

7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, nach peroraler Applikation von Endotoxin (LPS, Lipid A) an keimfreie Ratten des Inzuchtstammes AS/Ztm Veränderungen der Menge und Zusammensetzung der ins Colon sezernierten Mucine zu ermitteln. Parallel wurde das Colon-epithel in einer histologischen Untersuchung auf Anzeichen einer veränderten Mucinsynthesekapazität und auf Veränderungen im Anteil von Becherzellen, die neutrale oder saure Mucine enthalten, untersucht. Außerdem wurde die Adhärenz von Mannose-sensitiven *Escherichia coli* 0128 (ATCC) an diese Mucine geprüft.

Es wurden jeweils 6 männliche, 90 Tage alte Ratten pro Gruppe mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von $321 \pm 14,3$ g am 1., 3. und 5. Tag nach Applikation von 35 µg LPS oder 2,6 µg Lipid A pro 100 g Körpergewicht getötet.

Die Colonmucine wurden durch Gelfiltration auf Sepharose CL-4B und Sepharose CL-2B isoliert und in epitheliale und lumenale Mucine aufgetrennt. Die mit Hilfe der Perjodsäure-Schiff- (PAS-) Reaktion ermittelten Mengen der epithelialen Mucine nahmen in beiden Versuchsgruppen (LPS und Lipid A) zu. Nach LPS war die Vermehrung etwas stärker als nach Lipid A und erreichte am 3. Versuchstag den höchsten Wert. Die luminalen Mucine, die an allen Versuchstagen signifikant vermehrt waren, nahmen ebenfalls in der LPS-Gruppe stärker zu als in der Lipid A-Gruppe. Die Menge der luminalen Mucine nahm deutlich stärker zu als die der epithelialen Mucine.

Mit Hilfe von spezifisch bindenden, Peroxidase-markierten Lektinen wurden definierte Mono- und Disaccharidstrukturen der Mucinoligosaccharide bestimmt. Die Bindung der Lektine Peanut-Agglutinin (PNA) an Galaktose, Glycine-max-Agglutinin (SBA) an terminales N-Acetylgalaktosamin und Sambucus-nigra-Agglutinin (SNA) an terminale Sialinsäuren nahm in beiden Gruppen (LPS und Lipid A) an allen Versuchstagen, teils signifikant, zu. Geringe Änderungen in der Bindungsaktivität zeigte Datura-stamonium-Agglutinin (DSA),

das spezifisch an β -N-Acetylglukosamin bindet. α -Fucose, die durch Ulex-europaeus-I-Agglutinin (UEA I) detektiert wird, nahm sowohl in der LPS- als auch in der Lipid A-Gruppe um mehr als die Hälfte ab, während der Gehalt an α -Mannose, nachgewiesen durch Concanavalin A (Con A), in der Lipid A-Gruppe signifikant ab- und in der LPS-Gruppe signifikant zunahm. Die Menge des insgesamt an lumenale Mucine gebundenen Lektins war bei allen 6 Lektinen um 30 - 50 % geringer als an epitheliale Mucine. Das Verhältnis der an die epithelialen und luminalen Mucine gebundenen Lektinmengen änderte sich im Vergleich zum Kontrollwert an den Versuchstagen nur gering. Die Ergebnisse aus den Lektin-ELISA mit SBA, DSA, UEA I und Con A wurden durch die gaschromatographische Analyse bestätigt.

Parallel zu der biochemischen Charakterisierung der sezernierten Mucine wurden 8 μ m dicke histologische Schnitte des proximalen und distalen Colons nach Hematoxylin-Eosin- (HE-) bzw. Alcianblau(2,5)-PAS-Färbung lichtmikroskopisch untersucht. Im proximalen Colon nahm die Anzahl der Krypten pro Epithelstrecke in der LPS- und der Lipid A-Gruppe signifikant zu und erreichte jeweils am 3. Versuchstag den höchsten Wert. Im distalen Colon gab es in der LPS-Gruppe nur am 5. Versuchstag mit einer Verringerung der Kryptenanzahl pro Epithelstrecke eine signifikante Veränderung. In der Lipid A-Gruppe nahm die Anzahl der Krypten pro Epithelstrecke mit einem Maximum am 1. Tag an allen Versuchstagen signifikant zu. Die Kryptentiefe nahm im proximalen Colon in beiden Gruppen, im distalen Colon in der LPS-Gruppe jeweils am 1. Versuchstag signifikant zu, um am 5. Tag überall unter den Ausgangswert abzusinken. Die Anzahl der Becherzellen pro Kryptenpfeiler nahm in der LPS-Gruppe am 1., in der Lipid A-Gruppe am 5. Versuchstag gering zu. Dagegen war die Anzahl der Interkrypt-Becherzellen pro Epithelstrecke besonders im distalen Colon deutlich und an allen Versuchstagen signifikant erhöht. Der Durchmesser der Krypt-Becherzellen war in beiden Gruppen (LPS und Lipid A) und an allen Versuchstagen, teils signifikant, vergrößert und erreichte jeweils am 3. Tag sein Maximum.

Mit der Alcianblau(2,5)-PAS-Färbung konnten die intrazellulären Mucine in neutrale, gemischte und saure Gruppen eingeteilt werden. Der Anteil an neutralen Mucinen nahm in den Krypt- wie auch in den Interkrypt-Becherzellen mit einem Maximum am 3. Versuchstag signifikant zu.

