyn KA, Zielonka TM, Demkow U, Traburzynski MS. Chronic crusting, nasal carriage of Staphylococcus aureus and relapse rate in pulmonary Wegener's granulomatosis. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 6:825-831.
- (21) Laudien M, Gadola SD, Podschun R, Hedderich J, Paulsen J, Reinhold-Keller E 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):51-55.
- (22) Laudien M, Hasler R, Wohlers J, Bock J, Lipinski S, Bremer L et al. Molecular signatures of a disturbed nasal barrier function in the primary tissue of Wegener's granulomatosis. *Mucosal Immunol* 2011.
- (23) Kain R, Exner M, Brandes R, Ziebermayr R, Cunningham D, Alderson CA et al. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med* 2008; 14(10):1088-1096.
- (24) Kain R, Firmin DA, Rees AJ. Pathogenesis of small vessel vasculitis associated with autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens: new insights from animal models. *Curr Opin Rheumatol* 2010; 22(1):15-20.
- (25) Voswinkel J, Muller A, Lamprecht P. Is PR3-ANCA formation initiated in Wegener's granulomatosis lesions? Granulomas as potential lymphoid tissue maintaining autoantibody production. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051:12-19.

- (26) Voswinkel J, Mueller A, Kraemer JA, Lamprecht P, Herlyn K, Holl-Ulrich K et al. B lymphocyte maturation in Wegener's granulomatosis: a comparative analysis of VH genes from endonasal lesions. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(7):859-864.
- (27) Pendergraft WF, III, Preston GA, Shah RR, Tropsha A, Carter CW, Jr., Jennette JC et al. Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat Med* 2004; 10(1):72-79.
- (28) Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(2):241-249.
- (29) Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 2005; 125(4):615-628.
- (30) Nickel R, Beck LA, Stellato C, Schleimer RP. Chemokines and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(4 Pt 1):723-742.
- (31) Moser B, Willmann K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 Suppl 2:ii84-ii89.
- (32) Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:675-705.
- (33) Sachse F, Ahlers F, Stoll W, Rudack C. Neutrophil chemokines in epithelial inflammatory processes of human tonsils. *Clin Exp Immunol* 2005; 140(2):293-300.
- (34) Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2 Suppl):S460-S475.
- (35) Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12(2):121-127.
- (36) Wertheim WA, Kunkel SL, Standiford TJ, Burdick MD, Becker FS, Wilke CA et al. Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E2, dexamethasone, and IL-4. *J Immunol* 1993; 151(4):2166-2175.
- (37) Modi WS, Dean M, Seuanez HN, Mukaida N, Matsushima K, O'Brien SJ. Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily. *Hum Genet* 1990; 84(2):185-187.
- (38) Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y et al. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun* 1997; 65(8):3218-3224.
- (39) Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1997; 159(11):5550-5559.

- (40) Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84(4):1045-1049.
- (41) Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:891-928.
- (42) Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52(1):145-176.
- (43) Sachse F, von Eiff C, Stoll W, Becker K, Rudack C. Induction of CXC chemokines in A549 airway epithelial cells by trypsin and staphylococcal proteases - a possible route for neutrophilic inflammation in chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Immunol* 2006; 144(3):534-542.
- (44) 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):245-249.
- (45) Kenney JS, Baker C, Welch MR, Altman LC. Synthesis of interleukin-1 alpha, interleukin-6, and interleukin-8 by cultured human nasal epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93(6):1060-1067.
- (46) Becker S, Koren HS, Henke DC. Interleukin-8 expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokines tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8(1):20-27.
- (47) Kelley JM, Edberg JC, Kimberly RP. Wegener's granulomatosis: a model of auto-antibodies in mucosal autoimmunity. *Clin Immunol* 2010; 134(2):104-112.
- (48) Berger SP, Seelen MA, Hiemstra PS, Gerritsma JS, Heemskerk E, van der Woude FJ et al. Proteinase 3, the major autoantigen of Wegener's granulomatosis, enhances IL-8 production by endothelial cells in vitro. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(5):694-701.
- (49) Mayet W, Schwarting A, Barreiros AP, Schlaak J, Neurath M. Anti-PR-3 antibodies induce endothelial IL-8 release. *Eur J Clin Invest* 1999; 29(11):973-979.
- (50) Csernok E, Ernst M, Schmitt W, Bainton DF, Gross WL. Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol* 1994; 95(2):244-250.
- (51) Uehara A, Hirabayashi Y, Takada H. Antibodies to proteinase 3 prime human oral, lung, and kidney epithelial cells to secrete proinflammatory cytokines upon stimulation with agonists to various Toll-like receptors, NOD1, and NOD2. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(7):1060-1066.
- (52) Mukhtyar C, Luqmani R. Current state of tumour necrosis factor {alpha} blockade in Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64 Suppl 4:iv31-iv36.

- (53) Csernok E, Szymkowiak CH, Mistry N, Daha MR, Gross WL, Kekow J. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) expression and interaction with proteinase 3 (PR3) in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996; 105(1):104-111.
- (54) Torheim EA, Yndestad A, Bjerkeli V, Halvorsen B, Aukrust P, Froland SS. Increased expression of chemokines in patients with Wegener's granulomatosis - modulating effects of methylprednisolone in vitro. *Clin Exp Immunol* 2005; 140(2):376-383.
- (55) Lamprecht P, Kumanovics G, Mueller A, Csernok E, Komocsi A, Trabandt A et al. Elevated monocytic IL-12 and TNF-alpha production in Wegener's granulomatosis is normalized by cyclophosphamide and corticosteroid therapy. *Clin Exp Immunol* 2002; 128(1):181-186.
- (56) Ludviksson BR, Sneller MC, Chua KS, Talar-Williams C, Langford CA, Ehrhardt RO et al. Active Wegener's granulomatosis is associated with HLA-DR+ CD4+ T cells exhibiting an unbalanced Th1-type T cell cytokine pattern: reversal with IL-10. *J Immunol* 1998; 160(7):3602-3609.
- (57) Iking-Konert C, Vogl T, Prior B, Wagner C, Sander O, Bleck E et al. T lymphocytes in patients with primary vasculitis: expansion of CD8+ T cells with the propensity to activate polymorphonuclear neutrophils. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47(5):609-616.
- (58) Coulomb-L'hermine A, Capron F, Zou W, Piard F, Galateau F, Laurent P et al. Expression of the chemokine RANTES in pulmonary Wegener's granulomatosis. *Hum Pathol* 2001; 32(3):320-326.
- (59) Zhou Y, Huang D, Farver C, Hoffman GS. Relative importance of CCR5 and antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol* 2003; 30(7):1541-1547.
- (60) Richter AG, Stockley RA, Harper L, Thickett DR. Pulmonary infection in Wegener granulomatosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 2009; 64(8):692-697.
- (61) Hellmich B, Flossmann O, Gross WL, Bacon P, Cohen-Tervaert JW, Guillevin L et al. EULAR recommendations for conducting clinical studies and/or clinical trials in systemic vasculitis: focus on anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66(5):605-617.
- (62) Reinhold-Keller E, De Groot K, Rudert H, Nolle B, Heller M, Gross WL. Response to trimethoprim/sulfamethoxazole in Wegener's granulomatosis depends on the phase of disease. *QJM* 1996; 89(1):15-23.
- (63) Koldingsnes W, Nossent H. Predictors of survival and organ damage in Wegener's granulomatosis. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41(5):572-581.
- (64) Exley AR, Bacon PA, Luqmani RA, Kitas GD, Gordon C, Savage CO et al. Development and initial validation of the Vasculitis Damage Index for the standardized clinical

