

Sığır Pankreaslarındaki Galaktoz Rezidülerinin Mistellektin-1 ile Saptanması

Kamil SEYREK* Herbert KALTNER**

Geliş Tarihi: 22.11.2000

Özet: Fötal gelişimin normal seyri için farklı gruptan moleküller arasında şekillenen etkileşimler esansiyeldir. Özellikle glikokonjugatların (glikoproteinler, glikolipitler, proteoglikanlar vs.) yapısında bulunan karbonhidratlar ünitelerinin bazı spesifik proteinlerle interaksiyonları büyük önem taşımaktadır. Proteinlerin yapıtaşlarını oluşturan amino asitlerin yanı sıra karbonhidratların da yapılarında biyolojik bilgi taşıdıkları ve bunları önemli birçok fizyolojik olayın şekillenmesinde kullandıkları düşünülmektedir. Bu karbonhidrat rezidüleri spesifik proteinler (lektinler) tarafından tanınıp bağlanmakta ve içerdikleri biyolojik kod yine bu proteinler tarafından deşifre edilmektedir.

Bitkisel lektinler hücreler ve dokulardaki karbonhidrat strüktürlerinin varlığının ve lokalizasyonunun araştırılmasında son zamanlarda sıkça kullanım alanı bulmaktadırlar. Biz bu çalışmada β -D-galaktoza spesifik bir lektin olan mistellektin I'ın pankreastaki ligantlarının tespitine çalıştık. Bunun için biotin ile işaretlenmiş mistellektin I kullanıldı. Sonuç olarak, fötal gelişimin seyri sırasında reaksiyonların görüldüğü hücre çeşitlerinde ve reaksiyon yoğunluğunda devamlı bir değişkenliğin bulunduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: galaktoz, pankreas, sığır

Determination of Galactose Residues in Bovine Fetal and Adult Pancreas by Means of Mistletoe Lectin I

Summary: The course of accurate fetal developmental process is dependent upon the interplay of distinct epitopes on the molecular level. Among such factors, functional significance is increasingly attributed to the carbohydrate chains of cellular glycoconjugates. In addition to sequences of amino acids, carbohydrate structures apparently store biological information that is thought to be relevant for physiologically important processes. Such ligands, namely the carbohydrate part of cellular glycoconjugates, can be recognized by specific proteins.

Lectins from plants have gained a considerable popularity as histological reagents to examine the presence and distribution of defined carbohydrate structures in cells and tissues. In this report, we have focused on the binding-sites of β -galactoside-binding lectin from mistletoe in the pancreas. This lectin enabled us to assess the extent of the presence of respective binding sites in fixed sections from bovine fetal and adult pancreas. Specific binding was detected in fetal and adult stages. The intensity of the staining exhibited developmental regulation.

Key Words: galactose, pancreas, bovine

* Dr, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın

** Dr, Ludwig-Maximilians Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Münih, Almanya

Giriş

Uzun yıllardır hücrelerde sadece enerji kaynağı (glikojen, nişasta) ve yapı taşı (sellüloz, kitin) olarak görev yaptığı düşünülen karbonhidratların, hücreler arası haberleşmede, sinyal transferinde, hücre içi protein transportunda, büyümenin kontrolünde, hücre adezyonunda, döllemede, hücre migrasyonunda, immun sistemin uyarılmasında, metastazda, vs. gibi pek çok biyolojik olayın şekillenmesinde rol oynadıkları rapor edilmiştir¹⁻⁷. Enerji kaynağı olarak kullanılan karbonhidrat moleküllerinin yanı sıra birçok karbonhidrat ünitesi sitoplazmada, hücre membranında ve ekstrasellüler matrikste yerleşim gösteren lipitlere veya proteinlere kovalent bağlarla bağlı halde bulunur^{8,9}. Son zamanlarda yapılan araştırmalar sonucunda glikonjugatların (glikoproteinler, glikolipitler, proteoglikanlar) yapısında bulunan karbonhidrat rezidülerinin birçok fizyolojik ve fizyopatolojik olayda rol oynadıkları açığa çıkmış olsa da bunların organizmadaki rolleri henüz tam olarak bilinmemektedir⁷. Bunların yapılarında görülen en ufak bir değişiklikte bile intersellüler protein transportunda görülen oriyantasyon bozukluklarına bağlı birçok hastalık karşımıza çıkmaktadır¹⁰⁻¹². Bu yüzden histokimyasal tekniklerle hücrelerde lokalize olan karbonhidrat ünitelerinin belirlenmesi bu moleküllerin fonksiyonlarının aydınlatılmasına büyük katkı sağlayacaktır¹³⁻¹⁵. Bu moleküllerin tespitinde karbonhidratları spesifik olarak tanıyıp bağlayan lektinler oldukça geniş kullanım alanı bulmaktadır. Özellikle, hayvansal dokularda lokalize olan karbonhidrat rezidülerine özgü Concanavalin A (*ConA*), Ulex örapeus (*UEA*) ve mistellektin I gibi bitkisel lektinler sıklıkla kullanılmaktadır¹⁶.

