

## KÖPEKLERİN MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNDE $\alpha$ B-KRİSTALLİN DAĞILIMININ İMMÜNOHİSTOKİMYASAL TEKNİKLE BELİRLENMESİ

Siyami Karahan<sup>1</sup> Tolga Güvenç<sup>2</sup>

### Immunochemical Determination of $\alpha$ B-Crystallin Distribution in the Dog Central Nervous System

Geliş Tarihi: 07.12.2007

Kabul Tarihi: 31.01.2008

**Özet:** Polipeptid yapısında olan  $\alpha$ B-Kristallin, lensin ana bileşenlerinden multimerik protein  $\alpha$ -kristallin iki alt ünitesinden ( $\alpha$ A ve  $\alpha$ B) birisidir.  $\alpha$ B-Kristallin, moleküler şaperon ve ısı şok proteini olarak protein katlanmalarındaki yanlışları önler ve anti-apoptotik özellikleri vardır. Bu çalışmada,  $\alpha$ B-kristallinin köpek merkezi sinir sistemi (MSS)'ndeki ekspresyonu; beyin, beyincik, bulbus olfaktorius, hipofiz, medulla oblongata, ammon boynuzu, hipotalamus ve servikal omurilikten alınan doku örneklerinde immünohistokimyasal teknikle incelendi.  $\alpha$ B-kristallin ekspresyonuna, hipofiz hariç incelenen tüm MSS bölgelerinde glial hücrelerde rastlandı. Nöronlarda ise pozitif reaksiyon gözlenmedi.  $\alpha$ B-Kristallin/ 2',3'-siklik nükleotid 3'-fosfodiesteraz (CNPase) ikili immünohistokimyasal boyamada, immünoreaktif glia hücrelerinin CNPase pozitif oligodendrositler oldukları belirlendi ve kristallin immünoreaktivitesine özellikle ak madde ve boz maddenin ak maddeye yakın katmanlarındaki oligodendrositlerde rastlandı. Omurilik beyaz ve boz maddesinde oldukça fazla sayıda  $\alpha$ B-kristallin pozitif oligodendrositler saptanırken; ak maddede oldukça sınırlı sayıda  $\alpha$ B-kristallin pozitif, CNPase negatif glia hücreleri gözlemlendi.  $\alpha$ B-Kristallin immünoreaktivitesi hücrelerin sitoplazmalarında yoğun, çekirdeklerinde ise daha zayıftı. Bu çalışmada, normal köpek MSS'nde özellikle oligodendrositlerde saptanan  $\alpha$ B-kristallin'in, myelin temel proteini gibi oligodendrositler tarafından yoğun olarak sentezlenen fonksiyonel proteinlerin yapısının korunmasında görev alabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:**  $\alpha$ B-kristallin, köpek, merkezi sinir sistemi, oligodendrosit, immünohistokimya

**Summary:**  $\alpha$ B-Crystallin is one of two subunits of multimeric protein  $\alpha$ -crystallin ( $\alpha$ A and  $\alpha$ B), which is a major component of the lens. As a molecular chaperon and heat shock protein,  $\alpha$ B-Crystallin prevents false protein folding and has anti-apoptotic properties. In this study,  $\alpha$ B-crystallin expression was investigated in the central nervous system (CNS) using the tissues collected from the cerebrum, cerebellum, olfactory bulb, pituitary gland, medulla oblongata, cornu ammonis, hypothalamus and cervical spinal cord. Except in the pituitary,  $\alpha$ B-crystallin immunolocalized in glial cells in all nervous tissues investigated. No immunoreactivity was observed in neurons. In double staining of  $\alpha$ B-crystallin and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase), the immunoreactive glial cells were determined to be CNPase positive as oligodendrocytes. Immunoreactive oligodendrocytes located mainly the in the white matter and the layers of the gray matter adjacent to the white matter. However, the spinal cord had numerous  $\alpha$ B-kristallin positive oligodendrocytes both in the white and gray matters. In the white matter of the spinal cord, a limited number of glial cells were positive for  $\alpha$ B-crystallin, but negative for CNPase.  $\alpha$ B-Crystallin immunoreactivity was weak in cytoplasm but very light in the nucleus. As observed in oligodendrocytes of normal dog CNS tissues,  $\alpha$ B-crystallin may have roles in anti-apoptotic process of oligodendrocytes and prevention false folding of proteins such as myelin basic protein, which is synthesized intensively by oligodendrocytes.

**Key Words:**  $\alpha$ B-crystallin, central nervous system, dog, immunohistochemistry, oligodendrocyte

### Giriş

Polipeptid protein yapısında olan  $\alpha$ B-kristallin (22 kDa), lensin ana bileşenlerinden  $\alpha$ -kristallin iki alt ünitesinden ( $\alpha$ A ve  $\alpha$ B) birisidir (Quax-Jeuken ve ark., 1985; Iwaki ve ark., 1990). Isı stresi proteini (heat shock protein) olarak da sınıflandırılan  $\alpha$ B-kristallin lens dışındaki bazı dokularda da bulunur. İmmünoblot, Western ve Northern blot analizleri ile kalp, iskelet kası, siyatik sinir, böbrek, dalak, plasenta, beyin ile akciğer dokusunda  $\alpha$ B-kristallin varlığı gösterilmiştir (Dubin ve ark., 1989; Iwaki ve ark., 1990).

Sıçan beyinde yapılan bir araştırmada;  $\alpha$ B-kristallin'in, beyinde özellikle ak maddede dağılım gösterdiği ortaya konulmuştur.  $\alpha$ B-Kristallin ekspresyonu oligodendrositlerde ve düşük düzeyde de astrositlerde gözlenmektedir (Iwaki ve ark., 1992).

