

## K r Fare (Spalax ehrenbergi, Nehring, 1898) Kolonunda MUC1, MUC2 ve MUC5AC'nin Dağılımlı

M. Aydın K ETANİ<sup>1</sup>, Zelal KARAKOÇ<sup>2</sup>, Őennur KETANİ<sup>3</sup>,

<sup>1</sup> Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı- Diyarbakır

<sup>2</sup> Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı- Siirt

<sup>3</sup> Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı- Diyarbakır

### ÖZET

Birçok türde gastrointestinal kanal boyunca salgılanan m sinlerin profillerinin birbirinden farklı olduğu gösterilmiŐtir. Sunulan çalışmada k r farelerin kolonunun epitel ve kadeh hücrelerinde MUC1, MUC2 ve MUC5AC proteinlerinin ekspresyonlarını immunohistokimyasal olarak ortaya koymayı amaçladık. Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 200-220 gr. arasında değişen 2 adet dişi ve 2 adet erkek yetişkin k r fare kullanıldı. K r fare kolonundan alınan doku örnekleri, formol-alkol solusyonunda 18 saat süre ile tespit yapıldı. K r fare kolonunda luminal ve kript epitel hücrelerinden MUC1, MUC2 ve MUC5AC'nin ekspresse olduğu ve kadeh hücrelerinde MUC2'nin daha baskın olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, k r fare kolonunda luminal ve kript epitel hücreleri ile kadeh hücrelerinden MUC1, MUC2 ve MUC5AC'nin lokalize olduğu bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** K r Fare, MUC1, MUC2, MUC5AC

### Distribution of MUC1, MUC2 and MUC5AC in the Blind Mice Colon (Spalax ehrenbergi, Nehring, 1898)

#### Summary

Many species have been shown to be different from the profiles of release mucins through the gastrointestinal tract. With this study, our aim to demonstrated the immunohistochemical expression of MUC1, MUC2 and MUC5AC protein of epithelium and goblet cells in the colon of the blind mice. In this study, the average weight of 200-220 g of 2 female and 2 male adult blind mice were used. The blind mice's colon tissue samples taken and was fixed during 18 hours inside the formal-alcohol solution. The luminal and epithelial cells were expressed of MUC1, MUC2 and MUC5AC and goblet cells were found to be more dominant MUC2 in the colonic crypts blind mice. As a result, the blind mice colon epithelial cells, goblet cells and crypt luminal was found to be localized of MUC1, MUC2 and MUC5AC.

**Key Words:** Blind Mice, MUC1, MUC2, MUC5AC

### GİRİŐ

Sindirim sistemi, besinlerle mideye alınan ve yaşam için gerekli olan temel bileŐiklerin katabolize edildiği, zararlı veya atık bileŐiklerin ise etkisiz hale getirildiği özelleŐmiŐ bir sistemdir. Mideye alınan maddeler ve sindirim sisteminin kendi salgılarının yanında,

ince ve kalın bağırsaklarda giderek artan muazzam sayıda bakteri yükü bulunmaktadır (1,2,3). Sindirim süresince oluŐan mekanik ve kimyasal stresin yanı sıra bu mikroorganizmalarla baŐa çıkmak için de sindirim sisteminin luminal epiteli mukus adı verilen bir tabaka tarafından korunur (2,4).

Mukus, majör protein komponenti musin olarak bilinen disülfid bağlı glikoproteinlerden oluşur (5). Musinler yaklaşık olarak 15%-20% protein ve geri kalan kısmını ise O-linked glycanların oluşturduğu karbonhidratlardan meydana gelir (6). Histokimyasal olarak, musinler nötral ve asit musinler olmak üzere ikiye ayrılırlar (7, 8). Moleküler olarak ise, bütün musinler çok sayıda oligosakkarit zinciri taşıyan merkezi bir bölüm içerir. Serin ve threoninden zengin olan bu bölüm tandem tekrarlarından oluşur. Serin ve threonin bölümleri, oligosakkarit zincirleri için bağlanma bölgeleri gibi hizmet eder. Tekrarların sayısı ve herbir tekrardaki aminoasit sekansları musin genlerine bağlıdır (6). Şimdiye kadar, MUC1, 2, 3A,3B, 4, 5AC, 5B, 6-9, 11-13 ve 15-20 adlandırılan 21 musin geni cDNA cloning yoluyla ayırt edilmiştir (9, 10).

