

## BİTKİSEL PLASMA ZARININ (Plasmalemma) REAKTİVİTESİ

*Dr. Nebahat GENÇ*

Plasmalemma'yı diğer hücre zarlarından ayıran reaktivitenin varlığını göstermek için birçok sitokimyasal metod aynı yönde ve birlikte kullanılmıştır.

Şüphe götürmez pozitif sonuçlar iki çeşit metodla elde edilmiştir. Bir kısmı, dokular üzerinde elektronegatif gruplar tarafından yakalanan kolloidal metaller kullanılarak ortaya konmuş, diğerleri çok ince kesitler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bunlar; farklı inklusion (yerleştirme) ortamlarında aşağı Ph da fosfotungstik asit kullanılarak uygulanan metod ve APS (Asit-Periyodik-Schiff)'e dayanan teknik.

Diğer metodlar, özellikle inorganik iyonları yakalama teknikleri, ancak yer yer görülebilen sonuçlar temin ederler.

Bu sitokimyasal veriler, bitkisel plasmalemma'nın yüzeyinde hayvansal hücrelerinkini düşündüren bir çeşit glikokaliks'in varlığını işaret etmeye yöneliktir. Bununla birlikte onlardan çok defa bazı karakterleri ile ayrılırlar (Örneğin, nöraminidaz etkisinin yokluğu). Bu sonuçların histootoradyografik incelemelerden veya enzimatik aktivite testlerinden sonra elde edilmiş olanlarla karşılaştırılması, plasmalemma'nın aktivitesine bağlı bir organizasyonu olduğu fikrini doğrular. Ayrıca, bu sonuçlar zarların farklılaşmalarının niteliği ve hücre ile dış ortam arasında meydana gelen değişim (Pinositos, salgı vesiküllerinin görülmesi v.b.) olaylarındaki ilişki hakkında kesinlik sağlar.

Elektron mikroskopunun ilk incelemelerinden itibaren hücrelerde hücre zarlarının önemi ortaya konmuş, çizilen şema ve şekillerle zar sistemlerinde bir devamlılığın görüldüğü önerilmiştir (BUVAT 1965, FREY WYSSLING ve

MÜHLETHALER 1965, SCHNEPF 1969)\*. Plasmalemmaya ilişkin ultrastrüktürel gözlemler, plasmalemmanın organizasyonunun esas yapı yönünden diğer zarlarından pek farklı olmadığını düşündürmektedir.

Bununla beraber bazı farklar ortadadır. Şöyle ki, plasmalemmanın diğer hücre zarlarına oranla daha büyük bir kalınlığı ve osmik fiksasyondan sonra çok belirgin tripartit bir yapısı vardır. Tripartit veya ünit zarın moleküler organizasyonu yeni bilimsel tartışmanın konusu olmuş, misellar veya lamellar bir yapının varlığı yönünden şimdiki halde bir beraberlik sağlanamamıştır. Öyle görünüyor ki zarın yapısı özellikle çok plastiktir ve hücrenin görevine göre değişiklik kazanmaya çok yatkındır. Aynı şekilde, zarların farklılaşma ve iletme konusu, dış ortam ile madde değişimi sırasında plasmalemma ve diğer hücre zarları arasında kurulabilecek ilişki de ortaya konmuştur (Pinositos, salgı vesiküllerinin oluşumu) (BUVAT 1965 ve 1970, SCHNEPF 1969).

Bitki hücresinde zarların çeşitli kategorileri üzerine henüz pek az biyokimyasal bilgi elde edilmiştir. Bu, özellikle ultrasentrifikasyon ve homojeneizasyondan sonra düz ve parlak zarların tayininin çok güç oluşunun sonucudur (MORRE ve ark. 1970). Zarlar arasında yapısal farkı ortaya koyan en kesin bilgiler özellikle cryodecapage'da gerçekleştirilen araştırmalar sonucu elde edilmiştir. Burada partiküllerin durumu ve görünüşü her zar tipi için ekseriya karakteristiktir (MOOR ve MÜHLETHALER 1963, BRANTON ve MOOR 1964, NORTHCOTE 1969, BRANTON 1969).

