



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



SPERMDEN MODEL MEMBRANLARA LİPİT ASİMETRİSİNİN KAYBI

Gülçin PEKKURNAZ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Joshua ZIMMERBERG

2009 - ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SPERMDEN MODEL MEMBRANLARA LİPİT
ASİMETRİSİNİN KAYBI**

Gülçin PEKKURNAZ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Joshua ZIMMERBERG

**Bu tez, National Institutes of Health, Intramural Research and Education,
Program of Physical Biology doktora programı kapsamında Prof. Dr. Joshua
Zimmerberg tarafından desteklenmiştir.**

2009 – ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10 / 04 / 2009

Prof. Dr. Alp CAN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Jüri başkanı

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Raportör

Prof. Dr. Mehmet UĞUR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Nuray ULUSU

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Pelin ARIBAL

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	ix

1. GİRİŞ

1.1. Biyolojik membranlardaki asimetric lipit dağılımının keşfinin tarihçesi	1
1.2. Ökaryotik hücre membranlarında lipidlerin asimetric dağılımı	5
1.2.1. Plazma membranında “transbilayer” lipit hareketlerini düzenleyen mekanizmalar	9
1.2.1.1. Membran asimetricisinin korunması	10
1.3. Plazma membranında transbilayer lipit asimetricisinin kaybolma mekanizması	12
1.4. Fosfatidilserin’in sperm membranında “ transbilayer” yer değiştirmesi ve sperm yumurta füzyonundaki rolü	14
1.4.1. Sperm ve yumurta füzyonu: “ Fertilizasyon”	14
1.4.2. Fosfatidilserin’in hücre membranında “ transbilayer” yer değiştirmesi sperm aktivasyonu veya ölümü ile bağlantısı	15
1.5. Fosfatidilserin’in membran füzyonunu tetikleyici özellikleri	17
1.6. Lipid poru oluşması sonucunda fosfatidilserin asimetricisinin bozulması	18
1.7. Amaç	20

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Kullanılan malzeme ve cihazlar	22
2.2. Kullanılan lipitler ve kimyasallar	24
2.3. Analiz için kullanılan programlar	25
2.4. Gametlerin toplanması	26
2.5. Akrozom reaksiyonunun uyarılması ve saptanma yöntemi	26

2.6. AnnexinV – alexa488 ile PS transferinin, propidium iodide (PI) ile membran geçirgenliğinin belirlenmesi	27
2.7. Elektron Mikroskobu ile PS'in hücre membranında “transbilayer” yer değiştirmesinin sperm üzerinde tespit	27
2.8. “Bilayer lipid membranes (BLM)” üzerindeki deneyler	28
2.9. Küçük membran “patch” ’leri üzerindeki deneyler	29
2.10. Yapılan ölçümler	29
2.11. “Inner Field Compensation (IFC)” tekniği ile membran asimetrisinin saptanması	30

3. BULGULAR

3.1. PS'in sperm membranında “transbilayer” yer değiştirmesi ile acrosome reaksiyonunun ilişkisi	35
3.2. Transbilayer PS transferinin sperm-yumurta füzyonundaki rolü	41
3.3. Asimetrik membranların oluşturulması ve mekanik özelliklerinin belirlenmesi	44
3.4. Voltaj bağımlı kapasitatif membran cevabının birinci ve ikinci harmoniklerle ölçümü	45
3.5. Ramp yöntemi ile kapasitatif membran cevabının saptanarak membran asimetri kaybının ölçümü	49

4. TARTIŞMA

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

ÖZET

SUMMARY

KAYNAKLAR

ÖZGEÇMİŞ

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve “National Institutes of Health (NIH)” ‘ in birlikte imzaladıkları “ Individual Graduate Student Partnership” anlaşması kapsamında “NIH Intramural Research and Education” tarafından sağlanan doktora bursu ile desteklenmiş ve tüm deneyler NIH, “National Institutes of Child Health and Human Development (NICHD)” , “Laboratory of Cellular and Molecular Biophysics” , Bethesda, MD, USA’ de Prof. Dr. Joshua Zimmerberg’in yönetiminde yapılmıştır. Ankara Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji doktora programında tez danışmanım olan Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu, tez konusunun belirlenmesi, araştırmanın doktora programı dâhilinde ilerlemesi, farklı alanlara teşvik edici tartışmalarıyla tezin her aşamasında önemli katkılarda bulunmuştur. NIH danışmanım Prof. Dr. Joshua Zimmerberg tez çalışmasının konusunun belirlenmesinden, metot seçimine, karşılaşılan deneysel zorlukların aşılmasından sonuçların değerlendirilmesine kadar her aşamada birincil rol oynamıştır.

Bu tez çalışmasının tamamlanmasında her zaman beni destekledikleri için danışmanlarım Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu ve Prof. Dr. Josh Zimmerberg’e teşekkür etmek istiyorum. Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu bir adım daha ileri gidebileceğime ilk inanan kişi oldu. Her zaman yanımda olduğu ve sonsuz desteği için ona çok şeyler borçluyum. Prof. Dr. Josh Zimmerberg’e özellikle beni membran biyofiziği ile tanıştırdığı, istediğim konuları özgürce keşfetmemde yol gösterici olduğu için teşekkür ediyorum. Onun sınır tanımayan fikirleri, bitmek bilmeyen enerjisi, hiç bir zaman son bulmayan tartışmalarıyla bilimde gitmek istediğim yolu buldum.

Dr. Paul Blank’e bana rakamlarla uğraşmaktan zevk almayı öğrettiği, daha da önemlisi tüm bilgeliğini ve deneyimini benimle paylaştığı için minnettarım. Ondan, her an gerek hayat, gerekse bilimle ilgili yeni bir şey öğrendim.

Dr. Vadim Frolov ve Dr. Konstantin Pavlov ile birlikte çalışmak bir zevkti. Tezime çok büyük katkısı olan tekniğin geliştirilmesinde ve uygulanmasında benimle tecrübelerini paylaştıkları ve yardımcı oldukları için teşekkür ederim.

Dr. Thomas Reese’e elektron mikroskobu örneklerinin hazırlanması aşamasında bana laboratuvarını açtığı ve deneyimlerini benimle paylaştığı için teşekkür ederim.

“ Laboratory of Cellular and Molecular Biophysics” ‘ in tüm üyelerine özellikle Dr. Glen Humprey’e bana deniz kestaneleri ile ilk çalışmaya başladığımdaki destekleri, Dr. Sasha Chanturia’a enstürmasyon konusundaki yardımları ve Dr. Anna Shnyrova’ ya ihtiyacım olduğunda kimyasal malzemelerini ve deneyimlerini benimle paylaştığı için teşekkürü bir borç biliyorum. Değerli arkadaşım Dr. Julia Mazar’a laboratuvar içinde ve dışında her ihtiyacım olduğunda yanımda olduğu için minnettarım.

Doktora tezim boyunca gerek telefon ve e-mail vasıtasıyla Türkiye’den, gerekse Washington, DC’de benim yanımda olan tüm arkadaşlarıma özellikle Ethan Buch’a

MatLab kodunu yazmamdaki yardımları için teşekkür ediyorum. En zorlandığım günlerde onların destekleri olmadan bu aşamaya gelemezdim.

Özellikle Dr. Matthew Banghart'a binlerce mil uzaktan her zaman yanımda olduğu için, bitmek bilmeyen desteği, tezimi bitirmem için verdiği motivasyon, sonsuz sabrı ve bazen sabırsızlığı için teşekkür ediyorum. Her zaman söylemesi gereken cümleleri buldu ve son dört yılda hayatımdaki en büyük neşe kaynağı oldu.

Son olarak aileme teşekkür etmek istiyorum, onlara dünyayı borçluyum. Beni ben yapan her şeyi onlardan öğrendim. İyi ve kötü günlerimde koşulsuz destekleri, sevgileri, tüm şefkatleri ile hep benimle oldular, çok uzaklardan da olsa... Bilim aşkım beni onlardan çok uzaklara sürüklese de bir parçam bu tezin her anında onlarlaydı. Anneme, babama ve kardeşime bilim adamlığına uzanan seferimde benimle oldukları için teşekkür ediyorum ve bu tezi onlara armağan ediyorum.

KISALTMALAR

A23187	Calcium ionophore
AR	<u>A</u> croosome <u>R</u> eaction
ASW	<u>A</u> rtificial <u>S</u> ea <u>W</u> ater
BLM	<u>B</u> ilayer <u>L</u> ipid <u>M</u> embrane
C	Capacitance
DPhPC	1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DPhPS	1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Serine]
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EJ	<u>E</u> gg <u>J</u> elly
G	Conductance
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
I	Akım (Current)
IFC	<u>I</u> nnner <u>F</u> ield <u>C</u> ompensation
Lyso-PS	1-Acyl-2-Hydroxy- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho-L-Serine]
PBS	<u>P</u> hosphate <u>S</u> aline <u>B</u> uffer
PC	<u>P</u> hosphatidyl <u>C</u> holine
PE	<u>P</u> hosphatidyl <u>E</u> thanolamine
PI	<u>P</u> ropidium <u>I</u> odide
PS	<u>P</u> hosphatidyl <u>S</u> erine
Rh	Rhodamine
SD	Standart sapma
SM	<u>S</u> phingo <u>M</u> yeline
TEM	<u>T</u> ransmission <u>E</u> lectron <u>M</u> icroscopy
V	Voltaj (Voltage)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Biyolojik membran modellerinin kronolojik tarihi	4
Şekil 1.2. Hücre membranında yer alan 4 temel fosfolipitin moleküler yapısı	6
Şekil 1.3. Membran asimetrisini düzenlemede rol oynayan proteinler	11
Şekil 1.4. "Fertilizasyon" sperm-yumurta füzyonunun genel bir planı	15
Şekil 1.5. Membrandaki porlar	19
Şekil 2.1. Bilayer lipit zarlarında elektrofizyolojik ölçümler için kullanılan deneysel düzenek.	29
Şekil 2.2. Asimetrik membran içerisinde potansiyellerin dağılımı.	31
Şekil 2.3. Membran "boundary potential" ölçümleri aracılığı ile PS asimetrisinin kaybının ölçülmesinin temel prensibi.	34
Şekil 3.1. Akrozom reaksiyonunun phalloidin işaretlenmesi ile tespiti.	36
Şekil 3.2. AR uyarılmış spermelerde tranbilayer PS varlığı.	37
Şekil 3.3. AnnexinV-alexa488 ve PI ile birlikte işaretlenmiş, AR uyarılmış spermelerdeki heterojen paternler.	38
Şekil 3.4. AnnexinV-gold ile işaretlenmiş, AR uyarılmamış sperm.	39
Şekil 3.5. AnnexinV-gold ile işaretlenmiş, AR uyarılmış sperm.	40
Şekil 3.6. Yumurtada fertilizasyon kılıfı.	41
Şekil 3.7. Sperm ve yumurta füzyonunun AnnexinV ile inhibisyonu ve yumurtaların A23187 ile yeniden aktivasyonu.	42
Şekil 3.8. AnnexinV'in "cortical granule endocytosis" üzerindeki etkisi.	43
Şekil 3.9. Sperm ve yumurta füzyonunun Anti-PS antikoru ile inhibisyonu ve yumurtaların A23187 ile yeniden aktivasyonu.	44

Şekil 3.10. Asimetrik membranda frekans bağımlı kapasitatif cevap.	46
Şekil 3.11. Voltaj bağımlı kapasitatif cevap: ilk harmonik, simetrik ve asimetrik membran.	47
Şekil 3.12. Farklı simetrik membranlarda ikinci harmonik ölçümleri.	47
Şekil 3.13. Farklı simetrik ve asimetrik membranları ikinci harmonik cevabı.	48
Şekil 3.14. Ramp yöntemiyle boundary potential'ının ölçülmesi.	50
Şekil 3.15. Step ve Ramp yöntemleriyle ölçülen boundary potential değerlerinin karşılaştırılması.	51
Şekil 3.16. Yüksek voltaj muamelesi neticesinde membranda oluşan por.	52
Şekil 3.17. Yüksek voltaj muamelesi neticesinde membranda oluşan porların geçirgenlik değerlerinin dağılımı.	53
Şekil 3.18. Por oluşumu neticesinde transbilayer lipid transferi ölçümü ve zamana bağlı değişimi.	54
Şekil 3.19. Küçük membran “patch” ‘lerinde lipit transferinin tespiti.	55

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Temel lipid sınıflarının hücreden hücreye yüzdelerindeki değişim. 7

1. GİRİŞ

“Biyolojideki basite indirgeyici görüş, yapı-fonksiyon hipotezine dayanır: keşfettiğimiz kendine özgü fonksiyona sahip olan özel yapılar evrimsel olarak seçilmiştir. Biyolojik membranlara bu açıdan baktığımızda, ilk organizmanın oluşumdan başlayarak kompartımanlara ayrılmanın önemini görüyoruz. Spesifik yollarla bariyer oluşturarak hücreyi kompartımanlara ayıran membranlar, sıvı ortamları kendiliğinden çevreleyecek şekilde geçirgen bir bariyer oluşturan lipit bilayer yapısındadır. Bu yapı, ilave makromoleküllerle modifikasyona uğrayarak besin maddelerinin alımını ve artık maddelerin atılımını sağlayacak şekilde özelleşmiştir. Enerji depolama özellikleri, hücre ve çevresi arasında bilgi alışverişini sağlayan geçişler gibi ilave ayrıntılar bariyer fonksiyonuna evrimsel süreçte eklenmiştir.”

Donald M. Engelman¹

1.1. Biyolojik membranlardaki asimetric lipit dağılımının keşfinin tarihçesi

Biyolojik membranların yapısının keşfi, membranlardaki lipitlerin (yağların) suyla nasıl etkileştiğinin anlaşılmasıyla başlamıştır. Yağların sudaki etkilerinden ilk bahseden kişi Pliny the Elder'dir. Pliny “Natural History” ansiklopedisinde gözlemlerini: “deniz suyundaki sakin olmayan element yağ ile sakinleştirilebildiğinden dalgıçlar yüzlerine yağ sürerler...” şeklinde yazmıştır (Tanford, 1989). Yüzyıllar boyunca da yağın suyu sakinleştirdiği düşüncesi halk kültürünün bir parçası olmuştur.

Bu konudaki bilimsel ilk çalışma Benjamin Franklin tarafından yapılmıştır. Franklin, 1774 teki bir İngiltere ziyareti sırasında, yağın su yüzeyine etkileri

¹ Engelman'ın günümüzde en geçerli kabul edilen membran modelini tanımladığı yayınından alıntıdır (Engelman, 2005).

konusundaki ilk deneyi yapmıştır. Clapham Common’ da küçük bir havuzdaki suya bir miktar yağ ekleyen Franklin, yağın su yüzeyine ince bir film gibi yayıldığında göletin büyük kısmının “pürüzsüz saydamlıkta görüldüğünü” tespit etmiştir. Bu deneyin sonuçları “Philosophical Transactions of the Royal Society” ‘de yayınlanmış olmasına rağmen önemi yıllar sonra fark edilmiştir. Neredeyse yüzyıl sonra 1890 yılında Lord Raleigh, yağ ve su üzerinde yaptığı bir dizi deney sonucunda Franklin ‘in bulgularını doğrulamıştır. Raleigh, bilinen hacmindeki yağın kapladığı alanı hesap ederek, yağ tabakasının kalınlığını hesaplamıştır (Eichman, 2009).

Lord Raleigh’in elde ettiği sonuçlar sadece, bu alanda uzman birkaç kişi tarafından takdir toplamıştır. Ertesi yıl, Agnes Pocket isimli Alman bir kadından mutfağında yaptığı bazı deneyleri ve yağ filminin kapladığı alanı kesin derecede ölçen bir cihazı tanımlayan mektup alan Lord Raleigh, bu bayana yardım etmeye başlamıştır. Agnes Pockels elde ettiği sonuçlardan, Lord Raleigh yardımıyla ilk 14 bilimsel makalesini yayınlamış ve bu makalelerin bilime çok büyük katkısı olmuştur. Pockels’in bulduğu cihaz günümüzde kimyagerler ve fizikçiler tarafından halen kullanılmaktadır (Eichman, 2009).

Lord Raleigh ile aynı zamanlarda Charles Ernest Overton, yağ tabakalarıyla yaptığı deneylerde, maddelerin membrandan geçiş kabiliyetinin bir şekilde kimyasal doğasıyla ilgili olduğunu ileri sürmüştür. Zürih Üniversitesi’nde Botanik bölümünde öğrenci olan Overton, yanlışlıkla polar olmayan maddelerin membrandan çok çabuk bir şekilde bitki hücrelerine geçebildiğini keşfetmiştir. Bu buluş, membranın sadece su geçirir olduğu fikrinin hatalı olduğunu göstermiştir.

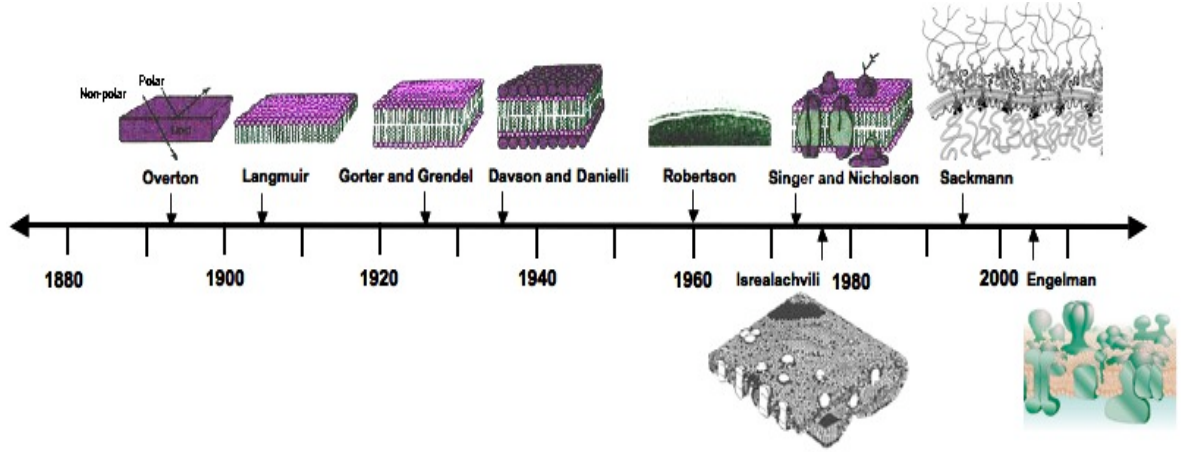
Çeşitli moleküllerin membrandan nasıl geçtiğiyle ilgili Overton:
(1) zeytinyağıyla, hücre membranı ve lipitlerin arasında bazı benzerliklerin olduğu ve
(2) belirli moleküllerin membranın içindeki lipitlerden geçerken “eriyebilir” özellikte olduğunu ileri sürmüştür. Günümüzde ne kadar önemli olduğu bilinen bu hipotezler,

o yıllarda kabul görmemiştir (Eichman, 2009).