Bu çalışmada daha önce birçok araştırma grubu tarafından dokulardaki galaktoz rezidülerini spesifik olarak tanıdığı rapor edilen bitkisel bir protein, mistellektin I, kullanıldı. Ribozomları inaktive ederek programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) uyardığı bildirilen bu lektin 29 kDa'luk A₁ ve 27 kDa'luk A₂ ünitelerinin oluşturduğu A ve 34 kDa'luk B polipeptid zincirlerinden oluşan bir heterotrimerdir^{17,18}. Çoğunlukla çam, elma ve meşe ağaçları üzerinde yarı parazitik bir yaşam süren ve yıl boyu yeşil kalabilen bu bitki halk arasında ökse otu olarak bilinmektedir. Lektinin B ünitesi aracılığı ile terminal yerleşim gösteren

β -D-galaktoz rezidülerine tutunduğu, ribozomları inaktive edici etkisini ise A ünitesi aracılığıyla gerçekleştirdiği bildirilmiştir¹⁹⁻²². B ünitesi ile galaktoz arasında kurulan bağa galaktozun yapısındaki hidroksil (OH) gruplarının aktif olarak katıldığı ve farklı karbon atomlarındaki hidroksil gruplarının oluşan bağa farklı derecelerde katkıda buldukları bildirilmiştir. Örneğin dördüncü karbon atomunda bulunan hidroksil grubunun oluşan bağa en fazla katkı sağlarken altıncı karbon atomunda bulunan hidroksil grubunun ise en az etkin olduğu rapor edilmiştir^{23,24}.

Materyal ve Metod

Bu çalışmada boyları 10 ile 30 cm arasında değişen dişi ve erkek inek fötüslerinden ve erişkin sığırlardan prepare edilen pankreas dokuları kullanıldı. Doku örnekleri alındıktan hemen sonra buz içersindeki fizyatife konuldu. Fizyasyondan kaynaklanabilecek maskeleye olayları olabileceği düşüncesiyle dokular eşit parçalara ayrılarak üç farklı türden fizyatife tespit edildiler. Asetik asitin metanol içersindeki %30'luk çözeltisi, % 4'lük parformaldehid ve Bouin çözeltisi (15:5:1 oranlarında pikrik asit, formol ve asetik asit) fizyatif olarak kullanıldı. 24 saat +4°C'de tespit edilen numuneler ardından yine 24 saat süre ile oda ısısında %70'lik etanolde bekletildiler. Sonra sırasıyla %80, %96, %100'lük etil alkol ve parafin içeren otomatik doku takipleme makinesinde 24 saat süreyle dehidre edilip parafin dispenser cihazında parafin bloklar hazırlandı.

