

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die biologische Einzelwirkung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) auf die Muzin- (*MUC*-) Gen-Expression und molekularen Strukturen der sezernierten Muzine der humanen Kolon-Adenokarzinomzelllinie LS180 (ATCC) zu untersuchen.

In Vorversuchen wurde das Wachstumsverhalten unter verschiedenen Kulturbedingungen untersucht und die morphologische Charakterisierung der LS180-Zellen durch licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen vorgenommen. In den Hauptversuchen wurden je Zellkulturflasche (à 75 cm²) 2,5 x 10⁶ LS180-Zellen eingesetzt. Nach 2 Tagen Kulturdauer erfolgte eine Umstellung der Zellen auf fetales Kälberserum- (FCS-) freies Medium. Die Versuche wurden nach dreitägiger Kulturdauer durchgeführt. Die Wirkung der eingesetzten Zytokine (1 ng IL-1 β /ml, 10 ng IL-6/ml und 10 ng TNF α /ml Minimal essential medium eagle (MEM)) wurde nach 1 h, 3 h und 6 h Inkubationszeit mittels einer semiquantitativen Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) auf die Gen-Expression von *MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B* und *MUC6* untersucht. Parallel dazu wurde eine dosisabhängige (1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml MEM, 8 h Inkubationszeit) und zeitabhängige (4 h, 8 h, 12 h und 16 h; 1 ng IL-1 β /ml, 10 ng IL-6/ml und 10 ng TNF α /ml MEM) Wirkung der Zytokine auf die Muzinsekretion der Zellen gemessen. Die in den Untersuchungen zur *MUC*-Gen-Expression und zeitabhängigen Wirkung auf die Muzinsekretion eingesetzten Dosierungen orientierten sich an den Ergebnissen der ersten Versuche zur dosisabhängigen Wirkung der Zytokine auf die Muzinsekretion und für IL-1 β und TNF α zusätzlich an der Literatur. Die Auftrennung der Muzine erfolgte durch Sepharose Cl-4B Gelfiltration in hoch- und niedermolekulare Glykoproteine. Diese wurden mit Hilfe der Bradford-Färbung über den Protein- und mit der Periodsäure-Schiff- (PAS-) Methode über den Kohlenhydratanteil quantifiziert. Die qualitative Muzinanalyse erfolgte über die gaschromatographische Kohlenhydratanalyse. Die Mittelwerte wurden auf Signifikanzen der Unterschiede untersucht.

Aus den Vorversuchen ging hervor, daß die Wachstumsrate der LS180-Zellen mit zunehmender Zelldichte abnahm. In der Phase der Adhärenz konnte auf FCS-Zusatz im Nährmedium nicht verzichtet werden. Die LS180-Zelllinie bestand aus Zellen unterschiedlichen Differenzierungsgrades mit unterschiedlicher Ausprägung charakteristischer Merkmale muzinsezernierender Becherzellen.

Die Hauptversuche erbrachten folgende Ergebnisse:

1. Innerhalb der Kontrollgruppe war mit zunehmender Versuchszeit eine ansteigende *MUC*-mRNA-Expression zu verzeichnen.
2. Die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α führten zu einer unterschiedlichen Stimulation der *MUC*-Gen-Expression. IL-1 β bedingte nur eine kurzfristige Hochregulation der *MUC2*- und *MUC5AC*-mRNA, die für *MUC2* auch noch nach 3 h zu beobachten war. Nach IL-6-Applikation war auch noch nach 6 h ein Stimulationseffekt durch Hochregulation der *MUC2*- und *MUC5B*-mRNA-Expression zu verzeichnen. TNF α führte nach 1 h Inkubationszeit zu einer kurzfristigen Hochregulation von *MUC2* und *MUC5B*, die im Falle von *MUC2* auch noch nach 3 h deutlich war. Nach 6 h bedingte TNF α eine Niederregulation der *MUC2*-, *MUC5AC*- und *MUC5B*-mRNA-Expression. Die *MUC6*-mRNA-Expression wurde durch die eingesetzten Zytokine nicht stimuliert.
3. Die Zelldichte der Kultur korrelierte negativ mit der Muzinsekretion pro1 Mio. Zellen.
4. In den Kontrollgruppen nahm die Muzinsekretion mit zunehmender Versuchszeit zu. Zusätzlich war eine zunehmende Glykosylierung der sezernierten Muzine zu verzeichnen. Die Sekretion der niedermolekularen Muzine stieg erst nach 16 h Inkubationszeit an.
5. Die Wirkung der verschiedenen IL-1 β -Dosierungen unterschieden sich in Bezug auf die Muzinsekretion nur sehr gering, während die Wirkung der verschiedenen IL-6- und TNF α -Dosierungen sich deutlich unterschiedlich auf die Muzinsekretion auswirkten. TNF α bedingte nach 8 h und IL-1 β und IL-6 nach 12 h Inkubationszeit eine stimulierte Sekretion. Vor allem IL-6 verursachte eine deutliche Sekretionsstimulation der niedermolekularen Muzine. Die überwiegend verminderte Glykosylierung der sezernierten Muzine war den drei Zytokinen gemeinsam.

6. Hinsichtlich der Zusammensetzung ihres Kohlenhydratanteils wiesen die Muzine der Kontrollgruppen zeitabhängige Veränderungen auf. Sie sezernierten zunächst weniger stark O-glykosilierte Muzine, die einen höheren Anteil N-glykosidisch gebundener Oligosaccharid-Ketten trugen. Mit zunehmender Versuchszeit ließ das Verteilungsmuster der muzintypischen Zucker auf eine Vermehrung der O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharid-Ketten schließen.

