

## İNSAN KOLONİK MUKUS GLİKOPROTEİNLERİ ÜZERİNDE ELEKTRON MİKROSKOBİK ÇALIŞMALAR

Nurten AKSOY<sup>1</sup>

### ELECTRON MICROSCOPICAL STUDIES ON HUMAN COLONIC MUCUS GLYCOPROTEINS

**Summary:** Colonic mucosa, like the other epithelial surfaces, is covered by a visco-elastic gel called 'mucus'. The biomolecules that are responsible for the rheological properties of the mucus layer protecting underlying epithelial cells from biological and physical damaging agents are mucus glycoproteins named as 'mucins'. The most predominant mucin component of colonic mucus is known as MUC2. Therefore in this study, which was focused on colonic mucins, first of all MUC2 mucin was produced in a cell culture environment *in vitro* and then purified and both intact forms of MUC2 and their subunits were fractionated by rate-zonal centrifugation on a guanidium chloride gradient and subsequently studied with a Joel 1200 transmission electron microscope. When the intact MUC2 and its subunits, which were firstly spreaded in a monolayer of benzylidimethylalkylammonium chloride, were visualised by electron microscopy, they were observed as having a picture of molecules which are conformatioanally quite versatile and structurally linear and flexible particules. Contour lengths of the macromolecules were measured with a Planix 5000 digitilizing area-line meter. As a result, we defined that intact MUC2 mucins are polymiers that assembled from many subunits joined end-to-end and the lengths of the intact molecules range from 500 to 5000 and of the subunits from 150 to 900 nm.

**Key Words:** Electron microscopy, colonic mucins, MUC2.

**Özet:** Kolonik mukoza diğer epitelyal yüzeyler gibi 'mukus' adı verilen bir viskoelastik jel tabakası ile örtülüdür. Örtmüş olduğu epitelyal hücreleri biyolojik ve fiziksel hasar yapıcı etkenlere karşı koruyan bu mukus tabakasının reolojik özelliklerini kazandıran biyomoleküller müsün diye adlandırılan mukus glikoproteinleridir. Kolonik mukusta yer alan predominant mucin molekülü MUC2 olarak bilinmektedir. Bu nedenle kolonik müsünler üzerine yoğunlaştırdığımız bu çalışmamızda, öncelikle *in vitro* olarak hücre kültürü ortamında MUC2 üretilip sonra da saflaştırarak hem bütün, parçalanmamış (intakt) formlarını hem de bunların parçalanmasıyla elde edilen alt birimlerini (subünitelerini) guanidinyum klorür gradiyenti üzerinde rate-zonal sentrifugasyonu ile fraksiyonlara ayırarak Joel 1200 transmisyon elektron mikroskobu ile inceledik. İlk önce tek bir tabaka benzildimetilalkilamonyum klorür üzerine yayılan parçalanmamış bütün müsün makromolekülleri ve alt birimleri elektron mikroskobu ile görüntülendiğinde konformasyonel olarak oldukça versatil bir görüntüye sahip, yapıca çizgisel ve elastiki partiküller olduğu gözlemlendi. Makromoleküllerin uzunlukları Planix 5000 digitalize area-line-metre kullanılarak ölçüldü. Sonuç olarak, intakt MUC2 makromoleküllerinin pek çok alt ünitenin (monomer) uç uca bağlanarak biraraya gelmesiyle oluşmuş polimerler olduğunu ve ortalama uzunlukların intakt müsünler için 500-5000 nm, alt üniteler için ise 150-900 nm arasında olduğunu tespit ettik.

**Anahtar Kelimeler:** Elektron mikroskobisi, kolonik müsünler, MUC2.

### GİRİŞ

Canlı organizmada pek çok epitelyal yüzey mukus adı verilen visko-elastik protektif bir sekresyon ile

kaplanmıştır. Yüksek oranlarda su içeren (%95) bu mukus sekresyonunun en önemli komponenti müsün olarak bilinen mukus glikoproteinleridir (%5). Küçük

<sup>1</sup> Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa



oranlarda da dökülmüş epitel hücreleri, sekretuar immunoglobulin A (Ig A), lizozim, laktoferrin ve a-lantitripsin içeren mukusun spesifik reolojik özelliklerinin tamamen müsinlere bağlı olduğu bilinmektedir(1). Müsinler yüksek molekül ağırlığına sahip glikoproteinler olup kuru ağırlıklarının yaklaşık % 50-80'i karbohidratlardan oluşmuştur, ve bu karbohidratlar müsin molekülünün polipeptid zincirine N-asetilgalaktosamin (GalNAc) ile serin ve treonin amino asitlerinin hidroksil grupları arasında oluşan O-glikozidik bağlarla bağlanmışlardır. Müsin moleküllerinin karbohidrat bileşimi geniş miktarlarda galaktoz, fukoz, GalNAc ve N-asetilglukosamin (GlcNAc), küçük miktarlarda da siyalik asid ve mannoz içermektedir. Mannozun varlığı müsin moleküllerinde N-glikosilasyonun varlığını göstermektedir. Amino asit kompozisyonunun serin ve treonin bakımından oldukça zengin olması (total amino asid miktarının yaklaşık %25-40'ı) müsinlerin diğer bir karakteristik özelliğidir(2).