Um zu untersuchen, ob die Veränderungen der Oligosaccharidzusammensetzung Einfluß auf die Adhärenz von Bakterien an diese Mucine hat, wurde ein semiquantitativer Test mit Fluoreszeinisothiocyanat- (FITC-) markierten, Mannose-sensitiven *Escherichia coli* verwendet. Trotz des unterschiedlichen Gehaltes an Mannose nahm die Bindung der Bakterien an die Mucine in der LPS- und der Lipid A-Gruppe ähnlich zu. Die Zahl der an die luminalen Mucine gebundenen Bakterien erreichte am 3. (Lipid A-) und 5. Tag (LPS-Gruppe) den höchsten Wert. An den epithelialen Mucinen nahm, nach einer maximalen Bindungsaktivität am 1. Tag, die Zahl der gebundenen *Escherichia coli* am 3. und 5. Tag wieder ab. Insgesamt war die bakterielle Bindung an die luminalen Mucine etwa 20fach stärker ausgeprägt als an die epithelialen Mucine.

Die Endotoxin-induzierte Stimulation von Synthese und Sekretion der Colonomucine führte somit neben einer Vermehrung zu molekularstrukturellen Modifikationen der sezernierten Mucine. Neben den rein mechanischen Epithelschutzfunktionen scheinen die Mucine auch die Fähigkeit zu besitzen, im Falle einer bakteriellen Infektion zu einem wirksamen Eliminationssystem zu konvertieren. Es ist vorstellbar, daß die hier dargestellten Veränderungen eine unspezifische Reaktion auf ein inflammatorisches Agens darstellen, daß bei infektiösen Geschehen zum Nutzen des Makroorganismus wirksam wird.

8 Summary

Hartmut Müller: Modifications of intracellular and released mucins in germfree rats, following a single peroral application of bacterial glycoconjugates.

The present study aimed to define in germfree AS/Ztm rats the response of released mucins to a single peroral application of endotoxins (lipopolysaccharide (LPS) and lipid A, respectively). In addition, the adherence of mannose-sensitive *Escherichia coli* 0128 (ATCC) to released mucins was determined. In parallel, histometrical evaluation of proximal and distal colon sections were processed to display alterations in mucin secreting goblet cells and their intracellular mucins.

Male rats with 90 days of age were randomly allocated to one of the study groups (n=6 each) and the controls (n=6 each), respectively. Animals with a mean body weight of $321 \pm 14,3$ g received 35 μ g LPS or 2,6 μ g lipid A per 100 g body weight. One, 3 and 5 days after application, the animals were sacrificed. Isolation of released colonic mucins was done by gel filtration on Sepharose CL-4B and Sepharose CL-2B, periodic acid-Schiff reaction (PAS) served for quantitation of released mucins. Due to their molecular weight, isolated mucins were separated into mucin constituents of high molecular weight, adherent to the epithelial layer and soluble mucins, immersed in the intestinal content.

As compared to the effects of lipid A, LPS generated an increased stimulatory effect on the release of adherent and luminal mucin with maximum values at day 3. The increase of luminal mucins was more evident.

Peroxidase-labelled lectins, applied in an ELISA-technique, served for the characterization of mucin oligosaccharide mono- or disaccharide structures. An increased lectin binding was observed for Peanut agglutinin (PNA) to galactose, for Soya bean agglutinin (SBA) to

N-acetyl galactosamine, and for *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) to sialic acids following stimulation by LPS and lipid A, respectively. However, the binding of *Datura stramonium* agglutinin (DSA) to N-acetyl glucosamine was almost constant. In contrast, a decreased binding of *Ulex europaeus* I agglutinin (UEA I) reflected a decreased content of terminally linked α -fucose. Using Concanavalin A (Con A) for detection, LPS significantly increased the content of α -mannose in mucins, while lipid A application coursed a significant decrease. Basically, luminal mucin constituents attached the entity of lectins to a lesser degree (30 - 50 % below epithelial constituents), still, the ratio of lectin binding was almost constant. The results of the lectin-ELISA confirmed the results of the gas chromatographic carbohydrate analysis.

In parallel to the biochemical characterization of released mucins, 8 μ m paraffin embedded sections of the proximal and distal colon were stained with Alcian blue(pH2,5)-periodic acid-Schiff (AB2,5-PAS) and hematoxylin-eosin (HE), serving for characterization of mucin releasing goblet cells and their intracellular mucins. After application of LPS and lipid A, either, sections of the proximal colon displayed an augmentation of crypts per epithelial surface length with maximal values at day 3. In the distal colon, this parameter increased after application of lipid A, while decreasing after LPS. Both stimuli generated a crypt elongation at day 1, while at the end of the study (day 5) these values were below the controls. The number of crypt goblet cells per crypt column was slightly increased (for LPS day 1; for lipid A day 5), while superficial, intercrypt goblet cells had significantly increased during the complete study period. Increased goblet cell diameters were observed in all study groups. In AB2,5-PAS stained sections, intracellular mucins were differentiated into neutral, mixed and acidic mucin constituents. All sections displayed a significant shift to neutral intracellular mucins, maximal differences were observed at day 3.

The adherence of mannose-sensitive *Escherichia coli*, labelled with fluorescein isothiocyanate to solid phase immobilized mucins was studied in an adherence assay. Their maximal adherence was evidenced at days 3 (lipid A-group) and day 5 (LPS-group), while for epithelial

mucins of both study groups a slight increase of bacterial adherence was assessed only at day 1. In contrast to variations of the mannose content, bacterial adherence of luminal mucin constituents exceeded that of epithelial mucins by factor 20.

The stimulation of synthesis and secretion of colonic mucins by endotoxin not only causes an increase in quality but also generate alterations of the molecular structure of released mucins. In addition to the well-known function of an epithelial protection, mucins obviously have the potential to act as a bacterial clearance system. This conversion suggests an unspecific, inflammatory reaction, acting for the host's benefit.