Ancak, Alzheimer ve Creutzfeldt-Jakob gibi nörodejeneratif hastalıklara sahip insanlarda, sınırlı olsa nöronal  $\alpha$ B-kristallin ekspresyonu görüldüğü rapor edilmektedir (Iwaki ve ark., 1992). Reaktif astrositlerde de  $\alpha$ B-kristallin up-regüle olmaktadır (Dabir ve ark., 2004). Ayrıca insanların Alexander hastalığında astrositlerde biriken ve Rosenthal fibrilleri olarak adlandırılan inklüzyon cisimciklerinin ana bileşeninin de  $\alpha$ B-kristallin olduğu gösterilmiştir (Iwaki ve ark., 1993).

Moleküler şaperon aktivesi gösteren  $\alpha$ B-kristallin'in, hücrel yaşam faaliyetlerinin sürdürülmesinde, özellikle de hücrel strete önemli düzenleyici rolü vardır (Klemenz ve ark., 1991).  $\alpha$ B-Kristallin, proteinlerin kümelenmesini ve hatalı katlanmalarını önler (Hortwitz, 1992). Isı toleransının

1 Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı, 71451 Yahşihan, Kırıkkale TÜRKİYE

2 Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, 55139 Kurupelit Samsun TÜRKİYE

oluşmasını sağlayan  $\alpha$ B-kristallin'in ısı ve ozmotik basınçtan kaynaklanan stres durumunda arttığı görülür (Klemenz ve ark., 1991). Hücre iskeleti elemanlarıyla ilişki kurarak hücrenin yapısal stabilitesini sağlar (Djabali ve ark., 1997). Mikrotubulus ilişkili protein aracılığı ile mikrotubuluslara bağlanır ve ayrışmalarını önler (Xi ve ark., 2006). Diğer taraftan aktin, dezmin filamanları, glial fibriler asidik protein, vimentin ve filensin/phakinine bağlanabildiği de bildirilmiştir (Bennardini ve ark., 1992; Djabali ve ark., 1997).  $\alpha$ B-Kristallin, aktin ile birlikte pinositoz işleminin sürekliliğini sağlar (Singh ve ark., 2007).  $\alpha$ B-Kristallin'in bölünen hücrelerin sentrozomları (Inaguma ve ark., 2001) ve Golgi Matriks 130 proteini ile eş yerleşim göstermesinin, mitoz sırasında organellerin reorganizasyonunda rol alabileceği yönünde yorumlanmaktadır (Gangalum ve ark., 2004).

$\alpha$ B-Kristallin'in en önemli özelliklerinden birisi de kaspaz-3 üzerinden antiapoptik aktivite göstermesidir (Ikeda ve ark., 2006). Aktive olan kaspaz-3 e bağlanarak bu enzimin aktivitesini engeller (Kamradt ve ark., 2002).  $\alpha$ B-Kristallin oksidatif stres ile indüklenmiş apoptozis sırasında pro-apoptotik bir protein olan mitokondrial p53'ün translokasyonunu da engeller (Liu ve ark., 2007). Ayrıca TNF-  $\alpha$  reseptörlerine bağlanarak bir seri protein ilişkisi sonucu, prokaspaz-8'i aktive eder (Garrido ve ark., 2001). Aktive olan kaspaz-8, prokaspaz-3'ü keser ve p24 ara molekülünü şekillendirir.  $\alpha$ B-Kristallin aynı zamanda, hücrede apoptozisin tetiklenmesi için gerekli olan kaspaz-3'ün oluşumunda gerekli olan otoproteolitik reaksiyonu baskılar (Duvanel ve ark., 2004).

$\alpha$ B-kristallin'in gerek normal hücre fonksiyonlarında, gerekse nörodejeneratif değişiklikler esnasındaki koruyucu ve düzenleyici işlevleri nedeniyle, MSS'deki varlığı önemlidir. Köpeklerin MSS'inde  $\alpha$ B-kristallin ekspresyonuna ve dağılımına ait bilimsel veriler oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, köpek MSS'in sistematik olarak farklı bölgelerinden alınan sinir dokularında  $\alpha$ B-kristallin ekspresyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

### Materyal Metot

Araştırmanın materyalini; Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine travma anamnezi ile getirilen ancak merkezi sinir sisteminde travma belirtisi olmayan veya nekropsisinde makroskopik herhangi bir hastalık bulgusu göstermeyen 1-3 yaşlarında melez ırklı 7 köpek oluşturdu. Her bir köpektan, beyin korteksinin frontal, parietal, temporal, oksipital lobları, beyincik, hipofiz, hipotalamus, bulbus olfaktorius, ammon boynuzu, medulla oblongata ve servikal omurilik'ten doku örnekleri alındı. Dokular, 48 saat

süreye %10'luk nötral formol solüsyonunda tespit edildi, etanol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra parafine bloklandı ve bloklaradan 5  $\mu$ m kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen & eozin ile boyanan doku kesitleri, yapılan histolojik inceleme sonucunda normal histolojik yapının korunduğu gözlemlendikten sonra diğer seri kesitler  $\alpha$ B-kristallin ekspresyonunu belirlemek amacıyla immünohistokimyasal çalışmada kullanıldı.

İmmünohistokimyasal İncelemeler: Doku kesitlerinin immünohistokimyasal boyanmasında streptavidin-biotin-peroksidaz (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) tekniği kullanıldı. Bir gece 37 °C'de tutulan parafini eritilen kesitler, ksilol serilerinden geçirilerek deparafinize edildi ve yüksekten düşük dereceye doğru alkol serilerinden geçirilerek rehidre edildi ve distile suya gelindi. Antijeni açığa çıkarmak amacıyla sitrat tampon solüsyonunda (pH 6.0), 600 W'luk mikrodalga fırında 2 dk süreyle ısıtıldı. Absolü metanolde taze hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit içinde 5 dk tutularak dokudaki endojen peroksidaz inaktive edildi ve PBS (pH 7.4)'le yıkandıktan sonra kesitler non-spesifik bağlanmaları engellemek için normal keçi serumu ile muamele edildi. Sonrasında, 60 dk monoklonal anti- $\alpha$ B-kristallin (SPA-222, Stressgen, Victoria, Canada) antikoruna ile inkübe edilerek PBS'le yıkandı. Takiben kesitler biotin ile konjuge geniş spektrumlu sekonder antikor (85-9043, Zymed, California, USA) 10 dk muamele edildi. Kromojen olarak, amino etil karbazol (AEC) ya da 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kullanılarak oda sıcaklığında peroksidaz (HRP) demonstre edildi. Mayer's hematoksilen ile 1 dk boyanan kesitler, çeşme suyunda yıkandı, su bazlı yapıştırıcı ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi. Test sırasında, negatif kontrol amacıyla bir kesitte primer antikor, diğerinde ise sekonder antikor yerine PBS kullanıldı.

