

Retinal Helix Pomatia Lektin Bağlanma Alanları: Altın İşaretleme İle Ultrastrüktürel İnceleme

Tongalp H. TEZEL*, Gülgün TEZEL*, İlhan GÜNALP", Ayse ŞEFTALİOĞLU**

ÖZET

Retina hücrelerinin fizyolojik işlevlerini yürütebilmeleri ve değişik patolojilerde oynadıkları rolün belirlenmesi hücre içi, hücre membranı ve hücreler arası matrikstekki glikoproteinler ve glikolipidler aracılığı ile olmaktadır. Hücre içi ve dışı ortamlarda bulunan bu moleküllerin tanınması içerdikleri oligosakkaridlere özgül bağlanabilen ve lektin olarak adlandırılan değişik glikoproteinlerle sağlanmaktadır. Bu çalışmada memelilere örnek olan şinşilla cinsi tavşanda retinadaki terminala-N-Asetil D-galaktozamin bağlanma alanlarının dağılımı Helix pomatia lektin ve altın işaretleme yöntemi ile ince yapı düzeyinde araştırıldı. Fotoreseptör dış segment plasma ve disk membranları ile fotoreseptörler arası matrikste Helix pomatia lektin ile işaretli altın partikülleri gözlemlendi. Bunlara ek olarak sinir lifleri katındaki akson kesitleri ile retina pigment epiteli lizozomlarında ve Bruch membranının iç ve dış kollajen katlarında terminala-N-Asetil D-galaktozamin bulunduğu belirlendi. Bu veriler oligosakkarid yan zincirlerinde terminala-N-Asetil D-galaktozamin içeren bileşiklerin, retina pigment epiteli ile fotoreseptörler arasındaki ilişkinin sağlanmasında ve fotoreseptör dış segment membranlarının yenilenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmekteydi.

Anahtar Kelimeler: Histokimyasal inceleme, Helix pomatia lektin, Altın işaretleme, Retina, Elektron mikroskopi

T Klin Oftalmoloji 1994; 3: 95-100

SUMMARY

HELIX POMATIA LECTIN BINDING SITES IN RABBIT RETINA: AN ULTRASTRUCTURAL STUDY WITH GOLD LABELING

The glycolipids and glycoproteins in the membrane, intracellular and extracellular compartments of the retinal cells participate in their normal physiologic processes and various pathologic responses. Lectins are proteins that has remarkable specificity for certain haptane sugars that constitute a part of these molecules. In this study the distribution of a-N-Acetyl D-galactosamine in the mammalian retina was investigated by using Helix pomatia lectin in the rabbit retina. This investigation was carried by gold labeling method at the ultrastructural level. Gold particles were found scattered on the photoreceptors outer segment plasma and disc membranes, as well as on the interphotoreceptor matrix. They also appeared to be distributed in the axons of the nerve fiber layer, lysosomes of the retinal pigment epithelial cells and the inner and outer collagenous layer of the Bruch's membrane. The identification of the sites of a-N-acetyl D-galactosamine residues suggested that they may play a role in the recognition processes between phagocytic pigment epithelium cells and the photoreceptors, as well as in the renewal of the disc membranes.

Key Words: Cytochemistry, Helix pomatia lectin, Gold labeling electron microscopy

Turk J Ophthalmol 1994, 3: 95-100

Geliş Tarihi: 2.8.1993

Kabul Tarihi: 2.9.1993

Giriş

* Op.Dr.Ankara Numune Hast. 2. Göz Kli. Başasıstani

** Prof.Dr.Ankara ÜTF Göz Hastalıkları ABD,

*** Prof.Dr.Hacettepe ÜTF. Histoloji-Embriyoloji ABD, ANKARA

Hücre membranında ve hücreler arası boşlukta bulunan protein ve lipidler doğal şekerlere bağlı olarak bulunurlar. Glikolipid ve glikoprotein olarak adlandırılan



Şekil 1. Tavşan tip 1 fotoreseptörlerinin dış segment plasm ve disk membranlarında lektin-altın bileşimi ile işaretlenme izlenmektedir. Fotoreseptörler arası matrikste ve retina pigment epitelini apikal yüzüne yakın lizozomun içinde de (yıldız) aynı işaretlenme görülmektedir.

bu moleküler bileşimlerin hidrofilik olan oligosakkarid parçaları hücre membranlarından hücreler arası boşluğa doğru uzanır (1). Bu özelliğinden dolayı, hücrelerin normal işlevleri ve patolojik cevaplarının düzenlenmesinde rol oynayan membran glikoprotein ve glikolipidlerinin, bu işlevlerini hücre dışı ortama uzanan oligosakkaridler aracılığı ile gerçekleştirdiği kabul edilmektedir. Bu oligosakkaridler aracılığı ile gerçekleştirilen hücre işlevleri arasında hücrenin gelişimi, çoğalması, çevresindeki hücreleri tanınması, immünolojik yanıt verebilmesi, kontakt inhibisyon, sinaptik işlev yapabilmesi ile dış toksin ve hormonlara yanıt verebilmesi sayılabilir (2).