Irving Langmuir, yağ tabakasının moleküler özellikleri ile ilgili detaylı araştırmalar yapan ilk kişidir. Agnes Pockels tarafından geliştirilen aparatın iyileştirilmiş versiyonunun kullanımı ile (günümüzde “Langmuir Trough” olarak adlandırılmaktadır), bilinen miktarda yağ molekülünün kapladığı alandan yola çıkarak yaptığı ölçümlerin sonuçlarını 1917’de tek bir makalede yayınlamıştır (Langmuir, 1917). Yağ asidi moleküllerinin, hidrokarbon zincirleri sudan uzak, karboksil grupları suya bakacak şekilde "monolayer" oluşturdukları modelini tanımlayan Langmuir, lipid bilayer yapısının anlaşılmasında anahtar rol oynamıştır.

Gorter ve Grendel ‘ın 1925 yılında biyolojik membranların yapısının "lipid bilayer" olarak tanımlanmasına giden ilk önemli adımı atmıştır (Gorter, 1925). Bilim adamları tarafından kabul edilen ilk membran modeli 1935 yılında Danielli ve Davson tarafından ortaya konulmuştur (Danielli, 1935). Yaklaşık yarım yüzyıl sonra, Singer ve Nicholson tarafından 1972 'de biyolojik membranı gerekli özellikleriyle tarif etmede en başarılı olan “sıvı-mozaik model” tanımlanmıştır (biyolojik membran modelleri Şekil 1.1 de kronolojik olarak gösterilmektedir). Singer-Nicholson modelinde biyolojik membranlarla tayin edilen en önemli özellikler, belirli bir akışkanlık ve organizasyon asimetrisidir (Singer, 1972).

Biyolojik membranlarda Singer ve Nicholson tarafından tanımlanmış olan protein asimetrisinden yola çıkan Bretscher, eritrosit membranlarında “transbilayer” lipid asimetrisinin var olduğunu 1972 yılında göstermiştir (Bretscher, 1972). Aminofosfolipitlerin ; Fosfotidiletanolamin [“ phosphatidylethanolamine (PE)”] ve Fosfotidilserin [“phosphatidylserine (PS)”] hücre membranının sitoplazmaya bakan yüzeyinde, kolin içeren lipitlerin ; Fosfotidilkolin [“ phosphatidylcholine (PC)”] ve Sfingomyelin [“ sphingomyeline (SM) “] hücre dışına bakan yüzeyinde yer aldığı böylece ilk kez tanımlanmıştır.



Şekil 1.1. Biyolojik membran modellerinin tarihçesi. Gorter ve Grendel biyolojik membranların iki molekül kalınlığında lipid moleküllerinden oluştuğunu gösterdi². Danielli ve Davson bu modele membran proteinlerini ilave etti³. Robertson elektron mikroskobu ile elde ettiği verilere dayanarak, membran proteinlerinin membranı sandviç şeklinde saran tabaka olarak tanımladığı “unit membrane” modelini ileri sürdü⁴. Singer ve Nicholson sıvı-mozaik membran modelini 1972’de tanımladı. Israelachvili ise bu modeli membran protein ve lipidlerinin birbirinin kalınlığına göre konumlarını ayarlayabilecek, membran poru oluşumunu, katlanmasını, heterojenliğini de dikkate alarak yeniden düzenledi⁵. Hücre iskeleti ve glikokaliks tabakası Sackmann modeli ile ilave edildi⁶. En son olarak ise Engelman tarafından yüksek miktarda protein içeriği, farklı özelliklerde “patchiness – thickness” değişiklikleri biyolojik membran modeline eklendi⁷.

Transbilayer membran asimetrisinin varlığı ilk önce sakınca ile karşılanmış, ancak ilerleyen yıllarda farklı yöntemler kullanılarak aynı sonuca ulaşılmasıyla kabul görmüştür (Gordesky ve ark., 1975). İnsan eritrositlerinde ilk kez gösterilmesini takip eden 30 yıl boyunca membran asimetrisi farklı ökaryotik plazma membranlarında, hücre organellerinin membranlarında, bakteri ve virüslerde

² (Gorter, 1925)

³ (Danielli, 1935)

⁴ (Robertson, 1957)

⁵ (Israelachvili, 1977)

⁶ (Strey ve ark., 1995)

⁷ (Engelman, 2005)

araştırılmıştır. Farklı araştırmacılar arasında kantitatif veriler tam olarak uyuşmasa da, genel olarak tüm biyolojik membranlarda transbilayer lipit asimetrisinin var olduğu günümüzde kabul edilmektedir.

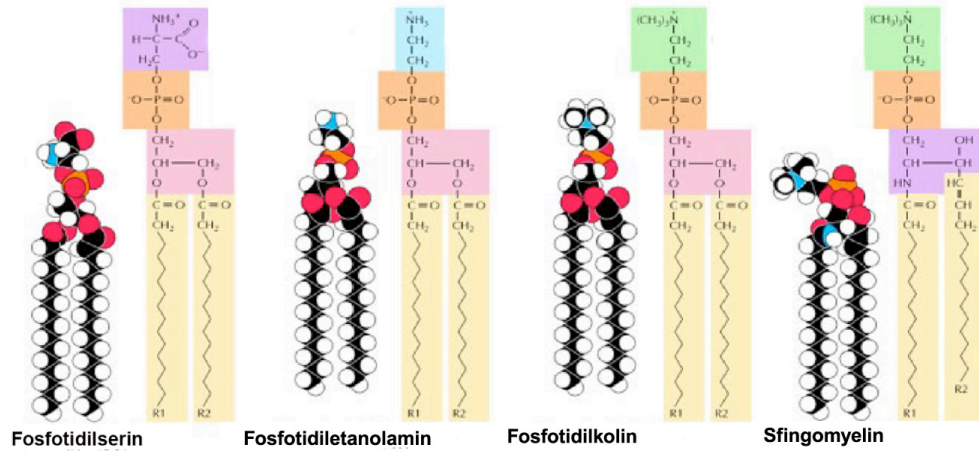
Çok uzun yıllar boyunca membran asimetrisinin sadece pasif bir olay olduğu düşünülürken 1984 yılında aslında hücrenin membranı asimetrik tutmak için enerji harcadığı bulundu (Seigneuret, 1984). Böylece membran asimetrisinin korunmasının fizyolojik olarak önemli olduğu ortaya çıkmış oldu (Devaux, 1988). Hücrenin korumak için enerji tükettiği membran asimetrisinin dinamik olarak düzenlenmesinin pek çok fizyolojik ve patolojik durumlarda rol oynadığı, sonradan yapılan çalışmalar neticesinde ortaya çıkmıştır (Kuypers, 1998).

1.2. Ökaryotik hücre membranlarında lipitlerin asimetrik dağılımı

Biyolojik membranlardaki temel lipit türü Fosfolipitler'dir ve sterol, yağ asitleri ve türevleri ile birlikte membranı oluşturur. Fosfolipid molekülleri hidrofilik (suyu seven) polar baş grubu ve hidrofobik (suyu sevmeyen), farklı uzunlukta ve doymuşlukta yağ asidi zincirlerinden oluşur. Polar baş kısım suya bakacak şekilde, yağ asidi zincirleri ise sudan uzakta kalacak şekilde yan yana paketlenerek membranı oluşturur. Lipitlerin bu amfipatik karakteri son derece stabil olan lipit bilayer yapısını meydana getirmekte temel rol oynar.

Ökaryotik hücre membranlarında yer alan 4 temel fosfolipit: Fosfotidiletanolamin (PE), Fosfotidilserin (PS) , Fosfotidilkolin (PC) ve Sfingomyelin (SM)'dir. Bu temel lipitlerin moleküler yapıları Şekil 1.2. de gösterilmektedir (Cooper, 2004). Daha önce de belirtildiği gibi PS ve PE hücre plazma membranının içe bakan yüzeyinde ("inner leaflet"), PC ve SM ise dışa bakan yüzeyde ("outer leaflet") lokalizedir. Hücre organellerini oluşturan membranlarda ise plazma membranının dış yüzeyinin topolojik olarak karşılığı, organel lümenine bakan yüzey olmaktadır. Bu sebepten dolayı, organel membranlarında da PS ve PE, sitoplâzmaya bakan yüzeyde yer alır. Ökaryotik hücre membranlarında az miktarda

membranda bulunan diğer fosfolipitler; Fosfotidik asit [“Phosphatidic acid” (PA)], Fosfotidilinozitol [“Phosphatidylinositol” (PI)], Fosfotidilinozitol-4-monofosfat [“Phosphatidylinositol-4-monophosphate” (PIP)] ve Fosfotidilinozitol-4,5-bisfosfat [“Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate” (PIP₂)] ‘dır. Bu minör fosfolipitler iç yüzey de yer almaktadır.



Şekil 1.2. Hücre membranlarında yer alan 4 temel fosfolipitin moleküler yapısı. Fosfolipid moleküllerinin çoğu; iki yağ asidi zinciri, gliserol, fosfat grubu ve polar bir grup (örneğin kolin, serin, etanolamin) içerir. Bu kurala uymayan Sfingomyelin ise gliserol yerine sfingozin içermektedir ⁸.

Membran lipitlerinin asimetric dağılımının en iyi karakterize edildiği model sistem, organel membran içeriğine sahip olmaması sebebiyle eritrositlerdir. Tüm membranı oluşturan temel fosfolipitlerden; PC'nin %65-75 'i ve SM'nin >%85 'i dış yüzeyde, PE'nin %80- 85'i ve PS'in >%96 'sı iç yüzeyde yer almaktadır. Minör lipitlerin (PA, PI, PIP, PIP₂) neredeyse %100'u membranın sitoplâzmaya bakan tarafında bulunur (Zachowski, 1993).

Membran asimetrisi korunsa da, lipit sınıflarının dağılımı hücreden hücreye değişiklik göstermektedir (Çizelge 1.1). Bazı hücrelerin plazma membranlarının dış

⁸ (Cooper, 2004) 'den modifiye edilmiştir.

bakan yüzeyinde yüksek miktarda PS ve PE tespit edilmiştir. Dış yüzeyinde en yüksek miktarda PS ve PE içeren membran, tavuk myoblast hücresi olarak gösterilmiştir. PS ve PE mevcudiyeti bu hücrelerin füzyona girerek kas fiberlerini (myotube) oluşturmasında önemli rol oynamaktadır (Zachowski, 1993).

Çizelge 1.1. Temel lipit sınıflarının farklı ökaryotik hücrelerdeki dağılımı. Çizelgede dinlenme halindeki farklı ökaryotik hücrelerin membranlarının dışa bakan yüzeylerindeki SM, PC, PE ve PS yüzdeleri gösterilmektedir⁹.

Hücre	SM	PC	PE	PS
İnsan eritrositi	80	77	20	4<
Fare eritrositi	85	50	20	0
Sıçan eritrositi	100	62	20	6
	100	63	0	0
Maymun eritrositi	82	67	13	0
İnsan trombosit	93	45	20	9
Domuz trombosit	91	40	34	6
Fare eritrolosemik hücreleri	80	45	50	15
LM hücreleri		48	24	
Fare sinaptozomu			10-15	20
Tavşan intestinal brush border	63	32	34	44
		30	28	
Tavşan böbrek brush border	80	35	23	15
Sıçan kardiyak sarcolemma	93	43	25	0
Krebs ascite hücreleri	47	52	45	19
Sıçan hepatositleri	65	85	50	0
Tavuk embriyonik fibroblastlar			35	20
Tavuk embriyonik myoblastlar			65	45

Plazma membranındaki lipit asimetrisinin en iyi karakterize edildiği hücreler, organelle sahip olmaması nedeniyle eritrositlerdir. Lipit asimetrisinin saptanmasında farklı yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler: hücre membranından geçemeyen kimyasallarla (2,4,6-trinitrobenzenesulfonate veya fluorescamine gibi) hücre dışına bakan lipitlerin işaretlenmesi, antikolar veya lipitlere özgü bağlanan proteinlerle (Annexin V gibi) immünolojik teknikler ile membranların işaretlenmesi, PS'e bağlı çalışan proteinlerle yapılan enzimatik

⁹ (Zachowski, 1993)

tahliller (kan pıhtılaşması gibi), fosfolipazlar ile spesifik lipitlerin sindirilmesi, fosfolipit “exchange” proteinleri, fiziksel metotlar (X-ray, Nükleer Magnetik Rezonans gibi) şeklinde özetlenebilmektedir (Devaux, 1991).

Eritrosit dışındaki ökaryotik hücrelerde biyolojik membranlardaki asimetrinin saptanması çok daha zordur. Plazma membranı, hücre organellerini oluşturan membranlar hesaba katıldığında toplam hücre membranı miktarının çok az bir yüzdesini oluşturmaktadır. Plazma membranındaki asimetri yukarıda belirtilen teknikler kullanılarak hesaplanılabilir. Bunlara ilaveten, ayrımsal santrifüj, plazma membranından tomurcuklanan (“budding”) virüs membranlarının analizi neticesinde farklı ökaryotik hücrelerdeki membran asimetrisi kantitatif olarak Çizelge 1.1’de özetlendiği gibi hesaplanabilmiştir. Kullanılan her yöntemin %10 hata payı içerdiği bilinmektedir (Devaux, 1991; Zachowski, 1993).

Plazma membranı ile kıyaslandığında, endoplazmik retikulum (ER), golgi gibi hücre organellerinin membranlarındaki lipit asimetrisi hakkında daha az bilgi mevcuttur. Bu membranların izolasyonu hücrenin lizisini (“ lysis”), pürifikasyon, “resealing” gibi aşamaları gerektirmekte ve her aşama metoda ayrı bir hata payı eklemektedir. Ayrıca, organel membranlarının çok dinamik olarak sürekli yeniden düzenleniyor olması da elde edilen sonuçlar arasında farklılıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Son verilere göre ER membranı diğer tüm biyolojik membranlara göre daha simetrik lipit dağılımına sahiptir. Membran asimetrisi ER’da golgi membranında başlayıp plazma membranına doğru gittikçe artmaktadır (Kol ve ark., 2004).

Normal şartlarda hücre membranındaki dağılımı asimetrik olan lipitler, hücre ölümü, kan pıhtılaşması, lenfosit aktivasyonu, makrofajlarda fagositoz, myoblast-myoblast füzyonu gibi özel durumlarda ya da patolojik oluşumlarla (kan kanseri gibi) tetiklendiğinde, bu asimetrik dağılımlarını kaybetmekte ve simetrik hale geçmektedirler (Das ve ark., 2004; van den Eijnde ve ark., 2001; Zwaal ve ark., 2005).

1.2.1. Plazma membranında “transbilayer” lipid hareketlerini düzenleyen mekanizmalar

Plazma membranında lipidlerin asimetrik dağılımı ER'dan itibaren kalıtsal olarak oluşur. Transbilayer asimetri oluşuktan sonra, lipidlerin suyu sevmeyen kuyruk grupları, aksine suyun yanında durmak isteyen baş grubu sebebiyle membran yapısı son derece istikrarlı bir şekilde korunur. Çünkü hidrofobik özellikte olan yağ asidi zincirlerinin membran bilayer yapısından uzaklaştırılıp suyun içerisine koyulması 55kcal/mol harcamak demektir. Bu sebepten dolayı membranda, özellikle transbilayer olarak lipidlerin yer değiştirmesi hiç kolay değildir (Zimmerberg, 2006).

Lipitlerin kendiliğinden transbilayer olarak tek tek transferi (“flip-flop” olarak adlandırılmaktadır), 1-6 lipid/saat hızında gerçekleşebilmektedir. Bu hız model membranlarda daha yavaş, hücre membranlarında ise daha hızlı olarak hesaplanmıştır. Flip-flop hızı lipid baş kısmının yapısına, yüküne, yağ asidi zincirinin hidrofobikliğinin düzeyine ve uzunluğuna, aynı zamanda lipid paketlenmesine göre de değişmektedir. Ekzositoz, endositoz, membran açılanması “curvature” değişiklikleri flip-flop hızını artırmaktadır (Paulusma, Oude Elferink, 2006). En kısa ömre sahip hücrenin (örneğin eritrosit) 5-120 gün boyunca canlı kaldığı düşünülürse, 1-6 saatte bir PS'in hücre dış yüzeyine bakan membrana transferi “flip-flop” belli süre sonunda membran asimetrisinin bozulması ve daha simetrik hale gelmesi demektir. Hücreler, asimetri kaybını önlemekle görevli ve dış yüzeye transfer olan PS ve PE'yi iç yüzeye taşıyan proteinlere sahiptir. Bunun tam tersi, membran asimetri kaybının gerekli olduğu durumlarda ise kendiliğinden transfer çok yavaş olacağından, hızlı bir şekilde membranı simetrik hale getirecek mekanizmaya gereksinim vardır. Membran asimetrisinin kaybolma mekanizmasının ne olduğu hala aydınlığa kavuşmamıştır (Devaux, 1991).

1.2.1.1. Membran asimetrisinin korunması

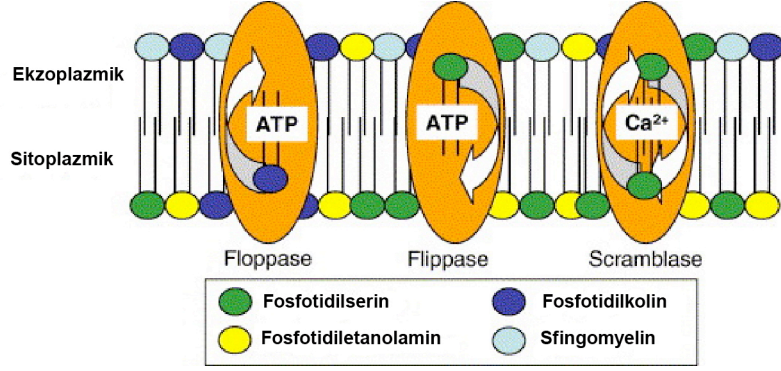
ATP-bağımlı olarak çalışan lipit taşıyıcı protein “ Flippase” ’in ilk kez insan eritrosit membranlarındaki keşfi ile hücrede membran asimetrisinin korunmasının önemi ilk kez ortaya çıkmış oldu (Seigneuret, 1984). Bu aktivite dış yüzeyden iç yüzeye PS ve PE taşınması ile karakterize edildi. Bu buluşu takiben yapılan çalışmalar sonucu flipaz aktivitesi diğer ökaryotik hücrelerde tanımlandı, “ bovine chromaffin granule” ’lerinden sorumlu protein izole edildi (Tang, 1996). Flipaz aktivitesinden sorumlu protein ailesi P-tip ATP-az (“ P-type ATPase”) olarak karakterize edildi (Şekil 1.3.).

Flipaz PS ve PE’yi iç yüzeye 5-10 dakika yarı zamanıyla (“half time”) transfer etmektedir (Zachowski, 1986). Aminofosfolipit taşıma aktivitesi ATP-hidrolyzi ve Mg^{+2} ‘a ihtiyaç duymaktadır (Beleznay, 1993). Flipaz’ın taşıma aktivitesi vanadate, sulfhidril ve histidin reaktif kimyasallar ile inhibe edilebilmektedir ancak bu inhibe edici koşullarda membran asimetrisinde kayıp tespit edilmemiştir (Connor, Schroit, 1990; Connor, 1988). Ayrıca sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonu mikromolar düzeye çıktığında flipaz aktivitesi inhibe olmaktadır (Bitbol, 1987).