- assessment of damage in the systemic vasculitides. *Arthritis Rheum* 1997; 40(2):371-380.
- (65) Luqmani RA. Assessing disease activity in the systemic vasculitides. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14(1):23-28.
- (66) Reinhold-Keller E, Beuge N, Latza U, De Groot K, Rudert H, Nolle B et al. An interdisciplinary approach to the care of patients with Wegener's granulomatosis: long-term outcome in 155 patients. *Arthritis Rheum* 2000; 43(5):1021-1032.
- (67) Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999; 111(4):507-513.
- (68) Poumay Y, Roland IH, Leclercq-Smekens M, Leloup R. Basal detachment of the epidermis using dispase: tissue spatial organization and fate of integrin alpha 6 beta 4 and hemidesmosomes. *J Invest Dermatol* 1994; 102(1):111-117.
- (69) Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31(1):11-24.
- (70) Schwerer MJ, Kraft K, Baczako K, Maier H. Coexpression of cytokeratins typical for columnar and squamous differentiation in sinonasal inverted papillomas. *Am J Clin Pathol* 2001; 115(5):747-754.
- (71) Hicks W, Jr., Ward R, Edelstein D, Hall L, III, Albino A, Hard R et al. Cytokeratin expression in human respiratory epithelium of nasal polyps and turbinates. *Cell Biol Int* 1995; 19(4):301-306.
- (72) Holtfreter S, Grumann D, Schmutde M, Nguyen HT, Eichler P, Strommenger B et al. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45(8):2669-2680.
- (73) Delogu LG, Deidda S, Delitala G, Manetti R. Infectious diseases and autoimmunity. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5(10):679-687.
- (74) Moudgil KD, Choubey D. Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment. *J Interferon Cytokine Res* 2011; 31(10):695-703.
- (75) Kantarci A, Van Dyke TE. Lipoxins in chronic inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(1):4-12.
- (76) Hata TR, Gallo RL. Antimicrobial peptides, skin infections, and atopic dermatitis. *Semin Cutan Med Surg* 2008; 27(2):144-150.
- (77) Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 2002; 109(6):699-705.

- (78) Tamashiro E, Xiong G, Anselmo-Lima WT, Kreindler JL, Palmer JN, Cohen NA. Cigarette smoke exposure impairs respiratory epithelial ciliogenesis. *Am J Rhinol Allergy* 2009; 23(2):117-122.
- (79) Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D, Avila PC. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(6):1279-1284.
- (80) Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(6):1233-1244.
- (81) Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, DeLeo FR. Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53(6):505-517.
- (82) Rudack C, Maune S, Eble J, Schroeder JM. The primary role in biologic activity of the neutrophil chemokines IL-8 and GRO-alpha in cultured nasal epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res* 2003; 23(2):113-123.
- (83) Balding CE, Howie AJ, Drake-Lee AB, Savage CO. Th2 dominance in nasal mucosa in patients with Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 2001; 125(2):332-339.
- (84) Coulomb-L'hermine A, Capron F, Zou W, Piard F, Galateau F, Laurent P et al. Expression of the chemokine RANTES in pulmonary Wegener's granulomatosis. *Hum Pathol* 2001; 32(3):320-326.
- (85) Wikman A, Fagergren A, Gunnar OJ, Lundahl J, Jacobson SH. Monocyte activation and relationship to anti-proteinase 3 in acute vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18(9):1792-1799.
- (86) Tesar V, Jelinkova E, Masek Z, Jirsa M, Jr., Zabka J, Bartunkova J et al. [The effect of plasmapheresis on cytokine serum levels and adhesion molecules in ANCA-positive renal vasculitis]. *Cas Lek Cesk* 1997; 136(20):627-632.
- (87) Kekow J, Szymkowiak CH, Sticherling M, Schroder JM, Christophers E, Gross WL. Pro- and anti-inflammatory cytokines in primary systemic vasculitis. *Adv Exp Med Biol* 1993; 336:341-344.
- (88) Balkwill FR, Burke F. The cytokine network. *Immunol Today* 1989; 10(9):299-304.
- (89) Szekanecz Z, Vegvari A, Szabo Z, Koch AE. Chemokines and chemokine receptors in arthritis. *Front Biosci (Schol Ed)* 2010; 2:153-167.
- (90) Mullol J, Xaubet A, Gaya A, Roca-Ferrer J, Lopez E, Fernandez JC et al. Cytokine gene expression and release from epithelial cells. A comparison study between healthy nasal mucosa and nasal polyps. *Clin Exp Allergy* 1995; 25(7):607-615.
- (91) Bartunkova J, Fucikova T, Tesar V, Janatkova I, Rychlik I, Sulkova S. Antineutrophil cytoplasmic antibody-positive sera inhibit candidacidal activity of granulocytes. *Exp Nephrol* 1995; 3(1):58-60.

- (92) Bartunkova J, Araujo A, Hrusak O, Sediva A. Autoimmunity to polymorphonuclears: functional consequences of the binding of antibodies to membrane and cytoplasmic target antigens of polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Immunol* 1997; 17(6):455-461.
- (93) Zwierzina H, Holzinger I, Gaggl S, Wolf H, Schollenberger S, Lam C et al. Recombinant human interleukin-8 restores function in neutrophils from patients with myelodysplastic syndromes without stimulating myeloid progenitor cells. *Scand J Immunol* 1993; 37(3):322-328.
- (94) Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 2010; 465(7296):346-349.
- (95) Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(3):505-520.
- (96) Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 2002; 72(5):847-855.
- (97) Holtmann H, Enninga J, Kalble S, Thiefes A, Dorrie A, Broemer M et al. The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. *J Biol Chem* 2001; 276(5):3508-3516.
- (98) Ling H, Recklies AD. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor- α . *Biochem J* 2004; 380(Pt 3):651-659.
- (99) Rudack C, Sachse F, Albert N, Becker K, von Eiff C. Immunomodulation of nasal epithelial cells by *Staphylococcus aureus*-derived serine proteases. *J Immunol* 2009; 183(11):7592-7601.
- (100) O'Brien GJ, Riddell G, Elborn JS, Ennis M, Skibinski G. *Staphylococcus aureus* enterotoxins induce IL-8 secretion by human nasal epithelial cells. *Respir Res* 2006; 7:115.
- (101) Christiansen B, Grabowski B, Kirstein P. *Arbeitsbuch Hygiene*. Gustav Fischer Verlag, 1995.
- (102) Gluck U, Gebbers JO. Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and beta-hemolytic streptococci). *Am J Clin Nutr* 2003; 77(2):517-520.
- (103) Bischoff WE, Wallis ML, Tucker KB, Reboussin BA, Sherertz RJ. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a student community: prevalence, clonal relationships, and risk factors. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25(6):485-491.

- (104) Heczko PB, Hoffler U, Kasprovicz A, Pulverer G. Quantitative studies of the flora of the nasal vestibule in relation to nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 1981; 14(3):233-241.
- (105) Stenfors LE, Raisanen S. The bacterial flora of the nasopharynx, with special reference to middle ear pathogens. A quantitative study in twenty children. *Acta Otolaryngol* 1989; 108(1-2):122-125.
- (106) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124(4):783-801.
- (107) Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(3):521-540.
- (108) Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72(4):955-962.
- (109) Manuzak J, Dillon S, Wilson C. Differential interleukin-10 (IL-10) and IL-23 production by human blood monocytes and dendritic cells in response to commensal enteric bacteria. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19(8):1207-1217.
- (110) Shinefield HR, Ruff NL. Staphylococcal infections: a historical perspective. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23(1):1-15.
- (111) Wertheim HF, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JA et al. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* 2004; 364(9435):703-705.
- (112) Peres AG, Madrenas J. The broad landscape of immune interactions with *Staphylococcus aureus*: From commensalism to lethal infections. *Burns* 2013.
- (113) Becker MN, Sauer MS, Muhlebach MS, Hirsh AJ, Wu Q, Verghese MW et al. Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169(5):645-653.

7 Veröffentlichung

Wohlers et al. *Arthritis Research & Therapy* 2012, **14**:R203
<http://arthritis-research.com/content/14/5/R203>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Aberrant cytokine pattern of the nasal mucosa in granulomatosis with polyangiitis

Janet Wohlers^{1†}, Katrin Breucker^{1†}, Rainer Podschun², Jürgen Hedderich³, Peter Lamprecht⁴, Petra Ambrosch¹ and Martin Laudien^{1*}

Abstract

Introduction: In granulomatosis with polyangiitis (GPA), a complex autoimmune small-vessel vasculitis frequently associated with chronic necrotizing inflammation of the nasal mucosa, elevated nasal *Staphylococcus (S.) aureus* carrier rates are a risk factor for relapse. As cytokines are primarily involved in the regulation of defense against potentially pathogenic microorganisms, the aim of this study was to compare healthy individuals and GPA patients with respect to their baseline cytokine expression of nasal epithelial cells (NEC), which form the first barrier against such triggers. The ability of *S. aureus* to influence the nasal microenvironment's cytokine secretion was assessed by exemplary stimulation experiments.