Glikoproteinlerin histolojik olarak belirlenmesi, bu moleküllerin değişik yapıdaki oligosakkaridlerine özgül bağlanabilen ve çoğu bitkisel kaynaklı olan protein problemlerin kullanılması ile sağlanmıştır. Lektin adı verilen bu karbohidratlara özgül proteinler kullanılarak yaklaşık son 10 yıldır memeli retinasında kon ve rodların hücre içi ve hücre dışı ortamlarında glikoprotein dağılımının farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir (3-7).

Bu çalışmalarda, daha kesin yorumlar yapabilmek için lektin bağlanma alanlarının kesinlikle belirlenmesi gerekmektedir. Ne var ki, ışık mikroskopi düzeyinde yapılan çalışmalar hem çözünürlük açısından hem de lektinlerin hücre içi bağlanma alanlarının belirlenmesi açısından yetersiz kalabilmektedir (8).

Biz de bu çalışmada tavşan retinasında, indirgenmemiş a-N-Asetil D-galaktozamin (a-GalNAc) içeren

glikoprotein ve glikolipid dağılımını Helix pomatia lectin kullanarak araştırdık. Bu incelemede terminal a-N-Asetil D-galaktozaminin retinadaki lokalizasyonunu daha kesin olarak belirlemek amacıyla ince yapı düzeyinde altınla işaretleme yöntemini kullandık.

Gereç ve Yöntem

Dokunun Hazırlanması

Bu çalışmada memeli retinasına örnek olarak şingilla cinsi pigmentli erişkin erkek tavşan retinası kullanıldı. Bu çalışmanın planlanmasında ve deney hayvanına uygulanan tüm işlemlerde Helsinki Deklarasyonu kararlarına uyuldu (9). Denek tavşan intraperitoneal olarak uygulanan üretan (1 grm/kg) ile derin anestezi altındayken her iki gözü enüklüe edildi ve yüksek doz intravenöz pentobarbital verilerek öldürüldü. Enükleasyonun hemen sonrasında glob ora serrata hizasından koronal düzlemde kesildi; lens ve vitreus boşaltıldı. Fosfat tampon solüsyonu (PBS) (pH:7.4) içinde hazırlanan %0.5 glutaraldehit ile oda sıcaklığında 2 saat tesbit edildikten sonra retinanın değişik bölgelerinden diseksiyon mikroskopi (Olympus Co., Japan) altında 2x3 mm.'lik doku parçaları hazırlandı. Elde edilen doku parçaları fosfatla tamponlanmış salin (PBS) ile yıkandı ve serbest aldehit gruplarının bloklanması amacıyla 0.5 M NH₄Cl ile oda sıcaklığında inkübe edildi. %30, %50, %70 ve %90'lık etanol alkol solüsyonlarında 10'ar dakika geçirilerek dehidratasyon sağlandı. Dehidrate edilen doku örnekleri Agar resin 100 gömme materyali içine gömüldü.