Hazırlanan parafin bloklardan 4-6 μ m kalınlığında kesitler alınıp 12 saat süre ile 37°C'de kurutuldu ve rutin doku takipleme işlemine geçildi. Preparatlar beşer dakikalık iki defa ksilolde tutulup, sırasıyla her biri ikişer dakika olmak üzere %100, %96 ve %70'lik alkol serisinden geçirildi. Takiben dokulardaki peroksidad aktivi-tesini bloke etmek için kesitler 30 dakika süre ile H₂O₂'nin metanol içersindeki %2'lik solüsyonunda bırakıldı. PBS (10 mM, pH 7.4) ile 10 dakika yıkanan kesitler, spesifik olmayan bağlanma noktalarını bloke etmek için %2'lik sığır albumini (BSA, Sigma) çözeltisinde 30 dakika inkübe edildi. Üç defa beşer dakika PBS'de yıkanan dokular Ludwig-Maximilians Üniversitesi Veteriner Fakültesinden Prof. Dr. Gabius'un hediye ettiği biotinlenmiş mistellektin

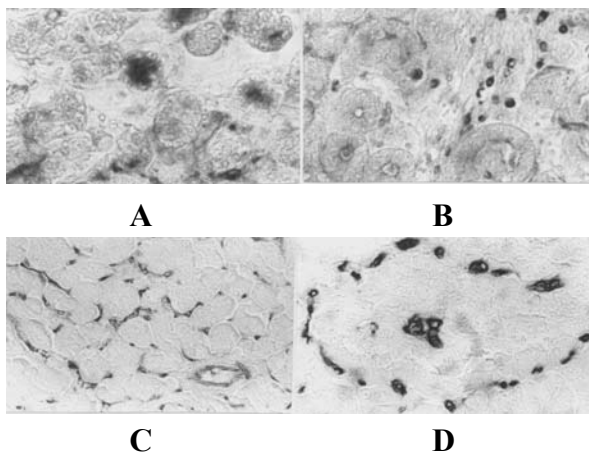
I'in 1:1000 oranında sulandırılmış solüsyonunda +4°C'de en az 12 saat süreyle bırakıldı. Bu süre sonunda tekrar 3 defa beşer dakika PBS ile yıkanan kesitler 1 saat süreyle streptavidin - biotin - peroksidaz kompleksiyle (Camon, Burlingame, USA) inkübe edildi. Takiben, üç kere beşer dakika olacak şekilde PBS ile yıkanan dokular % 0.05'lik kromojen (3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorit, Sigma) solüsyonunda 4 dakika süreyle bekletildi. Hemen sonra soğuk PBS ile reaksiyon durduruldu ve kesitler %70'lik alkol serisinden başlayarak dehidre edilip ökit ile üzerleri kapatıldı.

Oluşan reaksiyonların spesifitesini kontrol etmek için ikişerli kontrol grupları oluşturuldu. Gruplardan birinde biotin ile işaretlenmiş lektin yerine PBS, diğerinde ise laktoz ile bloke edilmiş biotinlenmiş mistellektin I kullanıldı.

Bulgular

Yapılan çalışmada mistellektin I epitoplarının fetal ve erişkin sığır pankreaslarındaki farklı gelişim evrelerinde değişik hücre tiplerinde lokalize oldukları gözlemlendi. Fetal gelişimin ilk evrelerinde herhangi bir reaksiyon gözlemlenmezken ilk reaksiyonların varlığı 16 cm büyüklüğündeki fetal pankreasta (gebeliğin yaklaşık 90'ıncı günü) olduğu saptandı. Reaksiyonlar ağırlıklı olarak pankreasın ekzokrin kısmını teşkil eden Korpus glandularında görüldü. Galaktoz rezidülerinin özellikle asiner hücrelerinin lumene bakan kısımlarında lokalize olduğu tespit edildi (Şekil-1 A). Aynı gelişim evresindeki pankreas dokusunda çok nadir olmak üzere bazı bağdoku hücrelerinin de pozitif reaksiyon gösterdikleri belirlendi.

Şekil 1:



Galaktoza spesifik Mistellektin I'in fetal (A,B)

(x540, x340) ve adult (C,D) (x270, 340)pankreas dokusundaki spesifik bağlantı yerleri.

Histochemical localisation of specific binding sites in fixed, paraffin embedded sections of bovine fetal (A,B) (x540, x340) and adult (C,D) (x270, x340) pancreas for the galactoside-specific lectin from mistletoe.

