

## Вивчення експресії секреторних муцинів у кон'юнктиві ока людини

І. Й. Гут<sup>1, 2</sup>, Р. Еллінгем<sup>2</sup>, Д. Істі<sup>2</sup>, Г. С. Семенова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Львівський медичний університет  
Львів, вул. Некрасова, 35а

<sup>2</sup> Брістольський очний госпіталь, Велика Британія

*У роботі досліджено експресію секреторних муцинів (MUC 2–9) у кон'юнктиві ока людини. Застосовуючи метод гібридизації in situ із специфічними олігонуклеотидними пробами, було виявлено експресію лише двох секреторних муцинів (MUC4 і MUC5AC) в епітеліальному шарі кон'юнктиви. Експресію MUC4 транскрипційної РНК, яка мала гомогенний характер розподілу, було виявлено в усіх шарах сквамозного епітелію. На відміну від MUC4, MUC5AC експресується тільки в базальному шарі кон'юнктиви і має плямистий характер експресії. Базуючись на даних з вивчення функції секреторних муцинів в інших тканинах, можна припустити, що MUC4 і MUC5AC відіграють важливу роль у формуванні і стабілізації мукози, яка харчує, зволожує і захищає епітеліальні клітини кон'юнктиви від патогенних факторів і шкідливих впливів зовнішнього середовища.*

**Вступ.** Дихальний, шлунково-кишковий і репродуктивний тракти ссавців вкриті слизовою оболонкою (мукозою), яка є захисним бар'єром і оберігає епітеліальні клітини від шкідливих впливів зовнішнього середовища.

Мукоза продукується спеціальними клітинами і являє собою в'язкий віскозний секрет, до складу якого входять вода, мінерали, імуноглобуліни, антимікробні речовини, білки і мукополісахариди [1–3]. Хімічний склад, а також фізичні властивості мукози залежать від її місцезнаходження в організмі. Наприклад, мукозна оболонка шлунково-кишкового тракту в значній мірі відрізняється за хімічними, а також фізичними властивостями від мукози дихальних шляхів. Та поряд з тим багато компонентів, які визначають структуру, еластичність і антибактеріальну властивість мукози, є спільними для різних типів мукозної оболонки.

Однією з складових частин мукози є муцини, які утворюють гетерогенну групу високомолекулярних (більше 200 кДа) глікопротеїнів [2, 3]. Біохімічний аналіз муцинів, виділених з різних

тканин, показав, що до їхнього складу входить велика кількість карбогідратів (інколи до 75 % від загальної ваги) [4].

На даний час відкрито дев'ять типів муцинових генів (MUC1–9). Базуючись на структурних особливостях і клітинній локалізації, епітеліальні муцини поділяють на дві групи: трансмембранні (MUC1) [5] та секреторні MUC2–9) [6–15].

Аналіз нуклеотидних і амінокислотних послідовностей показав відсутність гомології між різними типами муцинових генів. Разом з тим було виявлено спільні особливості в організації білкового скелета цих генів. По-перше, муцинові гени характеризуються наявністю тандемних повторів, які є специфічними для кожного з цих генів. По-друге, присутність серинових або треонінових залишків у тандемних повторах створює потенційні місця для O-глікозилювання, через які сотні карбогідратних ланцюгів можуть приєднатися до однієї білкової структури. По-третє, високий ступінь гетерогенності муцинових генів може пояснюватися різницею у кількості тандемних повторів, а також неоднаковою інтенсивністю глікозилювання.

Відомо, що карбогідратні ланцюги продуктів муцинових генів мають різну довжину: від 1 до 20 залишків на ланцюг. У багатьох роботах було

продемонстровано, що кількісний склад приєднаних карбогідратів в значній мірі відрізняється між різними муцинами [4]. Цікаво також відмітити, що продукти одних і тих же муцинових генів мають різний склад карбогідратів у різних органах і їхній склад часто змінюється при хворобах [16—18].

Грунтуючись на якісному і кількісному вмісті карбогідратів, муцини можна також розділити на три основні групи: сіаломуцини (кислі муцини), сульфомуцини і нейтральні муцини, які містять, в основному, гексози. Ці групи муцинів можна легко відрізнити одну від одної за допомогою спеціальних гістохімічних аналізів.

З використанням електронної мікроскопії було показано, що молекули муцинів формують філаментні структури довжиною від 200 до 1000 нм [19]. Протягом останніх років продемонстровано, що формування філаментних структур відбувається завдяки дисульфідним зв'язкам між окремими муциновими субодинамиціями.