Müsinlerin jel oluşturma özelliklerinin onların polimerik yapılarından kaynaklandığı gösterilmiştir (3,4). Jel oluşturan müsinlerin oligomerisasyon mekanizmaları tam aydınlatılmamış olmasına rağmen cDNA klonlama çalışmalarıyla bazı müsin polipeptidlerinin (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) C-ve N-terminallerinde karakterize edilmiş olan ve von Willebrand faktör (vWf)'ün yapısında yer alan bazı sekanslara homoloji gösteren sekansların vWf'de olduğu gibi bu müsinlerinde oligomerizasyonunda rol oynadığı ileri sürülmüştür (5-7).

Müsinlerin bu oligomerik yapılarını inceleyebilmek için mukus jelinin öncelikle visko-elastik, yapışkan özelliğinin çözülebilmesi gerekmektedir. Fakat kullanılan yöntemin mukus glikoproteinlerinin yapılarını bozmadığından emin olunmalıdır. Yapılan çalışmalar mukus jeli içerisinde bazı proteolitik enzimlerin varlığını göstermiştir(8). Bu nedenle mukusun visko-elastik yapısı çözüldükçe müsin molekülünün özellikle çıplak polipeptid

kısımlarının proteolitik saldırıya maruz kalma olasılığı da göz önünde bulundurulmalıdır. Önceki bir çalışmamızda bütün bunları göz önünde bulundurarak, müsinlerin hem moleküler büyüklüğünü hem de primer yapılarını korumak için müsinlerin ekstraksiyonu ve pürifikasyonu süresince güçlü bir keotropik ajan olan guanidinyum klorür içerisinde proteinaz inhibitör kokteyli kullandık (1,4). Daha önce yayınladığımız başka bir çalışmamızda da hücre kültürü ortamında benign bir kolonik adenoma hücresinden üreterek çoğaltmaya çalıştığımız MUC2 glikoproteinlerini saflaştırmak için oldukça başarılı iki yöntem uygulamıştık (9). Bu çalışmamızda da daha önce saflaştırdığımız MUC2 müsinlerinin hem intakt multimerik hem de redükte edilmiş monomerik formlarını önce rate-zonal sentrifugasyon yöntemi ile fraksiyonlarına ayırıp sonra da elektron mikroskobu ile görüntüleyerek farklılıklarını ortaya koyduk.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda kullandığımız kimyasal malzemeler Sigma Chemical Co. (Poole, UK)'dan sağlandı. Guanidinyum klorür'ün stok solüsyonları kullanılmadan önce çarkol ile muamele edildi. Bir poliklonal antikor olan LUM2-3 (MUC2 antikor) Dr. Ingemar Carlstedt (University of Lund, Sweden) tarafından hediye edildi. Bu poliklonal antikor MUC2 molekülünün C-terminalinde 'tandem repeat' olmayan bir bölgede yer alan NGLQPVRVEDPDGC sekansından oluşan bir sentetik peptide karşı oluşturulmuştu (11).

### Saf müsin stok solüsyonunun hazırlanması

Hücre kültürü ortamında kolonik bir hücreden (PC/AA8) üretilip çoğaltılan kolonik müsinler 10mM EDTA, 10mM N-etilmaleimid, 100mM e-amino-n-kaproik asid ve 5mM benzamidin hidroklorid'den oluşan proteinaz inhibitörü kokteyli içeren 6M guanidinyum klorür/0.1M Tris ile ekstrakte edilerek ya üç kez isopiknik dansite-gradient sentrifugasyon ya da jel filtrasyon kromatografisini takiben bir kez isopiknik dansite-gradient sentrifugasyon yöntem-

leriyle saf hale getirildi ve bu çalışmamızdaki deneylerimiz için stok solüsyon olarak kullanıldı (9).