Diğer ATP- bağımlı olarak çalışan lipit taşıyıcı protein “Floppase” ilk kez eritrosit membranlarında tanımlanmış, kolin içeren lipitleri membranın iç yüzeyinden dış yüzeyine yarı zamanı flipaz’dan 10 kat daha yavaş olacak şekilde taşıdığı tespit edilmiştir (Connor ve ark., 1990). Flipaz’a benzer olarak flofaz’da vanadate, sulfhidril ve histidin reaktif kimyasallar ile inhibe edilebilmektedir. Flofaz aktivitesinden sorumlu olarak “ Multi drug resistance-associated protein (MPR1)” tanımlanmıştır (Dekkers ve ark., 1998).

Hücre membranının dinamik yapısı içerisinde gerek flipaz, gerekse flofaz aktivitesi birlikte hareket ederek membranın asimetrik yapısını korumaktadır. İki protein ailesinin birlikte uyumlu şekilde çalışması neticesinde lipit asimetrisinin

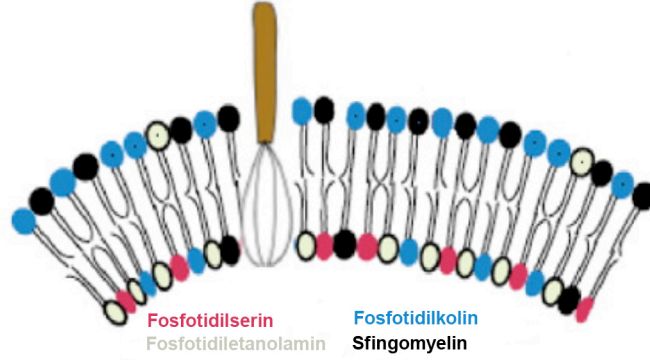
bozulması ve patolojik olayların oluşumu engellenmektedir (Schlegel, Williamson, 2007).



Şekil 1. 3. Membran asimetrisini düzenlemede rol oynayan proteinler. Çok yavaşta olsa flip-flop ile membranda olması gereken lipid düzeni değişmeye başladığında bu düzeni yeniden kurmakla görevli tanımlanan iki protein vardır: “flippase” ve “floppase” olarak adlandırılır. Flippaz’ın görevi, hücre dışına çıkmış olan PS ve PE ‘yi içe doğru taşımaktadır. Flopaz ise genellikle membran yapısında gerçekleşen değişiklikler sonucunda lipid sayısındaki değişiklikleri modifiye etmek üzere ATP bağımlı olarak PC taşıyan proteindir. Bu bahsi geçen asimetri korunmasında rol oynayan proteinler dışında bir de “scramblase” olarak adlandırılan ve asimetri kaybında rol oynadığı öne sürülen bir protein mevcuttur ¹⁰.

¹⁰ (Paulusma ve ark., 2006)

1.3. Plazma membranında transbilayer lipit asimetrisinin kaybolması



“... hızlı, enerji gerektirmeyen ve transbilayer olarak her iki yönde tüm lipitleri taşıyan –birbirine karıştıran- bir protein... bu aktivite çok kolay bir şekilde ölçülmüş “scramblase” olarak adlandırılmış. Ancak bu adı taşıyacak protein halen ortada yok¹¹.”

Hücrenin yaşamı boyunca çeşitli olaylar membranın bilayer organizasyonunun bozulmasına sebep olmakta asimetrisinin kaybına yol açmaktadır. Membran asimetrisinin korunması hücre fonksiyonlarının yerine getirilmesi ve yaşamı için ne kadar gerekliyse, asimetri kaybı da o kadar gereklidir. İlk olarak trombositlerde, kanın pıhtılaşması reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için membran asimetrisinin kaybının gerektiği gösterilmiştir (Schick ve ark., 1976). Asimetri kaybı trombositlerde, 5 saniyeden çok daha az zamanda gerçekleşmektedir (Born, Richardson, 1980). Daha sonra yapılan çalışmalarda çok farklı fizyolojik olay ve patolojik durumlarda membran asimetri kaybının önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur.

Çok çabuk olarak gerçekleşen asimetri kaybının gerçek mekanizması ise hala bilinmemektedir. Kendiliğinden gerçekleşen flip-flop'un çok yavaş olduğu, flipaz ve

¹¹ (Schlegel ve ark., 2007)'den alıntıdır.

flopaz proteinlerinin membran asimetrisini korunmasında oynadığı rol, onların inhibe olduğu durumlarda bile asimetrisinin hala uzun süre devam ediyor olması, asimetri kaybı için özel bir mekanizmanın gerekli olduğunu düşündürmektedir.

Asimetri korunmasında rol oynayan proteinler dışında bir de “scramblase” olarak adlandırılan ve asimetri kaybında rol oynadığı öne sürülen bir protein mevcuttur. Bu protein pıhtılaşma sorunu olan “Scott sendromlu” hastalar ile normal bireylerin kan hücrelerinin karşılaştırılması neticesinde ilk olarak tanımlanmıştır (Zhou *ve ark.*, 1997). Ancak yapılan knock-out, over-expression, yapay membranlarda aktivite çalışmaları neticesinde bu proteinin asimetri kaybından sorunlu olmadığı kesinlik kazanmıştır. İnsanda 4 homologu saptanan bu proteinin gerçek rolünün ne olduğu ise henüz bilinmemektedir (Acharya *ve ark.*, 2006; Janel *ve ark.*, 1999; Schlegel *ve ark.*, 2007; Zhou *ve ark.*, 1998).

Tek aday protein olan scramblase’in de artık adaylıktan çekilmesi ile asimetrisinin kaybolmasında rol oynadığı düşünülen bir protein kalmamıştır. Bu durumda alternatif mekanizmaların ileri sürülmesi gerekmektedir.

Hücrelerde çeşitli olaylar, bilayer organizasyonunu rahatsız edebilir ve kısmi lipit tekrar dağıtımını üretebilir. Bu olayların bir kısmı, kendiliğinden olmaktadır; endositoz ve ekzositoz gibi. Bazı, yapay tetiklenmiş olaylar da (örneğin membrana ilaç eklenmesi, elektroporasyon gibi) aynı etkiyi yapmaktadır. Doğal ve yapay bu olaylardaki ortak nokta membrandaki bilayer yapısından yerel ve geçici bir ayrılışı meydana getirmeleridir.

Ekzositoz neticesinde flip-flop miktarının hızlandığı durumlar gözlenmiştir (Devaux, 2000). Ayrıca bazı proteinlerin membrana insersiyonunun da geçici olarak transbilayer yeniden düzenlenmeyi tetiklediği bilinmektedir (Greenhut, Roseman, 1985). Özellikle bakteri membranlarında yapılan çalışmalar, heliks yapısındaki hidrofobik membran proteinlerinin flip-flop miktarını fazla miktarda artırdığını göstermiştir (Kol *ve ark.*, 2002).

Membran asimetrisinin kaybolma mekanizması, sadece bir proteinin lipitleri tek tek taşınması ile açıklamamaktadır. Çok hızlı şekilde gerçekleşen asimetri kaybı, pasif lipitlerin difüzyonu ile olabilecek ilave mekanizmaların varlığına dair soru işaretleri uyandırmaktadır. Membranda meydana gelen geçici yeniden düzenlemeler por olarak da tanımlanan non-bilayer yapıların oluşmasına sebep olmaktadır. Porlar aracılığı ile membran asimetrisinin hangi şekillerde yeniden düzenlenebileceğine dair detaylar ilerleyen bölümlerde anlatılmaktadır.

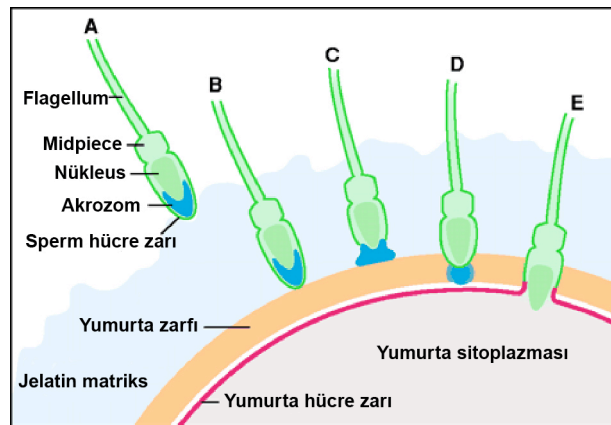
1.4. Fosfolipidlerin'in sperm membranında “ transbilayer” yer değiştirmesi ve sperm-yumurta füzyonundaki rolü

1.4.1. Sperm ve yumurta füzyonu: “ Fertilizasyon”

Fertilizasyon, spermin ve yumurtanın, yeni bir organizmayı yaratmayı başlattığı süreçtir. Fertilizasyonun ayrıntıları, türden türe oldukça değişmesine rağmen, genellikle, Şekil 1.4'de belirtildiği gibi tanımlanan beş büyük olaya dayanır. Her memeli hayvan sperminin, bir “akrozomal” vezikülü vardır. Akrozomal vezikül “ekzositoz” ’u, yani vezikül membranı ile plazma membranının füzyonu sperm aktivasyonu için gereklidir. Memeli yumurtaları, jel gibi bir matriksin altında bulunan bir yumurta zarfı ile kuşatılmıştır. Yumurtadan salınan kemoatraktan sinyal, spermin yumurtaya doğru yüzmesi için olumlu koşulları yaratır. Spermin yumurtaya dokunmasını takiben, akrozomal vezikül ekzositozu gerçekleşir [“akrozomal reaksiyon”(AR)]. AR ‘nu tamamlanmış sperm membranı, yumurta membranı ile füzyon için gerekli özelliklere sahiptir. Takiben gerçekleşen sperm-yumurta füzyonu ile sperm nükleusu yumurtaya girer. Sperm-yumurta füzyonu tür özelliği sergiler, yani eğer sperm hücreleri ve yumurtalar aynı türdence, kendisini füzyona götüren etkileşim, daha verimlidir. Eğer iki gamet, farklı türdence füzyon çok nadir olarak gerçekleşir. Fertilizasyonun tür seçiciliği, gamete tanıma proteinleri tarafından sağlanmaktadır. Füzyon aşamasının nasıl gerçekleştiği hala kesin olarak bilinmemektedir (Vacquier, 1998).

1.4.2. Fosfatidilserin'in hücre membranında “ transbilayer” yer değiştirmesi sperm aktivasyonu veya ölümü ile bağlantısı

Farklı hayvansal türden sperm hücrelerinde, PS'in hücre membranında “transbilayer” yer değiştirmesi, mitokondriyal transmembran potansiyelinin artması ve “kaspaz” aktivasyonu gibi apoptosis benzeri özellikler saptanmıştır. Membranın dışa bakan yüzeyinde sperm aktivasyonu sonucu PS'in belirlediği ilk olarak domuz sperm numunelerinde tanımlanmıştır. Memeli sperm hücreleri, dışı üreme kanalına ilk girdiklerinde fertilizasyon kapasitesine sahip değildir. Spermin bu hazırlanma aşaması “capacitation” olarak tanımlanır ve dışı üreme kanalında tamamlanır. Kapasitasyon *in vitro* olarak bikarbonat solüsyonu ile indüklenebilir.



Şekil 1.4. "Fertilizasyon" sperm-yumurta füzyonunun genel bir planı. (A) Yumurtaya doğru kimyasal olarak çekilen spermin yüzmesi ve (B) yumurta zarfına tutunması. (C) “Acrosome reaction” sonrası yumurta zarfının sindirilmesi için enzimlerin salınması ve deliğin meydana gelmesi. (D) Spermin, yumurta hücre zarına uzanıp ve (E) membran füzyonu ile iki hücrenin tek hücre haline gelip, diploit genom ile gelişmeyi aktif hale getirmesi (Vacquier, 1998).

Artırılan hücresel bikarbonat doğrudan, sperm “adenylyl cyclase” ’i aktif hale getirir ve sonuç olarak cAMP meydana gelir. cAMP, “protein kinase A (PKA)” ’nin aktif hale gelmesinden sorumludur. Bu mekanizmanın aktivasyonu sperm plazma zarının mimarisinde değişimlere sebep olmaktadır. Kapasitasyon reaksiyonu

neticesinde sperm membranı daha akışkan ve füzyona meyilli hale gelmektedir. Bu artırılan zar akışkanlığı, spermi bikarbonat ile muamelesi sonrasında merocyanine-540 adı verilen floresan boya ile tespit edilebilir. Zar akışkanlığının artmasının aynı zamanda zardaki lipidlerin transbilayer yer değiştirmesi ile de ilişkili olduğu C₆NBD ile işaretlenen fosfolipitlerin izlenmesi ile bulunmuştur. Bikarbonat ile stimüle edilmemiş sperm hücrelerinde membran asimetrik olarak düzenlenmiştir. Negatif yüklü olan PS, ilk bölümde belirtildiği gibi hücrenin sitoplâzmaya bakan membran yüzeyinde yer almaktadır. Bikarbonat ile uyarılan sperm hücrelerinin membranındaki asimetri kaybı, PS'e seçici olarak bağlanan flüoresan işaretli AnnexinV proteini aracılığıyla tespit edilmiştir (Flesch ,Gadella, 2000)

Bikarbonat uyarımı neticesinde gerçekleşen transbilayer fosfolipit dağılımı değişikliği, insan sperm hücrelerinde kapasitasyon ile ilişkilendirilmiştir. Kaspaz aktivitesinde artış, DNA'nın fragmente olması, mitokondri membran potansiyelinin değişmesi gibi hücre ölümüyle ilgili hiç bir değişiklik bu hücrelerde tespit edilmemiştir (Gadella ,Harrison, 2000). İnsan ve domuz sperm hücreleriyle yapılan bu çalışmalar, PS'in hücre membranında “ transbilayer” yer değiştirmesinin sperm aktivasyonu ile ilişkili ve apoptosisten bağımsız olduğu fikrini desteklemektedir. Takip eden başka bir çalışma, domuz spermi üzerinde yapılmış ve plazma membranının dış yüzeyinde PS'in ekspresyonunun kapasitasyon veya AR ile hiç bir ilişkisinin olmadığı, aksine sadece ölen sperm hücrelerinde membran asimetri kaybının gözlemlendiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, epididymiste ölü sperm hücrelerinin PS asimetrisini fagositoz amaçlı kullandığını öne sürmektedir (Kurz *ve ark.*, 2005).

Sonuç olarak sperm hücresinde PS'in hücre membranında “ transbilayer” yer değiştirmesinin aktivasyon ile ilişkili mi, yoksa apoptozis sebebiyle mi olduğu hala açıklığa kavuşmamıştır.

1.5. Fosfolipidlerin'in membran füzyonunu tetikleyici özellikleri

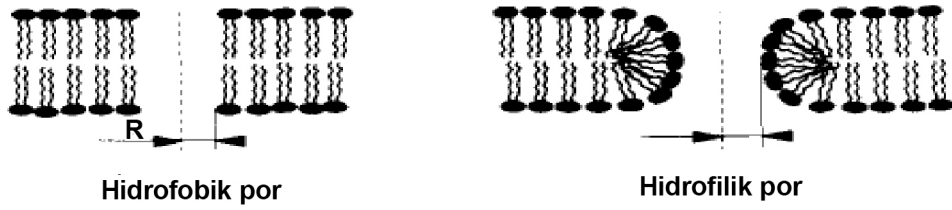
Yüzeyinde, PS bulunan ölü hücrelerin fagosite edilmesinin mümkün olduğu bilinmektedir. PS ile ilgili bilinen başka bir özellik ise model membranlarla yapılan çalışmalardan gelmektedir. PS içeren membranlarda kalsiyum varlığında, proteine gereksinim olmaksızın füzyon gerçekleşebilmektedir (Wilschut ,Papahadjopoulos, 1979). Tüm hücre, membran füzyonunun gerçekleştiği olaylarda (myoplastomyoplast, hücre-virüs, ekzositoz gibi) , lipide bağımlı gerçekleşen bir aşama mevcuttur (Chernomordik *ve ark.*, 2006).

Lipitlerin arasındaki suyun yarattığı iticilik yüzünden bilayer'lar , 2 nm veya daha az mesafe uzaklıkta birbirlerinden ayrılırlar. İki bilayer'ın birbirine moleküler düzeyde yaklaşabilmesi için aradaki su moleküllerinin uzaklaştırılması gerekmektedir. Kesinlikle temas, membran füzyonunun gerçekleşmesi için zorunludur, ama yeterli değildir. Membranlar arası direkt temas hücrelerde, iki bilayer'ı bir araya getiren özel proteinler ile kolaylaştırılır. Birbiri ile temas kuran membranlarda, füzyonun başlayıp, dışa bakan yüzeylerinin birleşmesi için basınca ihtiyaç duyulur. Membran füzyonunda yapılacak işi en aza indirmek için, iki membran arasındaki suyun uzaklaştırılması gereklidir. İki membran arasında hidrofobik küçük temas noktaları oluşturulduktan sonra bu küçük noktalar birleşir ve "stalk" oluşturur. Stalk'ın genişlemesi, hemifüzyona götürür. Hemifüzyon durumunun içinde bir lipit porunun oluşumu, genişlemesi, bir ko-planar füzyon gözeneginin oluşması, füzyonu tamamlayacak olan aşamalardır. Bazı özellikli lipitler, iyonlar ve sıcaklık, fosfolipit membran füzyonunu kolaylaştırır. PS kalsiyumun varlığında, zarların arasındaki su moleküllerini uzaklaştırarak zarlar arasındaki yapışmayı kuvvetlendirir, ve bu kuvvetli yapışma, membranın füzyonunu ilerletir (Chernomordik *ve ark.*, 2006; Zimmerberg ,Gawrisch, 2006).

1.6. Lipit poru oluşması sonucunda fosfolipidlerin asimetrisinin bozulması

Endo-ekzositoz gibi fizyolojik ya da hücre “lizis” ‘i gibi fizyolojik olmayan membran değişiklikleri, membranın çeşitli değişimlere uğrayıp, bilayer yapısını geçici olarak kaybedip, non-bilayer oluşumlar göstermesi neticesinde meydana gelmektedir (Chernomordik, 1996; Nanavati *ve ark.*, 1992). İlk olarak membran füzyonu ve lizis’in olduğu durumlarda membran lipitlerindeki flip-flop oranındaki artış Taupin tarafından gösterilmiştir ve bu artışın, membranda meydana gelmesi mümkün olan porlar sebebiyle olabileceği ileri sürülmüştür. Lipit moleküllerinden meydana gelen yerel “through-going” por yapısı, non-bilayer yapılanmaları açıklayan en basit model olarak ortaya atılmıştır. Bu modelde, lipit gözeneginin etrafında monolayer’lerini bağlamak, iç ve dış monolayer ‘lardan lipitlerin transferine izin verecektir (Taupin *ve ark.*, 1975). Membran füzyonunda rol oynayan proteinler (Chernomordik *ve ark.*, 1994; Kozlov ,Chernomordik, 1998), apoptotik (Basanez *ve ark.*, 1999) ve sitolitik peptit’lerin (Matsuzaki *ve ark.*, 1998; Miteva *ve ark.*, 1999; Vogt ,Bechinger, 1999) hücrelerde non-bilayer membran düzenlenmeleri oluşturarak, porların genişlemesini kolaylaştırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Hücre membranlarında hızlandırılmış flip-flop’un, hücreye uygulanan yüksek voltaj tarafından da sağlanabildiği Haest ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Haest *ve ark.*, 1983a; Haest *ve ark.*, 1983b). Bu çalışma, 1983 yılında “electroporated” eritrositler üzerinde yapılmıştır. İlk olarak Abidor tarafından, yüksek elektrik alan hücrelerinin membranın geçici olarak bariyer özelliğini kaybettiği ortaya koyulmuş ve bu günümüzde yaygın olarak kullanılan “electroporation” tekniğinin temelini oluşturmuştur (Abidor *ve ark.*, 1978). Elektrik alan altında membran bütünlüğünün bozulduğu durumlarda ortaya çıkan yapı teorik olarak modellenmiştir (Weaver *ve ark.*, 1999), bu yapı Şekil 1.5. de gösterilmektedir.