Mide ve kolon mukozasındaki mukus tabakası, yapısal ve fonksiyonel olarak 2 katmandan oluşur. İç katman, kompakt ve yoğun bir yapıda olup, bakteriyel penetrasyonu önlemeye yardımcı bir yapıya sahiptir. Bu nedenle kolonun iç tabakası bakterilerden yoksundur. Dış katman daha gevşek yapıda olup, büyük çoğunluğu yararlı bakterilerin oluşturduğu, gerçek bir immun yanıt oluşturmaksızın mikrobiyal kolonizasyon için iyi bir yaşam alanı sağlar (4,11, 12). Bağırsaklarda birçok MUC proteininin ekspresse olduğu bildirilmiştir (13). Özellikle, MUC2 müsinin yapısındaki oligosakkaritler, çok sayıda bakterinin bağlanma bölgeleri ve enerji kaynağını oluşturur. Kolonda MUC2 hem iç hem de dış tabakanın temel müsinidir ve kadeh hücreleri tarafından sentezlenirler (12). Sunulan çalışmada biz kör farelerin kolonunun luminal ve kript epitel hücrelerindeki MUC1, MUC2 ve MUC5AC proteinlerinin ekspresyonlarını ve fizyolojik fonksiyonlarını değerlendirdik.

#### **MATERYAL VE METOD**

Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 200-220 gr. arasında değişen 2 adet dişi ve 2 adet erkek yetişkin kör fare (Spalax ehrenbergi, Nehring, 1898) kullanıldı. Örnekler Dicle Üniversitesi Yerel Etik Kurulu kurallarındaki prosedürlere göre işlendi. Hayvanlara aşırı dozda İntraperitoneal sodyum pentotal verilerek sakrifikasyonu yapıldı.

Kör fare kolonundan alınan doku örnekleri, formol-alkol solusyonunda 18 saat

süre ile tespit edildi. Daha sonra dokular dereceli alkoller, metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Hazırlanan parafin bloklardan, Leica RM 2125 Rotary mikrotomunda 5 mikrometre kalınlığında seri kesitler 3-aminopropyl-triethoxysilane (APES) ile kaplanmış lama alındı.

MUC2, MUC5AC ve MUC6 müsin genlerinin ekspresyonları ve kolondaki lokalizasyonlarını belirlemek için strepavidin peroksidaz immunohistokimya yöntemi uygulandı.

Parafin kesitler, deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra distile suda çalkalandı. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için kesitler distile suda hazırlanmış %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 20 dakika muamele edildikten sonra 0.01 M Fosfat Buffer Saline (PBS)'de üçer kez 5'er dakika yıkandı. Kesitler blokama solüsyonda 5 dakika bekletildikten sonra Tablo 1 de verilen, 1/200 oranında sulandırılmış primer antikorlarla oda sıcaklığında 2 saat süresince inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 0.01 M PBS'te 3 kez yıkanan kesitler, biotinlenmiş sekonder antikor (Histostain Plus Bulk Kit, Zymed) ile 20 dakika nem odasında, oda ısısında inkübe edilip tekrar 3 kez PBS ile yıkandı. Yıkamadan sonra kesitler enzim konjugatlı strepavidinde (Histostain Plus Bulk Kit, Zymed) 20 dakika muamele edildi. Kesitler, tekrar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra DAB kromojen solüsyonlarında 5 dakika bekletildi. Mayer'in hematoksileninde 1 dakika süreyle zıt boyama yapılan kesitler çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı. DAP kromojen solüsyonu kullanılan kesitler alkolden geçirilerek ksilolde parlatıldıktan sonra entellan ile kapatıldı. Negatif kontrol için doku örnekleri primer antikor yerine PBS ile muamele edildi. Boyamalar sonrası preparatlar Nikon-Eclipse 400 DSRİ Nikon dijital fotoğraf makinesi (NIS Elements Imaging Software (version 3.10) ataçmanlı araştırma mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (14).