#### **İndirgenmiş MUC2 alt birimlerinin hazırlanması**

Redükte müsin alt birimlerini elde etmek için parçalanmamış MUC2 müsinleri (6M guanidinyum klorür/ 0.1M Tris, pH 8.0 tamponu içerisinde) 10mM dithiothreitol ile 37°C de 5 saat muamele edildi. Daha sonra 25mM iyodoasetamid ilave edilerek oda ısısında karanlık ortamda bir gece bekletildi. Bu elde edilen MUC2 alt birimleri redükte edilmiş MUC2 alt birimlerinin stok solüsyonu olarak kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

#### **Rate-zonal sentrifügasyon**

Rate-zonal sentrifügasyonu için parçalanmamış intakt ve redükte edilmiş MUC2 müsinlerini içeren stok solüsyonların herbirinden yaklaşık 500 µl 4M guanidinyum klorüre karşı diyaliz edildi. Daha sonra lineer bir gradient oluşturucu ile 6-8M guanidinyum klorür gradienti oluşturuldu (iki ayrı tüpte) ve diyaliz edilmiş müsin örnekleri bu gradientlerin üzerine ayrı ayrı pipetlerle çok yavaş olarak birer tabaka oluşturacak şekilde konuldu. Daha sonra bu tüpler (13 ml'lik tüp, 500 µl örnek içeriyor) bir Beckman SW40 swing out rotoru ile 40,000 rpm'de 20°C'de 2.5 saat sentrifüj edildi. Sentrifügasyondan sonra tüpler üst kısımlarından pipetlenerek (500 µl herbir fraksiyon) yaklaşık 24 fraksiyona ayrıldı. Elde edilen fraksiyonlar anti-MUC2 antikoru LUM2-3'yi kullanılarak analiz edildi. Fraksiyonların guanidinyum klorür konsantrasyonları Abbe refraktometre kullanılarak ölçülen refraktif indeks ile saptandı.

#### **Elektron mikroskobu**

Rate-zonal sentrifügasyonu ile elde edilen fraksiyonlardan LUM2-3 antikoru ile en yüksek derecede reaksiyon gösterenler elektron mikroskobu (EM) ile incelemeye alındı. Önce incecik karbon filmleri (2-5 nm), karbonun taze olarak hazırlanmış

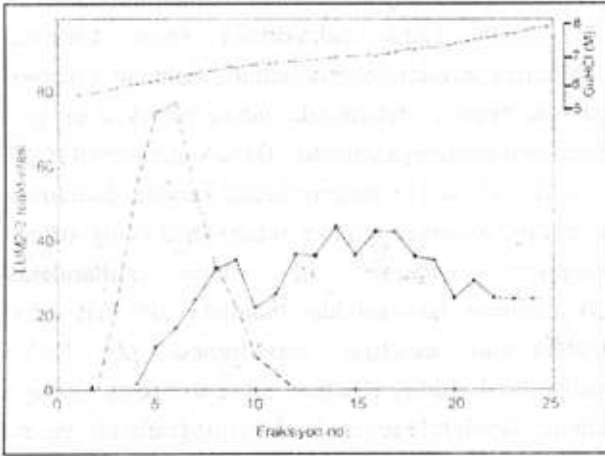
mika kesitleri üzerine evapore edilmesiyle hazırlandı. Sonra bu filmler distile su üzerine tabakalandırılarak 200 nm'lik bakır gridler üzerine alındı. Müsin örnekleri 200µg müsin/ml olacak şekilde 50mM magnezyum asetat ile dilüe edildi ve temiz bir zemin üzerine (bir neskofilm veya fayans olabilir) damlatılarak üzerine yaklaşık 1µl benzyldimethylalkylammonium (B.A.C; distile su ile 1µg/ml'lik solüsyonu) tabaka halinde konuldu. 10-15 dakika kadar bekledikten sonra karbonla kaplanmış gridlerle damla halinde bulunan solüsyon üzerine hafifçe dokunarak müsin molekülleri grid üzerine toplanmaya çalışıldı. Daha sonra etanol (%95 v/v) ile 1-2 saniye yıkanıp kendi kendine kurumaya bırakıldı. Kuruyan gridler rotary-shadowing (dönel gölgeleme) tekniği ile platin kullanılarak gölgelemeye tabi tutuldu. Sonrada bir Joel 1200 transmision elektron mikroskobu 60 Kv'de kullanılarak gridler elektron mikroskobik incelemeye alındı. Görüntülenen müsinler fotoğraflandı ve bu büyütülmüş (yaklaşık 28 000 büyütmeyle) fotoğraflar üzerinde bir Planix 5000 digitalize area-line metre kullanılarak müsinlerin uzunlukları saptanıp uzunluklarına göre dağılımları belirlendi.

