

# Einfluss von Lipoteichonsäuren (LTA) von *Staphylococcus aureus* auf die Proliferation von NSCLC-Zelllinien.

Christian Reinert<sup>1</sup>, Katja Hattar<sup>1</sup>, Gabriele Dahlem<sup>1</sup>, Jochen Wilhelm<sup>2</sup>, Ulf Sibelius<sup>1</sup>, Werner Seeger<sup>2</sup>, Friedrich Grimminger<sup>1</sup>, Ulrich Grandel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik IV/V, UGMLC, UKGM, Standort Gießen

<sup>2</sup> Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II, UGMLC, UKGM, Standort Gießen

## Einführung:

Zwischen Inflammation und Tumorprogression werden beim Lungenkarzinom enge Zusammenhänge vermutet. Viele Lungenkrebspatienten leiden zusätzlich an einer Infektion des tracheobronchialen Systems, vor allem an einer Pneumonie. Erreger sind insbesondere gramnegative Bakterien wie *E. coli*, gefolgt von grampositiven Keimen wie *S. aureus* oder *S. pneumoniae*. Zentrale Pathogenitätsfaktoren grampositiver Keime sind die Zellwandbestandteile Lipoteichonsäuren (LTA), welche in der Lage sind, inflammatorische Zellreaktionen zu aktivieren. Als möglicher Mechanismus wird dabei die Ligandierung von toll-like Rezeptoren (TLRs) und CD14 diskutiert. Diese inflammatorische Zellaktivierung durch LTA könnte einen verstärkenden Einfluss auf die Proliferation von Lungentumorzellen haben.

## Fragestellung:

Ziel dieser Arbeit ist es, das Wachstumsverhalten der beiden Adenokarzinomzelllinien A549 und H1299 sowie der Plattenepithelkarzinomzelllinie H226 (Abb.15) unter Einfluss von Interaktion mit LTA von *S. aureus* zu untersuchen.

## Material und Methoden:

Zu den drei Zelllinien wurden unterschiedliche Konzentrationen von LTA gegeben und diese über verschieden lange Zeiträume zusammen inkubiert. Zur Quantifizierung der Zellproliferation wurde die direkte automatisierte Zellzählung (Casy® Cell Count) durchgeführt (Abb.14). Des Weiteren erfolgte der Nachweis der Stoffwechselaktivität (MTT-Assay) und die Quantifizierung der Neusynthese von DNA im Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assay. Ebenso wurde mittels ELISA die Synthese von IL-8 gemessen.

## Ergebnisse:

Bei der Adenokarzinomzelllinie A549 sowie bei der Plattenepithelkarzinomzelllinie H226 führte die Zugabe von LTA in den Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml zu signifikanten Anstiegen der Proliferation bzw. Stoffwechselaktivität gegenüber den Kontrollwerten. Messzeitpunkte waren 6 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden nach Stimulation mit LTA. Der Cell Count ergab eine maximale Stimulation des Zellwachstums durch LTA nach 48 Stunden (Abb.2, Abb.3). Ebenso zeigte die zweite Adenokarzinomzelllinie H1299 den deutlichsten Anstieg der Proliferation und Stoffwechselaktivität nach 48 Stunden (Abb.3, Abb.9). Im ELISA ließ sich bei A549 zudem eine verstärkte IL-8-Expression unter Einfluss von LTA messen (Abb.10). Anschließend wurden mittels monoklonaler Antikörper bei A549 selektiv die zellulären Oberflächenrezeptoren TLR 2, TLR 4 oder CD14 blockiert und das Verhalten der Zellen unter Einfluss von LTA untersucht. Hier konnte durch direkte Zellzählung (Cell Count) ein signifikanter Abfall der Proliferation und Stoffwechselaktivität unter Blockade von TLR2 gemessen werden (Abb.12). Auch die Blockade des Zytokins IL-8 ergab eine Abschwächung des LTA-Effektes. Die Hemmung von TLR4 zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Proliferationsaktivität im Cell Count. Die im ELISA messbare verstärkte IL-8-Expression durch LTA konnte durch den Einsatz von TLR2-AK abgeschwächt werden (Abb.11). Die Untersuchung der Proliferation auf DNA-Ebene (BrdU-Assay) zeigte eine Abschwächung des LTA-Effektes durch Blockade von TLR2, TLR4 und CD14 (Abb.13).