MUC1 є на сьогодні єдиним відомим трансмембранним муцином, який складається з масивного позаклітинного домена і коротких трансмембранного і цитоплазматичного доменів [5]. Мембранну локалізацію MUC1, яку було знайдено за допомогою імуногістохімічних аналізів, можна пояснити наявністю гідрофобного трансмембранного домена в його структурі. Функція цитоплазматичного домена поки що невідома, та існує припущення, що цей домен відіграє важливу роль у взаємодії з цитоскелетом [20]. MUC1 не здатний формувати олігомерних структур, які є специфічними для секреторних муцинів. Детальний аналіз результатів біохімічних, а також імунофлуоресцентних досліджень вказує на те, що MUC1 має велике значення для стабілізації мукозної оболонки, її фіксації на апікальній поверхні епітеліальних клітин, а також у розподілі мукозного геля по верхній епітелію [21—23].

Експресію MUC1 було продемонстровано практично у всіх епітеліальних тканинах, які вивчалися. Особлива увага до MUC1 з'явилася з того часу, коли було показано наявність видозмінених форм продукту цього гена в ракових пухлинах різного походження [24—26]. Поява слабоглікозильованої форми MUC1 у пухлинах епітеліального походження є важливим діагностичним маркером злоякісного росту.

Секреторні муцини (MUC2—9) мають специфічну лідерну послідовність, яка визначає їхню позаклітинну локалізацію. Наявність цистеїн-багатих доменів у секреторних муцинах є основою для формування дисульфідних зв'язків і полімеризації муцинових субодинамиці. Секреторні муцини, на

відміну від трансмембранних, проявляють специфічний характер експресії в різних епітеліальних тканинах [16, 27, 28]. Наприклад, MUC5B експресується у більшості епітеліальних тканин, тоді як експресію MUC7 було знайдено лише в підшлунковій залозі [8]. З іншого боку, MUC3 є специфічним для епітелію шлунково-кишкового тракту.

Як відомо, поверхня ока вкрита кон'юнктивальним і корнеальним епітелієм, що складається з 5—7 шарів клітин [29]. По аналогії з іншими епітеліальними тканинами, спеціалізовані секреторні клітини епітелію ока продукують мукозу, яка є важливим компонентом для нормальної функції цього органу [30, 31]. Мукоза є складовою частиною сльозової плівки, що зволожує, харчує і захищає око від патогенних факторів і чужорідних тіл, а також створює гладку рефракційну поверхню з високою оптичною якістю [32, 33].

Слід відмітити, що на даний час ні одного з відомих муцинових генів не клоновано з епітеліальних тканин ока. Поряд з тим біохімічні властивості та експресію муцинових генів в епітеліальних покриттях ока теж вивчено недостатньо. Тому метою цієї роботи було дослідження експресії секреторних муцинових генів (MUC2—9) у кон'юнктиві ока людини за допомогою методу гібридизації *in situ*.

**Матеріали і методи. Вибір і приготування зразків для аналізу.** Зразки нормальної кон'юнктиви ока було отримано під час хірургічних операцій з приводу ентропіону в Брістольському очному госпіталі (Велика Британія). Хірургічно видалені тканини повіки ока відразу фіксували в 4 %-му розчині параформальдегіду і 10 %-му сольовому розчині формаліну. Після обезводнення в спирті зразки тканини було залито у воскові блоки. За допомогою мікротома готували пошарові зрізи тканин товщиною 4 мкм. Перед проведенням гібридизації *in situ* якість зразків було перевірено гістохімічним аналізом (фарбування гематоксилином і метиловим зеленим). Місцезнаходження Гоблетових клітин виявляли поєднанням фарбування гематоксилином і Periodic Acid Schiff.

**Аналіз муцинових генів і вибір олігонуклеотидних проб.** Структурний аналіз муцинових генів базувався на використанні білкового банку даних Swissprot і програм для порівняння білкових і ДНКових послідовностей (Bestfit і Fasta). Олігонуклеотидні проби для гібридизації *in situ* вибирали за наявністю повторюваних елементів у структурі муцинових генів. За допомогою комп'ютерного аналізу було відібрано вісім специфічних олігонуклеотидних послідовностей (48 нуклеотидів кож-

на), комплементарних тандемним повторам секреторних муцинових генів. Відібрані олігонуклеотиди аналізували в геномному банку даних з метою перевірки їхньої специфічності і неповторюваності.

*Синтез, виділення і мічення олігонуклеотидних проб.* Олігонуклеотиди синтезували на ДНК-овому синтезаторі фірми «ABI» (США). Синтезовані олігонуклеотиди очищували до гомогенності за допомогою хроматографії у зворотній фазі.