#### **BULGULAR**

Daha önce saflaştırılmış olan MUC2 mukus glikoproteinleri ve bunların alt birimlerinin molekül ağırlıklarına göre dağılımları rate-zonal sentrifügasyon yöntemi ile saptandı. İntakt MUC2 moleküllerinin heterojen, polidispers dağılımlarına rağmen alt ünitelerinin oldukça uniform ve daha düşük gradiyentlerde yoğunlaşan bir profil göstermeleri müsin makromoleküllerinin polimerik yapıya sahip olduklarını göstermektedir (Şekil 1).

Rate-zonal sentrifügasyon sonucu elde edilen fraksiyonlardan moleküler ağırlık dağılım profillerine bakılarak tahminen en fazla ve değişik büyüklüklerde müsin moleküllü içerenler (intakt müsin profilinden 9-14-17-21 no'lu fraksiyonlar, indirgenmiş MUC2 alt birimleri profilinden 5-6 no'lu fraksiyonlar) seçilerek

elektron mikroskobu ile incelemeye alındı. Gerek intakt (Resim 1) gerekse indirgenmiş MUC2 alt birimlerin (Resim 2) elektron mikrografları müsin moleküllerinin çizgisel, değişik uzunluklarda, filamentöz ve elastiki görüntülerini ortaya koymaktadırlar. Bu lineer moleküllerin zaman zaman katlanmalar, kıvrılmalar hatta bazan saç tokasını andırır tarzda büklümler yaptığı görülmektedir.

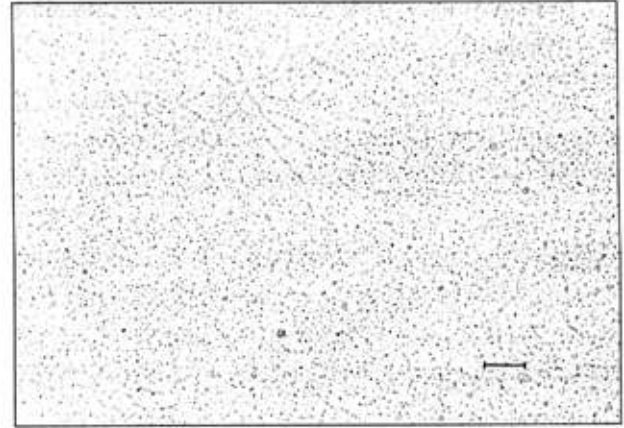


Şekil 1: MUC2 müsinlerinin rate-zonal guanidinyum klorür gradiyenti sentrifüjasyonu

Parçalanmamış intakt MUC2 molekülleri ve indirgenmiş alt birimleri 500 µl 4M guanidinyum klorür'e (GuHCl) karşı diyaliz edildi ve her iki müsin örneği önceden oluşturulmuş guanidinyum gradiyenti (6-8M) üzerinde ayrı ayrı tüplerde tabaka halinde konuldu ve daha sonra bir Beckman SW 40 swing-out rotor'da 40,000 rpm'de 2.5 h boyunca 20°C'de sentrifüj edildi. Sentrifüjasyondan sonra tüpler üst kısımdan pipetle alınarak 0.5 ml'lik fraksiyonlara ayrıldı ve sonra bütün (—■—) ve indirgenmiş alt birim (—□—) içeren fraksiyonlar bir poliklonal MUC2 antikoruna olan LUM2-3 ile analiz edildi. Refraktif indeks ölçülerek fraksiyonların içerdiği GuHCl molaritesi tayin edildi (---).

Bütün ve indirgenmiş redükte olmuş MUC2 alt ünitelerine ait elektron mikrograflar üzerinde yapılan uzunluk ölçümleri redükte olmamış intakt (Şekil 2) ve redükte olmuş müsin moleküllerinin (Şekil 3) uzunluklarına göre dağılımlarını göstermektedir. Elde edilen sonuç bize intakt moleküllerin polimerik yapılarını gösterdiği gibi aynı zamanda uzunluk açısından da ne kadar geniş bir dağılıma sahip olduklarını da göstermektedir. İntakt müsinlerin uzunlukları 500-5000 nm arasında yer alan yaygın dağılımları yanında redükte MUC2 alt birimlerinin

uzunlukları 150-900 nm aralığında dağılım göstermekteydi.