İmmünohistokimyasal boyamanın ikinci aşamasında ikili immün boyamaya geçildi; yukarıda tanımlanan prosedürün kromojen (AEC) aşamasından sonra, Mayer's Hematoksilen uygulanmadan tekrar PBS ile yıkandı. İkinci primer antikor olarak, oligodendrosit işaretleyicisi olarak da kullanılan (Yarim ve Kabakci, 2004) monoklonal anti-2',3'-siklik nükleotid 3'-fosfodiesteraz (CNPase) antikoruna (Sigma) ile oda sıcaklığında 60 dk süreyle inkübe edildi. Sekonder antikor ve mikroskopta izlenerek yapılan kontrollü DAB inkübasyon aşamalarından geçirilen kesitler, sonra Mayer's hematoksilen ile boyanıp lamel ile kapatıldı.

### Bulgular

$\alpha$ B-Kristallin antijen dağılımı, beyin korteksinin farklı bölgelerinden alınan kesitlerde birbirine oldukça benzerdi. Beyin korteksinin boz maddesindeki

immünoreaktif hücreler çoğunlukla ak maddeye yakın stratum polimorfikum katmanında görüldü (Şekil 1 ve 2). Str. molekülare ve Str. piramidale katmanlarında ise immünoreaktif hücrelere oldukça az sayıda veya hiç rastlanmadı. aB-Kristallin immünoreaktif hücrelere ak maddede yoğun olarak rastlandı (Şekil 3). İkili immünoperoksidaz boyama uygulanan kesitlerde aB-kristallin pozitif hücreler aynı zamanda CNPase pozitif, dolayısıyla bu hücrelerin aB-kristallin aktivitesi gösteren hücreler oldukları kesinleştirildi (Şekil 4 ve 5). Yalnızca omurilik ak maddesindeki sınırlı sayıda aB-kristallin immünoreaktif fakat CNPase negatif hücreler hariç merkezi sinir sisteminin diğer bölgelerinden alınan kesitlerdeki aB-kristallin pozitif hücrelerin de oligodendrosit oldukları belirlendi.

Beyincikte aB-kristallin immünoreaktif hücreler, boz maddenin stratum molekülare katmanında yok denecek kadar az sayıda, stratum gangliosumda Purkinje hücrelerinin çevresinde ve stratum gangliosum katmanında oldukça sınırlı sayıda görüldüler (Şekil 6-8). Beyinciğin ak maddesinde ise yoğun olarak oligodendrosit boyanması görüldü (Şekil 6 ve 8). Bulbus olfaktoriusun glomerüler ve mitral hücre katmanlarında immünopozitif boyanma görülmezken, internal granüler hücre katmanında oldukça sınırlı sayıda immünopozitivite tespit edildi (Şekil 9). Ammon boynuzu nöronlarında her iki antikora spesifik pozitif reaksiyon gözlenmediği halde nöronlar arasındaki oligodendrositlerde pozitif reaksiyon dikkati çekti (Şekil 10). Benzer şekilde, medulla oblongata (Şekil 11) ve hipotalamustaki (Şekil 12) oligodendrositlerde de immünopozitivite gözlemlendi. Adenohipofiz ve nörohipofizde kristallin aktivitesine rastlanmadı (Şekil 13). Omurilikte hem boz hem de ak maddede yoğun hücre boyanmaları şekillendi (Şekil 14 ve 15). Boz maddedeki immünoreaktif oligodendrositler özellikle ventral kornuda yoğundu (Şekil 14). Omuriliğin ak maddesinde oldukça sınırlı sayıda aB-kristallin pozitif, CNPase negatif glia hücresi görüldü (Şekil 16). Bu hücreler morfolojik olarak ta astrosit olarak değerlendirildi.

aB-Kristallin immünolokalizasyonu yoğun olarak sitoplazmada, çok daha az yoğunlukta ise çekirdekte görüldü (Şekil 7,11 ve 15).

### Tartışma ve Sonuç

Isı şok proteinleri ailesinin bir üyesi ve moleküler şaperon olarak değerlendirilen aB-kristallin, anti-apoptotik ve hatalı protein katlanmasını önleme özelliklerine sahiptir (Klemenzen ve ark., 2001; Ikeda ve ark., 2006). Özellikle sinir sistemi gibi rejenerasyon kapasitesi oldukça sınırlı olan dokularda bulunması, bu dokuların bütünlüklerinin korunmasında önemli rolleri olduğunu ortaya koymaktadır (Iwaki ve ark., 1992; Duvanel ve ark., 2004). Bu çalışmada, köpek

MSS'nden alınan sistematik doku örneklerinde aB-kristallinin varlığı, immünohistokimyasal metotla araştırılmıştır. Hipofiz bezi dışında, test edilen beyin korteksinin farklı bölgeleri, beyincik, ammon boynuzu, hipotalamus, medulla oblongata, bulbus olfaktorius ve omurilikte aB-kristallin lokalizasyonu görülmüştür. Daha önceki çalışmalarda da sıçanların hipofiz bezinde, aB-kristallin lokalizasyonunun olmadığı bildirilmiştir (Iwaki ve ark., 1990).

