

Fare Retinasında Laminin ve Tip IV Kollajen Dağılımlarının Faz Kontrast, Normanski ve Flüoresan Objektifleri İle Gösterilmesi¹

DEMONSTRATION OF LAMININ AND COLLAGEN IV IMMUNOREACTIVITIES IN MOUSE RETINA BY PHASE CONTRAST, NORMANSKY AND FLUORESCENCE OBJECTIVES

H. Seda VATANSEVER*, V. Sevinç İNAN**, Özcan KAYIKÇIOĞLU***, M. Kemal ÖZBİLGİN*

* Yrd.Doç.Dr., Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD,

** Uz.Dr., Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD,

*** Yrd.Doç.Dr., Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göz Hastahkları AD, MANİSA

Özet

Bazal membranın formasyonu ve çeşitliliği, yapısında bulunan özel proteinleri sayesinde sağlanmıştır. Vücutta geniş bir yayılıma sahip olan bazal membran içerdiği proteinleri sayesinde hücrenin büyümesinde, farklılaşmasında, göçünde ve fonksiyonunda önemli rol oynar. Gözün tabakalarından biri olan retina-da bulunan farklı hücreler ve bazal membran görmede önemli fonksiyonlara sahiptir.

Retina'nın bazal membranının temel yapısını oluşturan laminin ve tip IV kollajen'in dağılımı ve önemini araştırmak amacıyla bu çalışma planlandı. Bu amaçla 6 erişkin fareden alınan gözler % 4 paraformaldehit ile fikse edildikten sonra frozen bloklar hazırlandı. 7 µ alınan kesitler, laminin ve tip IV kollajen antikorları ile anti-rabbit TRITC ikincil antikorunu kullanarak indirekt immünoflüoresans yöntemi ile boyandı. Kesitler Normanski, faz kontrast ve flüoresan objektifleri ile incelendi.

Faz kontrast ve Normanski objektifi ile incelenen retinanın tüm tabakaları kolaylıkla seçiliyordu. Laminin ve kollajen immunoreaktiviteleri retina hücre tabakaları arasında gözlenirken her iki immunoreaktivite arasında bir farklılık bulunamadı.

Her iki bazal membran proteininin retinadaki dağılımlarının benzer olması dolayısı ile retinada, proteinler arasında fonksiyonel olarak farklılık olmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Bazal membran, Retina, Işık mikroskopu

T Klin Tıp Bilimleri 2001, 21:260-263

Summary

Formation and differences of basement membranes has been provided by their structural proteins. Widely distribution of basement membranes in body, play important roles during cell proliferation, differentiation, migration and function via basement membrane proteins. Retina, which is one of the eye layer, have a specific role during vision with consisting of different cells and basement membrane.

This study was planned to investigate of distribution and importance of laminin and collagen IV that are structural proteins of basement membrane in retina. For this reason, eyes which were collected from six adult mouse were fixed with 4% paraformaldehyde and obtained frozen blocks. Sections (7 µ) were stained using indirect immunofluorescence with anti-laminin or anti collagen IV antibodies as a primer antibodies and anti-rabbit TRITC as a secondary antibody. Sections were observed under phase, Normansky and fluorescence objectives.

All layers of retina were detected clearly using both phase and Normansky objectives. Immunoreactivities of both laminin and collagen IV were observed all cell layers of retina and there was no differences of their immunoreactivities.

Our results suggested that function of both proteins in retina was similar because of similar distribution of both basement membrane proteins.

Key Words: Basement membrane, Retina, Light microscopy

T Klin J Med Sci 2001, 21:260-263

Bazal membran endotelial ve epitelial hücreleri sınırlamakla kalmayıp, yağ hücresi, kas hücresi ve periferik sinir hücrelerinin etrafında bulunan bir ekstrasellüler matriks elemanıdır (1). Doku bütünlüğü, dokular arası kompartizasyon ve doku tamirinde görev alması yanında, özel-

likle embriyonik dönemde hücrenin büyümesi, farklılaşması, çoğalması ve göçü gibi bazı temel hücre fonksiyonlarında da önemli rol oynaması araştırmacıların ilgisini çekmiştir (2-4).

Yapısında bulunan özel proteinleri sayesinde bazal membranın formasyonu ve çeşitliliği sağlanmıştır (5). Yapısında birçok proteinden oluşması yanında, temel olarak dört ana proteini vardır. Bunlar laminin, tip IV kollajen, perlekan ve nidogendir. Bu temel proteinlerin birbirleri arasında yaptıkları organizasyonlar sonucu bazal membran meydana gelir (6).