Sitoplasmik zarın dış yaprağı üzerinde glusidik bir oluşumun varlığı ilk kez Amip gibi bazı Protozoa'larda ortaya kondu (PAPPAS 1954, O'NEIL 1964). Bu örtü proteinlere bağlı asit polisakaritlerin bileşimidir; Lifsi görünüşte bir tabaka oluşturur. Ekseriya 1000 Å kadar varabilen bir genişlikte olabilir ve tabakada bir çeşit, bitkisel hücrelerin etrafındaki oluşumlara benzer bir yapı görülmüştür. Bununla beraber, bu örtü plastik bir zarla sıkı sıkıya bağlıdır ve mekanik olarak ondan ayrılmaz.

Aynı şekilde Metazoa hücrelerinin plasma zarının üzerinde de bir örtünün bulunduğu gösterilmiştir (RAMBOURG 1969). Böyle bir yapı çok geneldir ve birçok hayvan dokularında az veya çok büyük bir gelişme ile vardır. Bu örtü veya hücre kılıfı (RAMBOURG ve LEBLOND 1967), hücre kılıfı veya (BENNETT 1963) glikokaliks olarak isimlendirir galaktoz, fukoiz ve asit gruplarından zengin (sialik asit, sulfat ve karboksil grupları) glikoproteik tabiat gösterir. Bugünkü otoradyografik araştırmalar (BENNETT ve LEBLOND 1970, BENNETT 1970, WHUR 1970) polisakaridik kompozanların sentezinin bazı özel koşullara bağlı

\* Bibliyografyada gösterilenlerin dışındaki Literatür ROLAND, J.-C., BRIGITTE VIAN (1971)'den site edilmiştir.

bulunduğunu kesinlikle göstermiştir. Hayvan hücrelerinin glikokaliksini oynadığı rol gittikçe önem kazanmaktadır. Bir cins koruyucu jel oluşturmak suretiyle permeabilite ve immunité olaylarına karıştığı gösterilmiştir. Farklılaşması hormonal kontrol altındadır (PISAM ve ark. 1970).

Virüsler tarafından şekil değişikliğine uğratılmış hücreler çok kalın bir glikokaliks ve negatif yükte bir artış gösterirler; Bu örtü böylece bazı asit poliholosid boyaları (Rutenyum kırmızısı gibi) şiddetle tutar. Sonuç olarak, bitki hücresi için plasmalemma ve zar sistemi önemli bir rol oynar. Hücrenin bu bölgesinin özel aktivitesini işaret eden veriler arasında peroksidazik ve fosfotazik aktiviteyi açığa koymak (POUX 1967 ve 1969, ROBARDS ve KIDWAI 1969, CZANINSKI ve CATESSON 1969), otohistrografide radyoaktif prekürsörlerin katılması gibi olayları sayabiliriz (PICKETT-HEAPS 1967, RAY 1967, WOODING 1968). Bu çalışmalardan hemen önce de HAUPT (1970) fitokromun plasmalemmada lokalize olduğunu deneysel olarak açıklamıştır. ROLAND (1969) kollankimanın ultrastruktürel yapısında sitokimyasal teknikler kullanarak plasmalemmanın bir kısım reaktivitesini göstermiştir. Bu zarın farklılaşma özelliklerinin kesinlik kazanması ilginç görünmüştür. Şöyle ki: Bunun bir yandan sitoplasmik zarlarla plasmalemma arasında ve diğer yandan çeper ile plasmalemma arasındaki ilişkiler konusunda yeni bilgiler getirebileceği düşünülmektedir.

## Materyal ve Teknik

Reaksiyonlar *Pisum sativum*'un 4 günlük çimlenmiş kökçüklerinin uç kısımlarına ve *Ballota nigra*'nın büyümekte olan gövdesinin farklılaşmakta olan dokularına uygulanmıştır. Bir kısım metaller çok ince kesitler üzerine, diğer bir kısmı da gömme işleminden önce parçalar üzerinde denenmiştir.