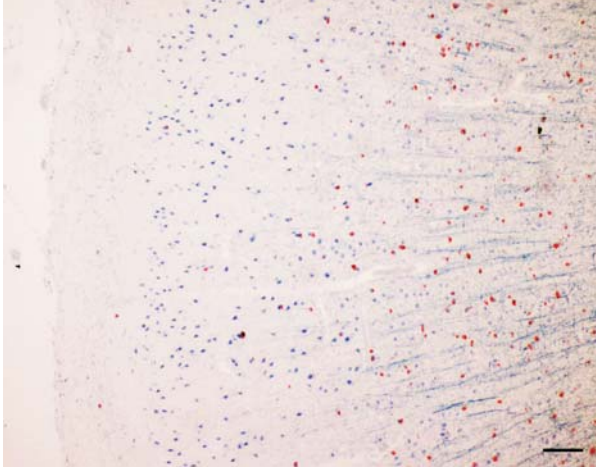
aB-Kristallin normal MSS dokularında çoğunlukla ak ve boz maddedeki glial hücrelerde görülmektedir. Yapılan morfolojik değerlendirmede bu hücrelerin çoğunlukla oligodendrosit ve sınırlı sayıda ve daha az yoğunlukta astrositler olduğu belirlenmiştir (Iwaki ve ark., 1990 ve 1992). Köpek MSS dokularında yapılan bu çalışmada aB-kristallin immünoreaktif hücrelerin hemen hepsi oligodendrosit işaretleyicisi olarak kullanılan CNPase için immünopozitif reaksiyon gösterdiler. Sadece, omuriliğin ak maddesinde oldukça sınırlı sayıda glial hücrenin aB-kristallin pozitif, fakat CNPase negatif. Bu hücrelerin morfolojik olarak astrosit oldukları değerlendirildi. aB-kristallin immünoreaktif oligodendrositler çoğunlukla MSS'nin ak maddesinde ve daha az sıklıkta da boz maddenin ak maddeye yakın katmanlarında görüldü. Dolayısıyla aB-kristallinin yanlış protein birikimi ve katlanmasını engelleyici şaperon aktivitesi (Klemenzen ve ark., 1991; Xi ve ark., 1999; Duvanel ve ark., 2004) göz önüne alındığında, oligodendrositlerin en önemli fonksiyonel proteini olan miyelin bazik protein (MBP)'in bütünlüğünün korunmasında rol alabileceği söylenebilir. Ratlarda oluşturulan antikör-aracılı demiyelinasyon modelinde aB-kristallinin upregüle olması, aB-kristallin'in akson kılıflarının miyelinizasyonunda görevi olabileceğini düşündürmüştür (Duvanel ve ark., 2004). Köpek MSS korteksinin farklı bölgeleri, hipotalamus, bulbus olfaktorius, ammon boynuzu, medulla oblongata ve servikal omurilikte aB-kristallin ekspresyonunun ortaya konulmasıyla özellikle köpek gençlik hastalığı, yaşlı köpek ensefalitis'i ve yaşlılığa bağlı nörodejeneratif bozukluklarda, oligodendrositlerin fizyopatolojik rollerinin anlaşılmasında büyük avantaj sağlanabilecektir. Bu tür hastalıklarda, miyelin kılıfta yıkılma ve myelin sentezi bozukluklarıyla birlikte, damar duvarlarında anormal protein birikimleri görülmesi de bu öneriyi destekler niteliktedir.

Normal MSS dokularında aB-kristallin immünoreaktivitesi, nöronlar ve mikroglia hücrelerinde görülmez (Iwaki ve ark., 1992). Ancak patolojik durumlarda, bu hücrelerde eksprese edilmektedir (Iwaki ve ark., 1992; Duvanel ve ark., 2004). Bu çalışmada test edilen köpek MSS dokularının hiç birinde nöron boyanmasına rastlanmadı. Medulla spinalis ak maddesinde sınırlı sayıda görülen aB-

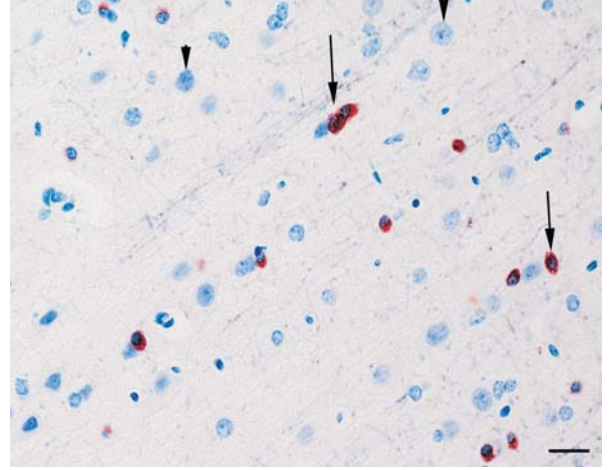
kristallin pozitif fakat CNPase negatif hücreler, morfolojik olarak mikrogliadan çok astrositlere benzemektedir. Normal sinir dokusu ve subpial astrositlerde zayıf bir boyanma olduğu ve patolojik durumlarda aB-kristallinin upregüle olabileceği bilinmektedir (Iwaki ve Ark., 1992). Sunulan çalışmada da, benzer şekilde servikal omuriliğin ak maddesinde kristallin pozitif astrositler gözlemlendi; ancak bunların subpial bölgeden çok ak maddenin orta kısımlarında lokalize oldukları dikkati çekti.

aB-Kristallin sitoplazmik boyanma özelliğine sahiptir (Iwaki ve ark., 1992). Ancak, bu çalışmada da bildirildiği gibi, daha az yoğunlukta da olsa çekirdek boyanması göstermektedir (Duvanel ve ark., 2004). Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalarda; sitoplazmada sentezlenen aB-kristallinin çekirdeğe taşındığı ve "nuclear SC35 speckle" olarak adlandırılan spesifik nükleer yapılara bağlanarak görev yaptığı ortaya konulmuştur (van Rijk ve ark., 2003). Interkromatin granül kümeleri olarak da bilinen "nuclear SC35 speckle" yapıları çekirdekteki "recycling" ve "splicing" faktörlerinin depolandığı yerlerdir (Lamond and Spector, 2003). aB-Kristallin'in "recycling" ve "splicing" faktörleri ve söz konusu hücrel olaylarla ilişkisi araştırılan güncel konular arasındadır (del Engelsman, 2005).