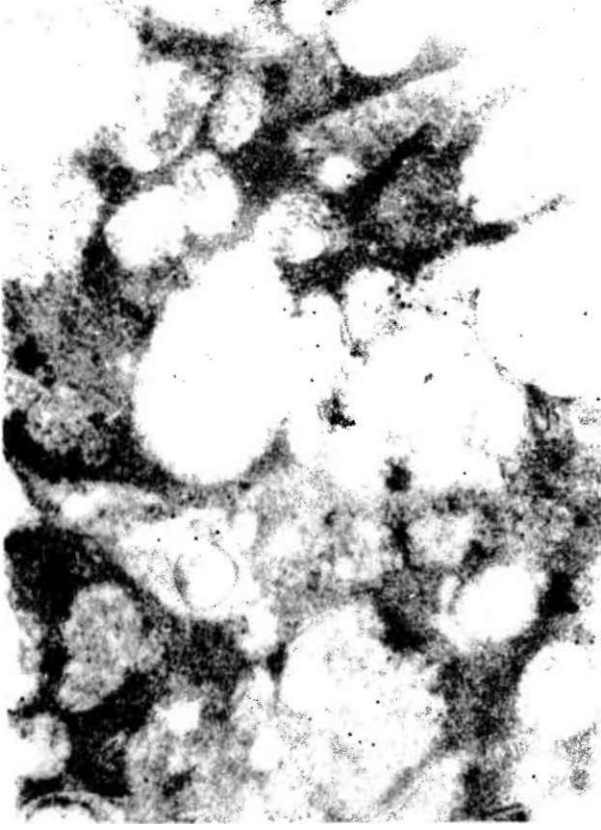
Altın İle İşaretleme Yöntemi

Bu çalışmada Montreal Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Bölümü Öğretim Üyesi Sn.Dr.Frederick W.K. KAN tarafından temin edilen Helix pomatia lektin altın bileşimi kullanıldı.

Gömme materyali içindeki dokudan cam bıçakla elde edilen ince kesitler (LKB-Ultratome III, 8300, Bromma, Sweden) pariodion-carbon kaplı nikel grid'lere alındı. Direkt bağlama işlemi oda sıcaklığında gerçekleştirildi. İnce kesitler 5 dakika süre PBS ile yıkandı. Bunu takiben doku örnekleri 60 dakika süre ile 3:1 oranında PBS ile dilüe edilen %0.02'lik Helix pomatia- lektin altın karışımı ile inkübe edildi. PBS ve distile su ile yıkanan kesitler %3 uranyl asetat (7 dakika) ve kurşun sitrat (7 dakika) ile boyandı. Elde edilen tüm örnekler Carl Zeiss EM 9 S-2 transmission elektron mikroskop altında incelendi. Elektron mikrofotografları ise EM (Ilford Ltd., Mobberley Cheshire) film kullanarak elde edildi ve fotoğrafların banyosu için D-19 siyah-beyaz banyo, baskılar için de 3 numara Brovira BN1 (Agfa-Gevaert, Leverkusen) kart kullanıldı.

Haptenik Oligosakkarid ile İnhibisyon

Kullanılan lektinlerin reseptörlere olan ilgisi haptenik oligosakkaridden çok daha fazla olduğu için (2) kontrol doku örneklerinde inhibisyon amacıyla yüksek dozda (0.1 mol/L) a-GalNAc (Sigma, St. Louis, MO) kullanıldı. Helix pomatia lectin gold kompleksi haptenik



Şekil 2. Sınır lifleri tabakasındaki akson kesitlerinde altın partikülleri izlenmektedir.

oligosakkarid ile 30 dakika süre inkübe edildi ve retinal doku kesitleri yukarıda anlatıldığı şekilde kontrol bağlanma işlemine alındı.

Sonuçlar

Helix Pomatia Lektin İle Bağlanma

İncelenen doku örneklerinde iki ana tip fotoreseptör hücresi izlenmekteydi. Bunlar, sayıca çok daha fazla olan ve dış segmentlerinin ince ve uzun olmasıyla ayırd edilebilen rodlarla, dış segmentleri kısa, iç segmentleri uzun kon analoğu Tip 2 fotoreseptörlerdi (10). Her iki tip fotoreseptör hücrenin de dış segment plasm ve disk membranları ile dış segmentlerini çevreleyen fotoreseptör arası matrikslerinde Helix pomatia lektine bağlı altın partikülleri gözlenmekteydi (Şekil 1). Fotoreseptörlerin iç segmentlerinde, dış pleksiform, iç nükleer kat ve ganglion hücreleri tabakasında altın partikülleri gözlenmezken, sinir lifleri katındaki akson kesitlerinde altın partikülleri ile işaretlenme saptandı (Şekil 2). Retina pigment epitelii lizozomları ile bazal yüz katlantıları arasında ve ayrıca Bruch membranının iç ve dış kollajen katlarında da altın partikülleri ile işaretlenme izlenmekteydi (Şekil 3,4).

Haptenik Oligosakkarid ile İnhibisyon

Altın ile işaretleme işlemi öncesi haptenik şekerle inkübe edilen lektin-altın kompleksleri ile boyanan preparatlarda altın partikülleri izlenmemekteydi.