Strepavidin peroksidaz immunohistokimya yöntemi uygulandı. Mouse monoclonal antikorlar (santa kruz) kullanıldı (Tablo 1).

**Tablo 1:** Kullanılan antikorlara ait bilgiler

Antikoron Adı	Antikoron Türü	Katalog Numarası
1- Mucin 1 (SM3)	Mouse monoclonal	Santa Cruz, sc-53381
2- Mucin 2 (Ccp58)	Mouse monoclonal	Santa Cruz, sc-7314
3- Mucin 5AC (CLH2)	Mouse monoclonal	Santa Cruz, sc-33667

İmmunohistokimyasal boyanma, yoğunluk (intensity score) yöntemi kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirildi. Yoğunluk skorunda, hücrelerdeki pozitif boyanma yoğunlukları değerlendirildi.

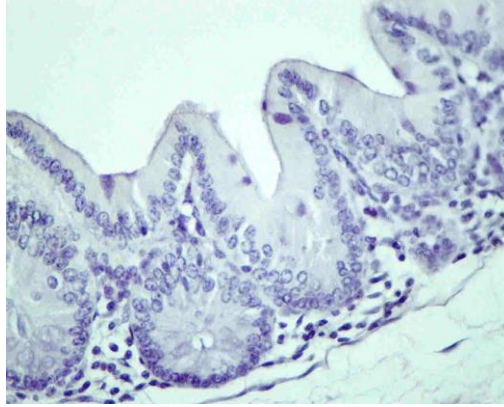
İmmunohistokimyasal boyanma sonuçlarındaki skoraama işlemi aşağıdaki gibi yapıldı.

**Yoğunluk skoru**

- (-) : Negatif (yüksek büyütmede hiçbir hücrede boyanma yok)
- (+) : Zayıf (sadece yüksek büyütmede görülen boyanmış hücreler)
- (+ +) : Orta (düşük büyütmelerde kolaylıkla görülen boyanmış hücreler)
- (+ + +) : Güçlü (ok düşük büyütmelerde görülen boyanmış hücreler)

**BULGULAR**

Kolon için kullanılan negatif kontrollerde boyanma görülmedi (şekil1).



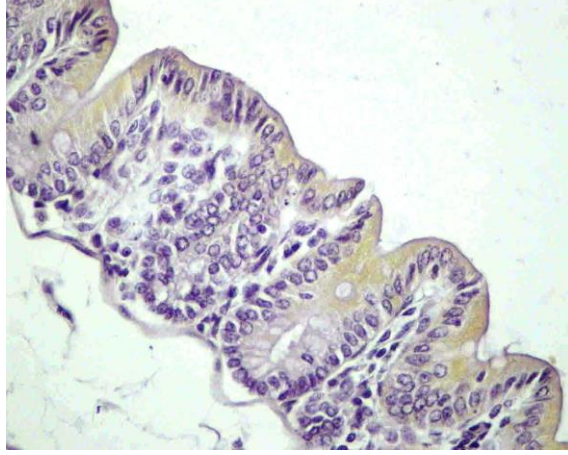
**şekil 1.** Negatif kontrol. Orijinal b y tmeX40.

Kolonda epitel, kript ve kadeh hücrelerinde değişen yoğunluklarda MUC1, MUC2 ve MUC5AC ekspresyonları görüldü. Hücrelerdeki ekspresyon yoğunlukları tablo 2’de özetlendi.