Синтезовані проби радіоактивно мітили, використовуючи деоксинуклеотидну трансферазу (Boehringer labelling kit, ФРН) і  $^{35}\text{S}[\alpha\text{-ATP}]$  («Amersham», Велика Британія). Гель-фільтраційні колонки фірми «Stratagene» (США) було використано для відділення мічених олігонуклеотидів від вільного  $^{35}\text{S}[\alpha\text{-ATP}]$ . Включення радіоактивної мітки до олігонуклеотидних проб було визначено за допомогою багатоканального лічильника («Beckman», США).

*Метод гібридизації in situ.* Гібридизацію *in situ* готових зрізів кон'юнктиви ока з міченими пробами здійснювали за методом, описаним в роботі [34]. Вона включала наступні етапи: пре-гібридизацію, гібридизацію і проявлення радіоактивного сигналу.

Пре-гібридизація (для зниження неспецифічної сорбції радіоактивної мітки): а) обробка зрізів протеїназою К (5 мкг/мл в 50 мМ трис, рН 7,5) протягом 20 хв при 37 °С (підвищує доступність міченої проби клітинній РНК); б) неспецифічне зв'язування з аміногрупами було блоковане ацетилюванням цих груп триетаноламіном (0,1 М триетаноламін, 0,25 %-й оцтовий ангідрид, 0,9 %-й хлорид натрію) протягом 10 хв при кімнатній температурі); в) обезжирення зразків відбувалося з використанням 100 %-го хлороформу.

Оптимальні умови гібридизації: 50 %-й деіонізований формамід, 4 × SSC (150 мМ NaCl, 15 мМ Na-цитрат), 10 %-й декстран сульфату (молекулярна маса 5 000 000), 500 мкг/мл одониткової ДНК сперми лосося, 1 мл 1 × розчину Денгардта (0,02 %-й полівінілпіролідон, 0,02 %-й фікол, 0,02 %-й альбумін сироватки бика) і 0,5 мкл тРНК з грибків (25 мг/мл) — при 45 °С через ніч. 400000 імп·хв<sup>-1</sup>·мкг<sup>-1</sup> кожної міченої проби було використано для гібридизації одного зразка.

Зразки відмивали в буфері 1 × SSC при кімнатній температурі (4 рази по 15 хв) і при 65 °С (4 рази по 15 хв). Після інтенсивного промивання зразки занурювали в срібну емульсію (K5, Kodak), висушували і експонували при 4 °С протягом двох тижнів у затемненій кімнаті. Сигнал проявляли за стандартним методом [29]. Наявність і інтенсивність радіоактивно активованих срібних гранул

у зразках визначали за допомогою світлового мікроскопу в темному і освітленому полях зору.

Специфічність гібридизаційного сигналу було підтверджено аналізом інших типів тканин, у яких експресію муцинових генів було показано в попередніх дослідженнях, а саме: шлунок, товстий і тонкий кишечники, підщелепна слинна залоза, бронхи і трахея. Згадані тканини було використано як позитивний контроль для визначення роботи методу.

Негативним контролем при вивченні експресії муцинових генів були: шкіра, м'язові волокна, кров'яні судини, хрящева і сполучна тканини, які входили до складу зрізу повіки ока.

*Результати та обговорення.* Кон'юнктива очного яблука являє собою мукозну мембрану, до складу якої входить неорогіваючий сквамозний епітелій, Гоблетові клітини та субстанція пропрія. Гістологічно кон'юнктивальний епітелій включає від 5 до 7 шарів клітин. Апікальна поверхня епітелію покрита сльозовою плівкою, що містить різні компоненти, серед яких і мукозу. Слід відмітити, що продукція і гомеостаз мукозного шару є важливим фактором для нормальної функції ока. Біохімічний і імуногістохімічний аналіз мукози очного епітелію дозволив отримати дані про молекулярну масу, ензиматичну активність і карбогідратний склад очних муцинів [30, 32]. За допомогою Нозерн-блот-аналізу було продемонстровано експресію трансмембранного MUC1 в корнеальному епітелії ока людини [33]. Разом з тим варто вказати на відсутність всебічного аналізу експресії муцинових генів в епітеліальних покривах ока людини, що і було метою цієї роботи.

Перед дослідженням експресії секреторних муцинових генів у кон'юнктиві ока людини необхідно було вибрати метод і підібрати гібридизаційні проби, які були б специфічними для кожного з муцинових генів. При вивченні експресії муцинових генів у тканинах і органах ссавців застосовували різні підходи, серед яких імуногістохімічний аналіз, Вестерн- і Нозерн-блот-аналізи, гібридизація *in situ*, ЗТ-ЛПР (зворотної транскриптази-ланцюгова полімеразна реакція). Нами було обрано метод гібридизації *in situ*, оскільки він має ряд переваг над іншими методами, а саме: цей метод забезпечує високий рівень чутливості і специфічності гібридизаційного сигналу; він може бути поєднаний з цитологічним аналізом, що дозволяє визначити клітинний розподіл гібридизаційного сигналу, а також за його допомогою можна отримати дані з експресії генів на кількісному рівні.