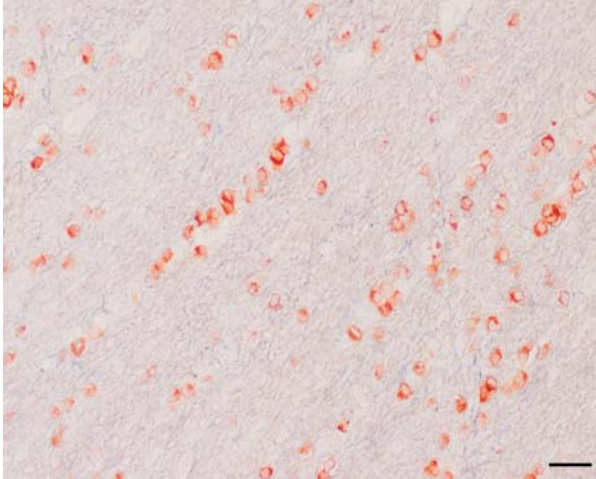
Sonuç olarak, bu çalışmada köpek MSS'de başlıca oligodendrositlerde aB-kristallin lokalizasyonu tespit edilmiştir ve immünopozitivite özellikle ak ve boz maddenin ak maddeye yakın kısımlarında yoğunudur. Bulgulara dayanılarak aB-Kristallin'in, oligodendrositler tarafından sentezlenen miyelin bazik protein'in etkin yapısal özelliklerini ve oligodendrositleri apoptozisten koruyan bir role sahip olduğu sonucuna varılmıştır.



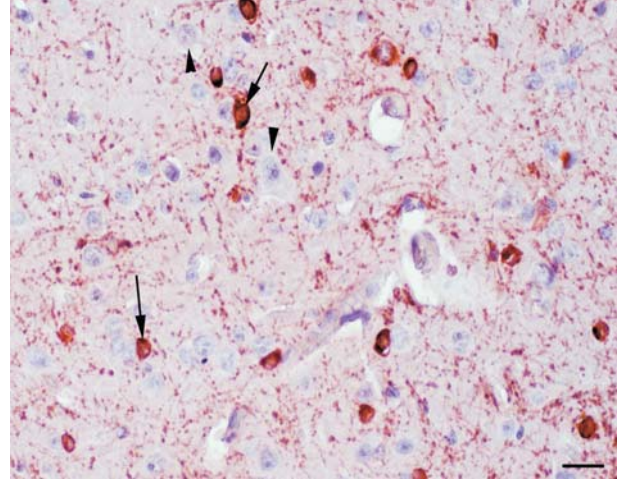
**Şekil 1.** Beyin korteksinin boz maddesinde  $\alpha$ B-kristalin dağılımı.  $\alpha$ B-Kristalin immünoreaktif hücreler genellikle ak maddeye yakın stratum polimorfikum katmanında görüldü. İmmünoperoksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 140  $\mu$ m



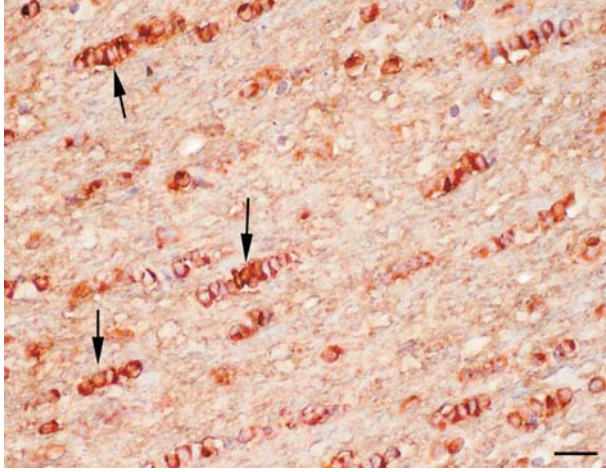
**Şekil 2.** Korteksteki  $\alpha$ B-kristalin immünoreaktif glia hücreleri (oklar) ve negatif nöronlar (ok başları). İmmünoperoksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 30  $\mu$ m



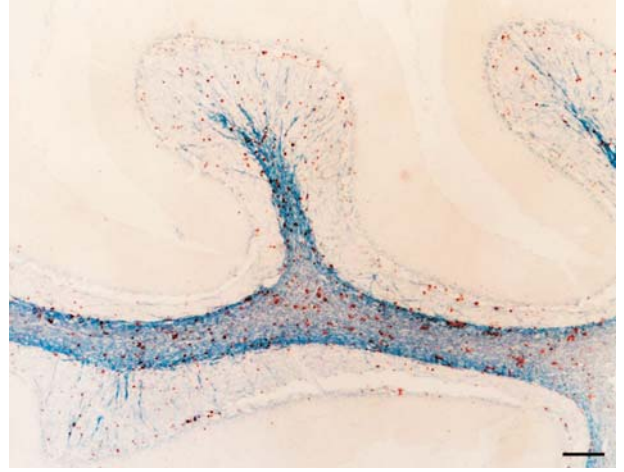
**Şekil 3.** Korteksin ak maddesindeki  $\alpha$ B-kristalin immünoreaktif hücreler. İmmünoperoksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 65  $\mu$ m