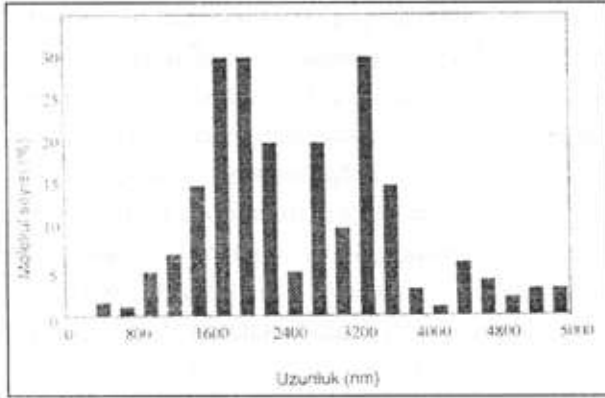
Resim 1: Bütün (intakt) MUC2 müsinlerinin elektron mikroskobisi

İntakt müsinler 200µg müsin/ml olacak şekilde 50mM magnezyum asetat ile dilüe edildi ve temiz bir zemin üzerine damlatılarak üzerine yaklaşık 1µl benzildimetilalkilamonyum (B.A.C.) tabaka halinde konuldu. 10-15 dakika kadar bekledikten sonra karbonla kaplanmış gridlerle damla halinde bulunan solüsyon üzerine hafifçe dokunarak müsin molekülleri grid üzerine toplandı. Daha sonra etanol (%95 v/v) ile 1-2 saniye yıkayıp kendi kendine kurumaya bırakıldı. Kuruyan gridler rotary-shadowing (dönel gölgeleme) tekniği ile platin kullanılarak gölgelemeye tabi tutuldu. Sonrada bir Joel 1200 transmisyon elektron mikroskobu 60 Kv'de kullanılarak gridler elektron mikroskobik incelemeye alındı. Elektron mikrograflarla görüntülenen müsinlerin konformasyonel olarak ne kadar değişken oldukları, lineer, filamentöz ve yer yer çeşitli şekillerde büklümler meydana getiren bir yapıya sahip oldukları gözükmektedir. Sağ alt köşede gösterilen ölçek çubuğu yaklaşık 100 nm'yi göstermektedir.

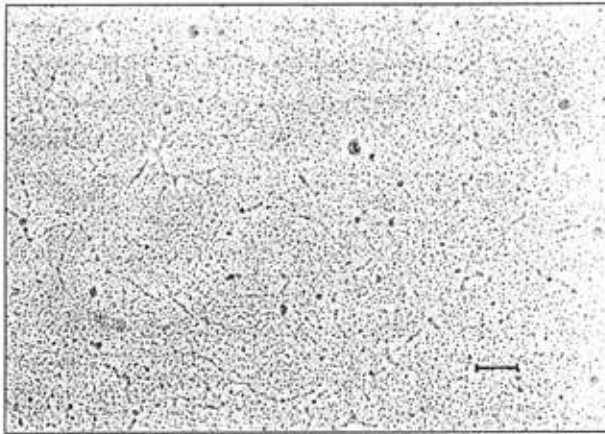
## TARTIŞMA

Organizmada hemen hemen bütün epitelyal yüzeyleri kaplayarak onların fiziksel zedelenmelere ve biyolojik ajanlara karşı korunması, kayganlığının her zaman korunması ve zaman zaman da transport fonksiyonlarının idamesi gibi çok önemli görevleri yüklenmiş olan mukus jel tabakasının reolojik özelliklerinden sorumlu olan ana moleküllerin müsinler dediğimiz mukus glikoproteinleri olduğu çok iyi bilinmektedir (2). Vücudun farklı bölgelerinde bulunan mukus tabakasının içerdiği müsin molekülleride farklıdır. Genel olarak amino asid ve karbohidrat kompozisyonları benzer olmasına rağmen fonksiyonları buldukları sisteme göre





Şekil 2: İntakt (bütün) MUC2 müsinlerinin uzunluklarının histogramla gösterilmesi  
Büyütülmüş (yaklaşık 60 000 büyütmeyle) elektron mikrograflar üzerinde bir Planix 5000 dijitalize area-line-metre kullanılarak müsinlerin uzunlukları tespit edilip uzunluklarına göre dağılımları belirlendi.