### Parçalar üzerinde inkubasyon

1. Kolloidal Metaller: Kolloidal demirhidrat ve thorotrast daha önce kurbağanın sidik torbası epitelial zarlarını ve diğer hayvan dokularını incelemek için 4-16 saat bekletildiği hallerde yararlı olmuştur (PISAM ve ark. 1970). Dokular daha sonra yıkanmış ve takiben ROLAND ve VIAN (1970) tarafından kullanılan alışılmış metoda göre reçine içine alınmışlardır.

Pozitif reaksiyonun sialik asidin varlığına bağlı olup olmadığını kontrol etmek için hayvan hücrelerinde olduğu gibi (PISAM ve ark. 1970) bir kısım parçalar önceden 37 C° de 3-16 saat nöraminidaz içinde bekletilmiştir.

2- Rutenyum kırmızısı, LUFT (1966) metoduna göre kullanılmıştır yani (Glutaraldehit-Osmium) gibi farklı fiksasyon ve yıkama banyolarına boya ilave ederek.

İnorganik iyonları bulmak için birçok teknikten yararlanılmıştır:

a- Fiksasyondan önce veya sonra doku parçalarını %2 lik kurşun esetat (CARASSO ve FAVARD 1966) veya kobalt nitrat içinde (FAURE-FREMIET ve ark. 1956) inkubasyon suretiyle değiştirme metodu.

b- Potasyum piroantimonat metodu, reaktif aynı zamanda daha önce TANDLER ve ark. (1970)'in ileri sürdükleri gibi fiksatif olarak da iş görür.

c- Oksalat metodu, Doku parçaları fiksasyondan önce 0,002 M. amonyum oksalat solusyonu içinde bir saat bekletilir (CARASSO ve FAVARD 1966).

#### Kesitleri Boyama

Uygulanan denemeler içinde genellikle glikoprotein ve polisakkaritlerin belirticisi gibi kabul edilen iki metod kesin sonuçlar vermektedir:

1 - APS (Asit periyodik Schiff)'den esinlenen metod, sitokimyasal mekanizması en iyi şekilde yerleşmiş olanıdır (JENSEN 1962). Metod SELIGMAN ve ark. (1965) tarafından elektron mikroskobu için bazı değişmelere uğratılmış, daha sonra THIERY (1967) üzerinde bir kısım değişiklikler yapmış, ROLAND ve SANDOZ (1969) da bitkisel hücrelere uygulamışlardır.

Asit periyodik tarafından okside edilen vic-glikol grupları aldehit fonksiyonu görür. Bu uygun bir reaktifle (örneğin, tiyokarbohidrolaz veya TCH, gümüş proteinat gibi) ortaya konulmuştur. Reaksiyon ürünleri spesifik ve opak gümüş taneleri ile örtülmüştür.