Şekil 1.5. Membranlardaki porlar¹².

Membran lipitleri arasındaki termal hareketten dolayı spontane olarak hidrofobik porlar kolayca oluşabilmektedir. Hidrofobik por oluşma olasılığı, por çapını por oluşma enerji kinetiği ile ilişkisine dayanmaktadır. Eğer bu porlar kritik bir büyüklüğe ulaşırsa, lipitleri yeniden düzenlenmesi hidrofobik poru, hidrofilik pora dönüştürmektedir. Hidrofilik por'un duvarlarını lipitlerin hidrofilik grupları oluşturmaktadır, böylece öne sürülen bu modelde monolayerlar arasında bağlantı sağlanmaktadır. Ancak bu modelin deneysel olarak da geçerli olduğuna dair bir bilgi yoktur (Glaser *ve ark.*, 1988).

Membranlarda oluşabilen non-bilayer yapıların, transbilayer lipit transferi ile ilişkisinin en iyi şekilde aydınlatılabilmesi, çok iyi tanımlanmış model sistem olan “bilayer lipit membran (BLM)” ‘ler ile çalışılması ile mümkün olabilir. BLM tekniği, asimetric membran oluşturmaya da müsaade etmektedir.

BLM’lerde lokal non-bilayer yapılar hücrede olduğu gibi yüksek elektrik alanı etkisinde oluşabilmektedir. Bunun nasıl gerçekleştiğine dair çok sayıda model ileri sürülmüştür (Krassowska, Neu, 1994; Moroz, Nelson, 1997; Needham, Hochmuth, 1989; Winterhalter, Helfrich, 1987), oluşan porların geçici olduğu, belli boyutun üzerine çıktıkları takdirde, geri dönüşü olmayacak şekilde membranın yırtılmasına sebep olduğu da bilinmektedir (Needham *ve ark.*, 1989; Sukharev *ve ark.*, 1983; Wilhelm *ve ark.*, 1993; Zhelev, Needham, 1993).

¹² (Glaser *ve ark.*, 1988)

Ancak şimdye kadar bu porların lipitlerin geçişine izin verip vermediği veya transbilayer lipit hareketinde nasıl bir etkilerinin olacağına dair literatürde bir bilgi bulunmamaktadır.

1.7. Amaç

Fertilizasyon, iki aşamalı gerçekleşen membran füzyonu sürecidir. İlk önce, akrozomal vezikül, sperm hücresinin plazma membranıyla füzyona girer (akrozomal vezikül ekzositozu). AR sonrasında lipit içeriğinde meydana gelen değişiklikler, sperm ve yumurta füzyonuna izin verir. Model membranlarda yapılan çalışmalar, myoplast-myoplast füzyonu, virüs hücre füzyonu deneyleri, PS'in membran füzyonunda rol oynadığını göstermektedir. Bugüne kadar sperm ve yumurta füzyonunda PS'in oynadığı role dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

PS'in hücre membranında “transbilayer” yer değiştirmesi sperm aktivasyonu ve ölümü ile ilişkilendiren çalışmalar mevcuttur. Ancak öne sürülen modeller birbiriyle çelişmektedir. Sperm aktivasyonu sırasında membran asimetrisinin düzenlenmesi, asimetri kaybı ve bunun füzyonla olan ilişkisini açığa çıkarılabilmesi için ilave araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

Literatürde var olan bu bilgiler doğrultusunda, bu tez çalışması kapsamında sperm-yumurta füzyonu ve membran asimetrisinin ilişkisinin irdelenmesine karar verilmiştir. Araştırmaya yön veren hipotez; PS'in sperm membranında “transbilayer” yer değiştirmesi ve yüzeye taşınması sperm aktivasyonu ile ilişkilidir ve PS sperm membranı ile yumurta membranının füzyonunu tetikler.

Bu tez kapsamında öncelikle biyolojik model olarak sperm'de membran asimetrisinin kaybı ve bunun sperm-yumurta füzyonundaki rolü, daha sonra da sperm'de membran asimetrisinin kaybının gerçekleştiği süreden yola çıkılarak model sistem üzerinden membran asimetrisinin por aracılığıyla nasıl kaybolduğu irdelenecektir. Tez çalışmasına yön veren hipotez; geçici hidrofilik porların oluşumu

neticesinde monolayerlar birleşmekte ve biyolojik olaylar için gerekli çok hızlı transbilayer lipit transferine sebep olmaktadır.

Ancak öncelikle herhangi bir model sistemde porlardan PS'in geçebileceğinin gösterilmesi gerekmektedir. Bu amaçla tamamen yepyeni bir teknik geliştirilmiştir. Amaç, model sistem üzerinde yapılan transbilayer lipit transfer ölçümleri ile biyolojik ölçümleri modellemektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Kullanılan malzeme ve cihazlar

Santrifüjler:

- J-6M (Beckman Coulter Inc., USA)
- Optima TL ultracentrifuge, TLA 100.4 rotor (Beckman Coulter Inc., USA)
- Eppendorf Centrifuge 5417R (Eppendorf, USA)
- Her rotora uygun tüp kullanılmıştır (Beckman Coulter Inc., USA)

Protein konsantrasyon analizi (colloidal-gold konjugasyonunda) :

- Bio-Mini DNA/RNA/Protein analyzer (Shimadzu Scientific Instruments Inc., USA)

Mikroskopi :

- Laborlux upright microscope (Leica, Inc., Germany) bilayer membranlarla çalışmak üzere yeniden dizayn edilmiştir.
- UltraLux HD lamp (fiber optic ile mikroskoba bağlanmıştır) (Bunton Instrument Company, USA)
- 60x, 0.70 NA objective (M PLAN; Nikon, USA)
- 32x, 0.40 NA objective (Leica, Inc., Germany)
- CoolSNAP HQ camera (Photometrics, USA)
- IPLab acquisition software (BioVision, Inc., USA)
- Dialux upright microscope (Leica, Inc., Germany)
- 100x, 1.32 NA oil objective (Ph3, Leica, Inc., Germany)
- 32x, 0.40 NA objective (Ph2, Leica, Inc., Germany)
- 25x, 0.55 NA objective (Leica, Inc., Germany)

- Zeiss 510 confocal microscope with workstation (488/543nm laser) (Zeiss, Inc, Germany)
- 10x, 0.3 NA water (Zeiss, Inc, Germany)
- 63x, 1.4 NA oil (Zeiss, Inc, Germany)
- Intensified charge-coupled device camera VE1000SIT (Dage-MTI, USA)
- Metamorph Flashbus acquisition software (Molecular Devices Analytical Technologies, USA)
- Tecnai G2 transmission electron microscope (FEI Company, USA)
- 300 mesh carbon-coated gold EM grid (Electron Microscopy Sciences, USA)

Elektrofizyolojik ölçümler:

- Flaming Brown Micropipette puller; Model P80/PC (Sutter Instruments Co., USA)
- 1.5 mm capillary borosilicate glass with filament (World Precision Instruments Inc., USA)
- MicroFil™ syringe needle (World Precision Instruments Inc., USA)
- Teflon film (Fluoro-plastics, Inc., USA)
- Red Sable brush #00 (Da Vinci brushes, USA)
- Ag/AgCl pellet electrodes #EP05 (World Precision Instruments Inc., USA)
- ESA-CSA Piezo micromanipulators (Newport Corp., USA)
- EPC 7 patch clamp amplifier (HEKA Instruments Inc., USA)
- Axopatch 200B patch clamp amplifier (Axon Instruments Inc, USA)
- Model SR830 DSP lock-in amplifier (Stanford Research Systems, USA)
- Tektronix 2211 digital oscilloscope (Tektronix, Netherland)
- Filter ASC50 ve 900 (Frequency Devices, USA)
- PC-44 acquisition board (Signallogic, USA)
- Bronew adquisition software (Ratinov *et al.*, 1998)

Kullanılan diğer malzeme ve cihazlar:

- PC workstations (Dell Inc., USA)
- Mac workstation (Apple Inc, USA)

- Özel dizayn edilmiş teflon çember, BLM formasyonu için kullanılmıştır.
- Özel dizayn edilmiş faraday cage.
- Stirrer/hot plate (Corning Inc., USA)
- Vortex-genie 2 mixer (Scientific Industries Inc., USA)
- PM 4600 Delta Range scale (Mettler-Toledo, Inc.)
- Balance (Sartorius AG, Germany)
- Ultra pure water system (Hydro Inc.,USA)
- Orion pH meter model 420A (Thermo Scientific, Inc, USA)
- Safeaire fume hood (Fischer Hamilton, USA)
- Vapor pressure osmometer 5500 model ve calibration solutions (Wescor Inc., USA)
- Freezers (-30 and -80) ve buz dolabi (4¼C) (Revco, Thermo Scientific, USA)
- Argon, compressed gas (NIH supply service)

2.2. Kullanılan lipitler ve kimyasallar

Lipitler

- 1-Acyl-2-Hydroxy-*sn*-Glycero-3-[Phospho-L-Serine] (Lyso-PS) (Avanti Polar Lipids, Inc.,USA)
- 1,2-Diphytanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DPhPC) (Avanti Polar Lipids, Inc.,USA)
- 1,2-Diphytanoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-L-Serine] (DPhPS) (Avanti Polar Lipids, Inc.,USA)
- Cholesterol (Avanti Polar Lipids, Inc.,USA)

İşaretlemede kullanılan malzemeler:

- Vybrant Apoptosis Assay Kit #2 (Annexin V- alexa 488 ve Propidium Iodide) (Molecular Probes™ Invitrogen™ Corp., USA)
- Dextran-conjugated tetramethylrhodamine (Rh-Dextran; 3000 MW Molecular

Probes™ Invitrogen™ Corp., USA)

- Alexa 555-Phalloidin (Molecular Probes™ Invitrogen™ Corp., USA)
- Uranyl Acetate (Electron Microscopy Sciences, USA)
- Gold chloride (Electron Microscopy Sciences, USA)

Solüsyonların hazırlanmasında kullanılan kimyasallar:

- Potassium Chloride, granular (KCl) (Mallinckrodt Baker Inc., USA)
- EDTA 0.5 M solution (Quality Biological Inc., USA)
- Calcium Chloride (Fluka Inc., USA)
- Tannic Acid (Electron Microscopy Sciences, USA)
- Sodium citrate (Sigma-Aldrich, USA)
- Potassium carbonate (Sigma-Aldrich, USA)
- Hepes buffer 1 M solution (Cellgro Mediatech, Inc, USA)
- Phosphate buffer saline (PBS) buffer pH 7.4 (KD Medical, Inc., USA)

Organik solventler:

- Chloroform 99.9% GC (Fluka, Sigma-Aldrich Corp., USA)
- Decane 99.8% GC (Fluka, Sigma-Aldrich Corp., USA)
- Hexadecane 99.7% GC (Fluka, Sigma-Aldrich Corp., USA)
- Pentane 99% (Supelco, Sigma-Aldrich Corp., USA)
- Methanol 99.8% GC (Fluka, Sigma-Aldrich Corp., USA)

2.3. Analiz için kullanılan programlar

- Origin 7.0 (OriginLab Corp., USA) ve SigmaPlot (SigmaPlot software Inc., USA) data analizi ve grafiklerin hazırlanmasında.
- ImageJ NIH software image analysis.
- MatLab data analizi için kullanılmıştır.

2.4. Gametlerin toplanması

Sperm ve yumurtaların elde edildiği organizma mor denizkestanesi olarak bilinen *Strongylocentrotus purpuratus*'dur. Mevsimlere göre denizkestaneleri Westwind SeaLab Supplies, Victoria, Canada veya Marinus Scientific, CA, USA.'den elde edilmiştir. Erişkinlere 1-2 ml. 0.5 M KCl'in vücut boşluğuna şırınga edilmesi ile sperm ve yumurta salması uyarılmıştır. Seyreltilmemiş semen, kuru olarak toplanmış ve buz üzerinde bekletilmiştir. Yumurtalar oda sıcaklığında yapay deniz suyu içerisinde 3 saatten fazla olmamak üzere bekletilerek kullanılmıştır. AR uyarılması için yumurta yüzeyindeki "egg jelly (EJ)" Keller ve Vacquier tarafından belirtildiği şekilde izole edilmiştir (Keller, 1994).

2.5. Akrozom reaksiyonunun uyarılması ve saptanma yöntemi

Buz üzerinde saklanan seyreltilmemiş sperm, ASW (Artificial Sea Water) (486 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 27 mM MgCl₂, 29 mM MgSO₄, 2.5 mM NaHCO₃ and 10 mM HEPES, pH 8.0) ile 1:1000 oranında seyreltilmiştir. Sperm süspansiyonu belirtilen sürelerde EJ(15°C) veya yapay olarak 10µM kalsiyum iyonoforu (A23187) ile muamele edilerek AR uyarılmıştır. 50µl sperm süspansiyonu, 750 µl ASW'de hazırlanan 3% paraformaldehit ile fikse edilmiştir. AR tespit edilmesinde literatürde en son belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır (Morisawa *ve ark.*, 2002). Fikse olmuş sperm 2 kez 500 µl PBS ile yıkanmış ve 2 dakika 5000xg 'de santrifüje edilmiştir. Elde edilen sperm peleti 0.4 ünite Alexa 555 phalloidin ile 100 µl, 1 mg/ml BSA PBS içerisinde 2 saat karanlıkta inkübe edilerek işaretlenmiştir. 3 kere 1 ml PBS'de yıkanan hücreler, %70 gliserol ile süspansiyon edilmiştir. AR yüzdesi flüoresan mikroskobu (555/565nm excitation/emission) yardımıyla kantite edilmiştir. *S. purpuratus* spermünde AR gerçekleştikten sonra polimerize olan aktin ~1µm uzunluğunda saptanabilmektedir.

2.6. AnnexinV–alexa488 ile transbilayer PS transferinin, propidium iodide (PI) ile membran geçirgenliğinin belirlenmesi

AnnexinV PS'e özgü bağlanan ve sadece dış membrandaki PS'i tespit edebilen bir proteindir. PI ise membrandan ancak por varlığında geçebilen ve nükleik asitlere bağlanan bir moleküldür. 5µl AnnexinV-alexa488 ve 6 µg/ul PI 10⁶ sperm ile sonuçlarda belirtilen sürelerde inkübe edilmiştir. Bu işlem AR önce ve sonra olmak üzere farklı koşullarda tekrarlanmıştır. İşaretlenme olup olmadığı flüoresan mikroskobu yardımıyla belirlenmiştir (AnnexinV-alexa488; 494/590nm excitation/emission ve PI; 535/617nm excitation/emission).

Annexin V ve PS'e bağlanan Anti-PS antikorunu (Philip Thorpe, University of Southwestern Medical Centre, Texas, USA tarafından hediye edilmiştir) sperm ve yumurta füzyonunun inhibisyonunda da kullanılmıştır. Belirtilen konsantrasyonlarda sperm-yumurta füzyonu sırasında eklenen AnnexinV veya Anti-PS antikorunu ile sperm-yumurta füzyonu (fertilizasyon) oranlarındaki değişiklikler hesaplanmıştır. Füzyon olup olmadığı yumurta yüzeyindeki fertilizasyon zarfının yükselmesinin faz-kontrast mikroskobu yardımıyla izlenmesi ile kantite edilmiştir. Annexin V'in yumurta aktivasyonu sırasındaki endositoza etkisi, Whalley ve arkadaşları tarafından belirtildiği şekilde sıvı faz işareti Rh-dextran kullanılarak konfokal mikroskobu ile yapılan görüntüleme neticesinde belirlenmiştir (Whalley ve ark., 1995) (RhodamineB 540/625nm excitation/emission) .

2.7. Elektron Mikroskobu ile PS'in sperm membranında transbilayer yer değiştirmesinin tespiti

4.5 nm kollidal gold, gold chloride'in modifiye edilmesiyle Prior ve arkadaşlarının belirttiği şekilde hazırlanmış ve Annexin V ile konjüge edilmiştir (Prior ve ark., 2003). Konjugasyon reaksiyonunun tamamlanmasında pH 7 (AnnexinV'in pI'ına göre metodun modifiye edilmesi sebebiyle) ve koloidal gold'u

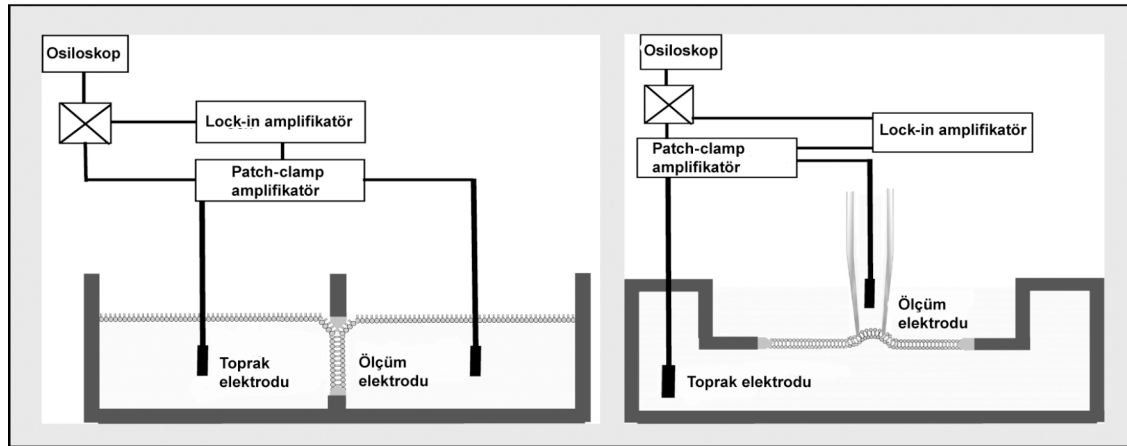
sature edici protein miktarı 3,5µg Annexin V olarak saptanmıştır. Gold ile işaretlenmiş Annexin V, 1:10 seyreltilerek 1:1000 sperm ile AR uyarılmadan veya AR uyarılmış (A23187(10µM) ya da EJ ile indüklenerek) sperm ile muamele edilmiştir. Bu şekilde işaretlenen sperm 2 kez 500 µl PBS ile 2 dakika santrifüje edilerek (5000 × g) yıkanmış ve 30 dakika 750 µl of 3% paraformaldehit (ASW) ile fikse edilmiştir. “Formvar-coated” ve “carbon-stabilized” 300-mesh bakır grid’ler, örnekler yapıştırılmadan önce taze olarak “glow discharge” edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan örnek “whole mount” olarak işaretlenme kalitesinin artırılmasında kullanılmıştır. Örneklerin yapışması gridlerin bir damla poly-L-lysine (1 mg/ml) üzerinde 30 dakika yündürülmesi ile sağlanmıştır. Distile su ile yıkanan gridlerin üzerine film-side yukarı gelecek şekilde 20µl sperm ilave edilmiş ve 15 dakika yapışması beklenen örnekler havada kurutularak transmission elektron mikroskobu (TEM) yardımıyla incelenmiştir. “Thin sectioning” yapılan örnekler aynı şekilde hazırlanmış ancak grid yerine “gold-head” üzerine santrifüje edilmiştir (5000 × g). Membran bütünlüğünün korunması için “high pressure freezing” tekniği ile örnekler dondurulmuş ve bu örnekler Tom Reese ‘in laboratuvarında Chen ve arkadaşları tarafından belirtildiği şekilde aşamalardan geçirilmiştir örnekler TEM yardımıyla değerlendirilmiştir (Chen ve ark., 2008).