Die Muzine der zytokinbehandelten Versuchsgruppen wiesen insgesamt einen deutlich höheren Anteil N-glykosidisch gebundener Oligosaccharid-Ketten bei gleichzeitig geringem Anteil an O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharid-Ketten auf.

Es ist anzunehmen, daß die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α durch die stimulierte Sekretion niedermolekularer, vermindert glykosilierter Glykoproteine eine Modifikation der funktionalen Eigenschaften der intestinalen Muzine bedingen. Diese Ergebnisse wurden im Modell einer transformierten Zelle gewonnen. Setzt man vergleichbare Reaktionen der nicht transformierten Zelle voraus, ist im Rahmen entzündlicher Prozesse des Darmes eine Sekretion modifizierter Muzine zu erwarten. Diese ist durch eine differentielle *MUC*-Gen-Expression und durch eine quantitative wie qualitative Veränderungen der sezernierten Muzine gekennzeichnet. Eine Reduktion ihrer epithelprotektiven Wirkung erscheint dadurch vorstellbar.

7 Summary

Mechthild Henrichs:

Effects of proinflammatory cytokines on *MUC*-gene expression and molecular structures of mucins secreted from a human colonic adenocarcinoma cell line.

The present study aimed to define particular effects of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF α) on mucin- (*MUC*-) gene expression and molecular structures of mucins secreted from the human colonic adenocarcinoma cell line LS180 (ATCC).

Initially, we studied the cell growth under different culture conditions and the cell morphology by light- and electron microscopy. Subsequently, $2,5 \times 10^6$ cells were seeded per culture flask (75 cm²). For experimental conditions medium containing fetal calf serum (FCS) was replaced after two days by FCS-free minimal essential medium eagle (MEM). The experiments started after three days of culture. The cytokine effect (1 ng IL-1 β /ml, 10 ng IL-6/ml, and 10 ng TNF α /ml MEM) on expression of *MUC2*-, *MUC5AC*-, *MUC5B*- and *MUC6*- was studied after 1 h, 3 h, and 6 h incubation using a semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. In parallel, dose effects (1 ng/ml, 5 ng/ml, and 10 ng/ml MEM, 8 h incubation time) and time effects (4 h, 8 h, 12 h, and 16 h; 1 ng IL-1 β /ml, 10 ng IL-6/ml, and 10 ng TNF α /ml MEM) on mucin secretion were studied. The applied doses of cytokines in the studies of *MUC*-gen expression and time effects on mucin secretion were determined from previous studies of dose effect on mucin secretion. Furthermore additional information were obtained for IL-1 β and TNF α from publications. For the separation of mucins in high and low molecular weight glycoproteins Sepharose Cl-4B gelfiltration was used. The quantification of mucins was performed by using Bradford-staining for protein detection and by using periodic-acid-Schiff method to stain the carbohydrate part of the mucins. The mucin carbohydrate composition was qualitatively analyzed by gaschromatography. Differences of mean values were determined for significance.

The initial studies have demonstrated that an increase of cell density resulted in a decrease of cell growth. FCS-containing medium was essential for cell adherence after seeding cells. The LS180 cells showed different grades of differentiation and typical morphological characteristics of mucin secreting goblet cells.

The following results were obtained:

1. The control groups exhibited an increase of *MUC*-gene expression with advancing experimental time.
2. The cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF α had different effects on stimulation of *MUC*-gen expression. IL-1 β caused a short time up-regulation of *MUC5AC*- and *MUC2*-mRNA-expression, which for the latter was still seen after 3 h of incubation time. After IL-6 application an up-regulation of *MUC2*- and *MUC5B*-mRNA-expression was found also after 6 h of incubation time. After 1 h of incubation time TNF α caused an up-regulation of the *MUC2*- and *MUC5B*-mRNA-expression. This effect still was found for *MUC2* after 3 h. After 6 h of incubation TNF α led to a down-regulatory effect on *MUC2*, *MUC5B* and *MUC5AC*-mRNA-expression. There was no cytokine effect on *MUC6*-mRNA-expression.
3. A negative correlation between cell density and mucin secretion per 1 Mio. cells was demonstrated.
4. With advancing experimental time the mucin secretion of the control groups showed an increase of mucin secretion. In addition, glycosylation of secreted mucins increased. The low molecular weight mucin secretion increased after 16 h.
5. Different IL-1 β doses hardly caused difference in mucin secretion, while different IL-6 and TNF α doses had different effects on mucin secretion. Mucin secretion increased after 8 h incubation with TNF α and after 12 h incubation with IL-1 β and IL-6. IL-6 had a strong stimulatory effect on the release of low molecular weight mucins. A decreasing amount of glycosylation was observed in all mucins secreted after cytokine application.
6. The control group showed an alteration of carbohydrate composition of secreted mucins in a time-dependent manner. They first secreted less O-glycosylated mucins with a higher

amount of N-glycosylated oligosaccharide chains. With advancing experimental time the carbohydrate composition suggested an increase of O-glycosylated oligosaccharide chains. The cytokine-treated groups showed a higher amount of N-glycosidic linked oligosaccharide chains and less O-glycosidic bound oligosaccharide chains at the same time.

Most probably, an IL-1 β , IL-6 and TNF α mediated mucin secretion of low molecular weight, less glycosylated glycoproteins modifies the functional properties of intestinal mucins. These results were obtained in a model of a transformed cell. Assuming comparable reaction of non-transformed cells, these results suggest that mucin secretion is modified during inflammatory processes of the gut. This is caused by a differential *MUC*-gen expression and quantitative and qualitative changes in secreted mucins. Therefore, a reduced protection of the gut epithelium is conceivable.