## Fazit:

LTA zeigt einen proliferationssteigernden Effekt auf die getesteten NSCLC-Zelllinien. Dieser Effekt scheint über TLR2 und IL-8 mediiert zu sein.

Infektionen durch grampositive Keime könnten auf diese Weise zur Tumorprogression im NSCLC beitragen.

## Zusammenfassung:

- Die Inkubation von A549, H226 und H1299 mit LTA in den Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml führte zu einer Zunahme der Zellproliferation.
- Ebenso zeigten die Zellen eine verstärkte Stoffwechselaktivität sowie vermehrte Neusynthese von DNA. Bei A549 ließ sich eine LTA-induzierte verstärkte IL-8-Synthese messen.
- Die Blockade von TLR2 führte bei A549 zu einer Abschwächung des LTA-vermittelten proliferationssteigernden Effektes sowie einer Abschwächung der IL-8-Expression.
- IL-8 scheint den proliferationssteigernden Effekt von LTA endogen zu medieren, da die Neutralisation von IL-8 den Effekt von LTA deutlich abschwächte.

## LTA induzierte verstärkte IL-8-Expression:

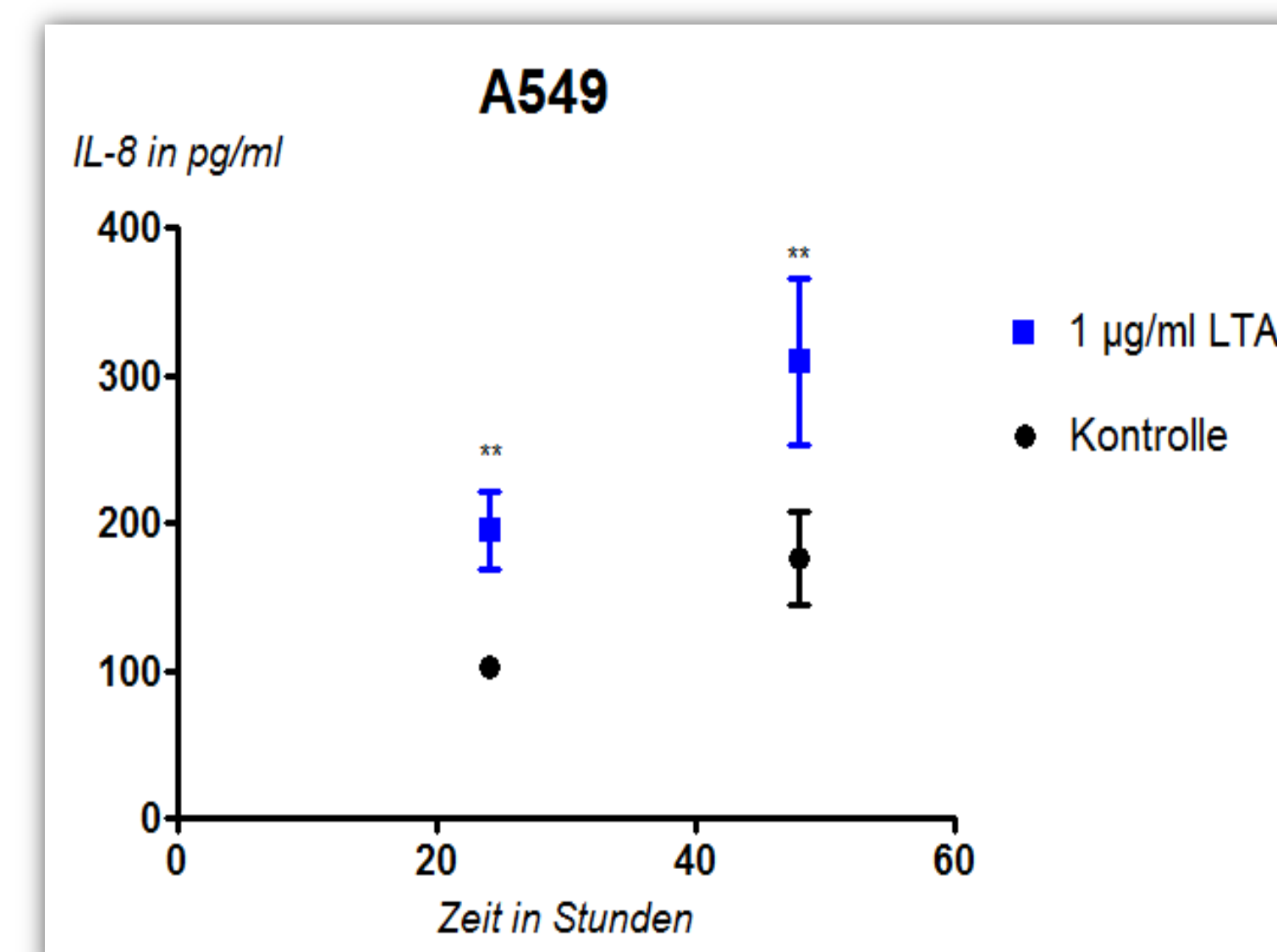


Abb. 10  
n=4; Messung durch ELISA nach 24 h und 48 h; Streuung der Werte dargestellt als SEM.