2.8. “Bilayer lipid membranlar (BLM)” üzerindeki deneyler

Asimetrik membranların oluşturulmasında Motal-Mueller tekniği kullanılmıştır. 50nm yarı çapı genişliğindeki teflondan delik içerisinde hava-su birleşme noktasında oluşturulan monolayer’lar bir araya getirilmiş ve bilayer formasyonu meydana gelmiştir (Sekil 2.1.) Teflon delik, lipidlerin tutunabilmesi amacıyla 1:1 hexadecane:decan karışımıyla muamele edilmiştir. Membran oluşturulmasında kullanılan lipidler pentane içerisinde çözülerek (10mg/ml) hazırlanmıştır. Membranların spesifik “capacitation (C)” ‘ı düzenli olarak ölçülmüş ve 0.8–1.15 µF/cm² arasında saptanmıştır. Tüm membran oluşumunda kullanılan solüsyonlar 100 mM KCl, 10mM HEPES ve 0.5mM EDTA pH 7.0 içermektedir. Ag/AgCl elektrotlar elektrofizyolojik ölçümleri yapmada kullanılmıştır (Şekil 2.1.).

2.9. Küçük membran “patch” ’leri üzerindeki deneyler

Mueller-Rudin tekniği ile simetrik membranlar oluşturulmuştur. Bu deney düzeneğinde (Şekil 2.1.) tüm ölçümler küçük membran patchleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu patchlerin boyutu $1\mu\text{m}$ 'dir ve camdan yapılmış mikropipet içerisine çekilerek meydana getirilmişlerdir. Mikropipetleri dolduran solüsyon: 100 mM KCl, 5 mM HEPES, pH 7 içerir ve direnci 1-3 MOhm. Piezo-driven mikromanipulâtör ile pipet membranla temas haline getirilmiştir. Daha sonra çok sıkı bir patch oluşturulmuş, bu kontakın sağlamlığı etkili direncine bağlı olarak 20-100GOhm olarak ölçülmüştür. Bu değer tüm deneyler sırasında sabit kalmıştır.



Şekil 2.1. Bilayer lipid zarlarında elektrofizyolojik ölçümler için kullanılan deneysel düzenek. (Sol) Montal Mueller tekniği ile oluşturulan asimetrik membran düzenneği ve (sağ) simetrik membran düzenneğiyle patch gösterilmektedir. Membranların elektrik parametrelerini izlemek, bir Ag/AgCl ufak elektrotu, asimetrik zar için bir teflon odasının her iki kompartımanına daldırılır ve patch için ise üst elektrot, mikropipetin içine sokulur.

2.10. Yapılan ölçümler

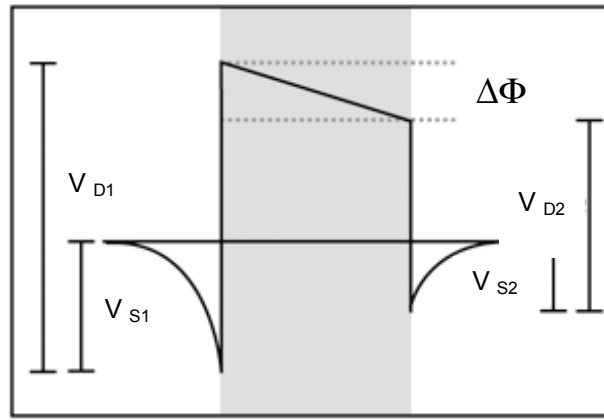
Yapılan ölçümlerin tamamı “patch-clamp amplifier” ‘ın voltage-clamp modunda gerçekleştirilmiştir. DC/sine-wave (frequency=400Hz, amplitude=100mV,

10KHz filter) lock-in amplifikatör aracılığıyla uygulanmış, ortaya çıkan akım (I) lock-in amplifikatöre yönlendirilmiş ve “capacitative” sinyal bilgisayar üzerine kayıt edilmiştir. Birinci harmonik sinyal C ölçümünde ve membran asimetrisinin hesaplanmasında, ikinci harmonik ise membranın “boundary potential” ‘ındaki küçük değişimlerin ölçümünde kullanılmıştır. I traseleri (DC ve harmonikler) bilgisayar üzerine AD dönüştürücü kartı kullanılarak, 0.1ms “acquisition rate” ile kaydedilmiştir. Membran “conductance (G)” ‘ında geçici değişiklikler ki bu por oluşumunu göstermektedir, 150mV’dan fazla olan voltaj (V) basamakları ile tetiklenmiştir. V düzeyi, por oluşumunu sağlayacak ancak membranın parçalanmasına izin vermeyecek şekilde ayarlanmıştır.

2.11. “Inner Field Compensation (IFC)” tekniği ile membran asimetrisinin saptanması

Membran üzerinde elektrik alanının dağılımı mikroskobik düzeyde oldukça komplekstir (Sekil 2.2.). Lipit molekülleri üzerindeki yüklü gruplar (membranın yüzeyine bakacak şekilde lokalize durumdadırlar), membran yüzey potansiyeli (V_s) oluşumundan sorumludur (Hagge *ve ark.*, 2004). Gouy-Chapman tarafından ortaya atılan teoriye göre membran yüzey potansiyeli membran yüzeyinden birkaç nanometre uzaklıktaki alan üzerinde katlanarak azalmaktadır (McLaughlin *ve ark.*, 1970). Dipol potansiyel (V_D) lipit bilayer içerisinde bağlı su moleküllerinin dipollerinin oryantasyonu sebebiyle oluşmaktadır. Lipit bilayeri oluşturan her iki monolayer arasında, lipit moleküllerinin dağılımı açısından fark olduğunda veya yüzeye bağlı olan iyonlar değiştiğinde potansiyellerin dağılımı değişmekte, birbirine eşit olmamakta ve “inner membrane potential ($\Delta\phi$)” farkına yol açmaktadır. Membranın içe ve dışa bakan yüzeyleri arasındaki bu fark “Inner Field Compensation (IFC)” tekniği yardımıyla ölçülebilmektedir. Bu teknik ilk kez 1980 yılında Sokolov ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Sokolov *ve ark.*, 1984; Sokolov *ve ark.*, 1980).

1970'lerde planar BLM'lerle yapılan çalışmalar neticesinde membran kapasitansının voltaja bağlı olarak, uygulandığı yöne göre değişmeyecek şekilde arttığı ve membranın hidrokarbon korunu sıfırlayacak voltajda minimum düzeye eriştiği gösterilmiştir (Alvarez *ve ark.*, 1978; Schoch *ve ark.*, 1979). IFC tekniği membran kapasitansını minimum düzeye eriştirecek voltajın saptanması mantığına dayanmaktadır.



Şekil 2.2. Asimetrik membran içerisinde potansiyellerin dağılımı. Transbilayer asimetrik lipid dağılımı veya yüklü moleküllerin membran ile ilişkileri “boundary potential” farkını doğurmaktadır ($\Delta\phi$). $\Delta\phi$, Denklem 1 ‘de gösterildiği gibi membran yüzey potansiyeli (V_S) ve dipol potansiyel (V_D) farklarının toplamına eşittir.

Ölçümlerin temel prensibi membranın elektrik alanı etkisiyle kompres olabilmesine dayanmaktadır. Elastik bir kapasitör olan membran kapasitansı, uygulanan voltaja bağımlı olarak değişmektedir. Bu kapasitans üzerine etki eden iki komponentin olduğu bilinmektedir: (1) “externally applied voltage (U)” ve (2) “inner membrane potential ($\Delta\phi$) (boundary potential)”. $\Delta\phi$, V_S ve V_D ‘ye bağımlı olarak değişmektedir:

$$\Delta\phi = \Delta V_S + \Delta V_D \quad (\text{Denklem 2.1.})$$

$\Delta\phi$ = "Inner membrane potential" farkı ("boundary potential" farkı)

V_S = Membran'ın "surface potential" 'i lipit gruplarındaki yüke göre değişmektedir.

V_D = "Dipole potential" lipit bilayer içerisinde su moleküllerinin oryente olmuş dipol'leri sebebiyle oluşmaktadır.

Membran kapasitansının uygulanan voltaja göre değişiklik göstermesinin en basit açıklaması "electrostriction" olmaktadır. Elastik kapasitör özelliğinde olan membranın inner/outer leafletleri plak olarak düşündüğümüzde elektrik alanında birbirlerine çekilirler ve aralarında sanki bir yay varmışçasına birbirlerinden uzağa itilirler. Kapasitansın artması membranın bu işlemler sırasında incilmesi neticesinde meydana gelmektedir (Schoch ve ark., 1979). Kapasitans, minimum düzeye plak arasındaki (inner/outer leaflet) elektrik alanının sıfıra erişmesi ile gerçekleşir. Membran kapasitansının uygulanan voltaja göre değişimi şu formülle ifade edilmektedir:

$$C = C_0 (1 + \alpha(\Delta\phi + U)^2) \quad (\text{Denklem 2.2.})$$

C_0 "minimum capacitance" (membran kuru içerisinde potansiyel sıfıra eşitlendiğinde), α "electrostriction coefficient" veya "proportionality constant" [membran kapasitansındaki fraksiyonel artışı ifade eder (per square volt), Montal-Muller bilayer için 0.02 V^{-2} olarak hesaplanmıştır].

Denklem 2.2'den de anlaşılacağı üzere, C minimal değere ($\Delta\phi$), dışarıdan uygulanan voltaj (U) ile kompanse edildiğinde ulaşmaktadır. Bu sebeple $\Delta\phi$ "capacitance minimization potential" olarak da adlandırılmaktadır.

$\Delta\phi'$ nin bilayer membranlarda IFC metodu ile belirlenebilmesi için, membranın elastik özelliklerini saptamak amacıyla AC ve DC voltajın birlikte uygulanmasını gerektirir. Bu durumda:

$$U = U_0 + U_1 \sin \omega t \quad (\text{Denklem 2.3.})$$

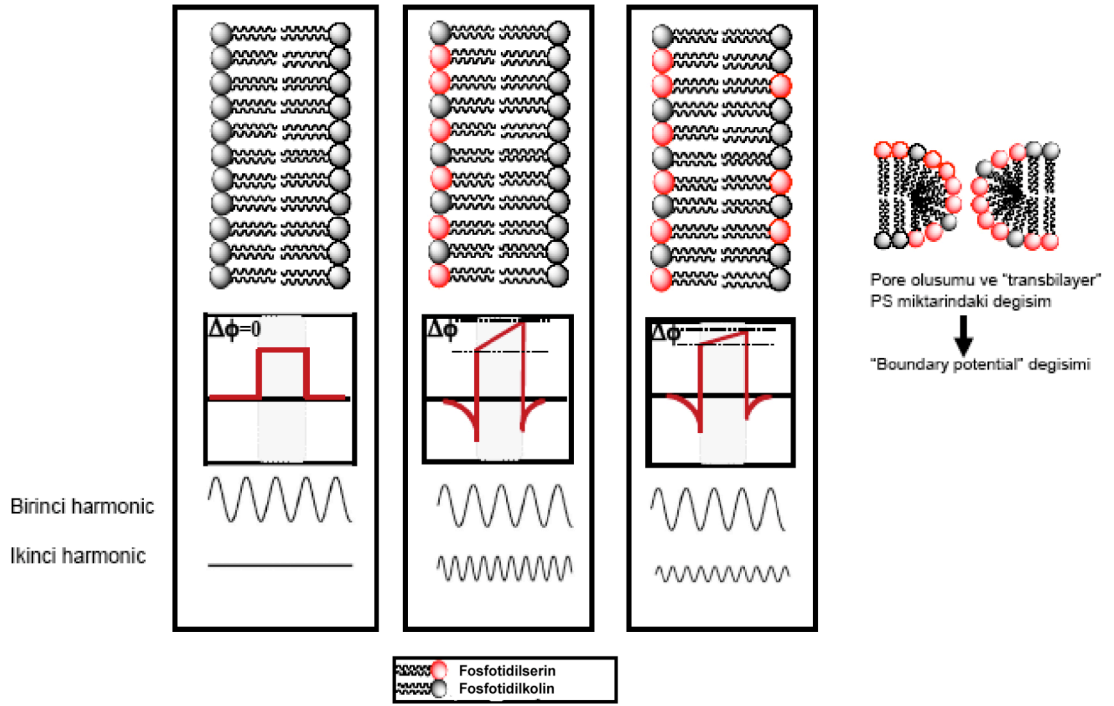
U bilayer üzerine uygulandığı zaman ortaya çıkan akımın harmonikleri vardır:

$$I = dCU/dt \quad (\text{Denklem 2.4.})$$

$$I(t) = C_0 [1 + 3\alpha (U_0^2 + \frac{1}{4} U_1^2)] U_1 \omega \cos(\omega t) + 3C_0 \alpha U_0 U_1^2 \omega \sin(2\omega t) - \frac{3}{4} C_0 \alpha U_1^3 \omega \cos(\omega t) \quad (\text{Denklem 2.5.})$$

Denklem 2.5.'den de anlaşılacağı üzere $U_0=0$, kapasitans minimal'dir ve ikinci harmonik değeri sıfır olur. Bu durum aslında simetrik membran yapısını göstermektedir veya "inner membran field" 'in dışarıdan uygulanan voltaj ile kompanse edildiği durumdur (Sokolov ve ark., 1980).

Bir monolayer'ında negatif yüklü PS içeren, diğer monolayerde yüksüz PC içeren asimetric membran oluşturulduğunda, monolayerlar arasında "boundary potential" farkı meydana getirilmektedir. "Boundary potential" farkını kompanse edecek voltajın belirlenmesi, membran asimetrisinin tespit edilmesini sağlayacaktır. Sokolov ve arkadaşları tarafından geliştirilen teknik bu voltajın otomatik olarak uygulanması veya basamak basamak test ederek uygulanması şeklindedir. Bu metotlar por oluşumuna ve dinamik ölçümlere imkân tanımadığından tarafımızdan "ramp metodu" olarak adlandırılan modifiye edilmiş IFC tekniği geliştirilmiştir. Metodun ana hatları Şekil 2.3.'de de özetlendiği gibi por oluşumu öncesinde ve sonrasındaki ölçümleri ile dinamik olarak geliştirdiğimiz teknik ile membran asimetrisi ölçülebilmektedir.



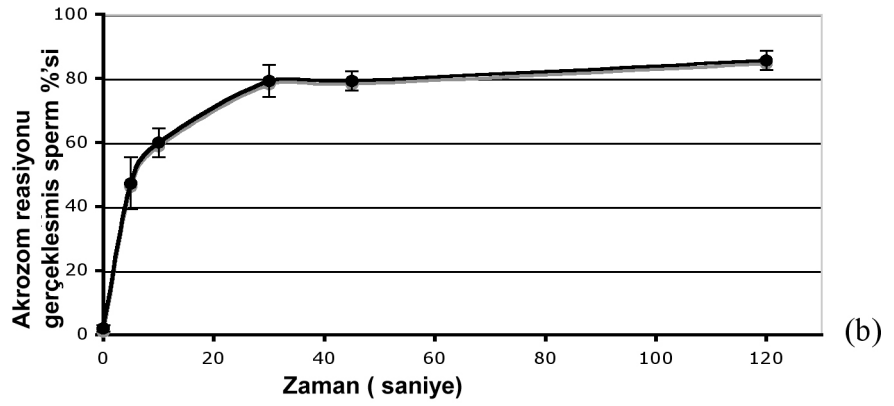
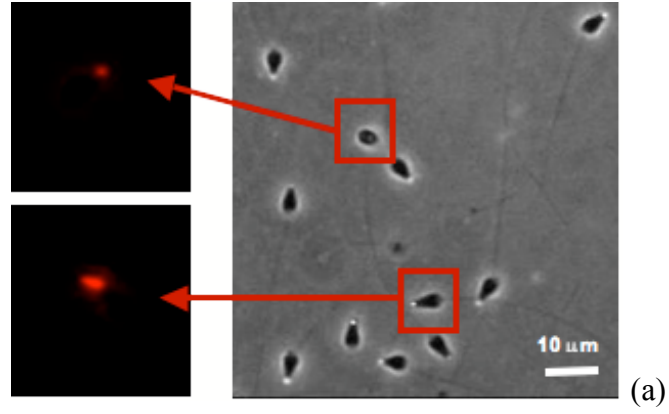
Şekil 2.3. Membran "boundary potential" ölçümleri aracılığı ile PS asimetrisinin kaybının ölçülmesinin temel prensibi. Membran kapasitansı uygulanan voltaja göre değişmekte ve uygulanan voltaj neticesinde "inner membrane field" sifira ulaştığında minimum olmaktadır. Membranların bu özelliği, devamlı olarak "tri-angular wave" voltaj uygulanarak por oluşumu öncesinde ve sonrasında ölçülerek membran asimetrisindeki dinamik değişiklikleri saptanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. PS'in sperm membranında “ transbilayer” yer değiştirmesi ile akrozom reaksiyonunun ilişkisi

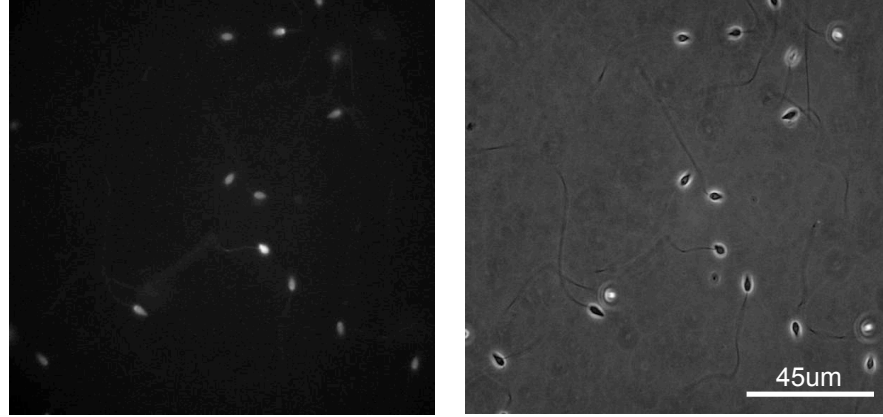
AR gerçekleşmiş ve gerçekleşmemiş sperm hücreleri aktin'e bağlanan “phalloidin” işaretlemesi yardımıyla birbirlerinden ayrılabilir. AR tamamlanmış spermde, akrozomal vezikülün hemen altında yer alan aktin polimerize olmuş haldedir. Bu sebeple “phalloidin” ile işaretlendiğinde çubuk benzeri bir yapı gösterir. AR olmayan sperm ise globüler yapıda aktin içerir ve “phalloidin” ile işaretlendiğinde nokta şeklinde tespit edilir (şekil 3.1.). Sperm hücrelerinde materyal ve metod'da belirtildiği şekilde AR uyarılmış ve phalloidin işaretlenmesi ile zamana bağımlı AR gerçekleşme oranı kantite edilmiştir (şekil 3.1.). EJ ya da A23187 ile AR uyarılan sperm hücrelerinin, uyarının başlamasından itibaren 30 saniye içerisinde en yüksek oranda aktivasyon seviyesine ulaşabileceğini sonuçlar göstermektedir.