Methods: Baseline expression of 19 cytokines of primary NEC of GPA patients and normal controls (NC) was quantified by a multiplex cytokine assay. Stimulation experiments were performed with supernatants of *S. aureus* and expression of interleukin-8 was determined by ELISA.

Results: In GPA, an altered pattern of baseline cytokine expression with significantly up-regulated G-CSF and reduced interleukin (IL)-8 concentrations was observed. Both NEC of GPA patients and NC responded to stimulation with *S. aureus*, but GPA patients displayed a significantly lower IL-8 secretion and a diminished dynamic range of response towards the stimulus.

Conclusions: The data presented underline the hypothesis of a disturbed epithelial nasal barrier function in GPA. The dysregulated baseline expression of G-CSF and IL-8 and the reduced response to microbial stimulation may facilitate changes in the composition of the nasal flora and favour an imbalanced inflammatory response, which might be relevant for the disease course.

Introduction

Granulomatosis with polyangiitis (GPA) is characterized by chronic necrotizing granulomatous inflammation with a predilection of the upper and lower respiratory tract and proteinase 3 (PR3) specific cytoplasmic anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (C-ANCA) [1,2].

So far, the pathogenetic mechanisms resulting in inflammation and autoimmunity in GPA are poorly elucidated. A complex interaction between genetic susceptibility and environmental factors is discussed [3-6], whereas low familiar clustering [7] stresses the importance of the latter.

Epidemiological studies revealed higher *Staphylococcus (S.) aureus* colonisation rates in GPA-patients compared to healthy and diseased controls [8-10]. Moreover, nasal carriage was shown to be associated with significantly elevated relapse rates, endonasal disease activity and first manifestation in the upper respiratory tract [8,11,12]. In addition, treatment with trimethoprim/sulfamethoxazole reduces the annual number of respiratory infections and the incidence of relapses in GPA-patients in remission [10,13,14].

Various staphylococcal superantigens were demonstrated to exert strong stimulatory effects on immunocompetent cells [15]. Furthermore, T-cells were shown to exhibit irregular modes of differentiation and cytokine expression upon stimulation with *S. aureus* [16,17], and *S. aureus* specificity was found in T-cell clones generated from peripheral blood lymphocytes of GPA-patients [17].

* Correspondence: laudien@hno.uni-kiel.de

† Contributed equally

¹University of Kiel, Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Arnold-Heller-Straße 14, D-24105 Kiel, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



Remarkably, recent findings suggest a dysbalanced microbiom of the nasal cavity rather than a distinct microbial trigger comparable to the dysbiosis in inflammatory bowel diseases like Morbus Crohn [18]. Kain *et al.* demonstrated that in ANCA-associated systemic vasculitides highly prevalent auto-antibodies to lysosomal membrane protein-2 can cross-react with adhesins of gram-negative pathogens [19].

Another hint at microbial triggering of GPA is given by Pendergraft *et al.* demonstrating that patients harbouring PR3-ANCA also produce auto-antibodies to complementary PR3 (cPR3), a peptide translated from the antisense DNA strand of PR3. Conversely, the presence of cPR3 leads to production of both anti-cPR3 and anti-PR3 auto-antibodies. Genetic sequences that could be translated to cPR3-peptides were identified in numerous microbial and fungal organisms, including *S. aureus*, *Entamoeba histolytica* and Ross-River virus [20].

Taken together, the evidence is increasingly pointing to an imbalanced inflammatory response to microbial challenge as a potentially relevant process in the pathogenesis of GPA or *vice versa*.

Cytokines are significantly involved in the regulation of immune and inflammatory processes [21]. They enable inter-cellular communication and initiate immune responses by recruiting and activating specific immune cells, thus playing a decisive role in successful local defense against microorganisms [22]. Although aberrant cytokine patterns in GPA-patients in serum or plasma [23-25], mononuclear cells [26,27], pulmonary lesions [28,29] and bronchoalveolar lavage fluid [30] are verified by numerous studies, so far no study has been performed to assess altered cytokine expression in nasal epithelial cells, which form the first barrier against potential exogenous triggers.

We hypothesized an alteration in the prevailing pattern of cytokine expression of nasal epithelial cells especially focusing on microbial defense. The main objectives of this study were, therefore, to determine: i) the basal expression levels of 19 cytokines closely linked to microbial defense mechanisms on protein level in GPA-patients and normal controls and, furthermore, ii) the ability of *S. aureus* to influence the nasal microenvironment's cytokine secretion by exemplary stimulation experiments.

Materials and methods

Patients and biopsies

For analysing baseline cytokine secretion, nasal mucosa biopsies were obtained from 20 patients with GPA and 19 normal controls (NC). For stimulation experiments, biopsies of 10 GPA-patients and 10 NC were generated. Biopsies were taken from nasal turbinates at sites that were visually free of disease activity and suspect alterations like granuloma, edema, bloody patches, purulent secretion or crusts.

The study protocol was approved by the ethics committee of the University of Kiel, Germany (AZ A101/07) and was in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (latest revision October 2008). All patients provided written informed consent prior to enrolment. Exclusion criteria included pregnancy, haemostatic disorder and age of less than 18 years.

GPA was diagnosed according to the American College of Rheumatology classification criteria and Chapel Hill definitions for GPA as recommended by the European League Against Rheumatism (EULAR) [31]. GPA-subgroups were determined according to the European Vasculitis Study Group definitions and recent EULAR recommendations [31]. Extent of the disease was assessed by the Disease Extent Index (DEI) [32], disease activity was classified using the Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) [33]. The Vasculitis Damage Index (VDI) was applied to record organ damage as a consequence of granulomatous inflammation and vasculitis [34,35]. All patients underwent a standardized interdisciplinary evaluation [36] and were examined endoscopically by an ear, nose and throat -specialist to evaluate endonasal GPA activity [2].

In order to assess the presence of systemic inflammation, white blood cell counts (WBC) as well as measurement of C-reactive protein (CRP) concentration and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were performed. Besides slightly elevated ESR, as typical in GPA patients [37], all serologic parameters were within the normal range. In case of GPA, serologic titers of PR3-specific C-ANCA and myeloperoxidase-specific P-ANCA were determined according to Savige *et al.* [38].

In the normal control group, biopsies were taken while doctors were performing airway passage improving surgery. No individual of this group showed anamnestic or endoscopic signs of acute or chronic inflammatory or autoimmune alterations of the nasal mucosa or was under immunomodulating medication.

Detailed description of patient groups is given in Tables 1 and 2.

Primary cell culture

Nasal epithelial cells (NEC) were enzymatically isolated from biopsies using dispase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). The cells were grown in Airway Epithelial Cell Growth medium (Promocell, Heidelberg, Germany) in a 96-well plate until pre-confluence with approximately equal numbers of cells per well were obtained. After a mean cultivation time of 13 days, supernatants were collected and stored at -80°C.