**Tablo 2.** Kolon epitel hücrelerindeki MUC proteinlerinin ekspresyon yoğunlukları.

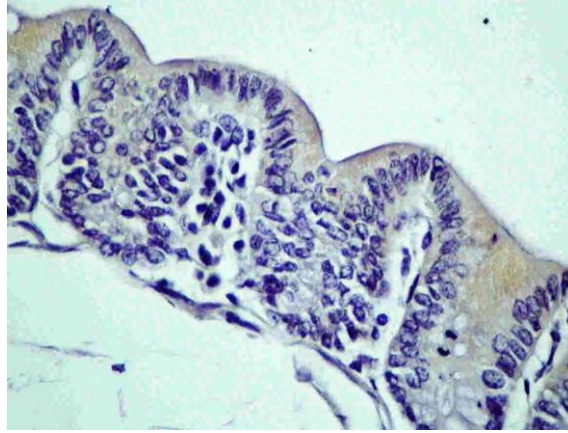
Kolonun Katmanları	MUC proteinleri		
	MUC1	MUC2	MUC5AC
Luminal epitel	++	++	+
Kript epiteli	++	++	+
Kadeh hücreleri	-	+++	-

Membrana bağlı müsin grubunda yer alan kolonda luminal epitelinin apikal yüzeylerinde MUC1’in lokalize olduğu görüldü (şekil 2).

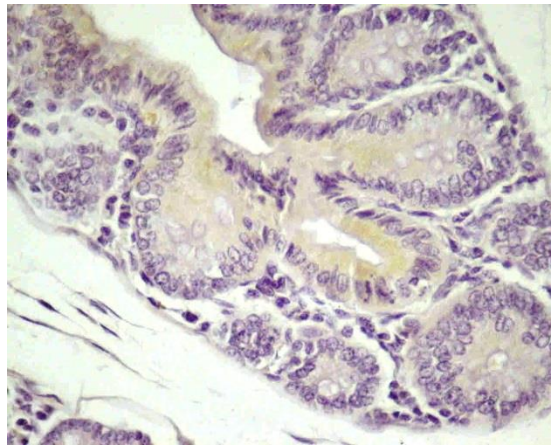


Şekil 2. Kolonda luminal epitelde MUC1 lokalizasyonu. Orijinal b y tmeX40.

MUC2'i luminal ve kript epitel hücreleri ile özellikle de Kadeh hücrelerinde lokalize olduğu görüldü ( ekil 3). Salgı m sini olan MUC5AC'nin yine kolonun luminal ve kript epitel hücrelerinde lokalize olduğu görüldü ( ekil 4).



Şekil 3. Kolonun luminal epitel hücrelerinde MUC2 lokalizasyonu. Orijinal b y tmeX40.



Şekil 4. Kolonun luminal ve kript epitel hücrelerinde MUC5AC lokalizasyonu. Orijinal b y tmeX40.



## TARTIŞMA

İnsanlarda ve diğer türlerde yapılan birçok çalışmada MUC1'in epitel hücrelerinin apikal membranlarında lokalize olduğu bildirilmiştir (15, 16). Bu çalışmada da, kör fare kolon luminal ve kript epitel hücrelerinden MUC1'in ekspresse olduğu belirlendi. Özellikle, glikokaliksin en önemli bileşenlerinden biri olan MUC1'in mikrobiyal patojenlerle etkileşime girdiğine dair çok sayıda kanıt mevcuttur (17, 18). Birçok patojenin, patojeniteye sebep olabilmesi için penetrasyon yolu ile mukozal epitel hücrelerine direkt bağlanması gerektiği ifade edilmiştir. Hücre yüzeyini kaplayan MUC1'in temel fonksiyonunun hücre yapışmasında rol aldığı (19), bakteriyel penetrasyon ve invazyonlara karşı mukozaları korumak olduğu bilgileri dikkate alındığında (17), kör farelerin kolonunda da MUC1'in benzer fonksiyonları yerine getirebileceği düşünüldü.