Bu sonuçlar dikkate alındığında, PS'in sperm membranında “transbilayer” yer değiştirmesi ile akrozom reaksiyonunun ilişkisi var ise, 30 saniye içerisinde sperm hücrelerinin tümünde PS'in izlenebileceği beklenmektedir. Buradan yola çıkarak, PS varlığı AnnexinV-alexa488 yardımıyla irdelenmiştir. Annexin V, PS'e seçici olarak bağlanan bir proteindir. Sadece hücre membranının dışa bakan yüzeyine transfer olmuş PS, Annexin V bağlayabilir.



Şekil 3.1. Akrozom reaksiyonunun phalloidin işaretlenmesi ile tespiti. (a) Kutu içerisinde alınmış sperm örnekleri AR olmayan (üst) ve olan (alt) spermelerin phalloidin ile nasıl işaretlendiğini göstermektedir. Grafikte zamana bağımlı olarak AR olan sperm yüzdeleri belirtilmektedir (n=3, mean \pm SD).

Daha önce de belirtildiği gibi PS'in sperm yüzeyine transferi ile aktivasyonu arasındaki ilişki henüz kesinliğe kavuşmuş değildir. Denizkestanesi spermının aktivasyonunda kapasitasyon aşaması mevcut değildir. Sperm yumurta yüzeyine temas ettiği anda AR başlar ve bu reaksiyonu tamamlamış sperm yumurta ile füzyona girebilir. İzole edilmiş EJ veya A23187 ile sperm uyarımını takiben spermeler AnnexinV-alexa488 ile işaretlendiğinde 30 saniye içerisinde uyarımı takiben tüm sperm hücrelerinde (%100) PS transferinin mevcut olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.2.).

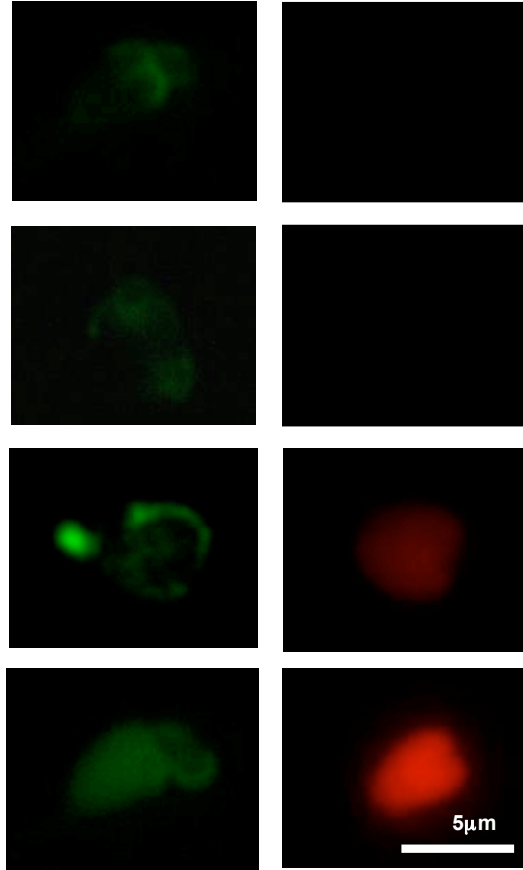


Şekil 3.2. AR uyarılmış spermelerde transbilayer PS varlığı. Sperm hücresinin dışı bakan yüzeyinde AR uyarımını takiben PS varlığı AnnexinV-alexa488 ile gösterilmektedir (sol). Tüm mevcut sperm hücreleri ($t=30$ saniye) işaretlenmiştir. Görüntülenme faz-kontrast ve gereç yöntem kısmında belirtilen excitation/emission'a uygun seçilmiş filtreler ile flüoresan mikroskobu yardımı ile yapılmıştır.

Bu spermelerin canlı olup olmadığını belirlemek amacıyla membran geçirgenliği olmayan ve nükleik asitlere bağlanan PI kullanılmıştır. PI sadece hücrede por olduğu takdirde nükleik asitlere bağlanabilmektedir. PI molekülünün çapı yaklaşık 1nm'dir. AnnexinV ve PI ile aynı zamanda işaretlenen hücreler apoptotik olarak kabul edilmektedir. 30 saniye içerisinde tamamen AnnexinV ile işaretlendiğini bildiğimiz AR olan sperm hücreleri, değişik aktivasyon aşamalarındaki PS varlığını belirlemek amacıyla sadece 15 saniye aktive edilmiş ve AnnexinV- PI işaretlenmesi değerlendirilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.3'de özetlenmektedir.

AR uyarılmış spermdeki işaretlenme heterojen olarak belirlenmiştir. İlk olarak spermın "midpiece" bölgesinde sadece AnnexinV ile işaretlenme saptanmıştır. Daha sonra spermın baş kısmına, akrozomal vezikülünü bulunduğu tarafa doğru bu işaretin yayıldığı gözlenmiştir. AR olduğu bölgeye denk gelen yerde sinyal artışını takiben, membranda PI geçirgenliğinin de arttığı gözlenmiştir. En son olarak, AnnexinV ile sperm homojen olarak işaretlenmiştir. Bu şekildeki spermeler,

PI pozitif ve mitokondrileri de deforme olmuş özellikleri ile ayrılmaktadır ki bu özellikler apoptotik spermin göstergesi olarak kabul edilmektedir.

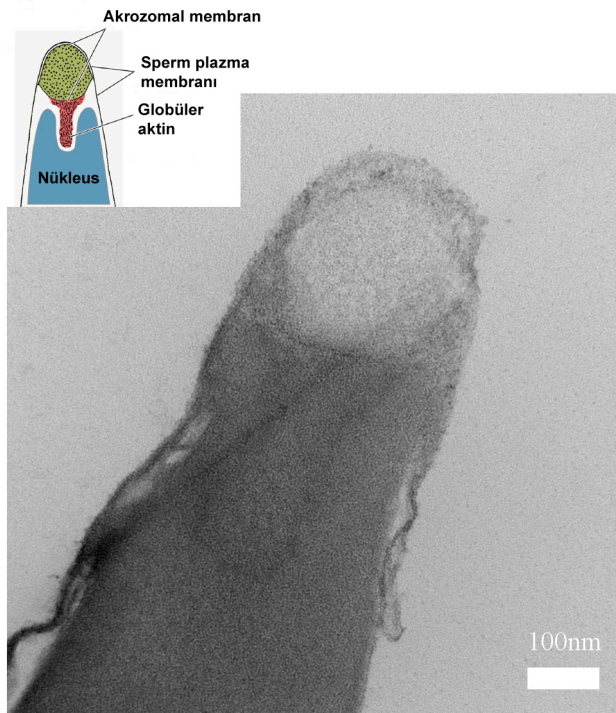


Şekil 3.3. AnnexinV-alexa488 ve PI ile birlikte işaretlenmiş, AR uyarılmış spermlerdeki heterojen paternler. AnnexinV yeşil, PI kırmızı renkle gösterilmektedir. Şekildeki işaretlenme ile ilgili detaylar yukarıda belirtilmektedir. Görüntülenme gereç yöntemi kısmında belirtilen excitation/emission'a uygun seçilmiş filtreler ile flüoresan mikroskobu yardımı ile yapılmıştır.

Farklı şekillerde işaretlenmenin 15 saniye AR uyarımını takiben tespiti, transbilayer PS transferinin aslında sperm aktivasyonu ile ilişkili olduğu, ancak daha uzun sürelerde sperm hücrelerinin apoptozis doğru gittiği sonucuna varılmıştır. Eğer bu yargı doğru ise, daha kısa zamanda daha yüksek magnifikasyonda AnnexinV

işaretlemesi yapılırsa, akrozomal bölgede PS varlığının gösterilebileceği düşünülerek elektron mikroskopi (EM) seviyesine geçilmesine karar verilmiştir. Bu amaçla AnnexinV proteinine 4.5nm büyüklüğünde koloidal gold konjuge edilmiştir.

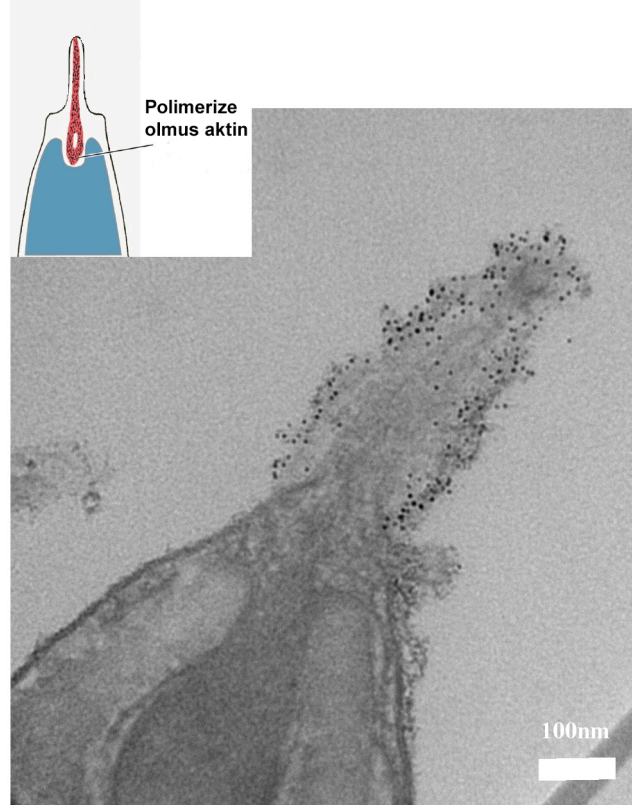
AnnexinV-gold ile AR uyarımı gerçekleşmemiş spermde hiç bir işaretleme belirlenmemiştir (Şekil 3.4.). EM yüksek magnifikasyonu sayesinde şekilde bütün şekildeki akrozomal vezikülü ve globüler aktinin detayları ayırt edilebilmektedir.



Şekil 3.4. AnnexinV-gold ile işaretlenmiş, AR uyarılmamış sperm. “High pressure freezing” ile hazırlanmış sperm kesitlerinde, gold ile işaretli AnnexinV varlığının olmadığı dolayısıyla PS transferinin gerçekleşmediği gözlenmektedir.

Aynı deney AR uyarımı yapılmış sperm ile tekrarlandığında, elde edilen sonuç hipotezimizi destekler niteliktedir (Şekil 3.5.). Spermin akrozomal vezikül ekzositozunun olduğu bölgeye yoğun olarak AnnexinV-gold ile işaretlendiği, dolayısıyla bu bölgenin PS’den zengin olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, AR olan spermdeki polimerize olmuş aktin ve akrozomal vezikülün füzyonunun gerçekleştiği

de bu şekilde gösterilmektedir. Bu aşamadaki sperm yumurta ile füzyon yeteneğine sahiptir.



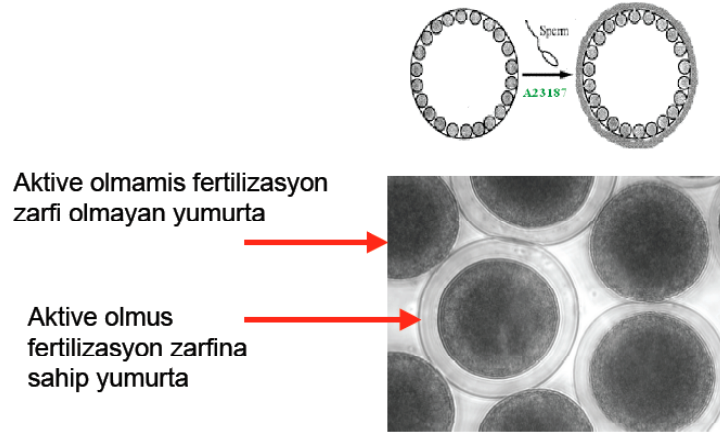
Şekil 3.5. AnnexinV-gold ile işaretlenmiş, AR uyarılmış sperm. “High pressure freezing” ile hazırlanmış sperm kesitlerinde, gold ile işaretli AnnexinV varlığı PS transferinin gerçekleştiği gözlenmektedir.

Elektron mikroskopi sonuçları, AR uyarılmış sperm, plazma membranının dışa bakan yüzeyinde PS transferinin gerçekleşmiş olduğu yani membran asimetrisinin bozulduğunu doğrulamıştır. PS'in membran füzyonuna aracı rolünü düşündüğümüzde, füzojenik hale gelmiş spermde, özellikle sperm yumurta membranı ile füzyona gireceği bölgeye lokalize olmuş olarak PS varlığını tespit etmek oldukça önemlidir. Sperm ve yumurta füzyonunda PS'in rolünün varlığı

konusunda literatürde bilgi bulunmamaktadır.

3.2. Transbilayer PS transferinin sperm-yumurta füzyonundaki rolü

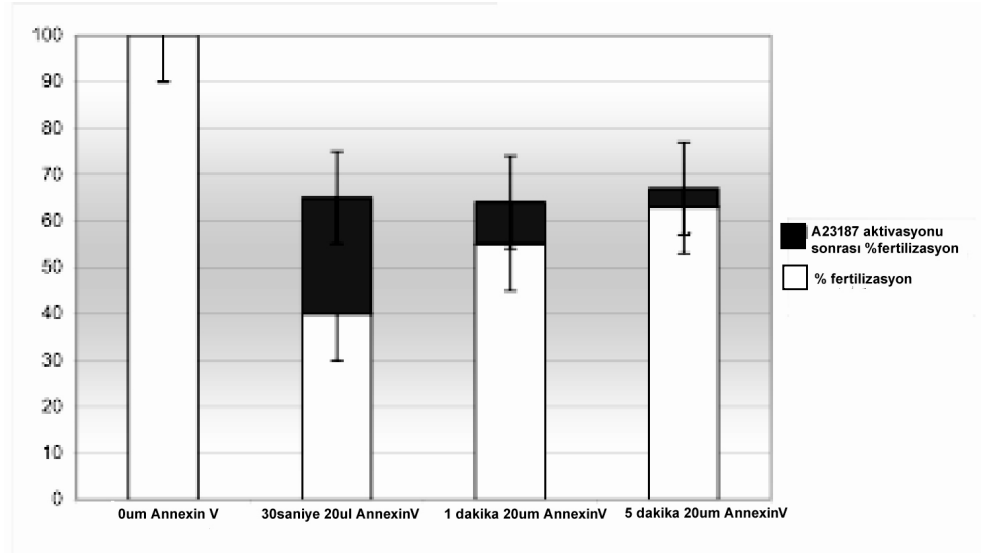
Spermin füzojenik membran bölgesindeki PS görünüşünün fizyolojik rolünü test etmek için, Annexin V'in varlığında sperm ve yumurta füzyonunun gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini test edilmiştir. Eğer PS membrane füzyonunu indükleyici role sahipse, PS gruplarının AnnexinV ile bloke edilmesi, membran füzyonunu da bloke edebilecektir. Füzyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini tespit etmek üzere, Sekil 3.6. de gösterildiği şekilde fertilizasyon kılıfının oluşup oluşmadığı kantite edilmiştir.



Şekil 3.6. Yumurtada fertilizasyon kılıfı. Yumurta içerisindeki “cortical” granüllerin exocytosis’i fertilizasyon veya A23187 ile indüklenmekte ve bu granüllerin içeriklerinin salınımı fertilizasyon kılıfının genişlemesine sebep olmaktadır.

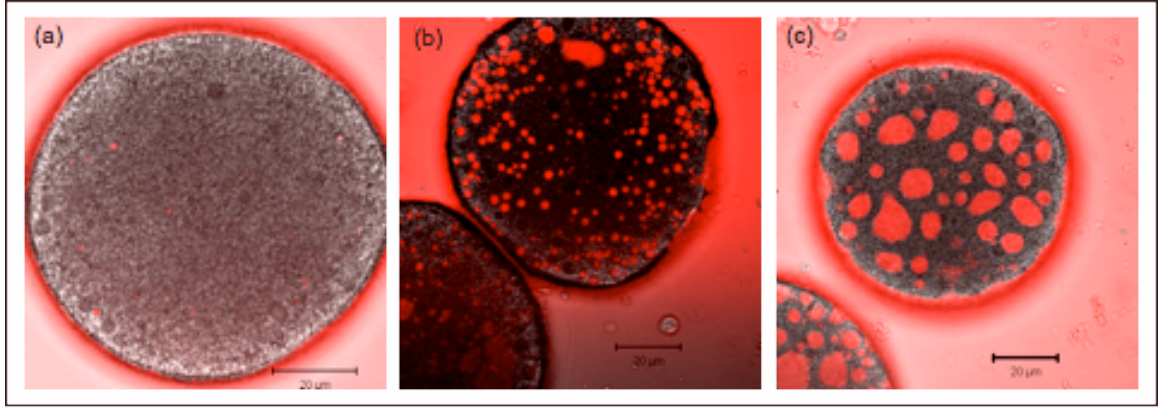
AnnexinV varlığının istatistiksel olarak anlamlı şekilde füzyonu inhibe ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.7.) Füzyonu inhibe edilmiş olan yumurtaların fizyolojik olarak sağlıklı olup olmadığını kontrol etmek amacıyla bu yumurtalar A23187 ile re-aktif edilmiştir. Reaktivasyon ancak belli bir düzeye kadar sağlanabilmiştir

(~60%). Bu sonuç, AnnexinV'in yumurtalar üzerinde başka bir etkisinin de olabileceği kaygısını yaratmıştır.



Şekil 3.7. Sperm ve yumurta füzyonunun AnnexinV ile inhibisyonu ve yumurtaların A23187 ile yeniden aktivasyonu. Sperm ve yumurta füzyonu 20ul AnnexinV varlığında inhibe edildi. A23187 (10uM) ile reaktivasyon belli bir düzeye kadar sağlandı. Yumurtaların %30-40'ının yeniden aktive olmadığı gözlemlendi (n=3, mean \pm SD).

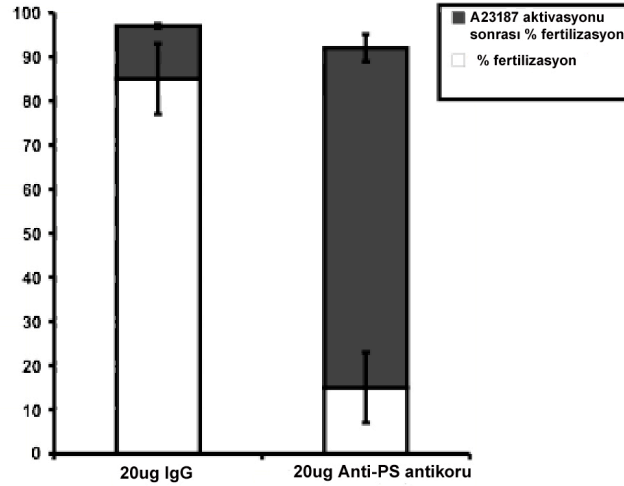
AnnexinV'in yumurtalar üzerinde başka ne gibi bir etkisinin olabileceğine dair yaptığımız detaylı araştırma neticesince, “cortical granule exocytosis” ‘i takiben gerçekleşen endositoz ile Annexin V arasında bir ilişki olduğu, yumurta membranına bağlanan AnnexinV’in endositik “patch” ’lerin çapında artışa yol açtığı belirlenmiştir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. AnnexinV'in “ cortical granule endocytosis” üzerindeki etkisi. Endositozu belirlemek amacıyla sıvı faz işareti olarak Rh-dextrane 3000MW kullanılmıştır. (a) normal, (b) sperm ile aktive olan AnnexinV olmayan (c) olan yumurtayı göstermektedir. Görüntülenme gereç yöntem kısmında belirtilen excitation/emission'a uygun seçilmiş filtreler ile confocal mikroskobu yardımı ile yapılmıştır.