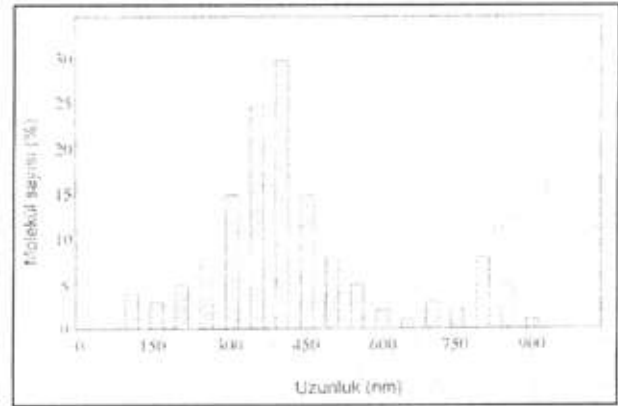


Resim 2: İndirgenmiş MUC2 alt birimlerinin elektron mikroskopisi

MUC2 müsin alt birimleri 200µg müsin/ml olacak şekilde 50mM magnezyum asetat ile dilüe edildi ve temiz bir zemin üzerine damlatılarak üzerine yaklaşık 1µl benzildimetilalkilamonyum (B.A.C.) tabaka halinde konuldu. 10-15 dakika kadar bekledikten sonra karbonla kaplanmış gridlerle damla halinde bulunan solüsyon üzerine hafifçe dokunarak müsin molekülleri grid üzerine toplandı. Daha sonra etanol (%95 v/v) ile 1-2 saniye yıkamp kendi kendine kurumaya bırakıldı. Kuruyan gridler rotary-shadowing (dönel gölgeleme) tekniği ile platin kullanılarak gölgelemeye tabi tutuldu. Sonrada bir Joel 1200 transmisyon elektron mikroskobu 60 Kv'de kullanılarak gridler elektron mikroskopik incelemeye alındı. Elektron mikrograflarla görüntülenen alt birimlerin lineer ve filamentöz yapıları gözükmetedir. Sağ alt köşede gösterilen ölçek çubuğu yaklaşık 100 nm'dir.

önemli farklılıklar göstermektedir. Örneğin; solunum sisteminde yer alan müsinler silial epitelin solunum

yollarını temizleme fonksiyonlarında esas rol oynamasına (11) rağmen servikal müsinler esas olarak fertilizasyonda (12) büyük rol alırlar. Ayrıca müsinler buldukları sistemlerin organ patolojilerinde de özellikle teşhis aşamasında büyük önem taşımaktadırlar. Şöyle ki; solunum sisteminde dominant olarak bulunan MUC5B kistik fibrozis de hayati pek çok değişiklik gösterirken (13) kolonda dominant olarak bulunan MUC2 da ülseratif kolit (14,15), müsinöz ve adenomatöz kolon kansinomalarında biyokimyasal ve biyofiziksel pek çok değişiklik göstermektedir (16,17).



Şekil 3: İndirgenmiş MUC2 alt birimlerinin uzunluklarının histogramla gösterilmesi

Büyütülmüş (yaklaşık 60 000 büyütmeyle) elektron mikrograflar üzerinde bir Planix 5000 dijitalize area-line-metre kullanılarak müsinlerin uzunlukları tespit edilip uzunluklarına göre dağılımları belirlendi.

Epitelyal müsinler temel olarak membrana bağlı olan veya sekrete edilen müsinler olarak iki kısma ayrılırlar (2). Membrana bağlı olan müsinler (örneğin; MUC1) biyokimyasal yapı itibarıyla sekrete edilenlere (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 gibi) benzerlik göstermesine rağmen mukus tabakasına visko-elastik jel özelliği kazandıran asıl eleman sekrete edilen müsinlerdir. Sekretuar müsinlerin bu özelliği de esas olarak onların disülfid bağlarıyla bağlı pekçok monomerden (alt birim) meydana gelmesine bağlıdır. Sekretuar müsinlerin C-terminal bölgelerinin sistein amino asitinden oldukça zengin olması onlara bu polimer oluşturma yeteneğini kazandırmakta ve buldukları mukus tabakasının da



viskozitesinden sorumlu yapmaktadır. Mukus tabakasının viskozitesinin sekrete edilen bu müsinlerin polimerik yapısına bağlı olduğunu anlamak için onları, yöntemler bölümünde tanımladığımız gibi redükte etmemiz yeterli olacaktır.

Farklı sitemlerden elde edilen sekretuar müsinlerin polimerik yapılarını gösteren pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazılarında rate-zonal sentrifügasyon (18) bazılarında da elektron mikroskopi yöntemi (19,20) kullanılmıştır. Respiratuar ve servikal müsinler üzerinde yapılan bu çalışmalarda iki farklı sistem de sekrete edilmiş müsinlerin yapıları elektron mikroskobu ile incelenmiş ve diğer jel oluşturan müsinler gibi polimerik bir yapıya sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır. Biz de bu çalışmamızda, ilk olarak, insan kolonunda bulunan sekrete edilmiş müsinler arasında en önemli yeri tutan MUC2 müsinin elektron mikroskobik görüntülenmesini gerçekleştirdik. Fakat bu çalışmamızda sadece elektron mikroskobunu değil rate-zonal sentrifügasyonu da beraber kombine olarak kullanarak kolonik müsinleri inceledik. Elektron mikroskobisinden önce rate-zonal sentrifügasyonu ile müsinleri fraksiyonlara ayırmamızın nedeni ise bizim bu çalışmamızda gayemizin sadece müsinleri görüntülemek değil farklı formlardaki müsin makromoleküllerini birkaç özelliğine göre birbirinden ayırıp biraz daha ayrıntılı ve spesifik bir çalışma ortaya çıkarmaktı. Kolonda en fazla bulunmasından ve bizim kullandığımız hücrenin de nerdeyse sadece (yaklaşık %95 çoğunlukla) MUC2 sentezlemesinden (4) dolayı kolonik müsinleri temsilen MUC2'yu incelemeyi hedef aldık. Bu amacımızı gerçekleştirmek için önce onları saflaştırmamız gerekiyordu. Bugüne kadar müsinlerin izolasyonu için en fazla kullanılmış olan ve müsinlerin polimerik yapılarını göz önüne aldığımızda en uygun metod olarak gözükken izopiknik dansite-gradient sentrifügasyon ve jel