## TLR2-abhängige Expression von IL-8:

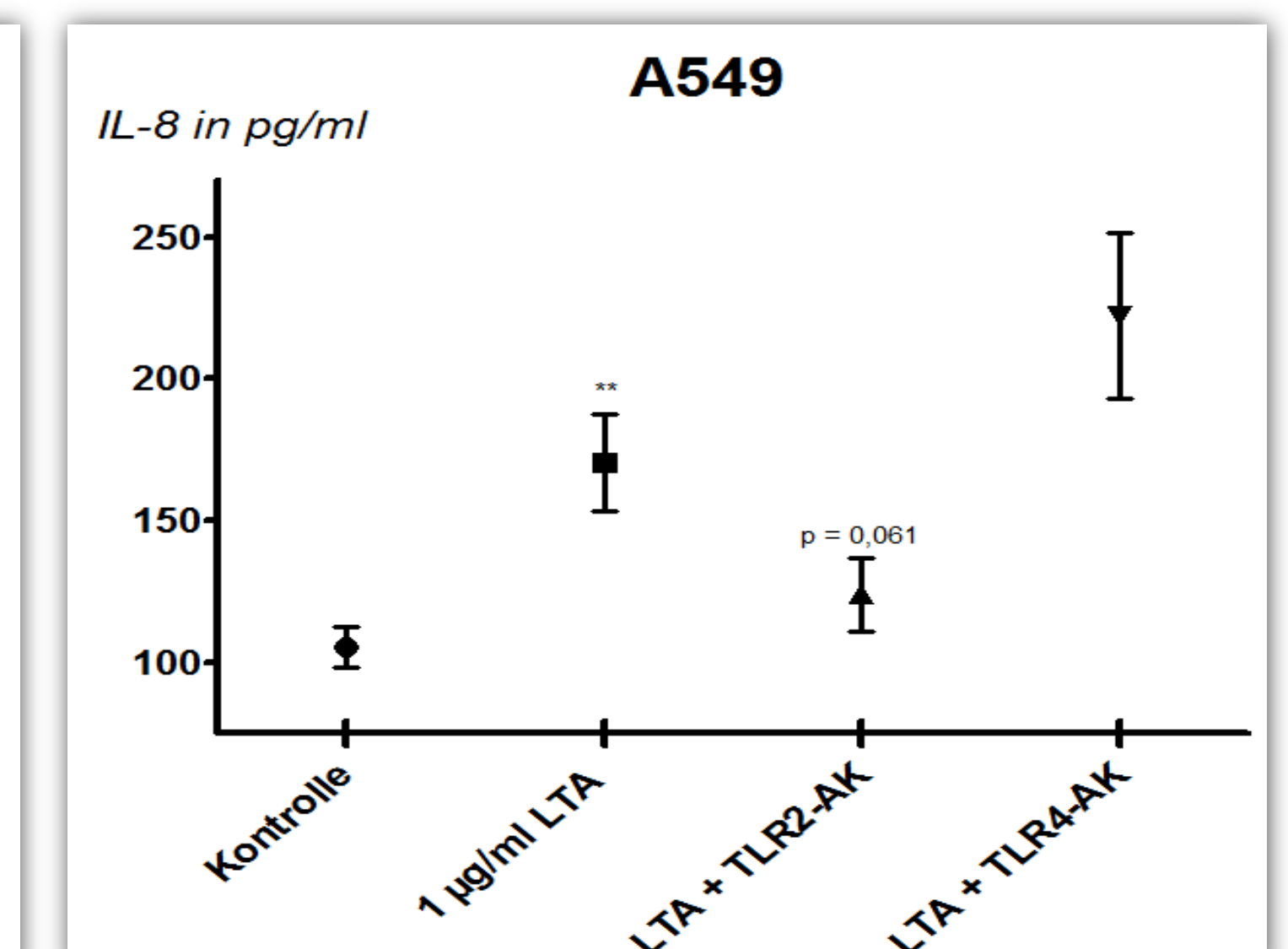


Abb. 11  
Kontrolle: n=8; LTA: n=8; LTA + TLR2-AK: n=6; LTA + TLR4-AK: n=6; Messung des synthetisierten IL-8 im ELISA nach 24h und 48h; TLR2-AK und TLR4-AK eingesetzt in der Konzentration 0,5 µg/ml; Streuung der Werte dargestellt als SEM. \*\* = p < 0,01



Abb. 14  
Casy® Cell Counter + Analyser System  
Model TT, innovatis AG Casy® Technology