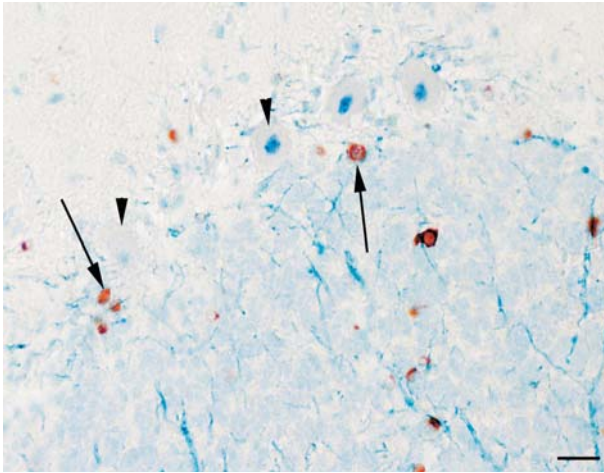
**Şekil 4.** Korteksin boz maddesinde  $\alpha$ B-kristalin (AEC kromojen) ve CNPase (DAB kromojen) immünoreaktif oligodendrositler (ok) ve negatif nöronlar (ok başı). İkili immünoperoksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 40  $\mu$ m



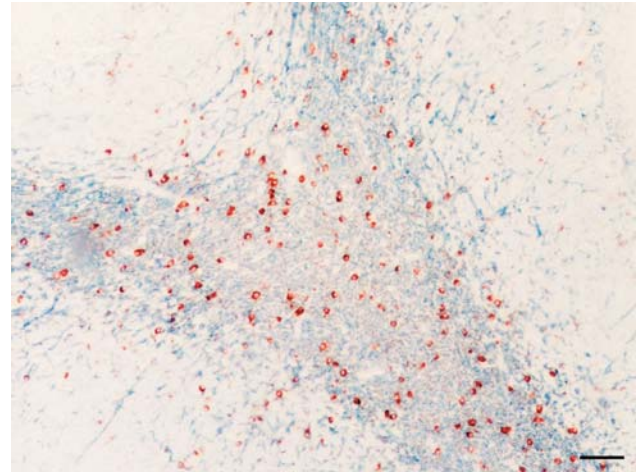
Şekil 5. Korteksin ak maddesinde  $\alpha$ B-kristalin ve CNPase immünoreaktif oligodendrositler (oklar). İkili immünoperoksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 65  $\mu$ m



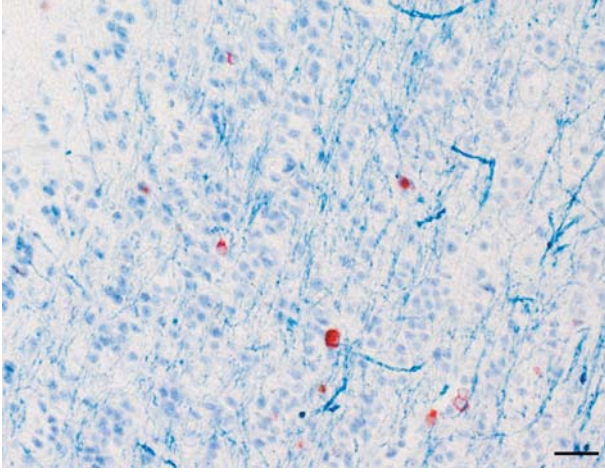
Şekil 6. Beyincikte  $\alpha$ B-kristalin immünoreaktif oligodendrositler. İmmünoreaktif oligodendrositler boz maddenin stratum molekulare katmanında yok denecek kadar az sayıda, stratum gangliosumda purkinje hücrelerinin çevresi 1-2 ve stratum gangliosum katmanında oldukça sınırlı. İmmünoperoksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 250  $\mu$ m



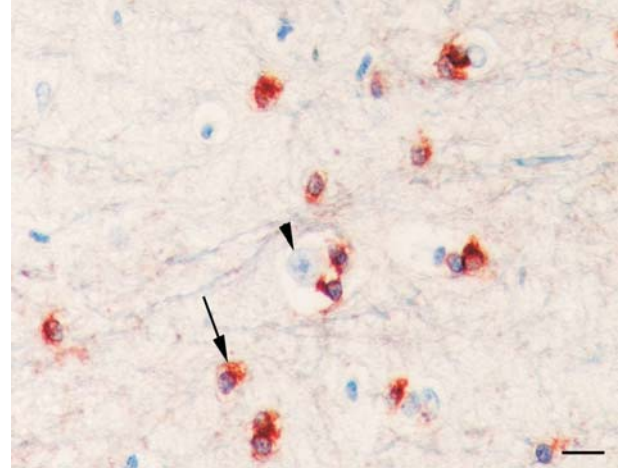
Şekil 7.  $\alpha$ B-Kristalin negatif Purkinje hücrelerinin (ok başları) yakınındaki az sayıda immünoreaktif oligodendrositler (oklar). İmmünoreaktif oligodendrositlerde yoğun sitoplazmik fakat çok daha az yoğunlukta çekirdek boyanması. İmmünoperoksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 30  $\mu$ m



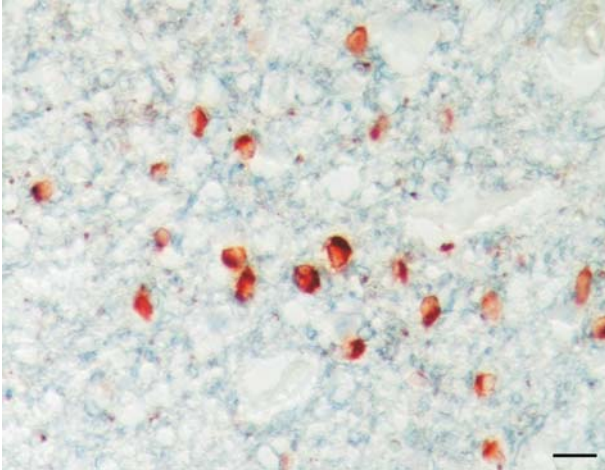
Şekil 8. Beyincik ak maddesinde  $\alpha$ B-kristalin immünoreaktif oligodendrositler. İmmünoperoksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 140  $\mu$ m