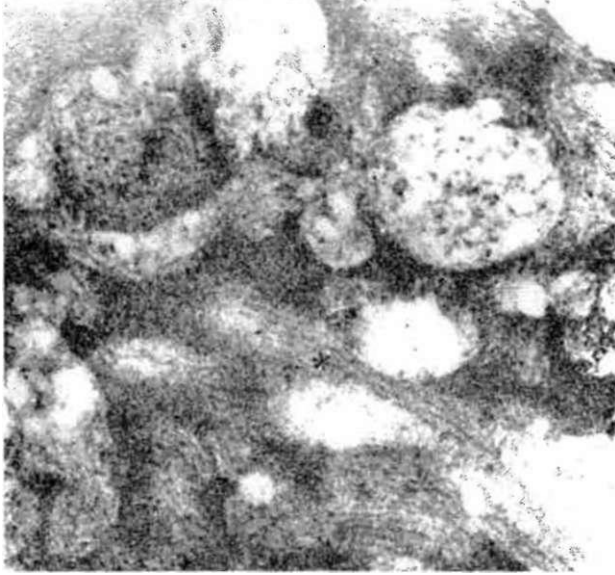
Tartışma

Değişik karbohidrat gruplarını bağlayabilen, multivalent, immünglobülin dışı ve çoğu bitki kökenli moleküler olarak tanımlanan lektinlerin günümüzde omurgalı dokularında da bulunabildiği saptanmıştır (11). Günümüzde lektin kapsamına giren moleküllerin sayısı giderek artmakta ve fibronektin gibi karbohidratları bağlayabilen memelilere özgü birçok endojen molekül de bu grubun üyesi olarak kabul edilmektedir (12). Bu grup moleküllerin hücre yüzeyinde tanıdığı oligosakkarid yan zincirlerinin, hücrelerin gelişmesi, farklılanması ve değişik patolojilere yanıt vermesinde, biyolojik bilgilerin kodlanarak iletilmesinde önemli bir işlevi olduğu kabul edilmektedir. Bu yüzden, lektinler ve tanıdıkları hücre içi ve dışı reseptörler ile ilgili çalışmalar giderek önem kazanmaktadır (13).

Lektin reseptörlerinin tanınması için şimdiye kadar ışık mikroskobu düzeyinde kullanılan floresans veya peroksidaz gibi işaretleme yöntemleri (3,4,5,7) ile hücre içi dağılımı tam olarak değerlendirilememektedir. Bizim uyguladığımız altın bağlama yöntemi ile ise, bu reseptörlerin kesin lokalizasyonu ince yapı düzeyinde tanımlanabildiği gibi, kantitatif olarak da değerlendirilebilmektedir (8).

Yılan albumin glandından elde edilen Helix pomatia lektin 79,000 Dalton; molekül ağırlığında bir glikoproteindir (14,15). Terminal a-N-Asetil D-galaktoz-amini özgül olarak tanıyabilen bu molekül insan Tip A eritrositlerini agglütine edebilmekte; değişik dokuların gelişimini incelemek amacıyla kullanılmakta ve lenf nodu, deri, akciğer (15) ve meme kansinomlarının (16) ayırıcı tanı ve prognozlarının belirlenmesinde yardımcı olmaktadır.

Bu çalışma ile memeli retinasında Helix pomatia lektin kullanarak terminalinde a-N-Asetil D-galaktozamin içeren oligosakkaridlerin varlığı ve yerleşimi saptanmıştır. Fotoreseptörler arası mat-rikste saptadığımız nispeten zayıf işaretlenmenin nedeni a-N-Asetil D-galaktoz-amini bu alanda az miktarda olmasının yanısıra, Helix pomatia'nın benzer molekülleri de zayıf olarak bağlayabilmesidir (17). Değişik memeli türlerinde fotoreseptör arası matriksin en önemli bileşeni olarak bildirilen kondroitin sülfatın içerdiği p-N-Asetil D-galaktozamin bu işaretlenmeye neden olabilir (18,19). Bu tip çapraz işaretlenmeler olmasına karşın galaktoz ve a-N-Asetil D-galaktozamin gruplarının lektin-altın bileşimi ile işaretlenmesinin diğer sakkarid gruplarminkine oranla daha güvenilir olduğu da bilinmektedir (17). Öte yandan kondroitin sülfat içerdiğini bilmemize rağmen (20), Bruch membranında gözlediğimiz işaretlenmeyi bazal membranların ağırlıkça %1'ini oluşturan glikozaminoglikanlarla açıklamak mümkün değildir (21). Bu bölgedeki işaretlenmenin nedeni retina pigment epiteininin, fagositlediği ve tam sindiremediği fotoreseptör dış segment atıklarını Bruch membranına yığması olabilir (22). Fotoreseptör dış segmentlerinde gözlediğimiz işaretlenmenin, pigment epitel lizozomları ve bazal yüz katlantıları ile Bruch membranında da olması, fagositoz — sindirim → atıkların hücre dışına yığılması şeklindeki fizyolojik aksın geçerliliğini göstermektedir. Nitekim, bu



Şekil 3. Yüksek büyütmede retina pigment epitelii lizozomları içinde fagosite edilmiş dış segmenti fragmanlarına ait lektin-altın bileşimi ile işaretlenme. Hücre sitozolünde görülen altın partikülleri ise hücre içi ara filamanlarla ilintilidir (yıldız).

atıkların lipid yapılarının fotoreseptör dış segmenti ile tıpatıp uyum göstermesi de (23), her iki işaretlenmenin fotoreseptör dış segmentinde aynı molekül gruplarına ait olduğuna işaret etmektedir.