Multiplex cytokine assay

The supernatants of NEC were analysed by performing a Bio-Plex™ Cytokine Assay according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories, Munich,

Table 1 Patients' characteristics

	Baseline cytokine secretion				Stimulation			
	Normal control		Granulomatosis with polyangiitis		Normal control		Granulomatosis with polyangiitis	
	(n = 19)		(n = 20)		(n = 10)		(n = 10)	
Age (yrs, mean and range)	39.50 (18 to 76)		51.55 (24 to 71)		43.30 (23 to 56)		50.80 (24 to 71)	
Sex	11 male, 8 female		12 male, 8 female		7 male, 3 female		7 male, 3 female	
First GPA manifestation till study entry (yrs, median and range)			3.8 (19 to 0)				3.3 (9 to 0)	
First GPA diagnosis till study entry (yrs, median and range)			1.6 (19 to 0)				3.1 (9 to 0)	
Serologic parameters								
	mean value	SD	mean value	SD	mean value	SD	mean value	SD
WBC (cells/nl)	6.74	1.55	8.22	2.82	7.87	1.97	7.77	2.33
ESR 1 st h (mm)	8.14	3.94	33.00	27.60	8.00	2.92	52.40	35.61
	median	range	median	range	median	range	median	range
CRP (mg/dl)	1.30	0.9 to 5.8	0.70	0 to 8.6	1.50	1.3 to 3.4	0.85	0.1 to 8.6
C-ANCA-titre (1:)			80	0 to 2560			640	0 to 2560
P-ANCA-titre (1:)			0	0 to 640			0	0 to 61

Table 2 Characteristics of patients with GPA

		Baseline cytokine secretion		Stimulation	
		n	%	n	%
Biopsy proof	GPA	12	60	7	70
EULAR subgroups	generalized	14	70	8	80
	early systemic	5	25	1	10
	local	1	5	0	0
	severe	0	0	1	10
EULAR disease activity	remission	6	30	2	20
	response	0	0	1	10
	relapse, minor	8	40	2	20
	relapse, major	4	20	3	30
	refractory	1	5	0	0
	low-activity	1	5	2	20
Endoscopy: endonasal activity	none	12	60	4	40
	mild	7	35	4	40
	moderate	0	0	2	20
	not evaluated	1	5	0	0
Disease scores		median (range)		median (range)	
	DEI	2 (0 to 5)		2 (0 to 5)	
	BVAS-1	3 (0 to 13)		1.5 (0 to 12)	
	BVAS-2	0 (0 to 4)		0 (0 to 4)	
	VDI	0.5 (0 to 3)		2 (0 to 4)	
Immunomodulating therapy		n (%)	mean value (mg)	n (%)	mean value (mg)
	prednisolone	19 (95)	12.89	9 (90)	10.67
	methotrexate	10 (50)	22.25	2 (20)	20
	cyclophosphamide regular	3 (15)	133.33	1 (10)	100
	cyclophosphamide bolus	2 (10)	1000	2 (20)	1000
	azathioprine	2 (10)	125	2 (20)	125
	leflunomide	2 (10)	25	2 (20)	25
	mycophenolate mofetil	1 (5)	2000	0 (0)	0
	cummulative cyclophosphamide	6 (30)	45.17 (g)	8 (80)	14.88 (g)

Germany) allowing quantification of multiple cytokines with broad range standard curves in small-sample-sizes. Pro-inflammatory (interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-17, tumour necrosis factor-alpha (TNF- α)) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10, IL-13) mediators, proteins mainly associated with adaptive immune responses (IL-2, IL-4, IL-12p70, IL-13, IFN- γ) or with recruitment of immune cells (IL-8, MCP-1, MIP-1), cytokines predominantly responsible for proliferation of inflammatory effector cells (G-CSF, GM-CSF) and control of apoptotic procedures associated with inflammation (TNF- β) were investigated.

Briefly, samples of 50 μ l NEC supernatant were incubated with anti-cytokine antibody-coupled beads. After washing, the complexes were incubated with biotinylated anti-cytokine detection antibodies, and finally with streptavidin-phycoerythrin. Cytokine concentrations were measured using a Luminex 96-well plate reader (Bio-Plex™ 100-Multiplex-Suspension-Array-Reader; Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) and the Bio-Plex™ Manager Software 4.1.1 (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). Human recombinant cytokines were used as standards.

Stimulation of human nasal epithelial cells with *S. aureus*

For stimulation of NEC, supernatants containing the bacterial secretory products of *S. aureus* strain T190-2 (kindly provided by B.M. Bröker, University of Greifswald, Germany), which has been described to predominate in nasal isolates in Western Europe, was chosen. The *S. aureus* supernatants were not analysed for virulence factors secreted into the growth medium. However, in PCR analysis the test strain was positive for toxic shock and enterotoxin genes [39]. Experiments were performed corresponding to Sachse *et al.* [40]. According to the results of preliminary experiments concerning time and dose dependency (8, 12, 16, 24 hours; data not shown), stimulation experiments were performed with *S. aureus* supernatants diluted 1:5 in a final volume of 300 μ l for 24 hours. An impact of the bacterial growth medium tryptic soy broth on the stimulation was ruled out before and NEC incubated in fresh cell culture medium without bacterial supernatants served as controls. Cell viability greater than 95% was verified by trypan blue dye exclusion test, and vital cell morphology was controlled in phase contrast microscopy. Moreover, 10 μ l of cell culture supernatants were incubated on Columbia blood agar to prove absence of bacterial contamination. After stimulation, cell culture supernatants were collected and stored at -80°C until analysis.

Quantification of IL-8 via ELISA

IL-8 concentrations in cell culture supernatants after stimulation were determined in duplicate by standard ELISA

using the BD OptEIA human IL-8 set (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

Statistical analysis

All statistics were performed in an exploratory manner using SPSS statistical software for Windows, version 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Based on the Shapiro-Wilk-Test, normal distribution could be assumed for neither the entire Bio-Plex™ data nor for the delta values (stimulated - basal) of the stimulation experiments. Therefore, differences between the two groups (GPA versus NC) were evaluated by the nonparametric Mann-Whitney-U-Test. Normally distributed stimulation data were analysed by means of a general linear model for repeated measurement procedures in order to test the effects of within-subject factors (effect of stimulation within each group) and of between-subject factors (comparison of GPA- and NC-group). A *P*-value of ≤ 0.05 was regarded as statistically significant.

Results

Altered pattern of baseline cytokine expression in GPA-patients

For 17 of the analysed 19 cytokines in the supernatants of NEC, no difference between GPA-patients and normal controls could be detected (see Table 3 for details).

In contrast, NEC of GPA-patients showed significantly higher protein expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF, *P* = 0.050). Furthermore, concentrations of interleukin-8 (IL-8, CXCL8) were remarkably reduced in NEC of GPA-patients compared to NC (*P* = 0.009), as illustrated in Figure 1.

Diminished response to stimulation with *S. aureus* culture supernatants in GPA-patients

Based on the results of the multiplex cytokine assay, a more detailed functional study of IL-8 expression of NEC upon stimulation with secretory products containing *S. aureus*-culture-supernatants was performed.

While both groups (GPA and NC) showed a statistically significant response to the stimulus (NC: *P* = 0.005, GPA: *P* = 0.005), baseline IL-8 expression (mean value 1,247.9, SD 881.6, maximum 2,735.3, minimum 379.0 pg/ml) as well as IL-8 expression after stimulation (mean value 2,753.0, SD 1,938.2, maximum 6,744.4, minimum 776.5 pg/ml) was significantly lower (*P* = 0.006) in GPA-patients compared to NC (basal: mean value 2,876.1, SD 1,498.3, maximum 4,935.5, minimum 500.0 pg/ml; stimulated: mean value 5,647.4, SD 2,407.9, maximum 9,516.1, minimum 1,521.9 pg/ml), as demonstrated in Figure 2A. Remarkably, also the dynamic range of the reaction (stimulated minus basal) was considerably more restricted in NEC of GPA-patients (*P* = 0.029, Figure 2B).