Специфіка організації муцинових генів стала основним критерієм вибору нуклеотидних проб для

гібридизації. У таблиці наведено результати детального аналізу тандемних повторів секреторних муцинових генів, який базувався на використанні білкового банку даних Swissprot і програм для вивчення білкової і ДНКової гомології (Bestfit і Fasta). Наявність коротких тандемних повторів у структурі цих генів дала можливість використати з високою ефективністю олігонуклеотидні проби в методі гібридизації *in situ*.

Синтезовані олігонуклеотидні проби, комплекстарні тандемним повторам восьми секреторних муцинових генів, наведено нижче:

Вибір довжини олігонуклеотидних проб (48 нуклеотидів) заснований на аналізі даних ряду

MUC2	GGTCTGGCCGGTGGGTGTTGGGGTTGGGGTCACCGTGGTGGTGGT
MUC3	GGTGGTCTCGGTGGTGGTGATGGAAGAAGTGAAGCTGGGAGTACTGTG
MUC4	GTCGGTGACAGGAAGAGGGGTGGCGTGACCTGTGGATGCTAGGAAGT
MUC5AC	AGGGGCAGAAGTTGTGCCCGTGTGGGAGCAGAGGTTGTCTGGTGGTGT
MUC5B	TGTGGTCAGCTCTGTGAGGATCCAGGTCGTCGCCGAGTGGAGGAGGG
MUC6	GTTGGGAAGCATGTGAGTGGAGTATGTAGATGTTTGGCTGTGCTG
MUC7	TGGTGGAGCTGGTGTAGTTGCAGAAGGTGTGGGTGGGGCAGCTGTGGT
MUC8	CTCTCCAGGAGGGGACACCGGGTTCACGGCTGCCACGCCCTCTCCA

Метод гібридизації *in situ* дозволив виявити експресію двох секреторних муцинів, а саме: MUC4 і MUC5AC в епітеліальному шарі кон'юнктиви ока. Мічена проба дала сильний гібридизаційний сигнал, який збігався з локалізацією кон'юнктивального епітелію. Використовуючи мікроскопічний аналіз у темному полі зору, було виявлено радіоактивно активовані гранули срібла в усіх шарах епітелію кон'юнктиви, які відповідали місцезнаходженню міченої проби і відповідно MUC4 мРНК (рис. 1). Слід відмітити, що експресія MUC4 мРНК має гомогенний характер розподілу. Це особливо чітко проглядається при сильнішому збільшенні (рис. 2, а, б).

досліджень, у яких показано, що олігонуклеотиди довжиною від 45 до 55 нуклеотидів дають найоптимальніший гібридизаційний сигнал [34].

Використовуючи  $^{35}\text{S}[\alpha\text{-ATP}]$  і дезоксинуклеотидну трансферазу синтезовані олігонуклеотидні проби було помічено на 3'-кінці. Мічені олігонуклеотиди очищували від невключеного  $^{35}\text{S}[\alpha\text{-ATP}]$  методом гель-фільтрації. У кінцевому результаті було отримано і використано для досліджень мічені проби з високою питомою активністю (від  $(1,4-3,7) \cdot 10^8$  імп · хв<sup>-1</sup> · мкг<sup>-1</sup>)).

Експресія MUC5AC мРНК виявляється тільки в базальному шарі кон'юнктивального епітелію, що спостерігається при мікроскопічному аналізі гібридизаційного сигналу в темному і освітленому полях зору (рис. 3 а, б). На відміну від MUC4, експресія MUC5AC мРНК має виражений плямистий характер. Отримані результати вказують на те, що MUC4 і MUC5AC експресуються в різних популяціях кон'юнктивального епітелію. За допомогою гістохімічного аналізу було показано, що Гоблетові секреторні клітини не містять гібридизаційного сиг-

Характеристика тандемних повторів продуктів секреторних муцинових генів

Ген	Послідовність повторів залишків амінокислот (з. а.)	Довжина повтору	Кількість повторів
MUC2	PTTTPPITTTTIVTPTPTGTQT	23	8
MUC3	HSTPSPTSSITTTGTTT	17	13
MUC4	TSSASTGHATPLPVTD	16	10
MUC5AC	TTSTTSAP	8	Невідома
MUC5B	SS'PGTANHLTVLTTATPTATGSTATP	29	«
MUC6	Дуже довгий повтор (169 з. а.)	169	«
MUC7	CRPKLPPSPNKPFPNPNQPPK	23	«
MUC8	Два повтори (13 і 41 з. а.)	13/41	«