Memeli modeli olarak seçilen tavşan retinasında baskın olan fotoreseptör tipi rodlardır. Ayrıca, kon analogu olarak kabul edilen, az sayıda, ikinci bir tip fotoreseptör hücrelerinin de bulunduğu bilinmektedir (10). incele yapı düzeyinde morfolojik olarak ayırd edilen bu iki tip fotoreseptör hücrenin diğer birçok (ektini bağlama özellikleri farklı olmasına rağmen (24), bu çalışmada Helix pomatia lektin bağlanma özellikleri açısından bir farklılık gözlenmemiştir. Dikkati çeken nokta Helix pomatia lektin bağlanma alanlarının fotoreseptörlerin sadece dış segment plasma ve disk membranlarında sınırlı kalması; buna karşın her iki tip fotoreseptör hücrenin iç segment ve diğer retinal nöronlarda bağlanmanın gözlenmemesidir.

Günümüze dek, retinada terminal a-N-Asetil D-galaktozamin içeren molekül gruplarının tanımlandığına dair bir bulgu mevcut değildir. Saptadığımız a-N-Asetil D-galaktozamin teorik olarak iki ana molekülün yapısı içinde yer alabilir. Bunlar, disk ve plasma membranlarındaki glikolipidler ile glikoproteinlerdir.

Memeli hücre membranlarının yaklaşık olarak %40't, çoğu poler yapıdaki, lipidlerden oluşmaktadır. Bu lipidlerin büyük çoğunluğunu fosfolipidler, çok daha az bir kısmını ise sfingolipidler oluşturur (25). Fotoreseptör dış segment fosfolipidlerinin %42'si fosfatidilkolin, %38'i fosfatidiletanolamin ve %16'sı fosfatidilserin oluşturur (26). Bunların dışında az oranda fosfatidik asid, fosfatidilinozitol, lizofosfatidilkolin, lizofosfatidiletanolamin ve kardiolipin gibi diğer fosfolipidler ile sfingomyelin, gangliozid, kolesterol, diasilgliserol, triasilgliserol ve mono-

asilgliserol de bulunmaktadır (27-29). Bu lipidlerin içerdiği oligosakkarid gruplarının genellikle glukoz, galaktoz ve N-asetil glukozamindert oluştuğu belirlenmiştir. Bazı fosfolipidler, gangliozidler ve nötral glikosfingolipitlerde saptanabilen N-Asetil D-galaktozaminin ise sıklıkla tabağı ile oligosakkarid halkasına tutunduğu bilinmektedir (25). Dolayısıyla, altın işaretleme ile saptadığımız o-N-Asetil D-galaktozamin gruplarının membran glikolipidlerine ait olma olasılığı düşüktür.

Fotoreseptör dış segmentlerinde bulunan glikoproteinlerin %85,95'ini rodopsinin oluşturduğu bilinmektedir (30). Her ne kadar bazı otörlerce Helix pomatia lektinin tanıdığı oligosakkarid spektrumunun sanıldığından geniş olduğu öne sürülmeğe de (17), rodopsinin iki yan karbohidrat halkasındaki terminal mannozil ve N-Asetilglukozamin grupları bu spektruma girmemektedir (31). Bu durumda gözlediğimiz karbohidrat gruplarının, fotopigmentlerin aksine, her iki tip fotoreseptörde dağılım açısından farklılık göstermeyen, sitogenetik olarak hücre tipine göre farklılaşmamış bir proteine ait olduğu kanısı uyanmaktadır. Aynı lektin-altın komplekslerinin retina pigment epitel lizozomlarında da gözlenmesi (Şekil 2,4), disk membranları ile birlikte fagosite edilen yapısal bir proteine ait oligosakkarid zincirine ait olma olasılığını kuvvetlendirmektedir. Nitekim daha önceki çalışmalarda, retina pigment epitel lizozomlarında N-Asetil D galaktozaminin saptanması, fagosite edilen dış segment fragmanları içinde N-Asetil D-galaktozamin bulunduğunu destekler indirekt bir kanıt niteliğindedir (32).