Geliş Tarihi: 18.09.2000

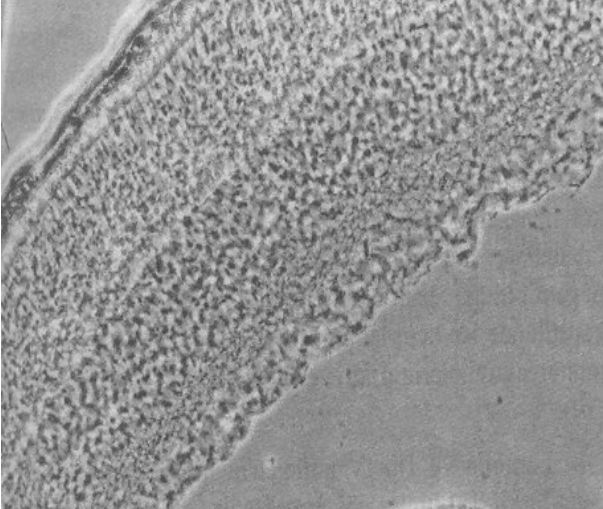
Yazışma Adresi: Dr.H. Seda VATANSEVER
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji AD
Dekanlık Binası, 45020, MANİSA

Laminin ilk olarak EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) tümöründen elde edilmiştir (7). Laminin α , β ve γ olarak adlandırılan üç zincirin birbirleri ile sarmal bir yapı oluşturması sonucunda üç kısa ve bir uzun kol olarak moleküler yapısı oluşur (7). Son yıllarda lamininin bu üç zincirinin farklı tipleri ortaya çıkarılmış ve böylece lamininin farklı formasyonlarının olduğu belirtilmiştir. Halen α zincirinin beş, β incirinin üç ve γ zincirinin de iki tipi bulunmaktadır (8-10). İlk bulunan laminin'e laminin-1 denmiş ve günümüze kadar da bu sayı 11'i bulmuştur (11).

Bazal membranın ikinci temel proteini olan tip IV kollajen ise sadece bazal membran yapısına katılan kollajen tipidir (12) ve vücudun diğer bölgelerinde bulunmamaktadır. $\alpha 1(IV)2\alpha 2(IV)$ moleküler yapıya sahip olan tip IV kollajen'in bazal membran yapısındaki esas görevi diğer bazal membran proteinleri ile bağlanmak ve mekanik olarak stabiliteyi sağlamaktır (12). Charonis ve ark. 1985 yılında in vitro olarak yaptıkları çalışmada tip IV kollajen'nin laminine direkt olarak bağlandığını göstermiş (13) ise de daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar bazal membranın bu iki temel proteini arasında direkt bir bağlanmanın olmadığı, nidogen ve perlekan aracılığı ile indirekt bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (14). Bu çalışmalar sonunda lamininin mi yoksa tip IV kollajen'nin mi bazal membran formasyonunda daha önemli olduğu tartışmaları doğmuş ve çalışmalar bu yönde yoğunlaşmıştır. Bununla beraber son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki özellikle laminin olmadan bazal membran formasyonu gerçekleşmemektedir (15). Gözün tabakalarından biri olan retinada bulunan farklı hücreler ve bazal membran görmede önemli fonksiyonlara sahiptir. Bu çalışmamızda, multi-laminar yapıya sahip retina'da, bazal membranın temel yapısında rol oynayan laminin ve tip IV kollajen'in dağılımının immunohistokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyel ve Metod

Retina'nın bazal membranının temel yapısını oluşturan laminin ve tip IV kollajen dağılımlarını ve önemini



araştırmak amacıyla planlanan bu çalışmamızda 6 erişkin fareden alınan gözler %4 paraformaldehit ile tespit edildikten sonra frozen bloklar OCT gömme materyali kullanılarak -50°C 'de hazırlandı. Kreostat ile alınan $7\ \mu\text{l}$ 'luk kesitler indirekt immunohistokimyasal boyama için hazırlandı.

Öncelikle gömme materyali fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile 30'ar dakika olmak üzere iki değişim sonucunda uzaklaştırıldı. Dako pen ile çevrilen kesitler %10'luk normal keçi serumu ile 1 saat tabii tutulduktan sonra yıkama yapılmadan direkt olarak tavşan anti-laminin veya tavşan anti-tip IV kollajen antikorları ile 18 saat boyandı.