30 cm büyüklüğündeki fetal pankreasta (gebeliğin yaklaşık 140'ıncı günü) ise asiner hücrelerdeki reaksiyonlar kaybolurken, bazı bağ doku hücrelerinde görülen galaktoz rezidülerinin sayısında ise artışların bulunduğu saptandı (Şekil 1 B). Erişkin sığır pankreaslarında görülen reaksiyonların ise fetal aşamalarındaki reaksiyonlardan büyük farklılık gösterdikleri gözlemlendi. Özellikle fetal pankreasların hiçbirinde görülmeyen endotel hücrelerindeki reaksiyonların adult pankreas dokusundaki endotelde yoğun olarak bulunduğu gözlemlendi (Şekil 1 C). Ayrıca bazı bağ doku hücrelerinin de reaksiyon verdiği tespit edildi (Şekil 1 C). Adult pankreas dokusunun endokrin kısmını teşkil eden Langerhans hücrelerinin hiçbir tipinde galaktoz rezidülerine rastlanmazken, endokrin kısmı besleyen damarların endotel hücrelerinde yine sitoplazmik reaksiyonlar saptandı (Şekil 1D)

Fikzatiflerin hemen hepsinde görülen reaksiyonların spesifik olduğu, Bouin içinde tespit edilen dokulardaki reaksiyonların paraformaldehit ve asetik asit çözeltisinde tespit edilenlere göre daha çabuk şekillendiği gözlemlendi.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, terminal galaktoz ünitelerine özgü bir lektin olan mistellektin I ile fetal ve adult pankreas dokusu glikokonjugatlarının terminal yerleşim gösteren galaktoz rezidülerinde zamanla görülen lokalizasyon farklılıklarının tespiti amaçlandı. Dokulardaki karbonhidrat ünitelerinin pasif ve stabil birer yapı değil, özellikle fetal gelişimde ve diğer birçok hastalık olgusunda devamlı değişkenlik gösterdiği daha önceki araştırma grupları tarafından rapor edilmiştir²⁵⁻²⁷. Bilindiği gibi karbonhidrat rezidüleri kendileri için spesifik olan lektinler tarafından tanınır ve içermiş oldukları biyolojik kodu bu proteinler aracılığıyla fizyolojik ve fizyopatolojik olayların şekillenmesinde kullanırlar. Histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemlerle sistematik olarak dokulardaki karbonhidrat ünitelerinde görülen değişikliklerin belirlenmesi hem

biyolojik kodu içeren şekerlerin, hem de bu kodu deşifre eden proteinlerin (lektinlerin) rollerinin anlaşılmasına katkıda bulunacağı açıktır. Daha önce sistematik olarak yapmış olduğumuz doktora çalışmasında, sığır organlarındaki birçok dokuda β -D-galaktoz üniteleri ile N-asetillaktozamin (lakNAc) rezidülerinin zamanla değişkenlik gösterdiklerini rapor etmiştik⁵. Doktora çalışmaları sırasında çalışmaya dahil edilen organların fazla sayıda olmasından dolayı pankreas çalışma dışında bırakılmıştı. Gerek bu organın doktora çalışmalarına dahil edilememiş olması gerekse başka araştırma grupları tarafından bu organdaki β -D galaktoz ünitelerine yönelik yapılmış bir çalışmanın bulunmayışı bizi sığır pankreaslarındaki karbonhidrat ünitelerine yönelik bu çalışmanın yapılmasına yöneltti. Aynı organ üzerinde daha önce hayvansal bir lektin olan ve mistellektin I ile aynı karbonhidrat rezidülerine spesifite gösteren galektin-1 ile yaptığımız çalışmada galaktoz ünitelerinin çok daha farklı bir lokalizasyonun bulunduğunu tespit etmiştik²⁸. Bu çalışmada ise fötal gelişimin erken evrelerinde pankreas dokusundaki Mistellektin I ile reaksiyona giren herhangi bir galaktoz rezidüsü tespit edilmedi. İlk reaksiyonlar 16 cm büyüklüğündeki yaklaşık gebeliğin 90'ıncı gününde bulunan fötal pankreas dokusunda Korpus glandulanın lumenine bakan kısmında ve bazı bağ doku hücrelerinde gözlemlendi. Fötal gelişimin daha sonraki evrelerinde asiner hücrelerde ender de olsa görülen ligandların kaybolduğu, buna karşın bağ doku hücrelerindeki galaktoz rezidülerinin arttığı tespit edildi. Mistellektin I'in epitoplalarının lokalizasyonu erişkin sığırlarda fötal evrelerdekinden oldukça farklılık göstermektedir. Fötal gelişimin yaklaşık 140'ıncı gününe kadar hiçbir fötal evrenin damar endotelinde terminal yerleşim gösteren galaktoz rezidüleri saptanmazken, erişkin sığır pankreasındaki endotel hücrelerinde bol miktarda bulunduğu gözlemlendi.