Son yıllarda Helix pomatia lektin ile değişik hücre modellerinde yapılan çalışmalarda, bu lektinin hücre yüzeyinde tanıdığı reseptörlerin, hücrenin iskeletini oluşturan yapısal proteinlerdeki değişiklikleri kontrol edebildiği kanısı uyanmıştır (15,33). Özellikle retina pigment epiteli ve kornea endoteli gibi oküler dokulara ait hücrelerin sitoplazmik filaman organizasyonunda belirgin değişiklikler gerektiren migrasyon, proliferasyon, fagositoz gibi işlevleri esnasında hücre yüzeylerinde N-Asetil D-galaktozamin reseptörleri belirgin biçimde artmaktadır (34,35). Bununla uyumlu olarak, retina pigment epiteli kesitlerinde hücre içi ara filamanların çevresinde altın partikülleri gözlememiz (Şekil 3) hücre içi iskeleti belirleyen protein çatı içindeki moleküllerin a-N-Asetil D-galaktozamin içerdiklerini göstermektedir. Benzer şekilde, dış segment plasma membranına yerleşik, N-Asetil D-galaktozamin içeren bir ya da birkaç değişik molekül grubu endojen lektinlerden gelecek uyarılar doğrultusunda hücre içi iskeletinin reorganizasyonunda rol alabilir. Önceleri dış segmentlerinde sitoskeletal elemanların olmadığı düşünülen fotoreseptörlerin, son yıllarda bu bölgede aktin, myosin ve kalmodülinden oluşan bir iskelet yapısına sahip oldukları gösterilmiştir (36). Bu iskeletin, dış segmentin ışığın geliş yönündeki oriyantasyonu ile ilgili olduğu (37) göz önüne alınırsa, N-Asetil D-galaktozamin içeren glikoprotein gruplarının bu işlevde rol oynayabileceği akla gelmektedir.

Son derece düşük yoğunlukta bulunmaları ve elde edilmelerindeki teknik zorluk, nedeniyle rodopsin dışındaki fotoreseptör dış segment disk proteinlerinden he-



Şekil 4. Bruch membranının iç ve dış kollajen zonunda alfm partikülleri görülmektedir. Aynı işaretlenme pigment epitelin bazal yüz katlantıları arasında da görülmektedir.

nüz fosfodiesteraz ve transducin gibi birkaç enzim tanımlanmıştır. Plasma membranlarına ek olarak dış segment disk membranları üzerinde gördüğümüz işaretlenmeden sorumlu molekül grubunun niteliği henüz bilinmemektedir. Diğer hücre modellerinde, hücre sitoplazmasındaik Helix pomatia lektinin bağlanma alanlarından hücrenin protein çatısına a-bağı ile tutunan N-Asetil Galaktozamin sorumlu tutulmuştur (38). Yaklaşık 1000'er disk içeren memeli fotoreseptör dış segmentlerinde bu disklerin son derece düzgün ve sıralı olarak bir arada tutulabilmesi bu kompartmanlarda çok iyi organize olmuş bir protein iskeletin varlığına işaret etmektedir. Nitelik, kimyasal yapısı henüz aydınlatılmamış olmakla beraber, diskleri düzgün bir biçimde birbirlerine ve plasma membranına bağlayan filamentöz yapıların varlığı bildirilmiştir (39). Disk membranları üzerinde gözlediğimiz Helix pomatia lektin bağlanma alanlarının, retina dışı hücre modellerindeki protein çatı analogu olan, bu filamanlara ait olabileceği kanısındayız.

Galaktoz içeren karbohidrat gruplarının rol oynadığına inanılan bir diğer hücre işlev de retina pigment epitelinin, fotoreseptör dış segmentlerini fagositodur. Retina pigment epiteli tarafından fagositlenecek olan dış segment fragmanlarında öncelikle plasma ya da disk membranlarındaki karbohidrat zincirlerinden terminal sialik asit halkaları ayrılmakta ve galaktoz grupları açığa çıkmaktadır. Bu ise yaşlanmış eritrositlerin retikuloendotelial sistemde fagosite edilmelerine benzer bir mekanizma ile, retina pigment epitelinin dış segment fragmanını fagosite etmesi için bir sinyal görevi görmektedir (40,41).