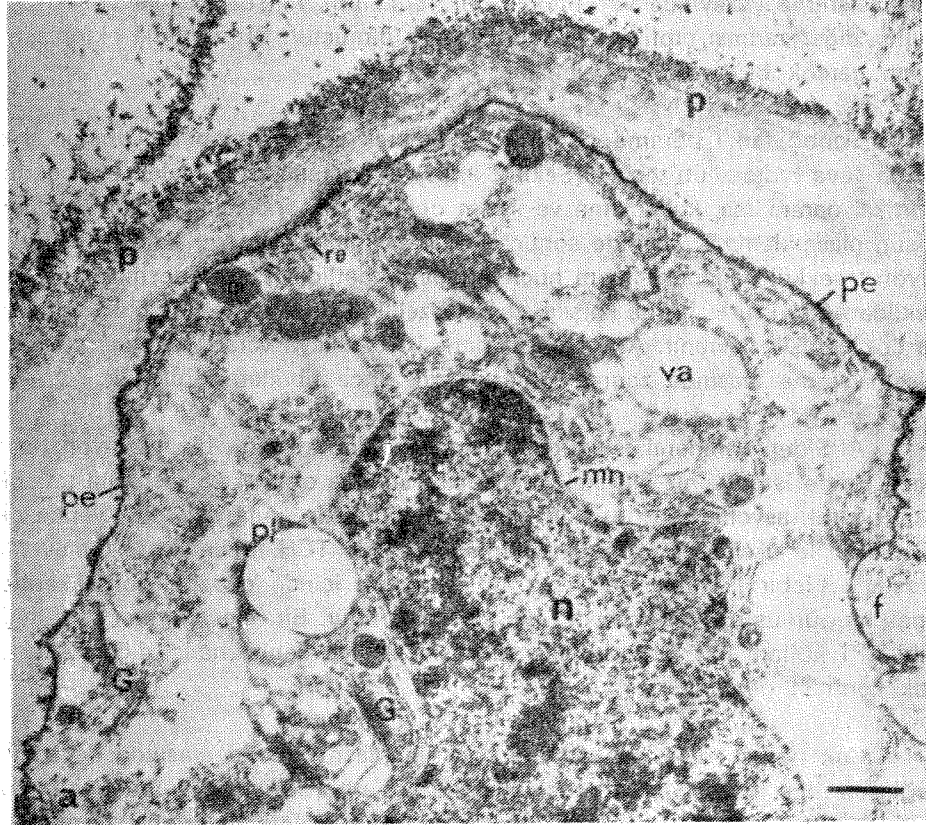
2- Aşağı Ph derecelerinde (APT) asit fosfotungstik kullanılarak yapılan reaksiyonların az bilinen bir mekanizması vardır fakat PEASE (1970) tarafından yapılan araştırmalar, bazı kullanma şartlarında bunların glusidik polimerazlar için seçime bağlı olduğunu göstermiştir.

Faydalanılan teknik RAMBOURG (1967) tarafından belirtilen tekniktir. Reaksiyonlar yalnız glutaraldehitte fikse edilmiş ince kesitler üzerinde uygulanmıştır. Gömme ortamının spesifitesi boyanınkinden farklı değildir. Aynı teknik hidrofob reçineler (epon, araldit, butilmetakrilat) veya hidrosolub reçineler (glikol-metakrilat veya GMA-glikometaakrilat- gibi) içindeki materyal kesitlerine de uygulanmıştır (LEDUC ve BERNHARD, 1967).

Sonuçlar sırayla gözden geçirildiğinde; 1. Ektoplastmik zarın bütün profili üzerinde özel bir farklılaşmanın olduğunu ortaya koyan ve bitkisel plasmalemma-ın yüzeyinde bir çeşit glikokaliks varlığını düşündürebilecek şüphe götürmez pozitif sonuçlar,

2. Sadece incelenmiş materyalin bir kısmı hakkında ve bu plasmalemmaın kalınlık değişikliğinin varlığını işaret eder gibi görünen pozitif sonuçlar olmak üzere 2 grupta toplanabilir.

Doku parçalarının demir veya thorotrast gibi kolloidal metaller içinde inkubasyonu, plasmalemmaın bütün yüzeyi üzerinde düzgün bir markaj meydana getirir. Diğer zarlar hiçbir metal yakalamaz ve ancak kesitlerin Uranil asetatla kontrastlığı artırıldıktan sonra farkedilir (Şekil 1). Kolloidal metalin yakalanması



Şekil: 1 - Kolloidal Demir. Reaksiyon parçalar üzerinde uygulanmış. *Pisum sativum* kök protoderması. Glutaraldehitte fiksasyondan sonra, parçalar 5 saat asetik demir hidrat içinde inkubasyona tutulup epon içine yerleştirilmiştir. Kesit uranil asetatla kontrast edilmiştir. f, salgı çukurcuğu, G: golgi cihazı, m: mitokondri, mn: nukleus zarı, n: nukleus, p: çeper, pe: plasmalemma, pl: plastid, va: vakuol.

bilhassa plasmalemma'nın dış yüzünde meydana gelir ve burada yoğun bir örtü oluşur. Zarın iç yüzünde yer yer tripartit bir yapı halinde kendisini belli eden ince bir birikinti kaydedilebilir.