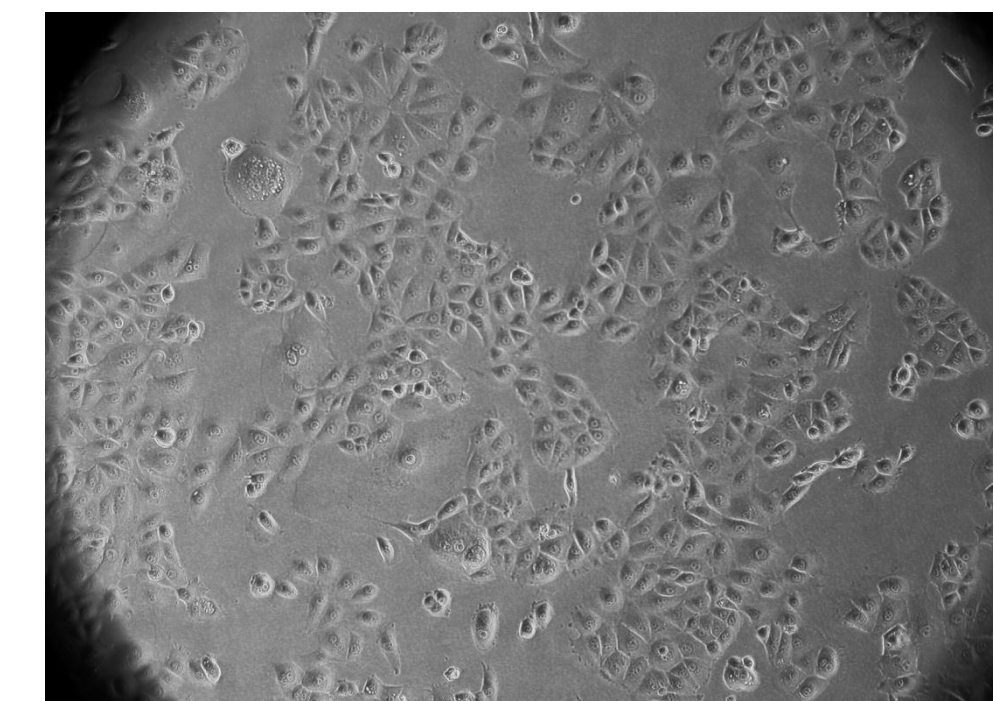


Abb. 15  
Lichtmikroskopische Aufnahme von H226 in Kultur, Vergrößerung 10 x

## Aufhebung des LTA-Effektes unter Einsatz von TLR2-AK und IL-8-AK im Casy Cell Count:

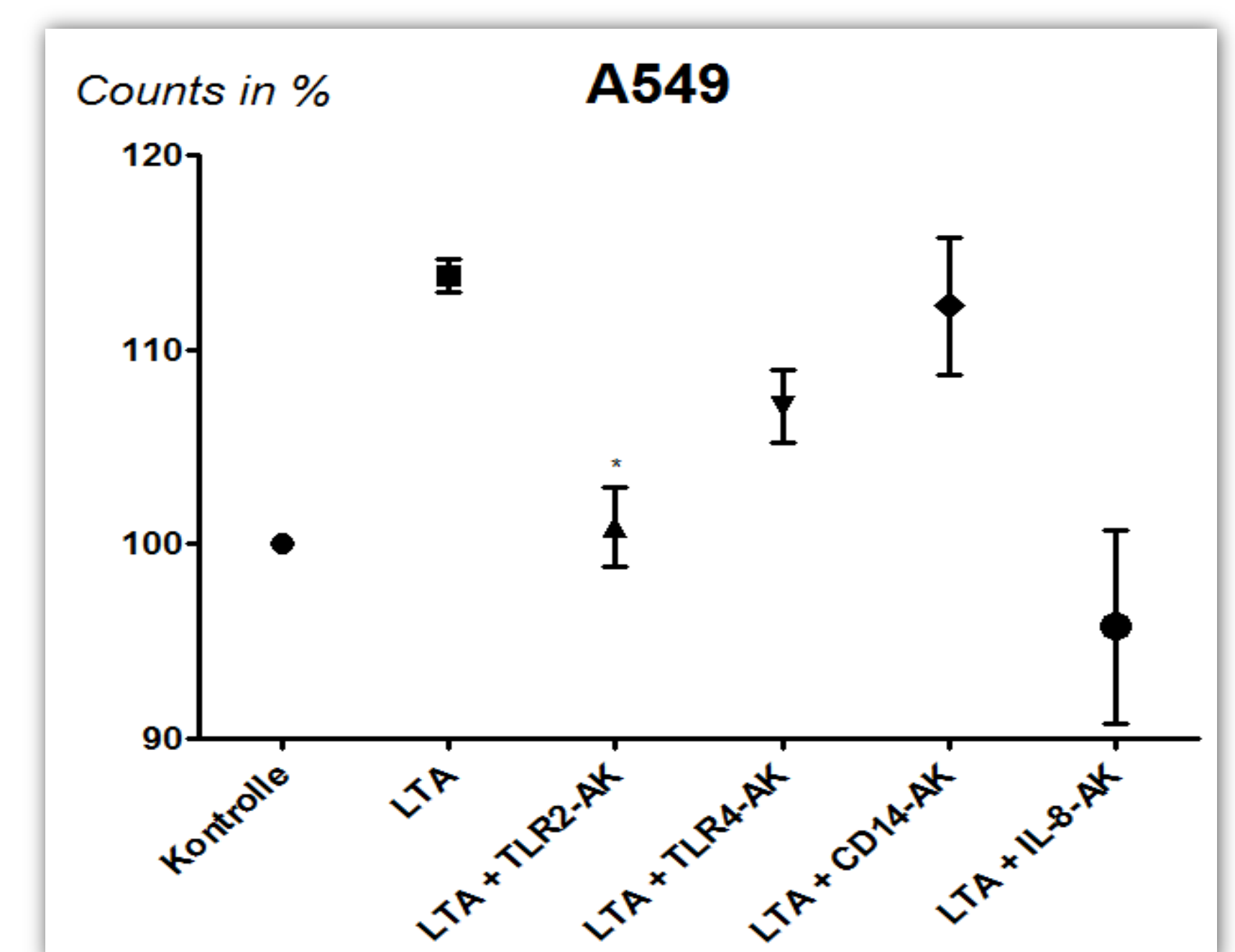


Abb. 12  
Kontrolle: n=12; LTA: n=10; LTA + TLR2-AK: n=9; LTA + TLR4-AK: n=8; LTA + CD14-AK: n=8; LTA + IL-8-AK: n=4; Messung der Proliferation nach 24 h und 48 h; LTA eingesetzt in den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml; TLR2-AK und TLR4-AK in den Konzentrationen 0,5 µg/ml und 1 µg/ml, CD14-AK und IL-8-AK in der Konzentration 5 µg/ml. Streuung der Werte dargestellt als SEM. \* = p < 0,05