Teorik olarak eskiyen ve dolayısı ile fagosite edilmesi gereken dış segmentlerde yukarıda anlatılan galaktozun açığa çıkma mekanizmasında bozukluk olursa, fagositlenmeyen dış segmentlerin birikmesi beklenir. Buna benzer bir patolojik görünüm Royal College of Surgeons (RCS) sıçan distrofi modelinde izlenmektedir. İlginç olan bu modelle yapılan araştırmalarda fagosite edilecek dış segment fragmanlarını tanıyacak retina pigment epitel apikal mikrovillus membranlarında N-Asetil Galaktozaminin protein oligosakkaridlerine bağlanmasında defekt saptanmıştır (42). N-Asetil galaktozaminil transferaz eksikliğinin gözleendiği bu tabloda, saptadığımız N-Asetil galaktozamin gruplarındaki defektin dış segment fragmanlarının fagositoz bozukluğuna katkısı olabilir.

Birbirine komşu iki retinal hücrede sitoplazmik aktin filamanları arasında köprü kurarak hücreleri birbirine bağlayabilen, kalmodülinin işlevini görmesi için N-Asetil galaktozaminofosfortransferaz enzimi gerekmektedir (43,44). Benzer şekilde retina pigment epiteli ve fagositlenecek dış segment fragmanları arasında bağlayıcı rol oynayan ya da oluşacak fagozomu aktin filamanları yoluyla hücre içine alacak sistemin N-Asetil galaktozaminil transferazın varlığında çalışması beklenebilir.

Bu çalışma ile memeli retinasında N-Asetil içeren oligosakkarid gruplarının varlığı ve lokalizasyonu belirlenmiştir. Değişik patolojilerde rol oynayan bu molekül gruplarının ayırd edilebilmesi fotoreseptör-retina pigment epitel ilişkisinin fizyolojisini ve ilgili bozuklukların patogenezisini anlamamıza yardımcı olacaktır.

Kaynaklar

1. Singer SJ, Nicholson GL. The fluid mosaic model of the structure of membranes. *Science* 1972; 175:720-31.
2. Bridges CDB, Fong SL. Use of lectins to investigate photoreceptors membranes. *Methods in Enzymology* 1982; 81:65-76.
3. Takumi K, Uehara F. In vivo lectin-binding of photoreceptors and interphotoreceptor matrix in rat. *Jpn J Ophthalmol* 1991; 35:16-22.
4. Bridges CDB. Agglutination of isolated rod outer segments by lectins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; 20:17-23.
5. Bridges CDB. Lectin receptors of rods and cones. Visualization by fluorescent label. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; 20:8-16.
6. Bridges CDB, Fong S. Different receptors for distribution of peanut and ricin agglutinins between inner and outer segments of rod cells. *Nature* 1979; 282:513-5.
7. Blanks JC, Johnson LV. Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25:546-57.
8. Koide H, Suganuma T, Murata F, Ohba N. Ultrastructural localization of lectin receptors in the monkey retinal photoreceptors and pigment epithelium: application of lectin-gold complexes on thin sections. *Exp Eye Res* 1986; 43:343-54.