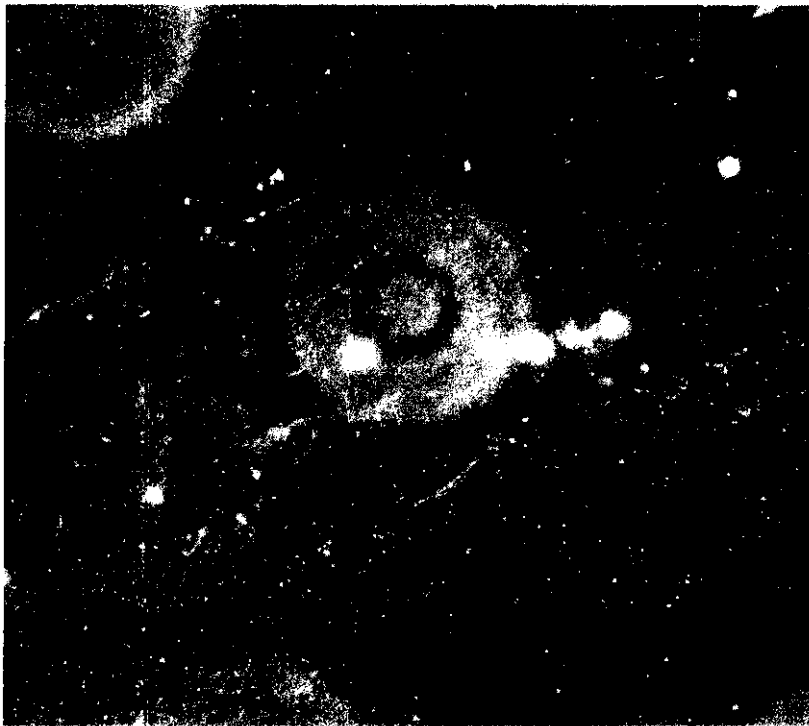
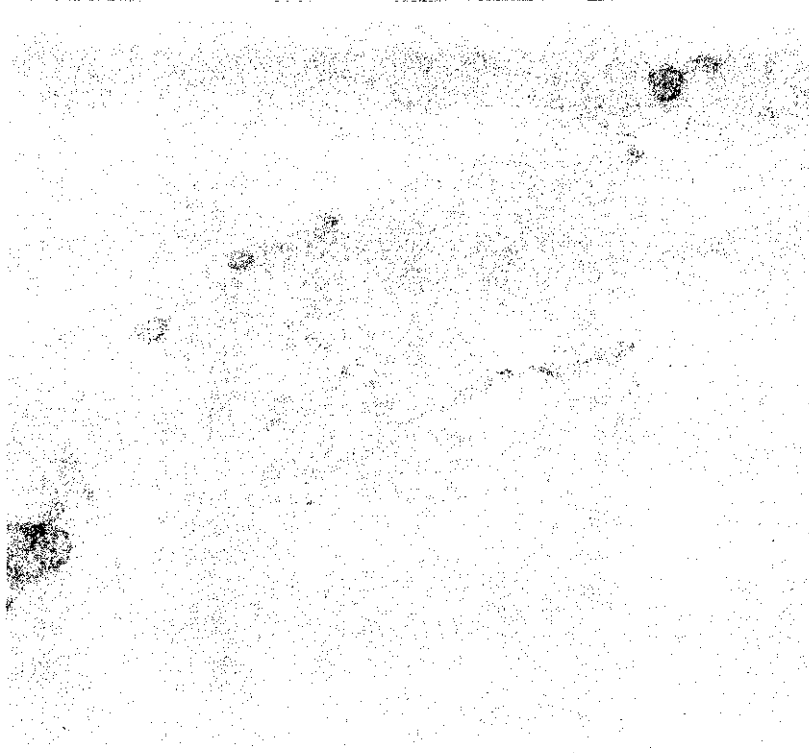


$^{99}\text{Tc}$  в кон'юнктиві ока людини: *a* — мікроскопічний аналіз проводили в темному явному освітлення (активовані срібні гранули) вказує на локалізацію MUC4 трансскр