Birincil antikorlar üç defa 5'er dakika olmak üzere PBS ile yıkandıktan sonra ikincil antikor olan anti-rabbit TRITC (Rhodamine) ile 2 saat karanlık ortamda boyandı. İkincil antikorlar 5'er dakika üç defa yıkanarak gelvatol kapatma mediumu ile kapatıldı.

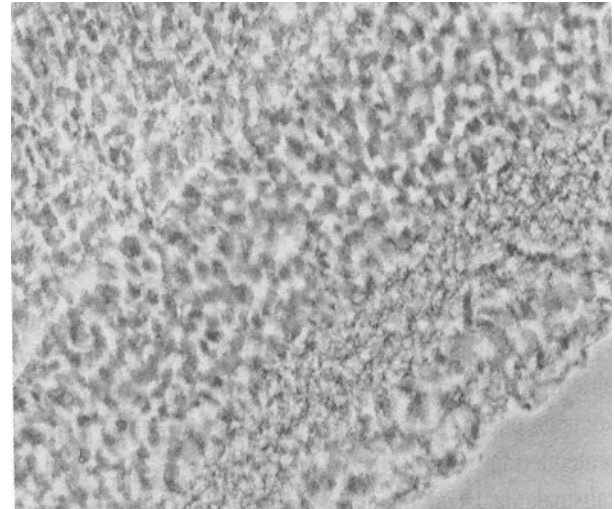
Kesitler retinanın ince ayrıntısı için Normanski ve faz kontrast objektifleri ile incelenirken, immunoreaktivite flüoresan objektifleri ile incelenerek laminin ve tip IV kollajen'nin retina tabakalarındaki dağılımları vermiş oldukları immunoreaktiviteler olarak değerlendirildi.

Bulgular

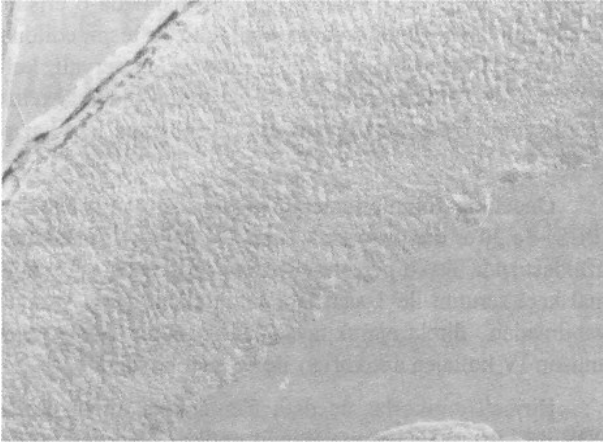
Retina faz kontrast objektifi ile incelendiğinde retinanın tüm hücresel ve membranöz tabakalarının ayrımı yapıldı. Faz kontrast mikroskobu ile hücre çekirdekleri siyah, sitoplazma beyaz ve membranöz tabakalar ise gri olarak görüldü (Şekil 1a ve 1b).

Hücre ve dokuların üç boyutlu olarak görülmesini sağlayan Normanski objektifi ile ise retinanın tabakalarını oluşturan yapıların çekirdek, sitoplazma ve membranöz yapıları ayırt edilemez iken, tabaka sınırları kolaylıkla seçiliyordu (Şekil 2a ve 2b).

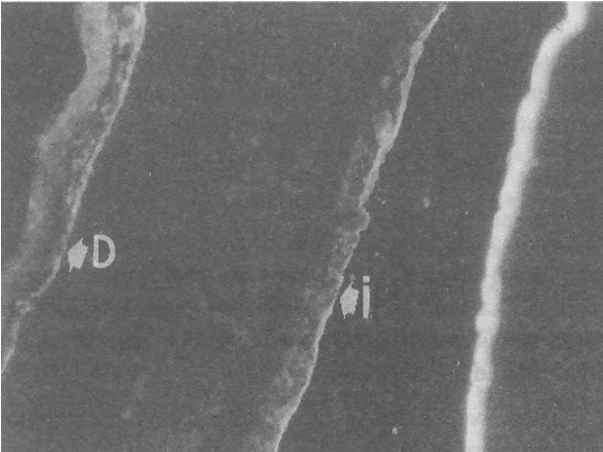
İndirekt immunoflüoresan tekniği ile yapılan immunohistokimyasal boyama sonucunda, retina tabakalarındaki