## Abschwächung des LTA-Effektes unter Einsatz von TLR2/4-AK und CD14-AK im BrdU-Assay:

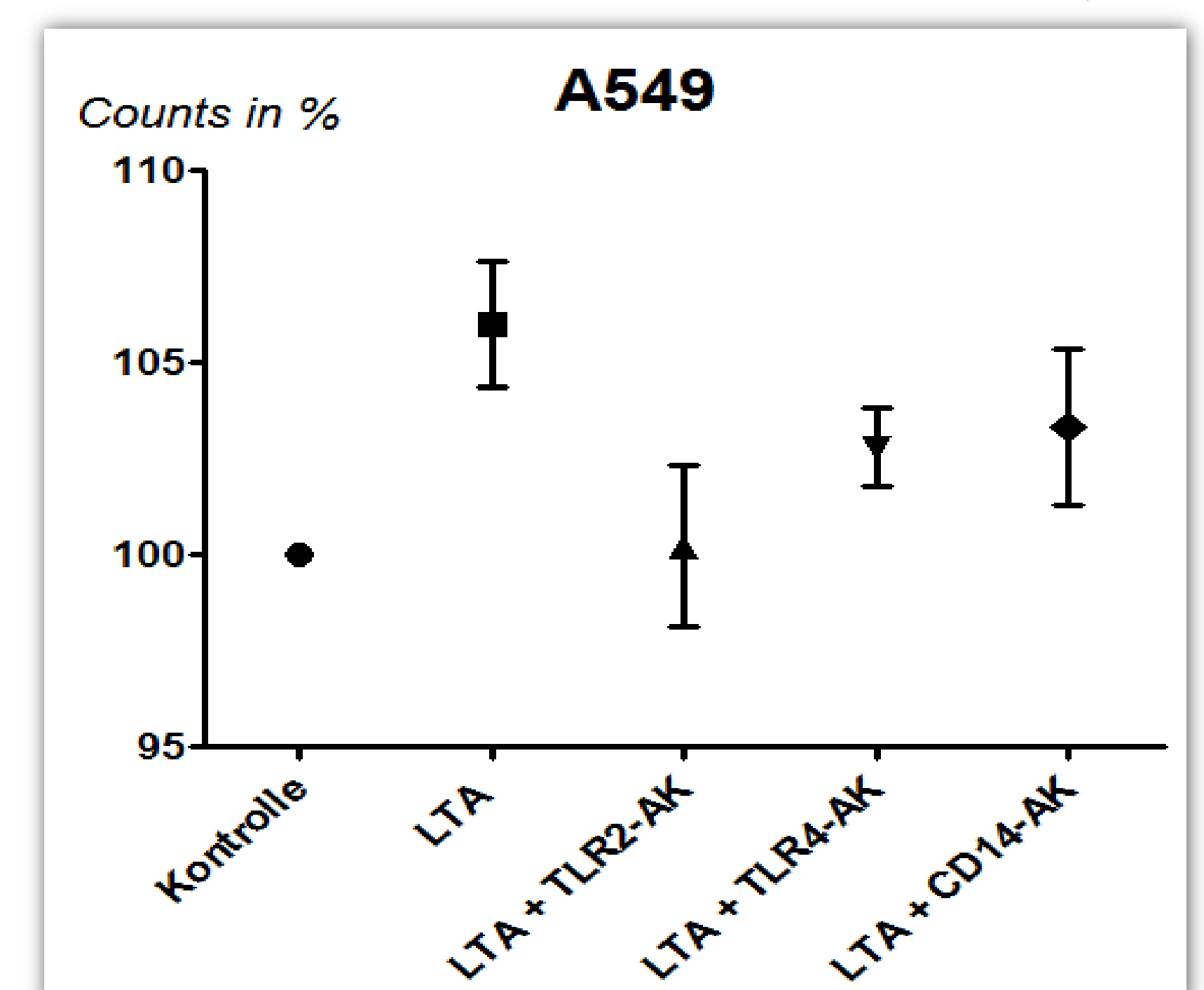


Abb. 13  
Kontrolle: n=27; LTA: n=18; LTA + TLR2-AK: n=12; LTA + TLR4-AK: n=13; LTA + CD14-AK: n=10; Messung der Stoffwechselaktivität im ELISA nach 24 h und 48 h; LTA eingesetzt in der Konzentration 1 µg/ml; TLR2-AK und TLR4-AK in den Konzentrationen 0,5 µg/ml, CD14-AK in der Konzentration 5 µg/ml. Streuung der Werte dargestellt als SEM.