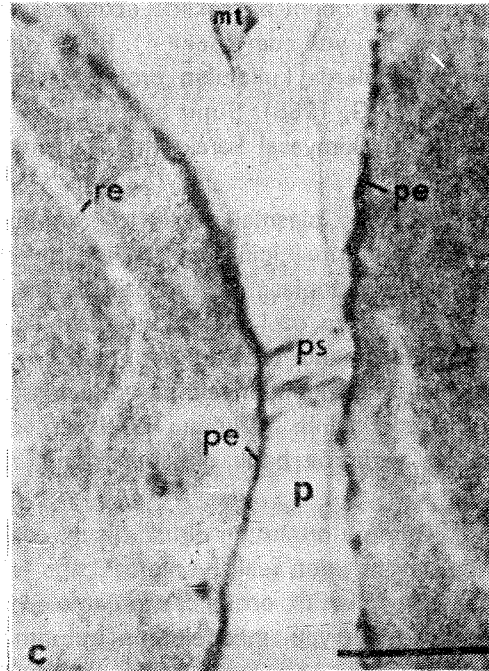
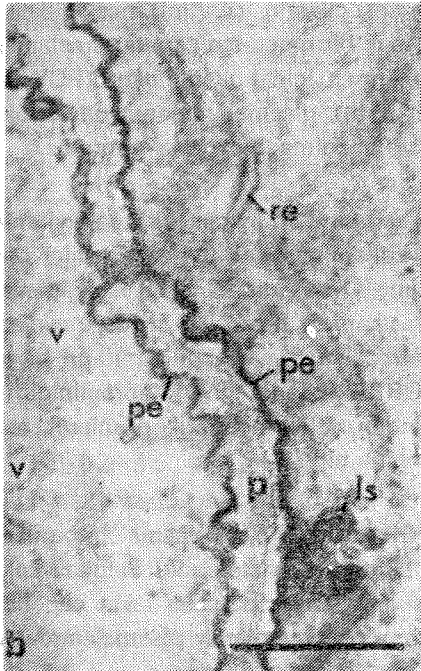
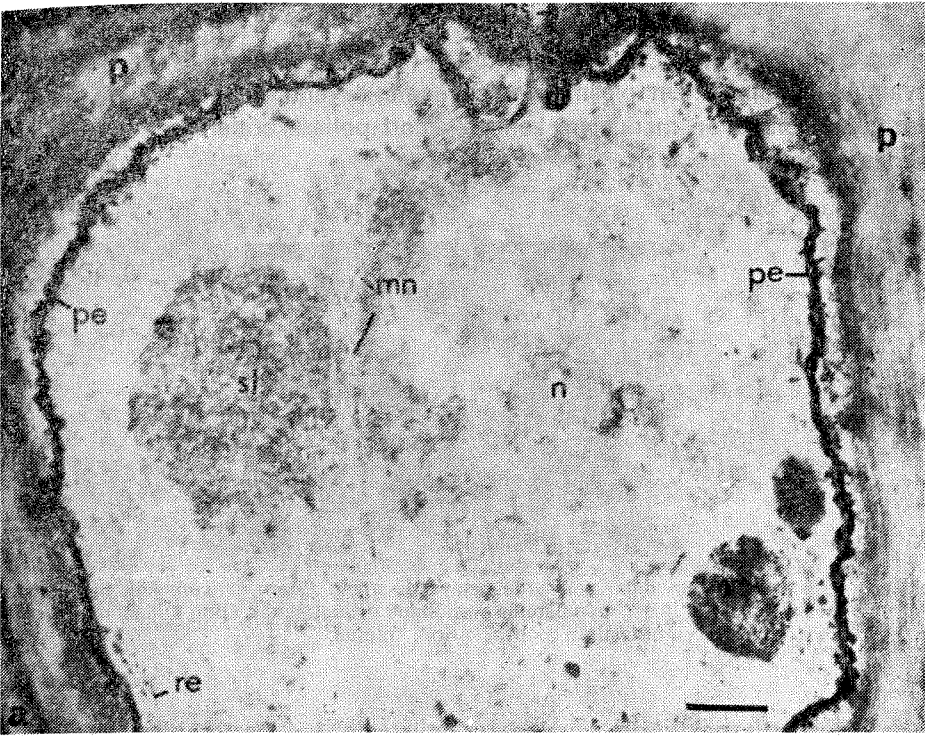
Bu tekniğin, asit gruplarının varlığını belirttiği kabul edilmiştir. Böylece zarın orta bölgelerinin de kolloidal partikülleri tuttuğu kaydedilebilir. Hayvansal hücre örtüsünün aniyonik grupları bağlamasında bir azalma meydana getiren nöraminidaz ile muamele (BLANQUET ve ark. 1970), plasmalemma yüzeyinde çökeltmenin şiddetinde bir değişiklik yapmaz.