Bütün bu sonuçlar; dokulardaki gliko-konjugatların yapısında bulunan terminal galaktoz ünitelerinin sabit birer yapı değil, devamlı değişkenlik gösteren ve fötal gelişim için esansiyel, dinamik moleküller olduğunun göstergesidir. Ayrıca galektin-1'in pankreastaki ligant-larıyla karşılaştırıldığında aynı şekere özgü farklı iki lektinin birbirlerinden çok farklı bir reaksiyon göstermesi, lektinlerin karbonhidrat

ünitelerine bağlanırken önemli olan tek faktörün şeker spesifitesi değil, aynı zamanda şekerin karbonhidrat zinciri içerisindeki yerleşim yeri olduğu gerçeğidir. Belki de bazı lektinler terminal yerleşim gösteren karbonhidrat rezidülerine bağlanırlarken, bazıları ise monosakkarit zincirleri arasından bazı rezidülere bağlanabilmektedirler. Bu da, aynı şekere özgü iki lektinin farklı rollerinin olabileceği kanısını vermektedir.

Kaynaklar

1. BEVILACUA, M., NELSON, R.M.: Selectins J Clin Invest., 91, 379-387 (1993).
2. GABIUS, H.J., KAYSER, K., GABIUS, S.: Protein-Zucker-Erkennung: Grundlagen und medizinische Anwendungen am Beispiel der Tumorlektinologie, Naturwissenschaften., 82, 533-543 (1995).
3. HAKOMORI, S., IGARASHI, Y.: Functional role of glykospihgilipids in cell recognition and Signalling J. Biochem., Tokyo 118, 1091-1101 (1995).
4. SCHMIDT, R.R.: Neu Methoden zur Glycosid- und Oligosaccharidsynthese-gibt es Alternativen zur Koenigs-Knorr-Methode? Angew. Chem., 98, 213-236 (1986).
5. SEYREK, K.: Expression und Lokalisation von Galektin-1 und Galektin-3 sowie der histochemische Nachweis ihrer möglichen glykosylierten Bindungsstellen in fetalen und adulten Organen des Rindes. Doktora tezi, Institut für Physiologische Chemie, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München/Deutschland (1999).
6. SHARON, N., LIS, H.: Glycoproteins: structure and function., in Glycosciences: status and perspectives (Gabius, H.-J. and Gabius, S., eds) 133-162, Chapman and Hall, Weinheim. (1997).
7. SIEBERT, S., SIEBERT, H.C., GABIUS, H.J.: Protein-Zucker-Erkennung-dem dritten Alphabet des Lebens auf der Spur. Fachwissenschaft., 46, 367-385 (1997).
8. DANGUY, A., CAMBY, I., SALMON, I., KISS, R.: Modern glycohistochemistry: A mayor contribution to morphological investigations., in Glycosciences: status and perspectives (Gabius, H.-J. and Gabius, S., eds) 547-562 (1997).
9. KOPITZ, J.: Glycolipids: structure and function, in Glycosciences: status and perspectives (Gabius, H.-J. and Gabius, S., eds) pp. 163-189, Chapman and Hall, Weinheim. (1997).