## Im Casy Cell Count zeigte sich eine LTA-induzierte Proliferationszunahme der Tumorzellen:

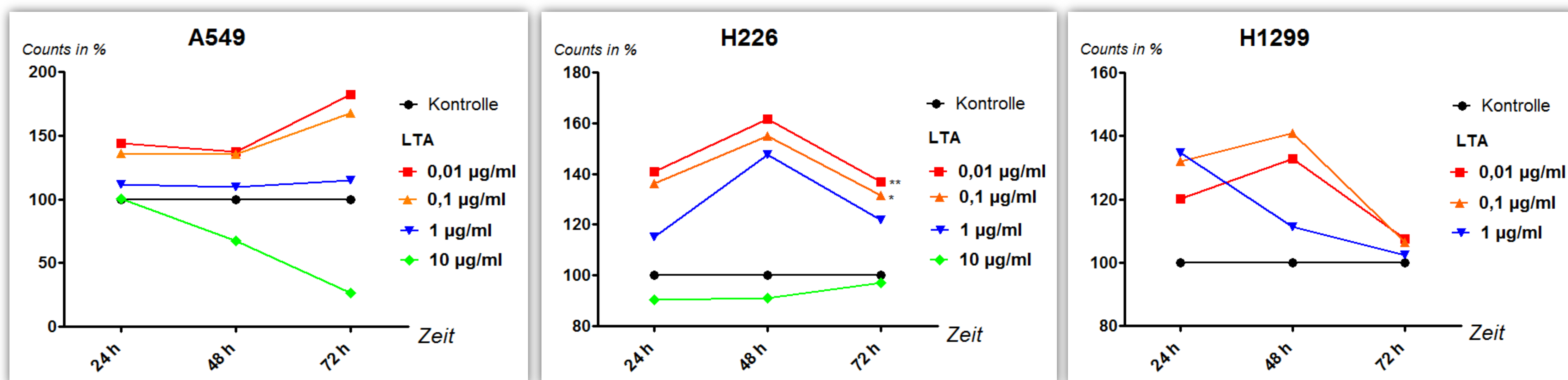


Abb. 1  
Kontrolle: n= 9-10; LTA (0,01 µg/ml): n= 6-7; LTA (0,1 µg/ml): n= 9-10  
LTA (1 µg/ml): n= 8-10; LTA (10 µg/ml): n= 2-3

Abb. 2  
Kontrolle: n= 9-10; LTA (0,01 µg/ml): n= 4-5; LTA (0,1 µg/ml): n= 9-10  
LTA (1 µg/ml): n= 9-10; LTA (10 µg/ml): n= 4-5

Abb. 3  
Kontrolle: n= 3-5; LTA (0,01 µg/ml): n= 3-5; LTA (0,1 µg/ml): n= 3-5  
LTA (1 µg/ml): n= 3-5; LTA (10 µg/ml): n= 3-5