AnnexinV yerine aynı fonksiyona sahip Anti-PS antikoru kullanıldığında füzyon inhibisyonu saptanmış ve yumurta A23187 ile tekrar aktive edilebilmiştir (Şekil 3.9.). Birbirinden farklı moleküler yapıda olan ve PS'e bağlanan her iki protein de istatistiksel olarak anlamlı derecede sperm ve yumurta füzyonunu inhibe etmiştir. Bu sonuçlar PS'in membran füzyondaki rolünün varlığını desteklemektedir.

Fizyolojik olarak önemli rol oynayan PS'in membranın dışa bakan yüzeyine transferi ve membran asimetrisinin kaybı saniyeler içerisinde gerçekleşmektedir. Sperm ve yumurta füzyonunun 20 saniyeden daha kısa zamanda gerçekleştiği düşünülürse (Whalley *ve ark.*, 1995), membran asimetrisindeki kaybında bu kadar kısa zamanda olması şaşırtıcı değildir. Çok hızlı bir şekilde membran asimetrisinin kaybolma mekanizmasının “lipidik por” aracılı lateral difüzyon ile olduğu hipotezi tarafımızdan ileri sürülmüş ve model asimetrik membran sisteminde “basite indirgeyici” yaklaşım ile bu hipotez test edilmiştir.



Şekil 3.9. Sperm ve yumurta füzyonunun Anti-PS antikorü ile inhibisyonu ve yumurtaların A23187 ile yeniden aktivasyonu. Sperm ve yumurta füzyonu 20ug Anti-PS antikorü varlığında inhibe edildi. A23187 (10uM) ile reaktivasyon tamamen sağlandı (n=3, mean \pm SD).

3.3. Asimetrik membranların oluşturulması ve mekanik özelliklerinin belirlenmesi

Montal-Muller tarafından tanımlanan asimetrik membran oluşturma tekniği (Montal, 1974; Reyes ,Latorre, 1979), daha sonra oluşma mekanizması açısından Niles ve arkadaşları tarafından aydınlığa kavuşturulmuştur (Niles *ve ark.*, 1988). Hava-su yüzeyinde oluşturulan lipit monolayerları vaseline, squaline gibi hidrokarbonlarla yapışkan hale getirilen teflondaki delik üzerinde yükseltilerek bilayer oluşturulması mümkündür. Oluşma mekanizması bilayerların incilmesi olarak tanımlanmıştır. Bu inceleme sırasında hidrokarbonlar kenara çekilir ve oluşan membran “ solvent-free” olarak kabul edilir.

IFC tekniği Denklem 2.2.’de gösterildiği gibi “electrostriction coefficient α ” yani membranın kalınlığına bağlıdır. α solvent –free membranlarda oldukça azdır bu da membranın incelmesini sağlar. Ancak IFC ölçülerindeki doğruluk payının yüksek olması için α ’ nın daha büyü değerde olması gerekmektedir. Bu sebeple, uygulanan

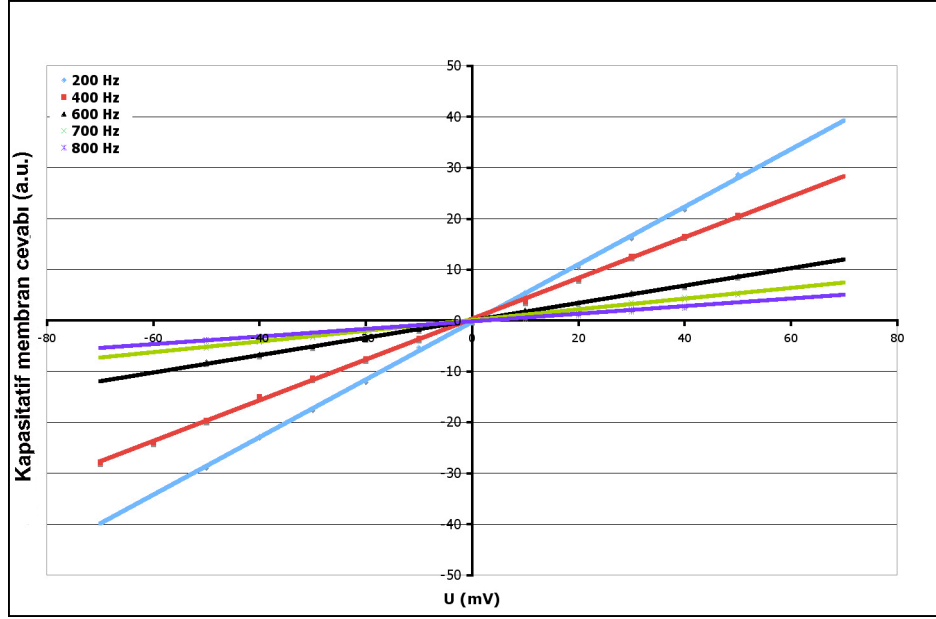
teknikte membran kalınlığı Montal-Muller ile Mueller-Rudin arasında kalınlığa sahip membranlar oluşturmak amacıyla hexadecane: decane (1:1) ile hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan membranlarda az miktarda solvent bulunmakta ve bu da “boundary potential” ölçümünü hassaslaştırmaktadır. Oluşan membranların son derece stabil ve 6 saatten daha uzun süre boyunca asimetric olduğu yapılan ölçümlerle onaylanmıştır.

Tüm deneylerde sadece çok düşük “Conductance (G)” ($\sim 1nS$) sahip olan membranlar kullanılmıştır. 10-70mol% PS içeren asimetric stabil membranlar oluşturulabilmiştir. Ancak 70mol%'in üzerine çıkıldığı takdirde membran formasyonunun zorlaştığı ve stabilitesinin azalttığı gözlenmiştir.

AC voltajın amplitüdü 100mV olarak seçilmiş, bu şekilde boundary potential ölçümleri yapılırken membranda deformasyon önlenmiştir. Frequency değerinin optimizasyonu için 200, 400, 500, 700 ve 800Hz AC voltaj farklı kompozisyonlardaki asimetric membranlara uygulanmıştır (Şekil 3.10.), 400Hz en uygun olanı olarak tayin edilmiştir.

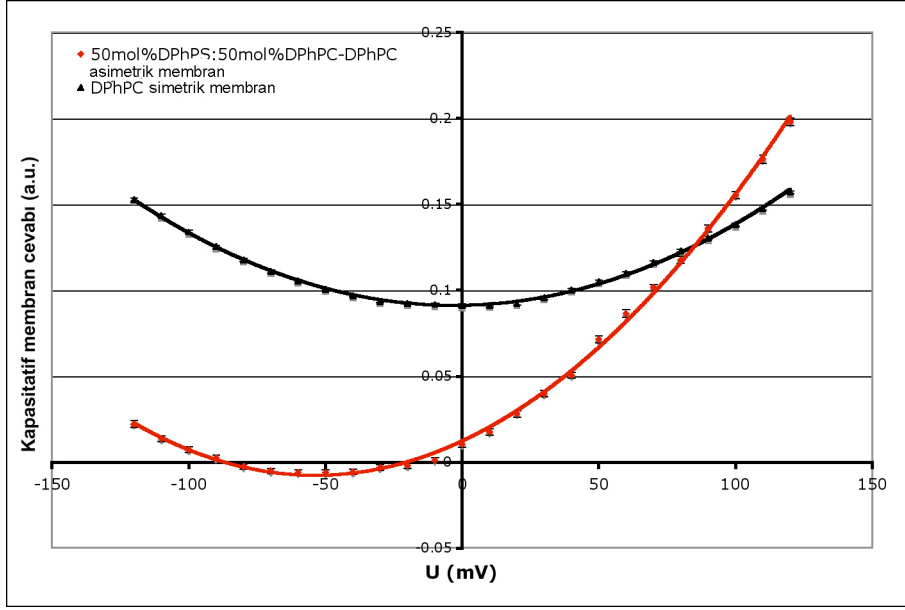
3.4. Voltaj bağımlı kapasitatif membran cevabının birinci ve ikinci harmoniklerle ölçümü

Denklem 2.2.'de gösterildiği üzere membran C'sinin voltaja bağımlı değişimini fiziksel modeller parabolik ilişki ile tanımlamaktadır. Bu parabolik ilişki aynı zamanda minima kuralını da takip etmektedir ve quadrik denklemin çözülmesi sonucunda membranın boundary potential'i hesaplanabilir (Şekil 3.11.) Şekil 3.11.'de tek monolayer'ında 50mol% PS içeren asimetric membranın voltaj bağımlı kapasitatif membran cevabının ilk harmonik ile ölçümü gösterilmektedir. Parabolik ilişki frequency= 400Hz, amplitude=100mV değerlerinde AC voltaj ile ölçülmüştür. Şekilden de anlaşılacağı gibi C'nin minimum olduğu değer -50mV civarındadır ki bu da teori ile örtüşür nitelikte 50mol% negatif yüklü lipit varlığı demektir.

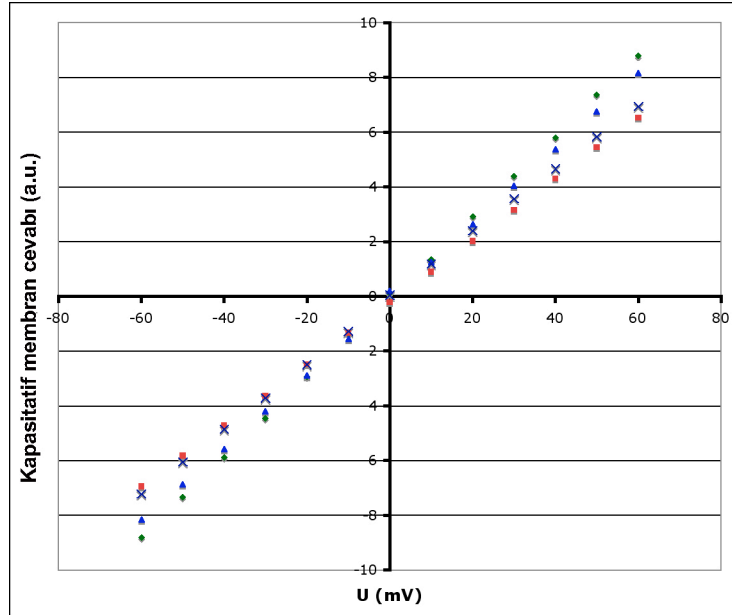


Şekil 3.10. Asimetrik membranda frekans bağımlı kapasitatif cevap. 200, 400, 500, 700, 800 Hz AC voltaj (100mV) ve DC voltaj stepleri 50mol%DPhPS-50mol%DPhPC ve 100mol%DPhPC kompozisyonundaki asimetrik membrana uygulanmış ve kapasitatif cevap ölçülmüştür. Membran hexadecane: decane (1:1) içermektedir.

Denklem 2.5.'de tanımlandığı gibi ikinci harmoniğin sinyali boundary potential'ının DC komponenti ile ilişkilidir. C minimuma ulaştığı durumda ikinci harmonik de minimuma erişir. Bu teori kullanılarak membran boundary potential daha kolay ölçülebilmektedir (Sekil 3.12.).



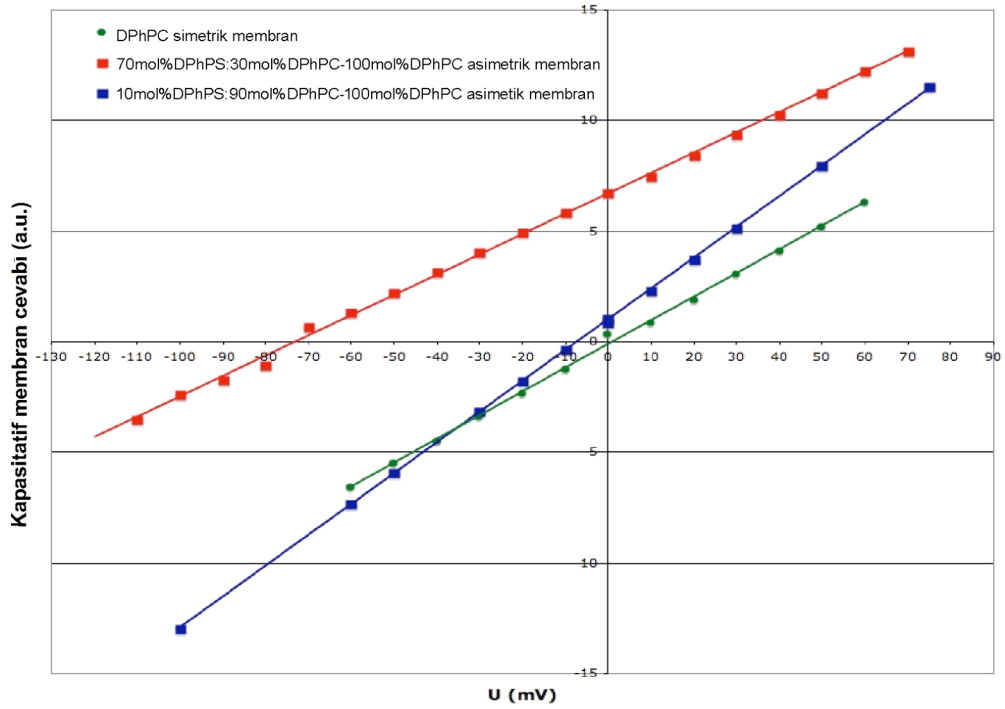
Şekil 3.11. Voltaj bağımlı kapasitatif cevap: ilk harmonik, simetrik ve asimetric membran. Voltaj bağımlı kapasitans, ilk harmonik cevabına bağlı olarak simetrik ve asimetric membranlarda ölçülmüştür. Ortaya çıkan sonuç membran kompozisyonunu direk olarak göstermektedir (frekans= 400Hz, amplitude=100mV).



Şekil 3.12. Farklı simetrik membranlarda ikinci harmonik ölçümleri. 4 farklı simetrik membranda kapasitansı minimal değere ulaştırın potansiyel ölçülmüş ve boundary potential'ın sıfıra eşit olduğu gösterilmiştir (teoriden tahmin edildiği gibi).

Bu ölçümler simetrik membranlarda yapıldığında membran boundary potential'ının sıfıra eşit olduğu, asimetric membranlarda tekrarlandığında ise içerdiği negatif yüklü lipid oranına (mol% PS) bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir (Şekil 3.13.).

Buraya kadar elde edilen bilgiler; ilk harmonik ile quadrik olarak saptanan ilişki, ikinci harmonik ile daha pratik olarak doğrusal sınır içerisinde ölçülmüş ve boundary potential değerlerinin tamamıyla membran asimetricisine bağlı olarak değiştiği saptanmıştır.



Şekil 3.13. Farklı simetrik ve asimetric membranların ikinci harmonik cevabı. Simetrik membranda kapasitansı minimal değere ulaştıran potansiyel =0 mV, 70mol%PS içeren asimetric membranda=-70mV, 10mol% PS içeren membranda=-10mV'dur.

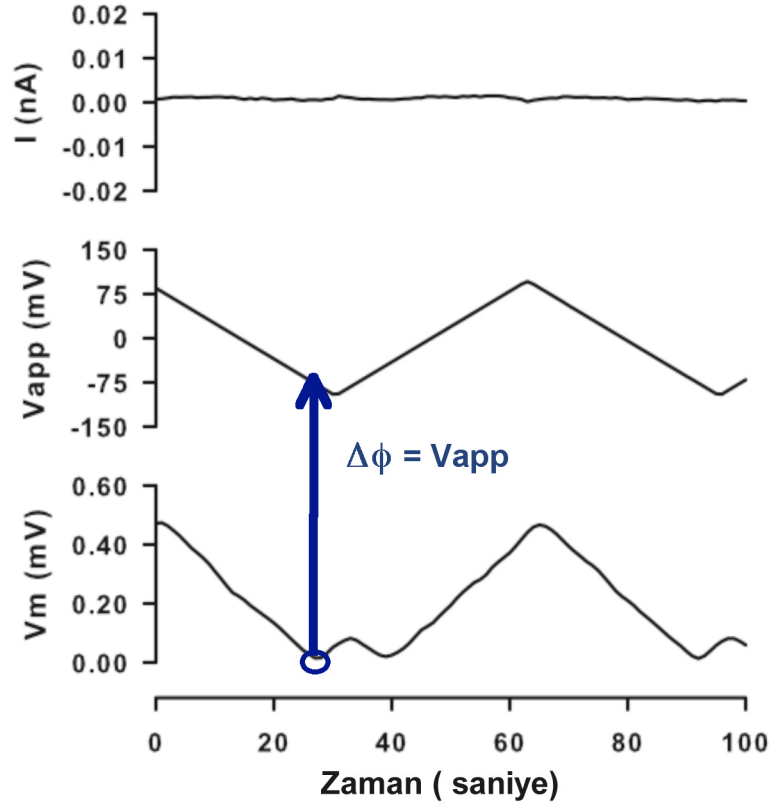
Bu şekilde boundary potential ölçümünün membran asimetrisini göstereceği anlaşılmıştır ancak step halinde farklı voltajlar uygulanması, elde edilen verinin analizi, aradan geçen uzun zaman sebebiyle dinamik, zaman bağımlı asimetri değişim değerini hesaplamaya imkân vermemektedir. Bu sebeple, lipitlerin dinamik olarak transbilayer hareketinin modellenmesinde, bu zaman diliminde yapılan deneyler sonuç vermeyecektir. Bu aşamalar sadece membran ilk oluşturulduğunda asimetrisinin confirmasyonu için uygundur.