MUC2'nin bağırsaklardan özellikle kolondaki kadeh hücrelerinden ekspresse edildiği pek çok çalışmada bildirilmiştir (15, 16, 18). İnsanlarda yapılan çalışmalarda MUC2'nin özellikle kadeh hücrelerinde daha baskın olduğu ortaya konulmuştur (18). İnsanlarda bildirildiği kör farelerde de MUC2'nin kadeh hücreleri ile birlikte luminal ve kript epitel hücrelerinde lokalize olduğu gösterildi. Bazı araştırmacılar, kolonun yüzeyini örten mukus tabakasının temel mütini olan MUC2'nin, besinlerin taşınmasında ve distal lümene madde geçişinin sağlanmasında gerekli olduğunu, iç ve dış kaynaklı ajanlar ile mikrobiyel tutunmaya karşı mukozayı koruduğunu bildirilmişlerdir (12, 21, 22). Motor sistem tarafından kontrol edilen bu mekanizmalar, incebağırsak fonksiyonlarının ve salgılarının düzenlenmesinde önemli roller oynar. Kör farelerin kolonunda da MUC2'nin benzer fonksiyonları yerine getirebileceği düşünüldü. Yapılan çalışmalarda, dış mukus tabakasında kommensal bakterilerin yer aldığı ve bu bakterilerin penetrasyon ile mukozaya tutunmalarını sağlamak için MUC2'nin dış tabakanın yüzeyini hacimsel olarak genişlettiği bildirilmektedir (23, 24). Bu bakterilerin enerji kaynağı olarak mütin glikanlarından yararlandıkları göz önüne alındığında, kör fare kolonunda bulunan bakteriler için MUC2'nin enerji kaynağı olarak kullanılabilirliği düşünüldü.

Midenin temel mütini olan MUC5AC'nin sadece yüzey epitel hücrelerinden ekspresse edildiği bildirilmesine

rağmen distal kolon dışında ince bağırsaklarda ve proksimal kolondan ekspresse edildiğine dair çalışmalarda mevcuttur (4,16, 25). Kolon mukus tabakasının MUC2 mütini etrafında, mide mukus tabakasının ise MUC5AC mütini etrafında yapılandığı bilinmektedir. Proksimal kolon boyunca MUC5AC proteininin varlığı sindirim kanalında distal kolondan ileriye doğru itildiğini yansıttığı ve ayrıca MUC5AC'nin MUC2 gibi endojen sindirim enzimlerine nispeten dirençli olduğunu ve MUC5AC'nin kolonda kommensal bakterilere ulaşmadan indirgenmediğini göstermektedir (4). Bu çalışmada kör fare kolon epitel hücrelerinde MUC5AC'nin zayıf olarak ekspresse olduğunun gösterilmesi, kör farelerde de bakterilere ulaşmadan indirgenmediğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak, kör fare kolonunda luminal ve kript epitel hücreleri ile kadeh hücrelerinden değişen yoğunluklarda MUC1, MUC2 ve MUC5AC'nin ekspresse olduğu ortaya konulmuştur.

## KAYNAKLAR

- 1- Van-Klinken BJW, Duits LA, Verburg M, Makkink MK, Tytgat K, Renes IB, Büller HA, Einerhand AWC, Dekker J. (1998). MUC2 is The Predominant Secretory Mucin in the Mouse Colon. *Gastroenterology* 114: A426–A427.
- 2- Gürbüz ED, Yılmaz Ö. (2011). *Helicobacter Pylori'nin Yaşam Stratejisi*. *T Mikrobiyol Cem Derg.* 41(2):49-56.
- 3- Bowcutt R, Forman R, Glymenaki M, Carding S. R, Else K. J, Cruickshank SM, (2014). Heterogeneity Across the Murine Small and Large Intestine, *World Journal of Gastroenterology.* 20(41): 15216–15232.
- 4- Rodriguez-Pineiro AM, Bergström JH, Ermund A, Gustafsson JK, A Schütte, Johansson M, and Gunnar C. (2013). HanssonStudies of Mucus in Mouse Stomach, Small Intestine, and Colon. II. Gastrointestinal Mucus Proteome Reveals Muc2 and Muc5ac Accompanied by a Set of Core Proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 305: G348–G356.
- 5- Perez-Vilar J, Mabololo R. (2007). Gel-forming Mucins. Notions from in Vitro Studies. *Histol Histopathol.* 22: 455-464.
- 6- Gendler SJ, Spicer AP. (1995). Epithelial Mucin Genes. *Ann. Rev. Physiol.* 57: 607–634.
- 7- Schumacher U, Duku M, Katoh M, Julia J, Krause WJ. (2004). Histochemical Similarities of Mucins Produced by Brunner's Glands and Pyloric Glands: A Comparative Study. *The Anatomical Record.* 278A:540–550.