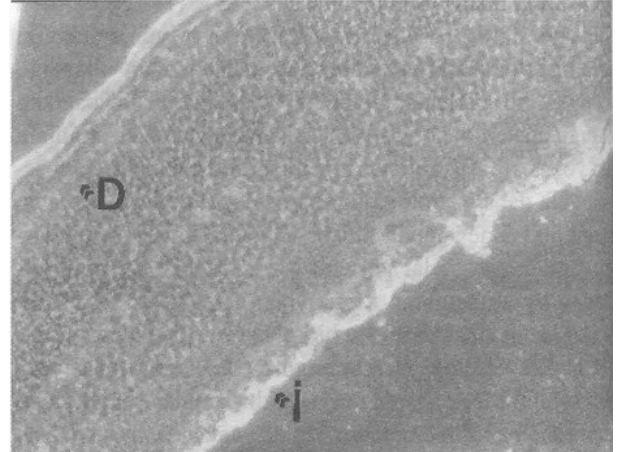
Şekil 1. Retinanın Faz Kontrast objektifi ile görünümü. a) X100, b) X400 (Orijinal büyütme).



Şekil 2. Retinanın Normanski objektifi ile görünümü. a) X100, b) X400 (Orijinal büyütme).



Şekil 3. Laminin immunoreaktivitesinin retina üzerindeki dağılımı. İ- İç sınırlayıcı membran, D- Dış sınırlayıcı membran. X200 (Orijinal büyütme).



Şekil 4. Tip IV kollajen immunoreaktivitesinin retina üzerindeki dağılımı. İ- İç sınırlayıcı membran, D- Dış sınırlayıcı membran. X200 (Orijinal büyütme).

laminin ve kollajen dağılımı değerlendirildi. Laminin immunoreaktivitesinin retina pigment epitel hücrelerinin oturduğu bazal membran ile iç ve dış sınırlayıcı membranda pozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 3). Tip IV kollajen'e ait immunoreaktiviteler ise daha çok pigment epitel hücre bazal membranında ve iç sınırlayıcı membranda kuvvetli pozitif iken dış sınırlayıcı membranda daha zayıf boyanma saptandı (Şekil 4).

Tartışma

Bazal membranın temel elemanlarından olan laminin ve tip IV kollajen, diğer bazal membran proteinlerinin birbirleri ile bağlanmasını sağlayarak bazal membran formasyonunda önemli fonksiyonlara sahip ekstrasellüler matriks proteinleridir. Çeşitli bazal membranlar üzerine yapılan çalışmalarda bazal membran proteinlerinin dağılımlarının farklı olmakla birlikte özellikle laminin'in farklı tiplerinin de farklı dağılımları olduğu gösterilmiştir (10).

Bazal membran proteinlerinin gözdeki dağılımları bölgesel farklılıklar göstermektedir. Buna göre; tip IV kollajen, laminin ve laminin subünitlerinin, kornea epitel (16), endoteli ve Descement membranında (17) farklı dağılımları olduğu bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada, hem laminin hem de tip IV kollajen'e ait immunoreaktivitelerinin Descement membranının endotel tarafında pozitif olarak gözlenirken, Descement membranının stromal kısmında sadece tip IV kollajen'e ait boyanma saptanmış, Descement membranının tabakaları arasında laminin immunoreaktivitesinin ise negatif olduğu tespit edilmiştir (17-18). Bunlara karşın lens kapsülünde ise hem laminin hem de tip IV kollajen'in immunoreaktivitelerinin kuvvetli pozitif olduğu gözlenmiştir (19).

Laminin ve Tip IV kollajen'in farklı izoformları vücutta farklı dağılımlar göstermektedir (11). Bu farklı formlardan kimisi embriyonik gelişimde daha önemli rol oynarken, kimisi hastalıkların etiolojisinde ve bazıları da

temel yapının oluşmasından sorumludur. Örneğin laminin-5 tipinin yapısını oluşturan $\alpha 3$ tipi hemidesmozom ile tutturucu fibriller arasındaki bağlantıyı sağladığı için, bu tip laminin yokluğu epidermolizis bullosaya neden olmaktadır (20). Ayrıca kollajen tip IV'ün $\alpha 3$ ve $\alpha 5$ formlarındaki bozukluklarında Goodpasture gibi böbrek hastalıklarının etiolojisinde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (21).