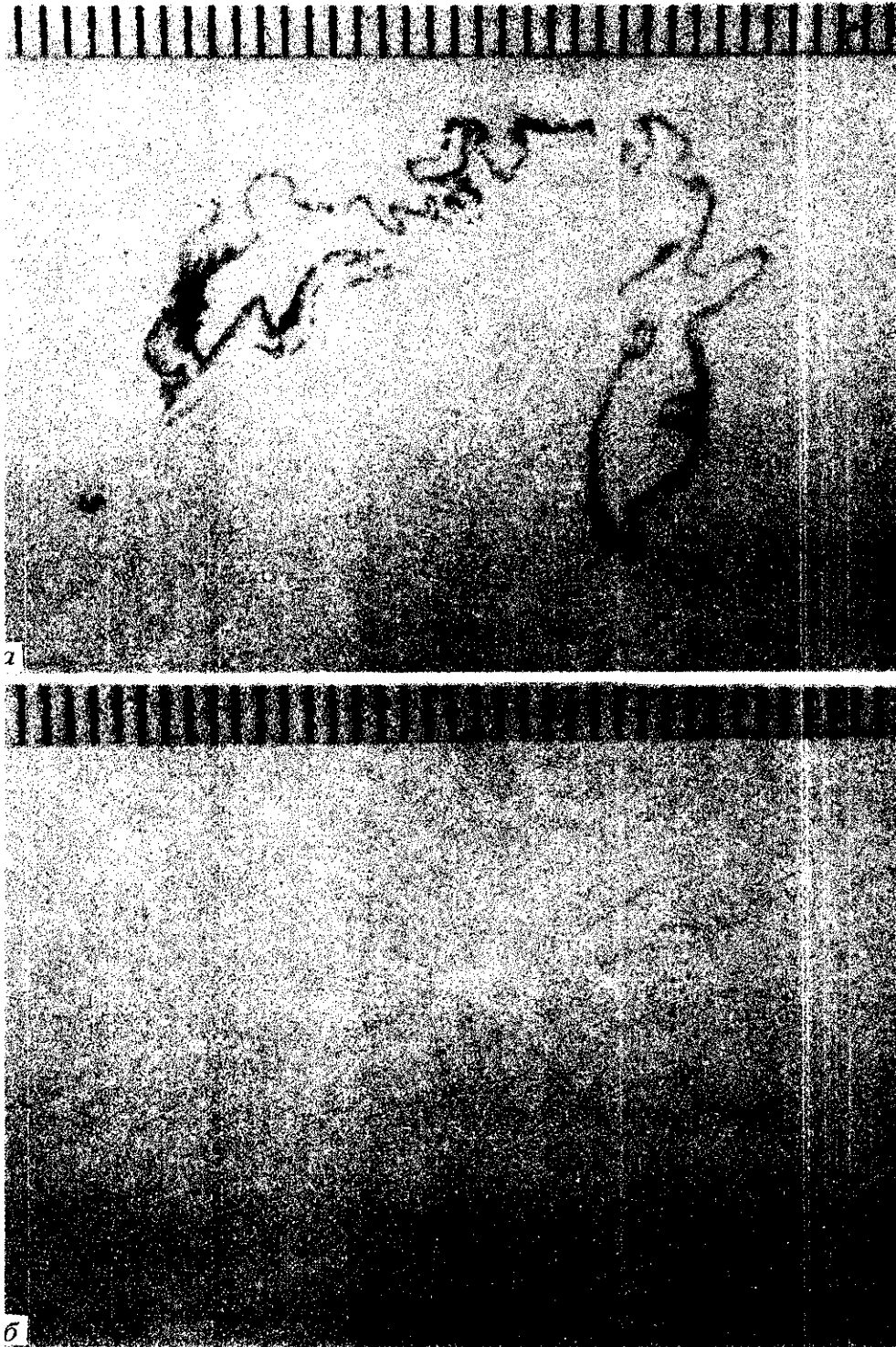


С4 транскрипту в кон'юнктиві ока людини при сильнішому збільшенні: *a* — локалізація зору відповідає темним гранулам активованого срібла; *b* — в темному полі зору, інтенсивність відповідає MUS4 мРНК. Шкала виміру відповідає 10 мкм

ВІВЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ СЕКРЕТОРИХ МУЦІН



а) експресії MUC5AC в базальному шарі кон'юнктивального епітелію; а --- аналітичний сигнал; б --- в темному полі зору (яскраві гранули срібла --- позитивні)



4. Наявність позитивного гібризаційного сигналу для MUC4 і MUC5AC в тонкому кишечнику лено поле зору. Шкала виміру в мм



налу.

Варто також відзначити, що інтенсивність сигналу MUC4 була в кілька разів сильнішою у порівнянні з сигналом при гібридизації з міченою пробкою MUC5AC. Позитивний гібридизаційний сигнал, отриманий при мікроскопії в темному і освітленому полях зору, повністю збігається.