Çok ince kesitler için aşağı Ph larda asit fosfotungstik kullanılarak iyi bir boyama şekli elde edilmiştir: Uygulama sonucunda meydana gelen kontrast, plasmalemma yüzeyinde ve endoplasmik retikulum, nuklear zar ve benzeri gibi yalnız diğer zarımsı profiller üzerinde yüksek olmuştur. Bu metodla ektoplasmik zarın gerçek bir markajı yapılmıştır.

Sonuç farklı gömme ortamları kullanarak tekrar edilebilir: Örneğin, hidrofob veya hidrosolub reçine (Şekil 2 a,b,c). Meristematik hücreler, protoderma, kortikal parankima, kollankima ve iletim dokusu gibi incelenen doku ne olursa olsun plasmalemma üzerinde sonuç aynı düzgünlükte kendini belli eder. Reaksiyon teşekkül halindeki floem hücrelerinde şiddetlidir. Plasmodesmalar da aynı şekilde APT'yi tutar; Buna karşılık çeper, özellikle GMA içine gömüldükten sonra çok değişik davranır. APT tesir zamanı 10 dakikaya varan hallerde, çeper ve plasmalemma arasında zarımsı bölge içinde ince fibriller görülebilir.

APS'den yararlanılan metod plasmalemmada kuvvetli bir reaksiyon temin eder. Hücre ister yalnız glutaraldehitte fikse edilmiş olsun veya osmium tetroksitle postfiksasyona tabi tutulsun, reaksiyon pozitifdir. Asit periyodik yerine oksijenli su ile oksidasyona tabi tutulan kontrollere TCH muamelesi görmeyenler arasında hiçbir kontrast görülmez. Aynı zaman içinde çeperin polisakkaritleri opak bir gümüş birikintisi ile düzgün şekilde örtülür. Bir önceki metodda olduğu gibi APT kullanılarak bazı sitoplasmik vesikülleri çevirenler hariç, diğer zarlar az çok kontrast gösterirler.

Çok hassas olan bu teknik, çeper ile plasmalemma arasında devamlılık sağlayan ince iplikçikleri (tractus) meydana çıkarır (Şekil 3). Protodermada çok sık olarak rastlanan bu iplikçikler incelenen bütün hücre tiplerinde görülebilir. Bununla beraber, bunlar devamlı değildirler ve örneğin sekresyon fazı gibi hücrelerin fizyolojik devrelerini ifade ederler. Böylece bu teknikle aynı hücre içinde plasmalemmayı değişik görünüşlerde görmek mümkündür: 1. İster plasmalemma



çepere bir iplikçik grubu ile birleşmiş olsun (Şekil 3), 2. İster iki yapı arasında bir devamlılık görülmeksizin plasmalemma çepere dayanmış olsun; 3. ve nihayet, ster çeperi oluşturan maddelere karışan amorf polisakkaritleri içeren kesecikleri belirlesin.



Şekil : 3 - Plasmalemma'nın diğer şekillerde ortaya çıkarılışı: *Pisum sativum* kök parankimasi, Kesitler üzerine APT uygulanmış ve gömme ortamı olarak Epon kullanılmış, t: çeper ve sitoplazma'yı birleştiren polisakkaridik tractus.