## LTA-induzierte Zunahme der Neusynthese von DNA der Tumorzellen im BrdU-Assay:

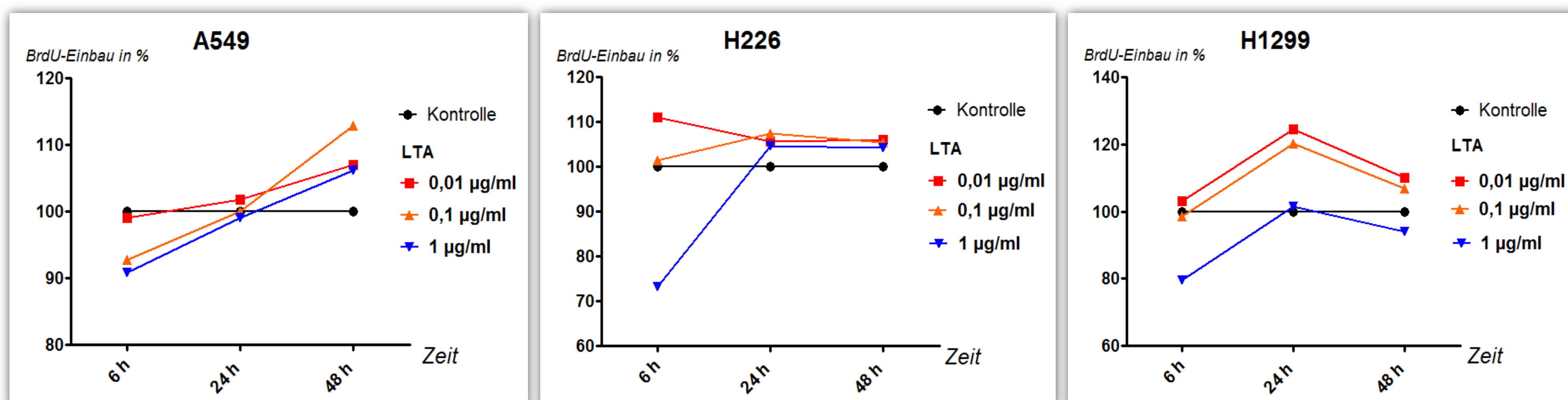


Abb. 4  
Kontrolle: n= 8; LTA (0,01 µg/ml): n= 8; LTA (0,1 µg/ml): n= 8  
LTA (1 µg/ml): n= 8; LTA (10 µg/ml): n= 8

Abb. 5  
Kontrolle: n= 4; LTA (0,01 µg/ml): n= 4; LTA (0,1 µg/ml): n= 4  
LTA (1 µg/ml): n= 4; LTA (10 µg/ml): n= 4

Abb. 6  
Kontrolle: n= 4-6; LTA (0,01 µg/ml): n= 4-6; LTA (0,1 µg/ml): n= 4-6  
LTA (1 µg/ml): n= 4-6; LTA (10 µg/ml): n= 4-6

## LTA-induzierte Zunahme der Stoffwechselaktivität der Tumorzellen im MTT-Assay:

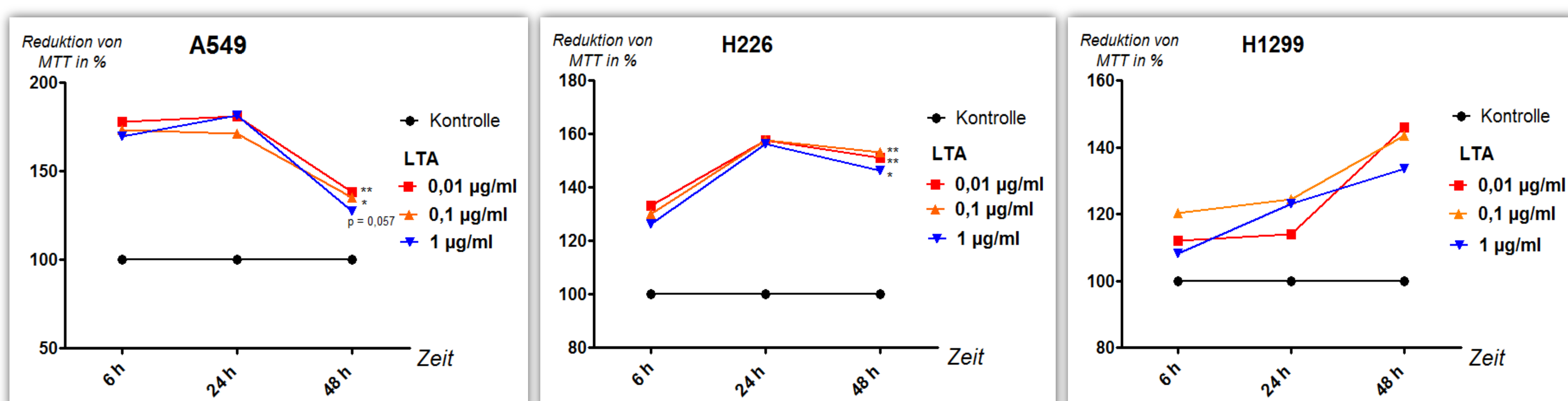


Abb. 7  
Kontrolle: n= 15-17; LTA (0,01 µg/ml): n= 15-17; LTA (0,1 µg/ml): n= 15-17; LTA (1 µg/ml): n= 15-17; LTA (10 µg/ml): n= 15-17

Abb. 8  
Kontrolle: n= 13; LTA (0,01 µg/ml): n= 13; LTA (0,1 µg/ml): n= 13  
LTA (1 µg/ml): n= 13; LTA (10 µg/ml): n= 13

Abb. 9  
Kontrolle: n= 10; LTA (0,01 µg/ml): n= 10; LTA (0,1 µg/ml): n= 10  
LTA (1 µg/ml): n= 10; LTA (10 µg/ml): n= 10