Тканини бронхів і трахеї людини, в яких високий рівень експресії MUC4 і MUC5AC продемонстровано в попередніх дослідженнях, було використано як позитивний контроль роботи методу. На рис. 4, а і б, показано специфічне зв'язування мічених проб MUC4 і MUC5AC до епітеліальних тканин тонкого кишечника і бронхів відповідно.

Додавання 50-разового надлишку немічених MUC4 і MUC5AC олігонуклеотидів до відповідних гібридизаційних проб призводило до повного зникнення позитивного сигналу. Конкурентне витіснення мічених проб багаторазовим надлишком немічених олігонуклеотидів підтвердило специфічність гібридизаційного сигналу.

Результати даного дослідження показали, що серед восьми відомих на сьогодні секреторних муцинів лише MUC4 і MUC5AC експресуються в епітелії кон'юнктиви ока людини. Можна припустити, що MUC4 і MUC5AC беруть участь у формуванні і стабілізації мукози кон'юнктиви ока, а також слъзової плівки. В подальшому було б цікаво проаналізувати експресію секреторних муцинів за патогенних станів, які призводять до запальних процесів кон'юнктиви, а також до появи симптому сухого ока. Відомо, що зволоження і захист епітеліальних клітин кон'юнктиви від патогенних факторів входить до функції секреторних муцинів.

И. И. Гут, Р. Эллингем, Д. Исти, Г. С. Семенова

Изучение экспрессии секреторных муцинов в конъюнктиве глаза человека

Резюме

В работе исследована экспрессия секреторных муцинов (MUC2—9) в конъюнктиве глаза человека. Применяя метод гибридизации *in situ* со специфическими олигонуклеотидными пробками, выявлена экспрессия только двух секреторных муцинов (MUC4 и MUC5AC) в эпителиальном слое конъюнктивы. Экспрессия MUC4 транскрипционной РНК, имеющая гомогенный характер распределения, отмечена во всех слоях сквамозного эпителия. В отличие от MUC4, MUC5AC экспрессируется только в базальном слое конъюнктивы и ему присуще распределение в виде пятен. Основываясь на данных по изучению функции секреторных муцинов в других тканях, можно предположить, что MUC4 и MUC5AC играют важную роль в формировании и стабилизации мукозы, которая питает, увлажняет и защищает эпителиальные клетки конъюнктивы от патогенных факторов и вредных воздействий окружающей среды.

I. I. Gut, P. Ellingham, D. Easti, G. S. Semenova

Study of expression pattern of mucin genes in human conjunctiva

Summary

The expression pattern of mucin genes in human tissues has been the subject of intensive research in recent years. Different methods were used to accomplish this aim, including Northern and Western blot analysis, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and *in situ* hybridization. The aim of this study was to assess the expression of mucin genes in human conjunctiva, using the *in situ* hybridization technique with specific oligonucleotide probes. The results demonstrate expression of MUC4 and MUC5AC genes in the epithelial layer of the conjunctiva. The importance of these mucins in the function of the preocular mucus layer and in tear film formation remains to be elucidated. Based on their known function in other human tissues, one can suggest that they may play an important role in stabilising and maintenance of the preocular mucus layer.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Gendler S. J., Spicer A. P. Epithelial mucin genes // *Annu. Rev. Physiol.*—1995.—57.—P. 607—634.
- Van Klinken B., Dekker J., Buller H. A., Enerhand A. Mucin gene structure and expression: protection vs expression // *Amer. J. Physiol.*—1995.—32.—P. 613—627.
- Gum J. R. Mucin genes and the proteins they encode: structure, diversity, and regulation // *Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol.*—1992.—7.—P. 557—564.
- Carraway K. L., Hull S. R. O-glycosylation pathway for mucin type glycoproteins // *BioEssays.*—1989.—10.—P. 117—121.
- Gendler S. J. Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumour-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium // *Proc. Nat. Acad. Sci USA.*—1987.—84.—P. 6060—6064.
- Gum J. R., Hicks J. W., Toribara N. W. et al. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA // *J. Biol. Chem.*—1994.—269, N 4.—P. 2440—2446.
- Dufosse J. Degenerate 87-base-pair tandem repeats create hydrophilic/hydrophobic alternating domains in human mucin peptides mapped to 11p15 // *Biochem. J.*—1993.—293.—P. 329—337.
- Bobek L. A., Tsai H., Biesbrock A. R., Levine M. J. Molecular cloning, sequencing, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7) // *J. Biol. Chem.*—1993.—268.—P. 20563—20569.
- Gum J. R. Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism // *Ibid.*—1990.—264.—P. 6480—6487.
- Guyonnet-Duperat V. Characterization of the human mucin gene MUC5AC: a consensus cysteine-rich domain for 11p15 mucin genes // *Biochem. J.*—1995.—305.—P. 211—219.
- Gum J. R. Molecular cloning of cDNAs derived from a novel human intestinal mucin gene // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1990.—17.—P. 407—415.
- Toribara N. W. Human gastric mucin identification of a unique species by expression cloning // *J. Biol. Chem.*—1993.—268.—P. 5879—5885.
- Crepin M., Porchet N., Aubert J. P., Degand P. Diversity of the peptide moiety of human airway mucins // *Biorhology.*—1991.—27.—P. 471—484.
- Shankar V., Gilmore M., Elkins R., Sachdev G. Novel human airway mucin cDNA encodes a protein with unique tandem-repeat organisation // *Biochem. J.*—1994.—300.—P. 295—298.
- Porchet N. Molecular cloning and chromosomal localization of