filtrasyon kromatografisi yöntemlerini (1,4,9) kullandık. MUC2 müsinlerinin saflaştırılması için oldukça etkili olan bu metodların (9) polimerik yapılarının tanımlanması için yetersiz kaldıklarını gördük. Şöyleki; parçalanmamış intakt MUC2 müsinlerini karakterize ettiğimiz 1.36-1.50 g/ml dansite aralığında yüksek miktardaki karbohidrat içeriklerinden dolayı redükte ettiğimiz, indirgediğimiz MUC2 alt ünitelerini de karakterize ettik. Yine aynı şekilde jel filtrasyon kromatografisi yaptığımızda da hem intakt MUC2 moleküllerini hem de redükte subünitelerini kullandığımız sefaroz CL-2B kolonumuzun void volüm (Vo) kısmında karakterize ettik (9). Respiratuar, servikal ve gastrik müsinlerin polimerik yapıda olduklarını gösteren daha önceki yayınlarda bu sonuca çoğunlukla elektron mikroskobik görüntüleme ile varılmıştır. Oysa biz bu çalışmamızda sadece görüntüleme ile değil müsinlerin bu multimerik yapılarını polimerizasyonun kazandırdığı diğer bazı biyofiziksel özelliklerden faydalanarak da tanımlamaya çalıştık. Bu nedenle biyomoleküllerin molekül kütlesi ve sedimentasyon hızlarına göre ayrılmalarını sağlayan rate-zonal sentrifügasyon yöntemini uyguladık. Oluşturduğumuz 6-8M guanidinyum gradienti üzerinde intakt moleküllerin yaygın bir şekilde çeşitli noktalarda özellikle yüksek gradient düzeylerinde çökelmelerine karşın indirgenmiş MUC2 alt üniteleri daha düşük gradientlerde ve daha üniformal bir şekilde çökdiklerini gördük. Bu şekilde MUC2 müsinlerinin polimerik ve monomerik formlarını ayırdıktan sonra her iki popülasyondan da fraksiyonlar olarak elektron mikroskobu ile incelemeye çalıştık.

Elektron mikroskobik inceleme daha önce bronşiyal, gastrik ve servikal müsinler üzerinde yapılmıştır (19,20). Farklı müsinler üzerinde yapılan bu çalışmaların sonuçları ile bizim kolonik müsinler üzerindeki bu çalışmamızın sonuçları birbiri ile oldukça uyumakta ve müsinlerin lineer ve oldukça

elastiki yapılarını ortaya koymaktadır. Müsinlerin uzamış çubuğumsu yapılarının zaman zaman katlandığı, düğümler oluşturduğu, hatta bazan saç tokasına benzer kıvrımlar oluşturduğu görülmektedir. Parçalanmamış (intakt) MUC2 molekülleri ile indirgenmiş alt birimlerini mukayese ettiğimizde ise alt birimlerin intakt moleküllerden çok daha kısa olduklarını ve ortalama molekül uzunluklarının dağılımı parçalanmamış bütün müsinler için 500-5000 nm, alt birimler için ise 150-900 nm arasında olduğunu saptadık. İntakt MUC2 müsin molekülleri ile alt birimleri arasındaki uzunluk bakımından bu kadar fark bulunması ve uzunluk dağılımlarının oldukça geniş bir aralıkta bulunması müsin monomerlerinin multimerizasyonunda herhangi bir limitin bulunmadığını bazen 3 bazen 5 bazen ise 10 hatta 100 monomerin uç uca disülfid bağlarıyla birleşerek uzun polimerler oluşturduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak kolonik müsinlerin de servikal, respiratuar ve gastrik müsinler gibi polimerik yapıdan oluştuğu ve bu polimerik yapının gösterilmesinde rate-zonal sentrifügasyon ile elektron mikroskopi metodlarının beraber kullanılmasının oldukça yeterli olduğunu ortaya koyduk.