- 8- Sağsöz H, Liman N. (2009). Structure of the Oesophagus and Morphometric, Histochemical–Immunohistochemical Profiles of the Oesophageal Gland During the Post-hatching Period of Japanese Quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Anat. Histol. Embryol.* 38: 330–340.
- 9- Dekker J, Rossen JWA, Iler HAB, Einerhand AWC. (2002). The MUC Family: An Obituary. *Trends Biochem Sci.* 27: 126–131.
- 10- Rose MC, Voynow JA. (2006). Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease. *Physiol Rev.* 86: 245–278.
- 11- Varum FJO, Veiga F, Sousa JS, Basit AW. (2012). Mucus Thickness in the Gastrointestinal Tract of Laboratory Animals. *J Pharm Pharmacol.* 64: 218–227.
- 12- Kim YS, Ho SB. (2010). Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Curr Gastroenterol Rep.*12:319–330.
- 13- Hoan VC. Mucin Changes Associated with Abomasal Parasitism in Sheep. Erişim: <http://www.massey.ac.nz>. Erişim tarihi: 24.12.2014.
- 14- Bancroft JD, Cook HC. (1984). *Manuel of histological techniques.*
- 15- McGuckin MA, Linden SK, Sutton P, Florin TH. (2011). Mucin Dynamics and Enteric Pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 9: 265–278.
- 16- Allen A, Hutton DA, Pearson JP.(1998) . The MUC2 Gene Product: A Human Intestinal Mucin. *30(7): 797-801.*
- 17- Lacunza E, Ferretti V, Barbeito C, Segal-Eiras A, Croce MV. (2010). Immunohistochemical Evidence of Muc1 Expression During Rat Embryonic Development. *European Journal of Histochemistry.* 54:49.
- 18- Linden A, Florin T, McGuckin M. (2008). Mucin Dynamics in Intestinal Bacterial Infection. *PLoS One* 3(12):e3952.
- 19- Lacunza E, Abba MC, Amada Segal-Eiras A, Croce MV. (2009). Identification and Expression of the Epithelial Muc1 Mucin in Normal Feline Tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 130:17-24.
- 20- Allen A, Flemström G. (2005). Gastroduodenal Mucus Bicarbonate Barrier: Protection Against Acid and Pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288: C1–C19.
- 21- Malin EV Johansson. The MUC2 Mucin -A Network in the Intestinal Protective Mucus. Erişim: <https://gupea.ub.gu.se>. Erişim tarihi: 23.12.2014.
- 22- Linden S, Semino-Mora C, Liu H, Rick J, Dubois A. (2010). Role of Mucin Lewis Status in Resistance to Helicobacter Pylori Infection in Pediatric Patients. *Helicobacter.* 15(4): 251–258.
- 23- Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Holm L, Velcich A, Hansson GC. (2008). The inner of the two Muc2 mucin dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 105: 15064–15069.
- 24- Parmley RR, Gendler SJ. (1998). Cystic Fibrosis Mice Lacking Muc1 Have Reduced Amounts Of Intestinal Mucus, *The Journal of Clinical Investigation.* 102(10):1798-1806.
- 25- Ermund A, Gustafsson JK, Hansson GC, Keita AV. (2013). Mucus Properties and Goblet Cell Quantification in Mouse, Rat and Human Ileal Peyer’s Patches. *PLoS ONE* 8(12): e83688.

**Yazışma Adresi:**

Prof. Dr. M. Aydın KETANİ

Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi

maketani@gmail.com