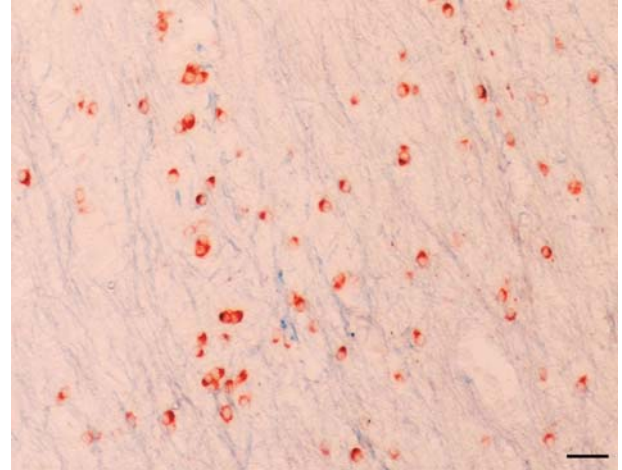
Şekil 9. Bulbus olfaktoriusun internal granüler hücre katmanında oldukça sınırlı sayıda immunopozitif hücreler. İmmünopeksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 65 µm



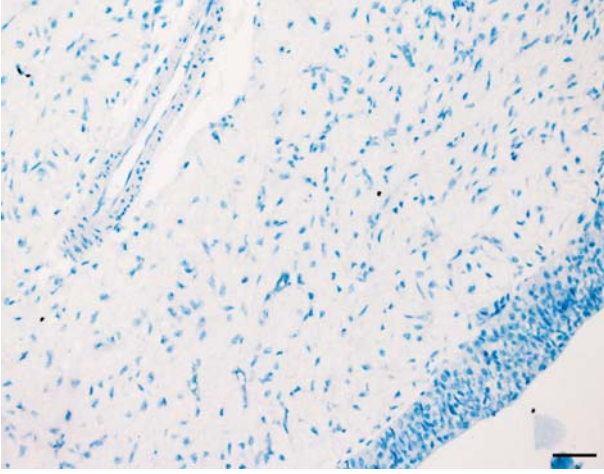
Şekil 10. Ammon boynuzu, nöronlar arasındaki aB-kristalin immünoaktif oligodentrositler. İmmünopeksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 30 µm



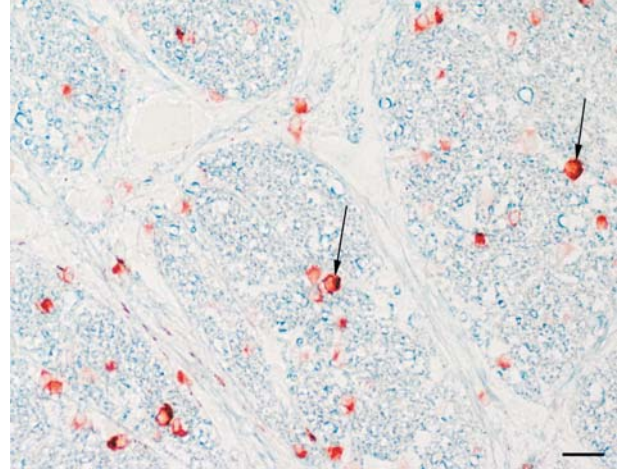
Şekil 11. Medulla oblongata, nöronlar (ok başı) arasındaki aB-kristalin immünoaktif oligodentrositler (ok). İmmünopeksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 30 µm



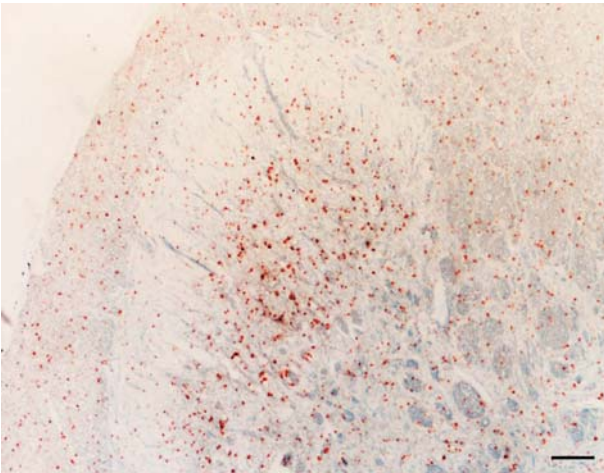
Şekil 12. Hipotalamus, aB-kristalin immünoaktif oligodentrositler. İmmünopeksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 65 µm



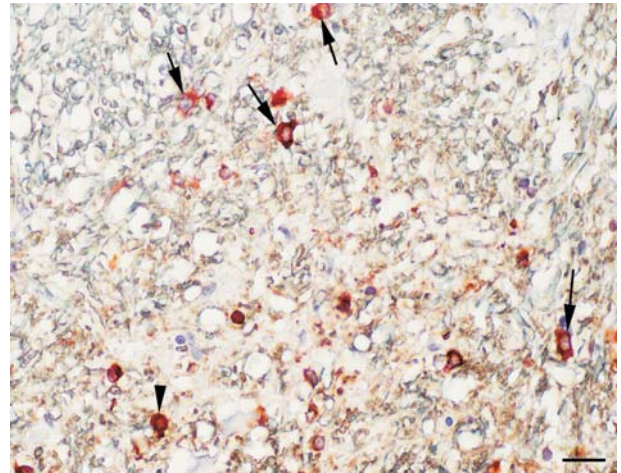
Şekil 13. aB-kristalin immünonegatif hipofiz. İmmünoperoksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 65 µm



Şekil 15. Servikal omurilik, akson demetleri arasındaki aB-kristalin immünoreaktif oligodentrositler. İmmünoperoksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 65 µm



Şekil 14. Servikal omurilik, gri ve ak maddede yoğun hücre boyanmaları. İmmünoperoksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 140 µm



Şekil 16. Omuriliğin ak maddesinde oldukça sınırlı sayıda aB-kristalin immünopozitif (AEC kromojen) ve CNPase (DAB kromojen) negatif glia hücreleri (oklar). Ok başı oligodendrositi göstermektedir (kristalin ve CNPase immünopozitif). İkili immünoperoksidaz test ve Mayer's hematoksilen zıt boyama. Büyütme çizgisi= 65 µm