Bu çalışmamızda her iki bazal membran proteinin retina üzerindeki dağılımlarının benzer olması dolayısı ile proteinler arasında retinada fonksiyonel olarak farklılık olmadığı sonucuna varıldı. Kullanılan laminin ve tip IV kollajen antikorları tüm laminin ve tip IV kollajen tiplerini tanıdığı için retinada bu proteinlerin dağılımlarına ait özellikler belirtilmemiştir. O nedenle özellikle laminini oluşturan zincirlere ait spesifik antikorlarla yapılacak olan immunohistokimyasal çalışmalar lamininin farklı formlarının retina üzerindeki dağılımlarını göstermede yararlı olacaktır.

Bununla beraber laminin ve tip IV kollajen immunoreaktiviteleri retina tabakalarında bulunan tüm bazal membran ve benzeri yapılarda pozitif olarak gözlenmiştir. Bazal membranın iki temel proteini olan laminin ve tip IV kollajen korneada olduğu gibi farklı dağılım göstermemekte ve retinadaki bazal membran yapısına birlikte katılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Beck K and Gruber T. Structure assembly of basement membrane and related extracellular matrix proteins. Princ Cell Adhes. Boca Raton: CRC press. 1995: 219-52.
2. Hay ED. Interaction of embryonic cell surface and cytoskeleton with extracellular matrix. Am J Anat 1982; 5:1-12.
3. Clark EA and Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. Science 1995; 268:233-9.
4. Ekblom P. Extracellular matrix in animal development. Experientia. 1995; 51:851-2.
5. Timpl R and Dziadek M. Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. Int Rev Exp Path 1986; 29:1-112.
6. Timpl R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. Eur J Biochem 1989; 180:487-502.
7. Timpl R, Rodhe H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM and Martin GR. Laminin- A glycoprotein from basement membranes. J Biol Chem 1979; 254:9933-37.
8. Engel J. Laminins and other strange proteins. Biochem. 1992; 31:10643-651.
9. Paulsson M. Laminin and collagen IV variants and heterogeneity in basement membrane composition. In: Rohrbach DH and Timpl R, eds. Molecular and cellular aspects of basement membranes. London: Academic Press. 1993: 177-87
10. Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, Martin GR, Meneguzzi G, Paulsson M, Sanes J, Timpl R, Tryggvason K, Yamada Y and Yurchenco PD. A new nomenclature for laminins. Matrix Biol 1994; 14:209-11.
11. Aumailley M, Symth N. The role of laminins in basement membrane function. J Anat 1998; 193:1-21.
12. Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furtmayr H and Kuhn K. A network model for the organization of the type IV collagen molecules in basement membranes. Eur J Biochem 1981; 120:203-9.
13. Charonis AS, Tsilibary EC, Yurchenco PD and Furtmayr H. Binding of laminin to type IV collagen: A morphological study. J Cell Biol 1981; 100:1848-53.
14. Aumailley M, Wiedemann H, Mann K and Timpl R. Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. Eur J Biochem 1989; 184:241-8.
15. Smyth N, Vatansever HS, Murray PA, Frie C, Paulsson M and Edgar D. Absence of basement membranes after targeting the LamC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. J Cell Biol 1999; 144:151-60.
16. Schittny JC, Timpl R and Engel J. High resolution immunoelectron microscopic localization of functional domains of laminin, nidogen, and heparan sulfate proteoglycan in epithelial basement membrane of mouse cornea reveals different topological orientations. J Cell Biol 1989; 107:1599-1610.
17. Sawada H, Konomi H and Hirokawa K. Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: It is relation to the type VIII collagen. J Cell Biol 1990; 110:219-27.
18. Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Michael AF, Sun T-T and Kenney C. Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms. Lab Invest 1995; 72:461-73.
19. Cammarata PR, Cantucrouch D, Oakford L and Morilla A. Macromolecular organization of bovine lens capsule. Tissue and Cell 1986; 18:83- 97.
20. Aberdam D, Galliano M, Vailly J, Pulkkinen L, Bonifas J, Christiano A M, Tryggvason K, Uitto J, Epstein JEH, Ortonne J-P and Meneguzzi G. Herlitz's junctional epidermolysis bullosa is linked to mutations in the gene (LamC2) for the gamma2 subunit of nicein/kalinin (Laminin-5). Nature Genet 1992; 6:299-304.
21. Butkowski RJ, Langveld JPM, Wieslander J, Hamilton J and Hudson BG. Localization of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen. J Biol Chem 1987; 262:7874-77.