- a novel tracheo-bronchial mucin cDNA containing tandemly repeated sequences of 48 basepairs // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1991.—175.—P. 414—422.
16. *Ho S. B., Niehans G. A., Lyfjotgt C. et al.* Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues // *Cancer Res.*—1993.—53.—P. 641—651.
  17. *Rose M. C.* Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases // *Amer. Physiol. Soc.*—1992.—263.—P. 1413—429.
  18. *Hilkens J., Ligtenberg M. J., Vos H. L., Litvinov S. Y.* Cell-membrane associated mucins and their adhesion modulating property // *Trends Biochem. Sci.*—1992.—17.—P. 359—363.
  19. *Sheehan J. K., Oates K., Carlstedt I.* Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins // *Biochem. J.*—1986.—239.—P. 147—156.
  20. *Parry G., Beck J. C., Moss L. et al.* Determination of apical membrane polarity in mammary epithelial cell cultures: the role of cell-cell, cell-substratum, and membrane-cytoskeleton interaction // *Exp. Cell Res.*—1990.—188.—P. 302—311.
  21. *Braga V. M., Pemberton L. F., Duhig T., Gendler S. J.* Spacial and temporal expression of an epithelial mucin, MUC1, during mouse development // *Development.*—1992.—115.—P. 427—437.
  22. *Parry G.* Studies of MHC 1 mucin expression and polarity in the mouse mammary gland demonstrate developmental regulation of MHC 1 glycosilation and establish the gormonal bases for mRNA expression // *J. Cell Sci.*—1992.—101.—P. 191—199.
  23. *Gum J. R.* Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism // *J. Biol. Chem.*—1990.—264.—P. 6480—6487.
  24. *Lalani E. N.* Expression of the gene encoding for a human mucin in mouse mammary tumour cells can effect their tumorigenicity // *Ibid.*—1991.—266.—P. 15420—15426.
  25. *Lan M. S., Surinder K. B., Qi W. N. et al.* Cloning and sequencing of a human pancreatic tumour mucin cDNA // *Ibid.*—1990.—265.—P. 15294—15299.
  26. *Davine P. L., McKenzie F. C.* Mucins: structure, function, and association with malignancy // *BioEssays.*—1992.—14.—P. 619—625.
  27. *Audie J. P.* Expression of human mucin genes in respiratory, digestive and reproductive tracts ascertained by the in situ hybridization // *J. Histochem. and Cytochem.*—1993.—41.—P. 1479—1485.
  28. *Dohrman A.* Distribution of lysozyme and mucin (MUC2 and MUC3) mRNA in human bronchus // *Exp. Lung Res.*—1994.—20, N 4.—P. 367—380.
  29. *Dilly P. N.* Structure and function of tear film // *Lacrimal gland, tear film, and dry eye syndromes* / Ed. D. A. Sullivan.—New York: Plenum press, 1994.—P. 239—247.
  30. *Gipson I. K.* Characteristic of glycoproteins in the ocular surface glycocalyx // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*—1992.—33, N 1.—P. 218—227.
  31. *Watanabe H.* Human corneal and conjunctival epithelia produce a mucin-like glycoprotein for the apical surface // *Ibid.*—1995.—36.—P. 337—344.
  32. *Hazlett L. D.* Corneal and ocular surface histochemistry // *Progr. Histochem. and Cytochem.*—1993.—25, N 3.—P. 1—60.
  33. *Inatomi T., Spurr-Michoud S., Tisdale A. S., Gipson I. K.* Human corneal and conjunctival epithelia express MUC1 mucin // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*—1995.—36, N 9.—P. 1818—1827.
  34. *Wilkinson D. G.* *In situ* hybridization: a practical approach in the principal approach series / Ed. D. Rickwood.—Oxford: Univ. press, 1994.