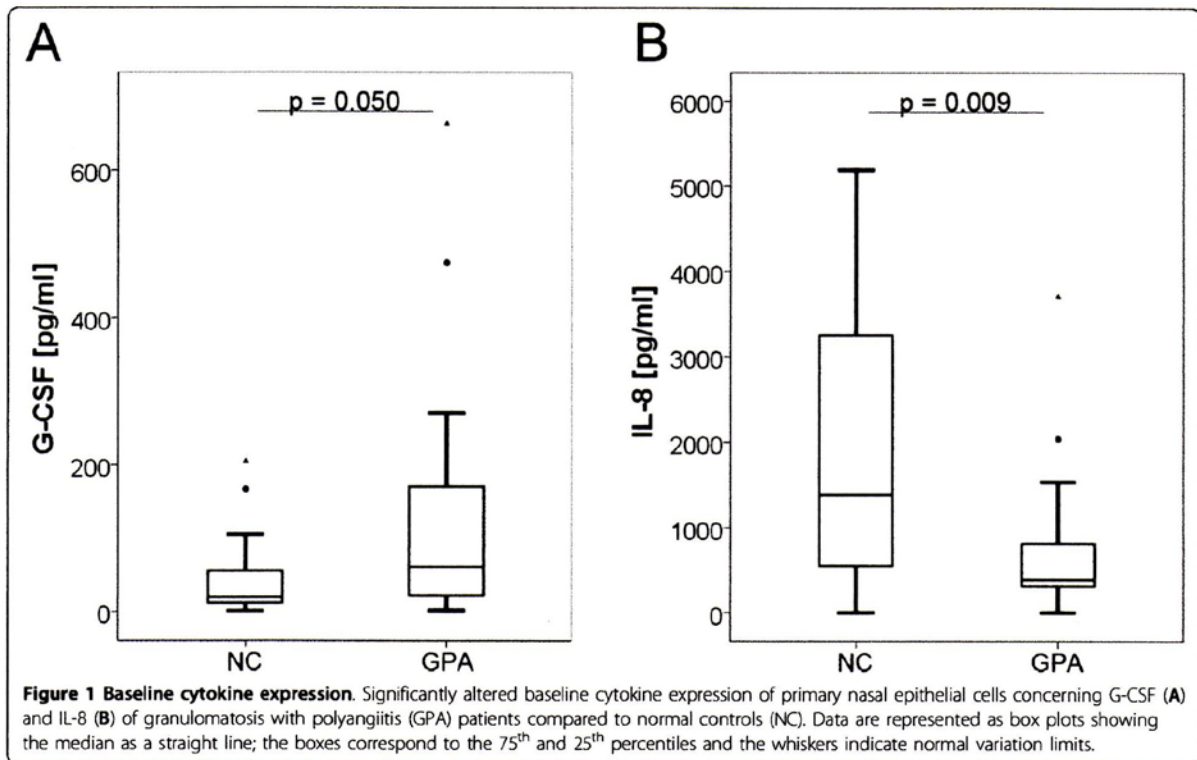
Table 3 Baseline cytokine expression of nasal epithelial cells (pg/ml)

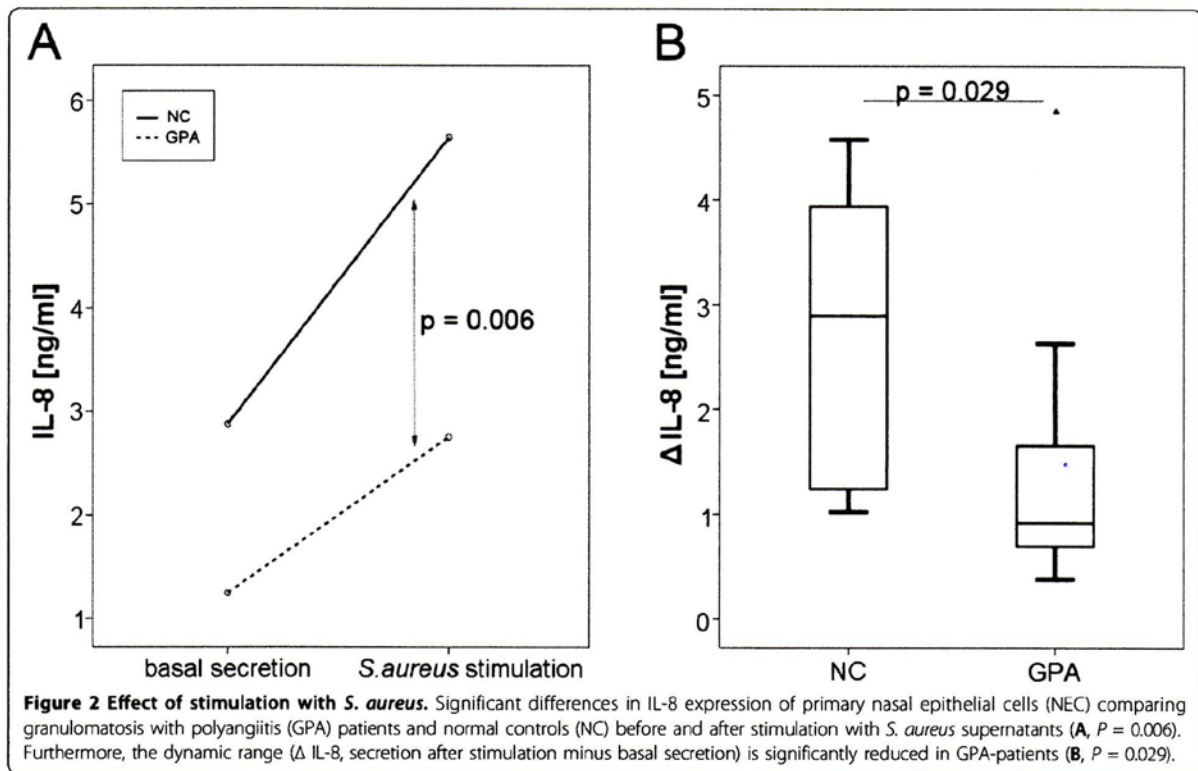
	Normal control (NC)		Granulomatosis with polyangiitis (GPA)		NC vs. GPA P-value
	median	range	median	range	
IL-1 α	71.74	<1.51 to 319.24	92.38	7.90 to 477.11	0.322
IL-1 β	<2.67	<2.67 to 8.67	2.70	<2.67 to 12.74	0.224
IL-2	<1.42	<1.42 to 6.46	3.60	<1.42 to 6.00	0.070
IL-4	<0.32	<0.32 to 0.80	<0.32	<0.32 to 0.72	0.283
IL-5			below detection limit (<2.51)		
IL-6	26.22	2.81 to 788.29	29.61	3.70 to 139.47	0.607
IL-7			below detection limit (<2.43)		
IL-8	1388.14	<1.77 to 5188.14	319.16	<1.77 to 3708.72	0.009
IL-10			below detection limit (<1.78)		
IL-12	<2.55	<2.55 to 3.75	<2.55	<2.55 to 4.03	0.283
IL-13			below detection limit (<2.68)		
IL-17	2.77	<1.87 to 6.41	3.54	<1.87 to 6.01	0.101
G-CSF	19.60	<1.31 to 204.41	61.30	1.53 to 663.58	0.050
GM-CSF	10.50	<0.74 to 28.70	12.50	7.74 to 21.56	0.084
IFN- γ	4.61	<1.61 to 21.41	5.92	2.27 to 18.18	0.089
MCP-1	3.66	<1.81 to 8.21	4.12	<1.81 to 7.90	0.667
MIP-1 β	<1.41	<1.41 to 2.37	1.43	<1.41 to 2.79	0.141
TNF- α	<6.42	<6.42 to 13.46	<6.42	<6.42 to 11.00	0.296
TNF- β	9.44	<2.14 to 24.46	14.20	3.35 to 23.40	0.054

No correlation between nasal *S. aureus*-colonisation, endonasal GPA-activity or prednisolone dosages and these results could be detected (data not shown).

Discussion

Cytokines' elaborate interplay enables inter-cellular communication and constitutes a crucial part in the





regulation of immune and inflammatory processes - two important components in the pathogenesis of GPA - thus allowing an adequate response to microbial challenges.

Apart from Balding *et al.*, who described an altered Th2-cytokine milieu in nasal biopsies [41], no comprehensive analysis of baseline cytokine expression in the nasal epithelium of GPA-patients has been performed so far.

For GPA, alterations in cytokine levels in pulmonary lesions have been described [28,29], but none of the 19 cytokines relevant for microbial defense included in this study were examined. Results of Richter *et al.*, who reported elevated concentrations of the pro-inflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid of GPA-patients [30], are difficult to compare to our findings obtained from a distinct compartment but hint at an altered cytokine spectrum.