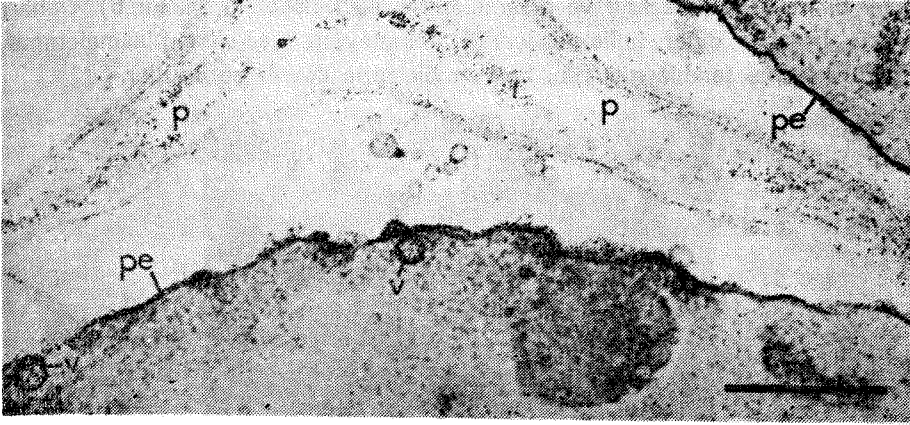
Selülaz ve pektinazla yapılan bir muamele 1-4 saatte plasmalemma'nın reaktivitesini belirli bir şekilde etkilemeksizin keseciklerin içeriğini, ince iplikçikleri ve çeperi yok eder (Şekil 4). Böyle enzimatik bir muamele çeperi parçalamak ve incelemelerde kullanılan protoplastı elde etmek için kullanılmıştır (POWER ve COCKING, 1968). Şunu belirtmek gerekir ki bu, plasmalemma'nın ultrastrüktürel ve sitokimyasal karakterleri üzerinde bir bozulma meydana getirmez.

Böylece plasmalemmayı diğer hücre zarlarından ayıran bir reaktivitenin varlığını göstermek için birçok metod birlikte kullanılmıştır. Bazı reaksiyonlar çok belirlidir ve ektoplazmik zarın özel bir markajına elverişlidir. Yine bu reaksiyonlar plasmalemmaya özel bir farklılaşmayı açığa çıkarır. Yalnız sitokimyasal verilerden farklılaşmanın tabiatını ayrıntıları ile çıkarmak güçtür. Düzgün zarların biyokimyasal analizlerinden alınan sonuçlar (MORRE ve ark. 1970), nöraminidazın olumsuz etkisinin varlığını kabul etmediğinden, elektrojenatif grupların asit sialik'in varlığına bağlı olmadığı görüşüne varılabilir.

Gömme ortamı ne olursa olsun, aşağı Ph larda APT ile plasmalemma üzerinde devam eden reaksiyonlar glikoproteik bir tabiat gösterebilir. Selülaz, pektinaz gibi glikolitik enzimlerle muamele çeperi tamamen parçalar fakat çeperin kilerden farklı yapı maddelerinin bulunmasının sonucu olarak plasmalemma'nın



aktivitesini azaltmaz. Buna karşılık bu parçalama işi plasmalemmadan ayrılan polisakkaridik ince iplikçikleri ortadan kaldırır.



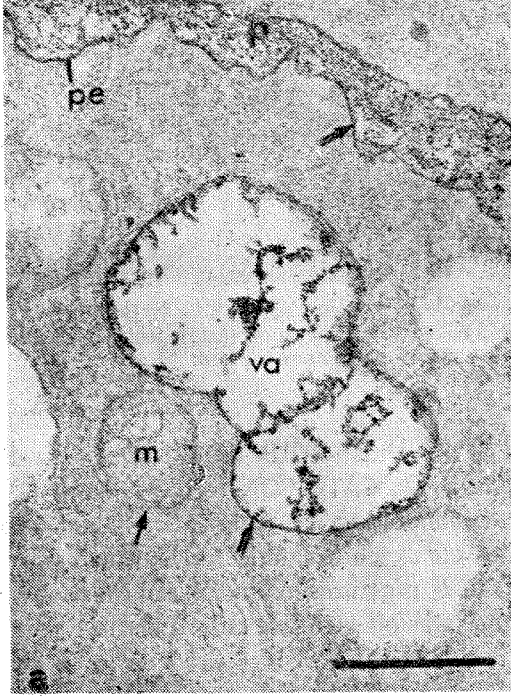
Şekil : 4 - *Pisum sativum* kök parankiması 2 saat selüloz ve pektinaz etkisine bırakıldıktan sonra elektron mikroskopu ile çekilmiştir. v: sitoplasmik vesikül. Sitoplazmanın reaktivitesi değişmemiş, bütün polisakkaridik tractus'lar erimiş, çeper parçalanmak üzere.