#### Teşekkür

*Manchester Üniversitesi'ne ve özellikle de Dr. John K. Sheehan'a çalışmamıza gösterdikleri ilgi ve destekten dolayı teşekkür ederiz.*

#### **KAYNAKLAR**

1. Sheehan, J.K. and Carlstedt, I. (1984) Hydrodynamic properties of human cervical-mucus glycoproteins in 6M-guanidium chloride. *Biochem. J.* 217: 93-101.
2. Strous, G.J. and Dekker, J. Mucin-type glycoproteins. (1992) *Cr. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27(1/2): 57-92.
3. Sheehan, J.K., Thornton, D.J., Howard, M., Carlstedt, I., Corfield, A.P. and Paraskeva, C. (1996) Biosynthesis of the MUC2 mucin: evidence for a slow assembly of fully glycosylated units. *Biochem. J.* 315: 1055-60.
4. Aksoy, N., Thornton, D., Corfield A.P., Paraskeva, C. and Sheehan, J.K. (1999) 'A study of the intracellular and secreted forms of the MUC2 mucins from the PC/AA intestinal cell line'. *Glycobiology.* 9 (7):739-46
5. Gum, J.R., Hicks, J.W., Toribara, N.W., Siddiki, B. and Kim, Y.S. (1994) Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. *J. Biol. Chem.* 269(4): 2440-6.
6. Desseyn, J.L., Buisine, M.P., Porchet, N., Aubert, J.P., Degand, P. and Laine, A. (1998) Evolutionary history of the 11p15 human mucin gene family. *J. Mol. Evol.* 46: 102-6.
7. Van de Bovenkamp, J.H.B., Hau, C.M., Strous, G.J.A.M., Büller, H.A., Dekker, J. and Einerhand, A.W.C. (1998) Molecular cloning of human gastric mucin MUC5AC reveals conserved cysteine-rich D-domains and a putative leucine zipper motif. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 245: 853-9.
8. Khatri, I.A., Forstner, G.G. and Forstner, J.F. (1998) Susceptibility of the cysteine-rich N-terminal ends of rat intestinal mucin MUC2 to proteolytic cleavage. *Biochem. J.* 331: 323-30.
9. Aksoy, N. and Sheehan, J.K. (2000) Two effective approaches for the purification of mucins from a cell culture environment. *J. Biochem. Mol. Biol. & Biophys.* 4: 285-92.
10. Carlstedt, I., Herrmann, A., Hovenberg, H., Lindell, G., Nordman, H., Wickström, C. and Davies, J.R. (1995) 'Soluble' and 'insoluble' mucins-Identification of distinct populations. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 845-51.
11. McCullagh, C.M., Jemieson, A.M., Blackwell, J. and Gupta, R. (1995) Viscoelastic properties of human tracheobronchial mucin in aqueous solution. *Biopolymers.* 35: 149-59.
12. Aplin, J.D. and Hey, N.A. (1995) MUC1, endometrium and embryo implantation. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 826-31.
13. Thornton, D.J., Sheehan, J.K., Lindgren, H. and Carlstedt, I. (1991) Mucus glycoproteins from cystic fibrotic sputum. *Biochem. J.* 276: 667-75.
14. Corfield, A.P., Myerscough, N., Gough, M., Brockhausen, R. Schauer, R. and Paraskeva, C. (1995) Glycosylation patterns of mucins in colonic disease. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 840-5.



15. Corfield, A.P. and Warren, B.F. (1996) Mucus glycoproteins and their role in colorectal disease. *J. Pathol.* 180: 8-17.
16. Aksoy, N., Corfield A.P. and Sheehan, J.K. (2000) A preliminary study pointing out a significant alteration in the biochemical composition of MUC2 in colorectal mucinous carcinoma. *Clinical Biochemistry* 33(3): 167-73
17. Aksoy, N., Corfield A.P., Paraskeva, C., Thornton, D and Sheehan, J.K. (2000) Alterations of MUC2 mucin in colorectal adenocarcinoma. *Turkish Journal of Medical Sciences* 30: 359-365.
18. Thornton, D.J., Carlstedt, I., Howard, M., Devine, P.L., Price, M.L. and Sheehan, J.K. (1996) Respiratory mucins: Identification of core proteins and glycoforms. *Biochem. J.* 316: 967-75.
19. Sheehan, J.K., Oates, K. and Carlstedt, I. (1986) Electron microscopy of cervical gastric and bronchial mucus glycoproteins. *Biochem. J.* 239:147-53.
20. Sheehan J.K. and Carlstedt I. (1990) Electron microscopy of cervical-mucus glycoproteins and fragments therefrom. *Biochem. J.* 265: 169-178