Once induced by an inflammatory stimulus, almost all tissues within the human body are capable of producing G-CSF, thus leading to an increase in number and activation of neutrophils [42]. G-CSF serum levels are markedly elevated in response to infection and usually fall in parallel with the recovery process [43], whereas they remain elevated and correlate with disease activity in chronic inflammatory conditions, such as rheumatoid arthritis and Behçet disease [44,45]. Locally elevated G-CSF concentrations

have also been observed in inflammatory bowel disease [46]. These findings match our results of locally elevated concentrations in NEC reasonably.

A prolonged life time of neutrophils resulting from a delayed apoptosis induced by G-CSF [47] increases the possibility of being primed and expressing PR3 on the cell surface [23,48]. Further activation through binding of ANCA can result in damage and lysis of endothelial cells [49]. In endothelial cells, G-CSF has been shown to down-regulate lipopolysaccharide-induced IL-8 expression [50], which would be conceivable for epithelial cells as well. Besides, the possible ability of G-CSF to reduce neutrophil killing of *S. aureus* [51] could have tremendous negative impacts on an effective immune defense.

IL-8 chemoattracts polymorphonuclear neutrophils (PMN) and monocytes and further promotes their activation [52], thus creating and maintaining an inflammatory microenvironment at the site of infection.

Lamprecht *et al.* suggested a down-regulation of monocytic production of IL-8 during the course of GPA [26], which is in line with our findings. Stimulation of PMN with IL-8, especially after previous treatment with TNF- α , leads to PR3 translocation to the cell surface [53], thus providing the prerequisite for interactions with PR3-ANCA, which directly activates diverse inflammatory

reactions in PMN [54]. Variation of IL-8 expression levels is fine-tuned by graduated activation of at least three signaling pathways: NF- κ B, JNK (JUN-N terminal protein kinase) and p38-MPK (mitogen-activated protein kinase) [55]. In order to evaluate whether this complex interplay is operating effectively in GPA-patients, we stimulated NEC with culture supernatants of *S. aureus*, which apart from its particular role in the pathogenesis of GPA has been shown to be a potent inducer of IL-8 expression in nasal epithelial cells [56,57]. The imbalance of IL-8 with a reduced baseline expression and a diminished response to bacterial stimulus of GPA-NEC could reasonably lead to a shift in the microbial flora towards an overbalance of facultative pathogenic microorganisms.

These data, in addition to the observation of a severely impaired ciliar beat frequency [58] and a reduced production of the antimicrobial peptide human β -defensin 3 of NEC upon stimulation with *S. aureus* [59], as well as an imbalanced regulation of genes involved in epithelial barrier function [18], fortify the hypothesis of considering GPA a disease with a disturbed epithelial barrier function as was also discussed for other chronic inflammatory diseases with nasal involvement [60].

However, this study has its limitations. Patients with GPA received immunomodulating therapy, for which negative impact on cytokine expression has been described [61,62]. Differential expression of the investigated cytokines (most of them without differences between NC and GPA) argues for successful prevention of such effects by cultivating NEC for an average of 13 days prior to the investigation.

The fact that the pattern of cytokine expression of NEC can be influenced by external stimuli paves the way for local pharmacological interference. Shifting the basal cytokine balance towards a higher IL-8 level, for example, by applying recombinant human IL-8 [63] or non-pathogenic bacteria components [64] could be a future therapeutic option.

Conclusions

Taken together, our data suggest a specifically altered pattern of baseline cytokine expression of the nasal epithelium in patients with GPA compared to NC. This can facilitate changes in the composition of microbial colonisation and favour an imbalanced inflammatory response to microbial challenge and thus disease exacerbation. Our findings of an aberrant response to *S. aureus* stimulation in patients with GPA further underline this hypothesis. It remains to be investigated whether our results exemplify a general alteration in the reactive cytokine response to external stimuli. Taken into account the results of all 19 examined cytokines, we assume pathophysiological relevance of IL-8 and G-CSF in GPA, which could have potential therapeutic implications.

Abbreviations

BVAS: Birmingham Vasculitis Activity Score; C-ANCA: cytoplasmic anti-neutrophil cytoplasmic antibodies; cPR3: complementary PR3; CRP: C-reactive protein; DEI: Disease Extent Index; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ESR: erythrocyte sedimentation rate; EULAR: European League Against Rheumatism; G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor; GPA: Granulomatosis with polyangiitis; IFN- γ : interferon- γ ; IL: interleukin; JNK: JUN-N terminal protein kinase; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; MIP-1: macrophage inflammatory protein-1; NC: normal controls; NEC: nasal epithelial cells; P-ANCA: perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies; PMN: polymorphonuclear neutrophils; PR3: proteinase 3; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; TNF: tumor necrosis factor; VDI: Vasculitis Damage Index; WBC: white blood cell count.

Acknowledgements

This study was supported by the German Research Foundation (DFG) funded Clinical Research Unit (KFO 170). We thank A. Hölzgen, U. Kreutz, T. Görögh and A.-M. Röen for their expert technical assistance. We gratefully acknowledge participation of all patients and healthy volunteers who took part in this study.

Author details

¹University of Kiel, Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Arnold-Heller-Straße 14, D-24105 Kiel, Germany. ²Institute for Infection Medicine, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Brunswiker Straße 4, D-24105 Kiel, Germany. ³University of Kiel, Department of Medical Informatics and Statistics, Brunswiker Straße 10, D-24105 Kiel, Germany. ⁴University of Lübeck, Department of Rheumatology, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, and Rheumaklinik Bad Bramstedt, Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck, Germany.

Authors' contributions

ML, RP, JH and PA designed and coordinated the study. JW carried out the experiments. ML, JW, KB and PL were involved in data acquisition and interpretation. JH, JW and ML performed the statistical analysis. JW, KB, PL, RP, JH, PA and ML drafted and revised the manuscript. All authors provided final approval of the submitted manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 7 December 2011 Revised: 11 June 2012
Accepted: 16 August 2012 Published: 17 October 2012

References

- Bacon PA: The spectrum of Wegener's granulomatosis and disease relapse. *N Engl J Med* 2005, **352**:330-332.
- Paulsen JJ, Rudert H: Manifestations of primary vasculitis in the ENT region. *Z Rheumatol* 2001, **60**:219-225.
- Hamidou MA, Audrain M, Ninin E, Robillard N, Muller JY, Bonneville M: *Staphylococcus aureus*, T-cell repertoire, and Wegener's granulomatosis. *Joint Bone Spine* 2001, **68**:373-377.
- Jagiello P, Gross WL, Epplen JT: Complex genetics of Wegener granulomatosis. *Autoimmun Rev* 2005, **4**:42-47.
- Laudien M, Ambrosch P, Till A, Podschun R, Lamprecht P: [Diagnosis, therapy and current research aspects of selected chronic inflammatory diseases with head and neck involvement]. *Z Rheumatol* 2008, **67**:397-406.
- Tervaert JW, Popa ER, Bos NA: The role of superantigens in vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 1999, **11**:24-33.
- Wieczorek S, Holle JU, Epplen JT: Recent progress in the genetics of Wegener's granulomatosis and Churg-Strauss syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2010, **22**:8-14.
- Laudien M, Gadola SD, Podschun R, Hedderich J, Paulsen J, Reinhold-Keller E, Csernok E, Ambrosch P, Hellmich B, Moosig F, Gross WL, Sahly H, Lamprecht P: Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and endonasal activity in Wegener's granulomatosis as compared to rheumatoid arthritis and chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin Exp Rheumatol* 2010, **28**:51-55.
- Stegeman CA, Tervaert JW, Sluiter WJ, Manson WL, De Jong PE, Kallenberg CG: Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus*

- aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 1994, **120**:12-17.
10. Stegeman CA, Tervaert JW, De Jong PE, Kallenberg CG: Trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. Dutch Co-Trimoxazole Wegener Study Group. *N Engl J Med* 1996, **335**:16-20.
 11. Popa ER, Stegeman CA, Abdulahad WH, van der Meer B, Arends J, Manson WM, Bos NA, Kallenberg CG, Cohen Tervaert JW: *Staphylococcal toxic-shock-syndrome-toxin-1* as a risk factor for disease relapse in Wegener's granulomatosis. *Rheumatology (Oxford)* 2007, **46**:1029-1033.
 12. Zycinska K, Wardyn KA, Zielonka TM, Demkow U, Traburzynski MS: Chronic crusting, nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and relapse rate in pulmonary Wegener's granulomatosis. *J Physiol Pharmacol* 2008, **59**(Suppl 6):825-831.
 13. De Groot K, Reinhold-Keller E, Tatsis E, Paulsen J, Heller M, Nolle B, Gross WL: Therapy for the maintenance of remission in sixty-five patients with generalized Wegener's granulomatosis. Methotrexate versus trimethoprim/sulfamethoxazole. *Arthritis Rheum* 1996, **39**:2052-2061.
 14. Reinhold-Keller E, de Groot K, Rudert H, Nölle B, Heller M, Gross WL: Response to trimethoprim/sulfamethoxazole in Wegener's granulomatosis depends on the phase of disease. *QJM* 1996, **89**:15-23.
 15. Popa ER, Stegeman CA, Kallenberg CG, Tervaert JW: *Staphylococcus aureus* and Wegener's granulomatosis. *Arthritis Res* 2002, **4**:77-79.
 16. Abdulahad WH, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CG: CD4-positive effector memory T cells participate in disease expression in ANCA-associated vasculitis. *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1107**:22-31.
 17. Mayet WJ, Marker-Hermann E, Schlaak J, Meyer Zum Büschenfelde KH: Irregular cytokine pattern of CD4+ T lymphocytes in response to *Staphylococcus aureus* in patients with Wegener's granulomatosis. *Scand J Immunol* 1999, **49**:585-594.
 18. Laudien M, Häslner R, Wohlens J, Böck J, Lipinski S, Bremer L, Podschun R, Ambrosch P, Lamprecht P, Rosenstiel P, Till A: Molecular signatures of a disturbed nasal barrier function in the primary tissue of Wegener's granulomatosis. *Mucosal Immunol* 2011, **4**:564-573.
 19. Kain R, Exner M, Brandes R, Ziebermayr R, Cunningham D, Alderson CA, Davidovits A, Raab I, Jahn R, Ashour O, Spitzauer S, Sunder-Plassmann G, Fukuda M, Klemm P, Rees AJ, Kerjaschki D: Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med* 2008, **14**:1088-1096.
 20. Pendergraft WF III, Preston GA, Shah RR, Tropsha A, Carter CW Jr, Jennette JC, Falk RJ: Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat Med* 2004, **10**:72-79.
 21. Tosi MF: Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 2005, **116**:241-249.
 22. Medzhitov R, Janeway C Jr: Innate immunity. *N Engl J Med* 2000, **343**:338-344.
 23. Csernok E, Szymkowiak CH, Mistry N, Daha MR, Gross WL, Kekow J: Transforming growth factor-beta (TGF-beta) expression and interaction with proteinase 3 (PR3) in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996, **105**:104-111.
 24. Krumbholz M, Specks U, Wick M, Kalled SL, Jenne D, Meinel E: BAFF is elevated in serum of patients with Wegener's granulomatosis. *J Autoimmun* 2005, **25**:298-302.
 25. Torheim EA, Ndstad A, Bjerkeli V, Halvorsen B, Aukrust P, Froland SS: Increased expression of chemokines in patients with Wegener's granulomatosis - modulating effects of methylprednisolone *in vitro*. *Clin Exp Immunol* 2005, **140**:376-383.
 26. Lamprecht P, Kumanovics G, Mueller A, Csernok E, Komocsi A, Trabandt A, Gross WL, Schnabel A: Elevated monocytic IL-12 and TNF-alpha production in Wegener's granulomatosis is normalized by cyclophosphamide and corticosteroid therapy. *Clin Exp Immunol* 2002, **128**:181-186.
 27. Ludviksson BR, Sneller MC, Chua KS, Talar-Williams C, Langford CA, Ehrhardt RO, Fauci AS, Strober W: Active Wegener's granulomatosis is associated with HLA-DR+ CD4+ T cells exhibiting an unbalanced Th1-type T cell cytokine pattern: reversal with IL-10. *J Immunol* 1998, **160**:3602-3609.
 28. Coulomb-L'Herminie A, Capron F, Zou W, Piard F, Galateau F, Laurent P, Crevon MC, Galanaud P, Emilie D: Expression of the chemokine RANTES in pulmonary Wegener's granulomatosis. *Hum Pathol* 2001, **32**:320-326.
 29. Zhou Y, Huang D, Farver C, Hoffman GS: Relative importance of CCR5 and antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol* 2003, **30**:1541-1547.
 30. Richter AG, Stockley RA, Harper L, Thickett DR: Pulmonary infection in Wegener granulomatosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 2009, **64**:692-697.
 31. Hellmich B, Flossmann O, Gross WL, Bacon P, Cohen-Tervaert JW, Guillevin L, Jayne D, Mahr A, Merkel PA, Raspe H, Scott DG, Witter J, Yazici H, Luqmani RA: EULAR recommendations for conducting clinical studies and/or clinical trials in systemic vasculitis: focus on anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2007, **66**:605-617.
 32. Reinhold-Keller E, Kekow J, Schnabel A, Schmitt WH, Heller M, Beigel A, Duncker G, Gross WL: Influence of disease manifestation and antineutrophil cytoplasmic antibody titer on the response to pulse cyclophosphamide therapy in patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1994, **37**:919-924.
 33. Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, Janssen BA, Pall A, Emery P, Savage C, Adu D: Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM* 1994, **87**:671-678.
 34. Eley AR, Bacon PA, Luqmani RA, Kitis GD, Gordon C, Savage CO, Adu D: Development and initial validation of the Vasculitis Damage Index for the standardized clinical assessment of damage in the systemic vasculitides. *Arthritis Rheum* 1997, **40**:371-380.
 35. Luqmani RA: Assessing disease activity in the systemic vasculitides. *Curr Opin Rheumatol* 2002, **14**:23-28.
 36. Reinhold-Keller E, Beuge N, Latza U, De Groot K, Rudert H, Nolle B, Heller M, Gross WL: An interdisciplinary approach to the care of patients with Wegener's granulomatosis: long-term outcome in 155 patients. *Arthritis Rheum* 2000, **43**:1021-1032.
 37. Fauci AS, Haynes BF, Katz P, Wolff SM: Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years. *Ann Intern Med* 1983, **98**:76-85.
 38. Savage J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, Hagen EC, Jayne D, Jennette JC, Paspaliaris B, Pollock W, Pusey C, Savage CO, Silvestrini R, van der Woude F, Wieslander J, Wiik A: International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999, **111**:507-513.
 39. Holtfreter S, Grumann D, Schmulde M, Nguyen HT, Eichler P, Strommenger B, Kopron K, Kolata J, Giedrys-Kalemba S, Steinmetz I, Witte W, Broker BM: Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2007, **45**:2669-2680.
 40. Sachse F, von Eiff C, Stoll W, Becker K, Rudack C: Induction of CXCL chemokines in A549 airway epithelial cells by trypsin and staphylococcal proteases - a possible route for neutrophilic inflammation in chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Immunol* 2006, **144**:534-542.
 41. Balding CE, Howie AJ, Drake-Lee AB, Savage CO: Th2 dominance in nasal mucosa in patients with Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 2001, **125**:332-339.
 42. Eyles JL, Roberts AW, Metcalf D, Wicks IP: Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils-forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006, **2**:500-510.
 43. Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, Abe H, Hirai M, Kurosawa S, Mori M, Fukushima M: Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood* 1990, **76**:1962-1964.
 44. Kawakami T, Ohashi S, Kawa Y, Takahama H, Ito M, Soma Y, Mizoguchi M: Elevated serum granulocyte colony-stimulating factor levels in patients with active phase of sweet syndrome and patients with active behcet disease: implication in neutrophil apoptosis dysfunction. *Arch Dermatol* 2004, **140**:570-574.
 45. Nakamura H, Ueki Y, Sakito S, Matsumoto K, Yano M, Miyake S, Tominaga T, Tominaga M, Eguchi K: High serum and synovial fluid granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2000, **18**:713-718.
 46. Ina K, Kusugami K, Hosokawa T, Imada A, Shimizu T, Yamaguchi T, Onsuga M, Kyokane K, Sakai T, Nishio Y, Yokoyama Y, Ando T: Increased mucosal production of granulocyte colony-stimulating factor is related to a delay in neutrophil apoptosis in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1999, **14**:46-53.