### Kaynaklar

1. Bennardini, F., Wrzosek, A., Chiesi, M. (1992).  $\alpha$ B-crystallin in cardiac tissue. Association with actin and desmin filaments. *Circ Res.*, 71, 2, 288-294.
2. Dabir, D.V., Trojanowski, J.Q., Richter-Landsberg, C., Lee, V.M., Forman, M.S. (2004). Expression of the small heat-shock protein  $\beta$ B-crystallin in tauopathies with glial pathology. *Am J Pathol.*, 164, 1, 155-166.
3. den Engelsman, J., Gerrits, D., de Jong, W.W., Robbins, J., Kato, K., Boelens, W.C. (2005) Nuclear import of  $\alpha$ B-crystallin is phosphorylation-dependent and hampered by hyperphosphorylation of the myopathy-related mutant R120G. *J Biol Chem.*, 280, 44, 37139-37148.
4. Djabali, K., de Néchaud, B., Landon, F., Portier, M.M. (1997).  $\alpha$ B-crystallin interacts with intermediate filaments in response to stress. *J Cell Sci.*, 110, Pt 21, 2759-2769.
5. Dubin RA, Wawrousek EF, Piatigorsky J (1989). Expression of the murine  $\alpha$  B-crystallin gene is not restricted to the lens. *Mol Cell Biol.*, 9, 3,1083-1089.
6. Duvanel, C.B., Monnet-Tschudi, F., Braissant, O., Matthieu, J.M., Honegger, P. (2004). Tumor necrosis factor- $\alpha$  and  $\alpha$ B-crystallin up-regulation during antibody-mediated demyelination in vitro: a putative protective mechanism in oligodendrocytes. *J Neurosci Res.*, 78, 5, 711-722.
7. Gangalum, R.K., Schibler, M.J., Bhat, S.P. (2004). Small heat shock protein  $\alpha$ B-crystallin is part of cell cycle-dependent Golgi reorganization. *J Biol Chem.*, 279, 42, 43374-43377.
8. Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., Kroemer, G. (2001). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun.*, 286, 3, 433-442.
9. Ikeda, R., Yoshida, K., Ushiyama, M., Yamaguchi, T., Iwashita, K., Futagawa, T., Shibayama, Y., Oiso, S., Takeda, Y., Kariyazono, H., Furukawa, T., Nakamura, K. Akiyama, S, Inoue, I. Yamada, K. (2006). The small heat shock protein  $\alpha$ B-crystallin inhibits differentiation-induced caspase 3 activation and myogenic differentiation. *Biol Pharm Bull.*, 29, 9, 1815-1819.
10. Inaguma, Y., Ito, H., Iwamoto, I., Saga, S., Kato, K. (2001).  $\alpha$ B-crystallin phosphorylated at Ser-59 is localized in centrosomes and midbodies during mitosis. *Eur J Cell Biol.*, 80, 12, 741-748.
11. Iwaki, T., Iwaki, A., Tateishi, J., Sakaki, Y., Goldman, J.E. (1993).  $\alpha$ B-crystallin and 27-kd heat shock protein are regulated by stress conditions in the central nervous system and accumulate in Rosenthal fibers. *Am J Pathol.*, 143, 2, 487-495.
12. Iwaki, T., Kume-Iwaki, A., Goldman, J.E. (1990). Cellular distribution of  $\alpha$ B-crystallin in non-lenticular tissues. *J Histochem Cytochem.*, 38, 1, 31-39.
13. Iwaki, T., Wisniewski, T., Iwaki, A., Corbin, E., Tomokane, N., Tateishi, J., Goldman, J.E. (1992). Accumulation of  $\alpha$ B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic conditions. *Am J Pathol.*, 140, 2, 345-356.
14. Kamradt, M.C., Chen, F., Sam, S., Cryns, V.L. (2006). The small heat shock protein  $\alpha$ B-crystallin inhibits differentiation-induced caspase 3 activation and myogenic differentiation. *Biol Pharm Bull.*, 29, 9, 1815-1819.
15. Klemenz, R., Fröhli, E., Steiger, R.H., Schäfer, R., Aoyama, A. (1991).  $\alpha$ B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88, 9, 3652-3656.
16. Lamond, A.I., Spector, D.L. (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 4, 8, 605-612.
17. Liu, S., Li, J., Tao, Y., Xiao, X. (2007). Small heat shock protein  $\alpha$ B-crystallin binds to p53 to sequester its translocation to mitochondria during hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 354, 1, 109-114.
18. Quax-Jeuken, Y., Quax, W., van Rens, G., Khan, P.M., Bloemendal, H. (1985). Complete structure of the  $\alpha$ B-crystallin gene: conservation of the exon-intron distribution in the two nonlinked alpha-crystallin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 82, 17, 5819-5823.
19. Singh, B.N., Rao, K.S., Ramakrishna, T., Rangaraj, N., Rao, ChM. (2007). Association of  $\alpha$ B-crystallin, a small heat shock protein, with actin: role in modulating actin filament dynamics in vivo. *J Mol Biol.*, 366, 3, 756-767.
20. van Rijk, A.E., Stege, G.J., Bennink, E.J., May, A., Bloemendal, H. (2003). Nuclear staining for the small heat shock protein  $\alpha$ B-crystallin colocalizes with splicing factor SC35. *Eur J Cell Biol.*, 82, 7, 361-368.
21. Xi, J.H., Bai, F., McGaha, R., Andley, U.P. (2006). Alpha-crystallin expression affects microtubule assembly and prevents their aggregation. *FASEB J.*, 20, 7, 846-857.
22. Yarim, M., Kabakci, N. (2004). Neurosteroidogenesis in oligodendrocytes and Purkinje neurones of cerebellar cortex of dogs. *Anat Histol Embryol.*, 33, 3, 151-154.

**BOŞ SAYFA**