9. Recommendations from the declaration of Helsinki, *Curr Eye Res* 1993; 12:96.
10. Bunt AH. Fine structure and radioautography of rabbit photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978; 17:90-104.
11. Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N, Letter. *Nature* 1985; 285:66
12. Gabius HJ. Detection and functions of mammalian lectins with emphasis on membrane lectins. *Biochemica et Biophysica Acta* 1991; 1071:1-18.
13. Harrison FL. Soluble vertebrate lectins: ubiquitous but inscrutable proteins. *J Cell Sci* 1991; 100:9-14.
14. Hammarstrom S. Snail (*Helix pomatia*) hemagglutinin. *Methods in Enzymology* 1972; 28:368-83.
15. Kawai T, Suzuki M, Torikata C, Suzuki Y. Expression of blood group-related antigens and *Helix pomatia* agglutinin in malignant pleural mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1991; 22:118-24.
16. Fukutomi T, Itabashi M, Tsuane S, Yamamoto H, Nanasa-wa T, Hiroto T. Prognostic contributions of *Helix pomatia* and carcinoembryonic antigen using histochemical techniques in breast carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 1989; 19:127-34.
17. Kivela T. Characterization of galactose-containing glycoconjugates in the human retina: a lectin histochemical study, *Curr Eye Res* 1990; 9:1195-209.
18. Hageman GS, Johnson LV. Chondroitin 6-sulfate glycosaminoglycan is a major constituent of primate cone photoreceptor matrix sheaths. *Curr Eye Res* 1987; 6:639-46.
19. Hollyfield JG, Varner HH, Rayborn ME, Osterfeld AM. Retinal attachment to the pigment epithelium. Linkage through an extracellular sheath surrounding cone photoreceptors. *Retina* 1989; 9:59-68.
20. Pino RM, Essner E, Pino LC. Location and chemical of anionic sites in Bruch's membrane of the rat. *Cytochem* 1982;30:245-52.
21. Kanwar YS, Farquhar MG. Isolation of glycosaminoglycans (heparan sulfate) from glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979. 76:4493-7.
22. Rungger-Brandle E, Englert U, Leuenberger PM. Exocytic clearing of degraded membrane material from pigment epithelial cells in frog retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28:2026-37.
23. Sheridah G, Steinmetz R, Maguire J, Pauleikhoff D, Marshall J, Bird A. Correlation between lipids extracted from Bruch's membrane and age. *Ophthalmology* 1993; 100:47-51.
24. Kawano K, Uehara F, Sameshima M, Ohba N. Binding sites of peanut agglutinin in mammalian retina. *Jpn J Ophthalmol* 1984; 28:205-14.
25. Lehninger AL. Lipids, lipoproteins and membranes. In: *Biochemistry*, 2nd edition. New York: Worth Publishers, Inc, 1975. 11:279-308.
26. Litman BJ, Methods for determining rod outer segment disk phospholipid transmembrane topology. *Methods in Enzymology* 1982; 81:309-15.
27. Haydee E, De Bazan P, Bazan NG. Lipid synthesis in retinas. *Methods in Enzymology* 1982; 81:788-94.
28. Dreyfus H, Virmaux- Colin N, Harth S, Mandel P. Methods for determination of gangliosides in retinas and rod outer segments. *Methods in Enzymology* 1982; 81:304-9.
29. Andrews LD, Cohen AI. Freeze-fracture studies of photoreceptor membranes: new observations bearing upon the distribution of cholesterol. *J Cell Biol* 1983; 97:749-55.
30. Rohlich P. Photoreceptor membrane carbohydrates on the intradiscal surface of retinal rod disks. *Nature* 1976; 263:789-91.
31. Fliesler SJ. Rhodopsin oligosaccharide structures: the sweeter the better? Italy: Abstracts of X. International Congress of Eye Research, Stresa, 1992: 3.
32. Feeney-Burns L, Berman ER. Methods for isolating and fractionating pigment epithelial cells. *Methods in Enzymology* 1982; 81:95-110.
33. Arena N, Bodo M, Baroni T, Alia FA, Gaspa L, Becchetti E. Effects of lectins on cytoskeleton and morphology of cultured chick embryo fibroblasts. *Cell Mol Biol* 1990; 36:317-28.
34. Gordon SR, Marchand J. Lectin binding sites to injured corneal endothelium mimics patterns observed during development. *Histochemistry* 1990; 94:455-62.
35. Bopp S, El-Hifnawi E, Laqua H. Lektin histochemische untersuchungen des retinalen pigmentepithels bei netzhautablösung. *Klin Mbl Augenheilk* 1990; 197:493-502.
36. Chaitin M, Bok D. EM immunocytochemical localization of actin myosin and calmodulin in mammalian photoreceptors (abstr.) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25:63.
37. Laties A, Liebman P, Campell C. Photoreceptor orientation in the primate eye. *Nature* 1969; 218:172-3.
38. Wu AM, Sugii S. Differential binding properties of GalNAc and/or Gal specific lectins. *Adv Exp Med Biol* 1988; 228:205-63.
39. Usukura J, Yamada E. Molecular organization of the rod outer segment. A deep-etching study with rapid unfixed frog retina. *Biomedical Res* 1981; 2:177-93.
40. Uehara F, Muramatsu T, Sameshima M, Kawano K, Koide H, Ohba N. Effects of neuraminidase on lectin binding sites in photoreceptor cells of monkey retina. *Jpn J Ophthalmol* 1985; 29:54-62.
41. O'Brien PJ. Rhodopsin as a glycoprotein: a possible role for the oligosaccharide in phagocytosis. *Exp Eye Res* 1976; 23:127-37.
42. Clark VM. Normal and dystrophic rat retinal pigment epithelia display different sensitivities to plant lectins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:327-35.
43. Balsamo J, Thiboldeaux R, Swaminathan N, Lilien J. Antibodies to the retina N-acetyl galactosaminyl phosphotransferase modulate N-cadherin-mediated adhesion and uncouple the N-cadherin transferase complex from the actin-containing cytoskeleton. *J Cell Biol* 1990; 113:429-36.
44. Gaya-Gonzales L, Balsamo J Swaminathan N, Lilien J. Antibodies to the retina N-acetyl galactosaminyl phosphotransferase inhibit neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 1991; 29:474-80.