47. Majanski NA, Mul FP, van Buul JD, Roos D, Kuijpers TW: **Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils.** *Blood* 2002, **99**:672-679.
48. Hellmich B, Csernok E, Trabandt A, Gross WL, Ernst M: **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) but not granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) induces plasma membrane expression of proteinase 3 (PR3) on neutrophils in vitro.** *Clin Exp Immunol* 2000, **120**:392-398.
49. Kallenberg CG, Stegeman CA, Heeringa P: **Autoantibodies vex the vasculature.** *Nat Med* 2008, **14**:1018-1019.
50. Schneider EM, Lorenz I, Ma X, Weiss M: **G-CSF modulates LPS-induced apoptosis and IL-8 in human microvascular endothelial cells: involvement of calcium signaling.** *Ann N Y Acad Sci* 2003, **1010**:78-85.
51. Leavey PJ, Sellins KS, Thurman G, Elzi D, Hiester A, Silliman CC, Zerbe G, Cohen JJ, Ambruso DR: **In vivo treatment with granulocyte colony-stimulating factor results in divergent effects on neutrophil functions measured in vitro.** *Blood* 1998, **92**:4366-4374.
52. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA: **Interleukin 8 and cardiovascular disease.** *Cardiovasc Res* 2009, **84**:353-360.
53. Csernok E, Ernst M, Schmitt W, Bainton DF, Gross WL: **Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo.** *Clin Exp Immunol* 1994, **95**:244-250.
54. Brouwer E, Huitema MG, Mulder AH, Heeringa P, van Goor H, Tervaert JW, Weening JJ, Kallenberg CG: **Neutrophil activation in vitro and in vivo in Wegener's granulomatosis.** *Kidney Int* 1994, **45**:1120-1131.
55. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M: **Multiple control of interleukin-8 gene expression.** *J Leukoc Biol* 2002, **72**:847-855.
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**:245-249.
57. Rudack C, Sachse F, Albert N, Becker K, von Eiff C: **Immunomodulation of nasal epithelial cells by Staphylococcus aureus-derived serine proteases.** *J Immunol* 2009, **183**:7592-7601.
58. Ullrich S, Gustke H, Lamprecht P, Gross WL, Schumacher U, Ambrosch P, Laudien M: **Severely impaired respiratory ciliary function in Wegener's granulomatosis.** *Ann Rheum Dis* 2008, **68**:1067-1071.
59. Hui Y, Wohlers J, Podschun R, Hedderich J, Lamprecht P, Ambrosch P, Laudien M: **Antimicrobial peptides in nasal secretion and mucosa with respect to S. aureus colonization in Wegener's granulomatosis.** *Clin Exp Rheumatol* 2011, **29**:49-56.
60. Tan BK, Schleimer RP, Kern RC: **Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis.** *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2010, **18**:21-26.
61. Sachse F, von Eiff C, Becker K, Rudack C: **Anti-inflammatory effects of ciprofloxacin in S. aureus Newman induced nasal inflammation in vitro.** *J Inflamm (Lond)* 2008, **5**:11.
62. Szekanecz Z, Vegvari A, Szabo Z, Koch AE: **Chemokines and chemokine receptors in arthritis.** *Front Biosci (Schol Ed)* 2010, **2**:153-167.
63. Zwierzina H, Holzinger I, Gaggli S, Wolf H, Schollenberger S, Lam C, Bammer T, Geissler D, Lindley I: **Recombinant human interleukin-8 restores function in neutrophils from patients with myelodysplastic syndromes without stimulating myeloid progenitor cells.** *Scand J Immunol* 1993, **37**:322-328.
64. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, Agata T, Mizunoe Y: **Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization.** *Nature* 2010, **465**:346-349.

doi:10.1186/ar4041

Cite this article as: Wohlers et al.: **Aberrant cytokine pattern of the nasal mucosa in granulomatosis with polyangiitis.** *Arthritis Research & Therapy* 2012 **14**:R203.

8 Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Prof. Dr. med. Petra Ambrosch, die diese Dissertation ermöglicht hat.

Herzlichen Dank an PD Dr. med. Martin Laudien für die hervorragende Betreuung, die permanente Erreichbarkeit, das immer offene Ohr und all das Zwischenmenschliche, das diese Zusammenarbeit so angenehm gemacht hat.

Vielen Dank auch an Janet Wohlers für den geduldigen Beistand und die riesige Hilfe im Labor, für den ständigen Austausch und einige gemeinsame Fahrradtouren.

Für die freundliche Aufnahme im Labor, für Rat und Tat, wenn Hilfe notwendig war, danke ich PD Dr. rer. nat. Tibor Görögh.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Barbara M. Bröker aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Greifswald für die Bereitstellung des *S. aureus*-Stammes.

Für die Zusammenarbeit bei der Analyse des Zytokeratinmusters bedanke ich mich bei Dr. med. Konstanze Holl-Ulrich aus dem Institut für Pathologie der Universität Lübeck.

Auch an Jürgen Hedderich vielen Dank für die Beantwortung statistischer Fragen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne deren jahrelange Unterstützung diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Danke Torben - für alles.

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Herrn

Dr. med. M. Laudin

Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde,

Kopf- und Halschirurgie

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Arnold-Heller-Straße 14

24105 Kiel

Schwanenweg 20

D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09

Telefax 04 31 / 597-18 31

Datum:

28.2.2011

AZ.: A 101/07

(bitte stets angeben)

Studienplan:

Einfluss endogener und exogener Faktoren auf die Grenzflächenläsion am respiratorischen Epithel bei Wegenerscher Granulomatose

Projektleiter:

Prof. Dr. med. St. Gottschlich, Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, UKSH, Campus Kiel

Mitarbeiter:

Dr. med. M. Laudin, UKSH, Campus Kiel

Datum des Erstantrages: 22.12.2006

Ihre E-Mail vom: 28.2.2011

Sehr geehrter Herr Kollege Laudin,

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

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

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

Curriculum Vitae

Name	Katrin Krueh geb. Breucker
Geburtsdatum	14. Juni 1985
Geburtsort	Herdecke

Berufserfahrung

seit 11/2012	<i>Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin Assistenzärztin</i>
---------------------	---

Hochschulstudium

10/2005 - 04/2012	<i>Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Studium der Humanmedizin Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2,0)</i>
09/2008 - 08/2009	<i>Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spanien Siebtes und achtes Semester des spanischen Medizinstudiums</i>

Schulbildung

08/1995 - 06/2004	<i>Städtisches Gymnasium Holthausen, Hattingen Allgemeine Hochschulreife (1,1)</i>
08/2001 - 06/2002	<i>Stoneman Douglas High School Coral Springs, Florida, USA Elfte Klasse der US-amerikanischen High School</i>

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	Verhandlungssicher
Spanisch	Verhandlungssicher
Französisch	Grundkenntnisse

Sonstiges Engagement

Schwimmen	1991 - 2004 Leistungssport 8-malige Teilnahme an den Deutschen Meisterschaften mit Platzierungen unter den ersten 10 Trainings- und Wettkampfbetreuung von Nachwuchs-Teams Seit 2005 aktives Mitglied der CAU Kiel Wettkampfmannschaft
Windsurf-Schulung	2004 Ausbildung zur VDWS Windsurf-Instruktorin 2004 - 2005 Windsurf-Instruktorin Betreuung internationaler Gruppen unterschiedlichen Alters Initialisierung und Durchführung spezieller Kursprogramme für Kinder mit körperlichen und geistigen Behinderungen