Daha önceleri de bir yandan POUX (1969) *Cucumis sativus*'un meristematik hücrelerinde, diğer yandan CATESSON ve CZANINSKI (1969) *Acer pseudoatanus* ve *Robinia pseudoacacia*'nın iletim hücrelerinde ektoplasmik zarın dış yüzünde çok belirgin olarak peroksidazik bir aktiviteyi gösterdiler. BRANTON (1969) zarların moleküler organizasyonundan bahseden bir çalışmada, zarın oluşturduğu iki lamel arasındaki dissimetriyi belirtti.

Sitokimyasal yol'a gün ışığına çıkarılan reaktivite, özellikle dış yaprağa ve suyun yüzeyine aittir. Bu yapılar, reaktivitelelerinden dolayı hayvansal hücrelerin mikokaliksini akla getirir. Çok defa, en az iki önemli karakterle glikokaliksinden ayrılırlar: Asit sialik'in yokluğu ve polisakkaridik iplikçikler vasıtasıyla çeperle arasındaki kurulan ve sürekli olmayan bağlantılarla.

Ohalde hücrede reaktiviteleri yönünden homolog olmayan iki tip zar ortaya konabilir: 1 - Farklı testlere kuvvetle tepki yapanlar; Bu, özellikle plasmalemma ve bazı sitoplasmik vesiküllerin örtüsü 2 - Az tepki gösterenler veya tepki göstermeyenler: Endoplasmik retikulum, tonoplast ve diğerleri... Sitoplasmik vesiküller ve plasmalemma arasında görülen değişim sırasında BUVAT'ın (1965, 1969) da belirttiği gibi moleküler yapısı eşit olmayan iki zar arasında anastomozlanabileceğini düşünmek zordur. Burada belirtmek gerekir ki içinde çeperin poli-

sakkaridik öncül maddelerinin teşekkül ettiği sitoplasma vesikülleri bir olgunlaşma devresi geçirir. Bu devrede sadece içeriğin yoğunluğu artmakta kalmaz aynı zamanda vesikülleri çeviren zar da şekil değişikliğine uğrar. Bu zar, plasmaninkine benzer bir reaktivite kazanır ve plasmalemma ile birleşebilir (Şekil 5). Daha az olmakla beraber diğer hallerde içeriği bilinmeyen vesiküller plasmalemmaya değdiği yerlerde farklılaşmış gibi beliren bir zarla çevrili görünürler.



Şekil : 5 - Zarların farklılaşması, Asit periyodik ve gümüş proteinat uygulanması. (Çift ok çok reaktiv zarları, tek ok reaktiv olmayan zarları belirtmektedir).

Bu hücre kısmının biyokimyasal karakterlerini kesinleştirmek için tamamlayıcı araştırmalara gerek vardır. Bu konuda, plasmalemma kontrast teknikleri hücre fraksiyonu sırasında diğer hücre zarları arasında onun tanınmasını sağlayan bir yol temin eder.

#### BİBLİYOGRAFYA

- FAURE - FREMIER, E., C. ROUILLIER et M. GAUCHERY (1956): La structure fine des Ciliés. Présentation de micrographies électroniques. Bull. Soc. Fr. Zoo. 81, 168.
- FREY-WYSSLING, A., and K. MÜHLETHALER (1965): Ultrastructural plant cytology.
- MOOR, H., and K. MÜHLETHALER (1963): Fine structure in frozen-etched yeast cells. J. Cell. Biol. 17, 609-628.
- ROLAND, J.- C., et BRIGITTE VIAN: Réactivité du plasmalemma végétal. Prot. 73-1. 1971.