10. ALBELDA, S.M., SMITH, C.W., WARD, P.A.: Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.*, 8, 504-512. (1994).
11. FUKUDA, M.: Carbohydrate-dependent cell adhesion. *Bioorgan. Med. Chem.*, 3, 207-215 (1995).
12. VARKI, A., MARTH, J.: Oligosaccharides in vertebrate development. *Sem. Dev. Biol.*, 6, 127-138 (1995).
13. ALROY, J., UCCI, A., PERIRA, M.E.A.: Lectin histochemistry: an update., In R.A. Dellis (ed): *Advances in Immunohistochemistry*. Raven Press. New York 93-131 (1988).
14. DAMJANOV, I.: Lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab. Invest.*, 57, 5-20 (1987).
15. DANGUY, A., AKIF, F., PAJAK, B., GABIUS, H.J.: Contribution of carbohydrate histochemistry to glycobiology. *Histol. Histopathol.*, 9, 155-171 (1994).
16. RÜDIGER, H.: Structure and functions of plant lectins, in: *Glycosciences: status and perspectives* (Gabius, H.-J. and Gabius, S., eds) pp. 415-439, Chapman and Hall, Weinheim. (1997).
17. GABIUS, H.J., WALZEL, H., JOSHI, S.S., KRUIP, J., KOJIMA, S., GERKE, V., KRATZIN, H., GABIUS, S.: The immunomodulatory galactoside-specific lectin from mistletoe: partial sequence analysis, cell and tissue binding and impact on intracellular biosignalling of monocytic leukemia cells. *Anticancer Res.*, 12, 669-676 (1992).
18. OLSNES, S., STIRPE, F., SANDVIG, K., PHIL, A.: Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album*. *J. Biol. Chem.*, 257, 13263-13270 (1982).
19. LEE R.T., GABIUS H.J. AND LEE Y.C.: Ligand binding characteristics of the major mistletoe lectin. *J. Biol. Chem.*, 267, 23722-23727 (1992).
20. WU, A.M., CHIN, L.K., FRANZ, H., PFUELLER, U., HERP, A.: Carbohydrate specificity of the receptor sites of mistletoe toxic lectin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1117, 232-234 (1992).
21. GABIUS, H.J., WALZEL, H., JOSHI, S.S., KRUIP, J., KOJIMA, S., GERKE, V., KRATZIN, H., GABIUS, S.: The immunomodulatory galactoside-specific lectin from mistletoe: partial sequence analysis, cell and tissue binding and impact on intracellular biosignaling of monocytic leukemia cells. *Anticancer Res.*, 12, 669-676 (1992b).
22. BARBIERI, L., BATTELLI, M.G., STIRPE, F.: Ribosome-inactivating proteins from plants, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1154, 237-282 (1993).
23. LEE R.T., GABIUS H.J., LEE Y.C.: The sugar-combining area of the galactose-specific toxic lectin of mistletoe extends beyond the terminal sugar residue: comparison with a homologous toxic lectin, ricin. *Carbohydr. Res.*, 254, 269-276 (1994).
24. WU, J.H., WATKINS, W.M., CHEN, C.P., SONG, S. C., WU, A.M.: Interaction of a human blood group Sd(a-) Tamm-Horsfall glycoprotein with applied lectins. *FEBS Lett.*, 384, 231-234 (1994).
25. BOURRILON, R., AUBERY, M.: Cell surface glycoproteins in embryonic development. *Int. Rev. Cytol.*, 116, 257-338 (1989).
26. MANN, P.L.: Membrane oligosaccharides: structure and function during differentiation. *Int. Rev. Cytol.*, 112, 67-96 (1988).
27. MURAMATSU, T.: Developmentally regulated expression of cell surface carbohydrates during mouse embryogenesis. *Cell. Biochem.*, 36, 1-14 (1988).
28. SEYREK, K.: Histochemical study of expression of galectin -1 and it's reactive carbohydrate epitops in normal bovine embryonal and adult pancreas. *İstanbul Üniv. Vet Fak Derg.*, (Basımında).