3.5. Ramp yöntemi ile kapasitatif membran cevabının saptanarak membran asimetri kaybının ölçümü

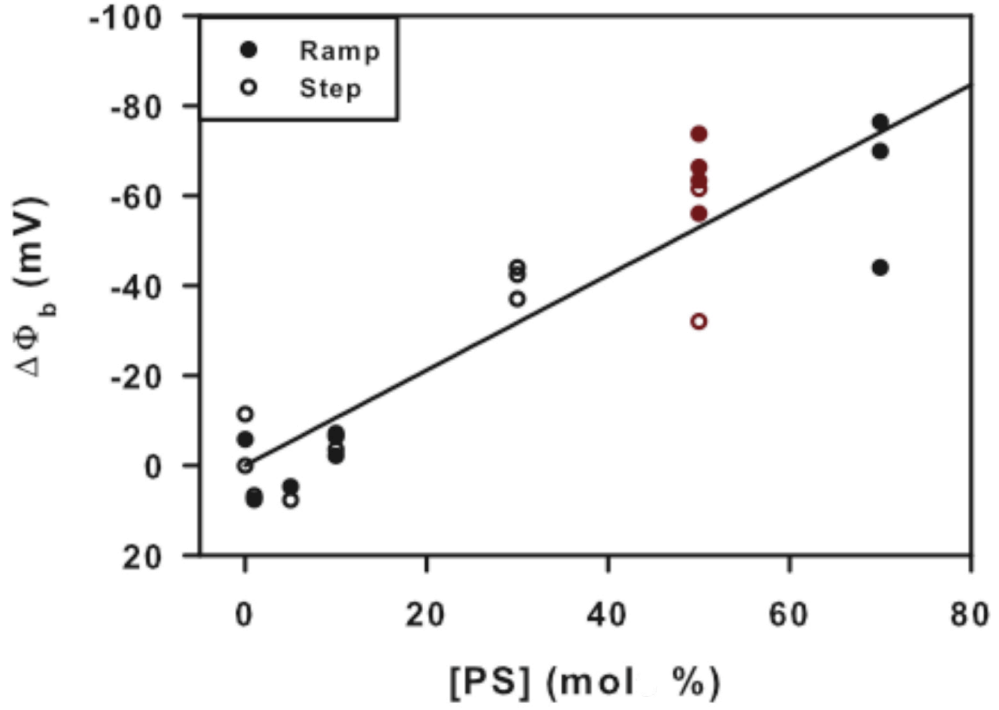
Lipit yeniden-düzenleme dinamiğini ölçmek amacıyla “ramp yöntemi” adını verdiğimiz teknik geliştirilmiştir (Şekil 3.14.). Şekil 3.14’de asimetrik bir membranda tipik olarak gerçekleştirilen kaydın nasıl görüldüğü gösterilmektedir. Halka içerisinde gösterilen ikinci harmonik kanalında (V_m), sinyalin sıfır’a eşit olduğu durum kapasitansı minimal değere ulaştıran potansiyel (“capacitation minimization potential”) olup, boundary potential’ini göstermektedir. Şekildeki membran 50mol% PS içermekte, bu sebeple boundary potential -50mV olarak saptanmaktadır.

Şekil 3.14’de de gösterildiği üzere hesaplanan ve ramp yöntemi ile ölçülen $\Delta\phi$ birbiriyle uyum göstermektedir. Devamlı ramp halinde uygulanan ve amplitudu asimetrik membrana uygun olarak seçilmiş voltaj, asimetri değişikliklerini dinamik olarak saptamaya imkân tanımaktadır. Boundary potential’in hesaplanabilmesi için ikinci harmoniğin minimum olduğu noktayı tespit eden MatLab kodu yazılmıştır. Bu şekilde deney sonrasında tüm analizler otomatik olarak yapılabilmektedir. Kısaca, uygulanan her ramp için ikinci harmonik sinyalinin lineer regrasyon analizi sonucu elde edilen formülde $y=0$ noktasına karşılık gelen voltaj değerinin bulunması ile boundary potential hesaplanabilmektedir.

Bu tekniğin daha önce uygulanan yöntem olan ve “step yöntemi” olarak kısaca adlandırdığımız yöntemle karşılaştırılması neticesinde elde edilen sonuç Şekil 3.15’da gösterilmektedir.



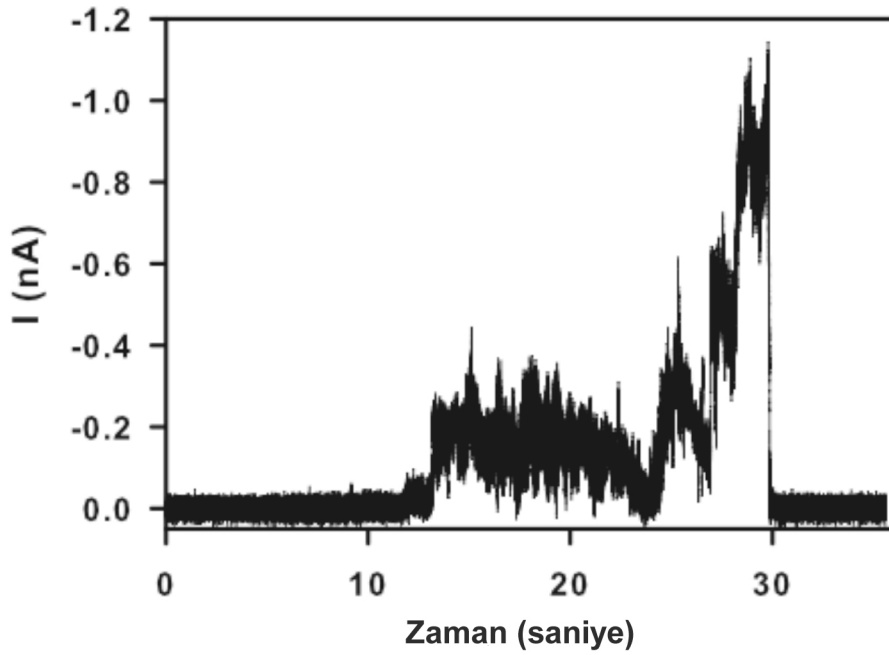
Şekil 3.14. Ramp yöntemiyle boundary potential’ının ölçülmesi. Membran kompozisyonu; 30mol%DPhPS-20mol%LysoPS-20mol%Cholestrol-30mol%DPhPC ve 100mol%DPhPC içeren asimetrik membran. Monolayerdaki toplam negatif yük = 50mol%. Gouy-Chapman-Stern teorisine göre hesaplanan boundary potential = -50mV. Ölçülen boundary potential ($\Delta\phi$)=-50mV \pm 3mV.



Şekil 3.15. Step ve Ramp yöntemleriyle ölçülen boundary potential değerlerinin karşılaştırılması. Membran kompozisyonları: DPhPC simetrik membrane, 5mol%DPhPS-95mol%DPhPC ve 100mol%DPhPC asimetrik membran, 10mol%DPhPS-90mol%DPhPC ve 100mol%DPhPC asimetrik membran, 30mol%DPhPS-70mol%DPhPC ve 100mol%DPhPC asimetrik membran, 30mol%DPhPS-20mol%LysoPS-20mol%Cholesterol-30mol%DPhPC ve 100mol%DPhPC asimetrik membran, 70mol%DPhPS-30mol%DPhPC ve 100mol%DPhPC asimetrik membran ($R^2=0.84$).

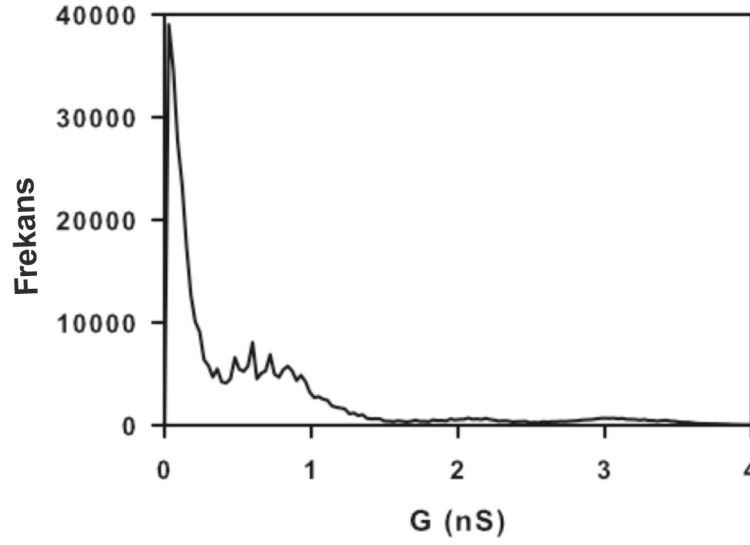
Elde edilen değerlerle lineer regresyon analizi neticesinde step ve ramp tekniklerinin birbir korelasyon gösterdiğini ortaya koymuş ve ramp tekniğini membran asimetri değişimlerini incelemek üzere kullanılması yolunda ilave deneylere devam edilmiştir.

Gereç ve yöntem kısmında belirtilen kriterlere uygun olarak yüksek elektrik potansiyeli altında membranda por oluşumu tetiklenmiş ve oluşan porlardan lipidlerin transfer olup olamayacağı yukarıda tanımlanan teknik yardımıyla değerlendirilmiştir. Por oluşumunun ölçümlerle nasıl gözleneceği Şekil 3.16.'da gösterilmektedir.



Şekil 3.16. Yüksek voltaj muamelesi neticesinde membranda oluşan por. Akım iniş çıkışları lipid por oluşumunu göstermektedir. -270mV voltajın 30mol%DPhPS-20mol%LysoPS-20mol%Cholestrol-30mol%DPhPC ve 100mol%DPhPC içeren asimetrik membran uygulanması sonucu por oluşmuştur.

Şekil 3.17. bu porların geçirgenlik (G) değerlerinin dağılımını göstermektedir. Yaklaşık olarak 1nS G, ~2nm çapındaki pora eşittir (Melikov ve ark., 2001). Farklı G seviyelerine rastlanıyor olması, porun büyüüp küçüldüğünü daha sonra da uygun enerji konumuna geçerek kapanmasına işaret etmektedir.



Şekil 3.17. Yüksek voltaj muamelesi neticesinde membranda oluşan porların geçirgenlik değerlerinin dağılımı. -270mV voltajın 30mol%DPhPS-20mol%LysoPS-20mol%Cholesterol-30mol%DPhPC ve 100mol%DPhPC içeren asimetrik membran uygulanması sonucu por oluşmuştur. Bu porda G analizi yapılmış ve elde edilen G verileri sıklıklarına bağlı olarak grafiğe aktarılmıştır. G=1nS, yaklaşık 2nm çapındaki pora eşdeğerdir.

Poru oluşturan ve birbiri ile ilişkideki monolayerlerden lipit transferi olduğu takdirde, porun kapanması ile birlikte bu lipitler difüzyon kurallarını izler.

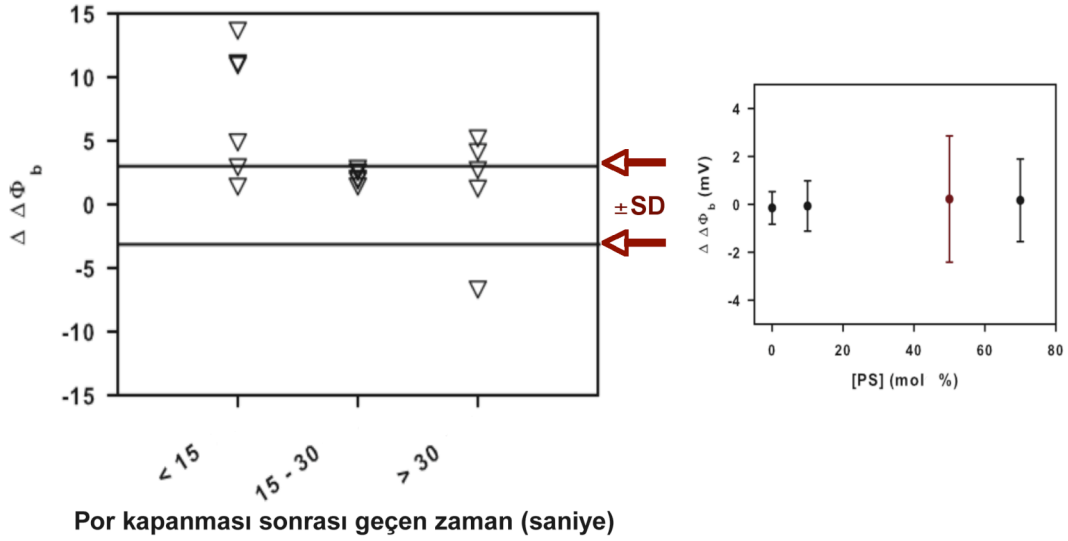
“*Brownian motion* (diffusion)” lipitlerin membrandaki difüzyonları:

$$X^2 = 4Dt \quad (\text{Denklem 3.1})$$

olarak ifade edilir (Saffman ,Delbruck, 1975). X^2 = mean square displacement, D = diffusion coefficient ($0.5-10 \times 10^{-8}$ BLM’i oluşturan lipitler için kabul edilen değer), t= zaman demektir. Bu hesaba göre eğer por neticesinde asimetri kaybı varsa ilk 15 saniye içerisinde tespit edilecek, sonra yok olup gidecektir (Lateral

diffusion rate of lipids in the membrane: $6.3\mu\text{m}^2/\text{sec}$). Elde ettiğimiz veriler bu tahmini doğrular niteliktedir (Şekil 3.18).

Burada unutulmaması gereken, asimetrik membran modelinde, bilayer sadece teflon ayıraçın üzerindeki, çapı 100 μm olan delikte oluşmakta ve sadece bu alandaki lipitler için ölçümler yapılabilmektedir. Bilayer dışında ise her iki monolayeri oluşturan “ lipit havuzu” mevcuttur. Dolayısıyla lateral difüzyon nedeniyle lipitler molayer lipit havuzuna doğru sürekli hareket halindedir.

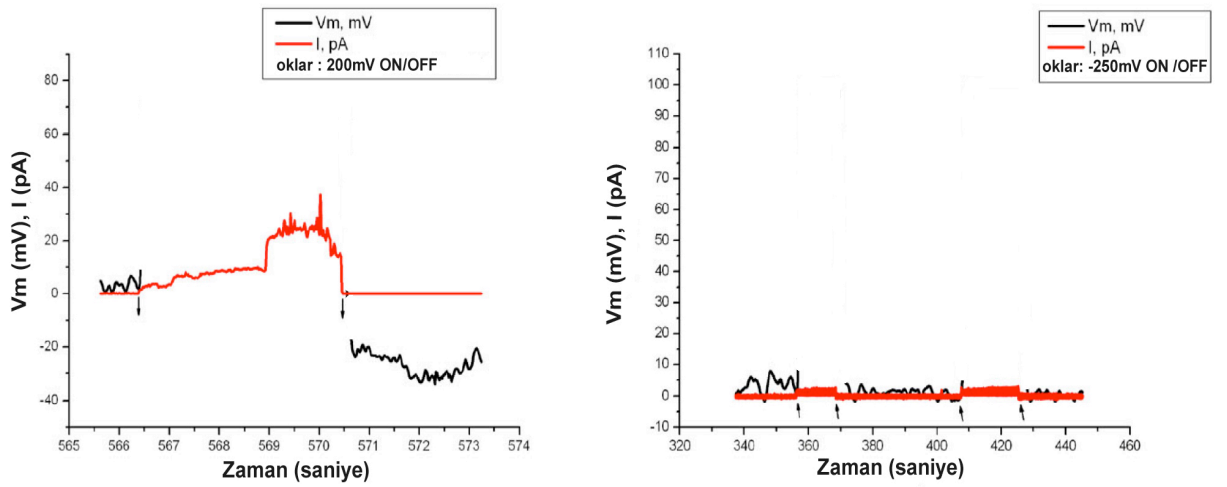


Şekil 3.18. Por oluşumu neticesinde transbilayer lipid transferi ölçümü ve zamana bağlı değişimi. Variance analizi boundary potential’ın por olmaksızın $\pm 3\text{mV}$ değişkenlik gösterdiğini bildirmektedir. İlk 15 saniye içinde 13 mol%’e varan PS transferi saptanmıştır. SD değeri Şekil 3.15.’de belirtilen membran kompozisyonları ile hesaplanmıştır (sağdaki şekil).

Bu sonuçlar, metodumuzun lipid transferini tespit etmeden başarılı olduğunu ve porlar aracılığıyla çok hızlı bir şekilde membran asimetrinde değişme

olabileceğini göstermektedir. Bir pordan 10-20 saniye acık kaldığı takdirde 13 mol%'e yakın PS transferi olabilir.

Elde ettiğimiz sonuçlar daha hassas bir methodla daha desteklenmiştir. Bu amaçla gereç ve yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde simetrik membran patchleri oluşturulmuş ve por oluşumunu takiben asimetrik hale gelmesi gözlenmiştir (3.19.).



Şekil 3.19. Küçük membran “patch” ‘lerinde lipit transferinin tespiti. Soldaki şekilde por oluşumunu takiben 30mol%PS içeren simetrik membranın asimetrik hale gelişi gösterilmektedir. Aynı membranda yüksek voltaj varlığında por olmadığı takdirde transfer gerçekleşmemiştir (sağdaki şekil) .

İki farklı model düzenek üzerinde non-bilayer yapılanmalar aracılığıyla lipit asimetrisinin bozulabileceği gösterilmiştir. Tüm veriler hipotezimizi destekler yöndedir. Yapılan hesaplamalar bu şekildeki membranda oluşan geçici porlardan saniyede 30.000 lipidin geçebileceğini göstermektedir. Ki bu da membran asimetrisinin nasıl olup da çok kısa sürede bozulabileceği açıklamaya yetmektedir.

4. TARTIŞMA

Hücre membran asimetrisi endoplazmik retikulumda lipid sentezi yapılırken başlayıp, plazma membranına doğru gittikçe artmaktadır. Lipitleri suyu sevmeyen kuyruk grupları, aksine suyun yanında durmak isteyen kafası sebebiyle membran yapısı oldukça stabildir. Sentezlenirken asimetric olarak oluşan plazma membranında, özellikle transbilayer olarak lipitlerin yer değiştirmesi hiç kolay değildir (Devaux, 1991). Membran asimetrisinin kaybolmasını gerektiren durumlardaki mekanizmasının ne olduğu hala aydınlığa kavuşmamıştır.

Deniz keşanesi sperm hücreleri üzerinde yaptığımız araştırma 10 saniye içerisinde membran asimetrisinin sperm aktivasyonu ile birlikte kaybolmaya başladığı ve ~20 saniyede çapı yaklaşık 5µm olan spermin membranın simetric hale geldiği gösterilmiştir. Bu veriler 1µm çapındaki trombositlerde 5 saniyeden daha az zamanda gerçekteşen asimetri kaybıyla da uyum göstermektedir (Born ,Richardson, 1980). Bugüne kadar kısa surede lipitlerin transbilayer olarak yer değiştirmesinden sorumlu olan bir protein tanımlanmamıştır.

Plazma membranındaki lipitlerin saniyeler içerisinde karışmasını sağlayan mekanizma, lipitlerin pasif hareketlerini içine alacak şekilde düşünöldüğünde, non-bilayer oluşumlardan lateral difüzyon ile transbilayer lipit transferi ile açıklanabilmektedir. Deniz keşanesi sperminde transbilayer PS transferi ilk olarak non-bilayer membran “ intermediate” aşamalar gerektiren (Martinez ,Morros, 1996) akrozomal vezikul ekzositozunun olduğu yerden başlamaktadır. Elektron mikroskobu düzeyinde, gold konjuge edilen Annexin V ile akrozomal membranda PS varlığı gösterilmiştir. Ayrıca bu aşamada membran geçirgenliğinin de arttığı PI ile işaretlenen sperm hücrelerinde tespit edilmiştir. Buna ilaveten elde edilen sonuçlar, PS’in hücre membranında “transbilayer” yer değiştirmesinin sperm aktivasyonu ile ilişkili ve sperm membranı ile yumurta membranının füzyonunu tetiklemede fizyolojik role sahip olduğunu göstermektedir.

Tüm bu veriler membranlarda oluşan non-bilayer deformasyonlar neticesinde oluşan porlar ile transbilayer lipid transferinin olabileceğini destekler niteliktedir. Por oluşumu neticesinde her iki monolayerin birbiri ile birleşmiş halde bulunup, lipid difüzyonuna izin vereceği fikri teorik fizik alanında düşünülse de, (Taupin *ve ark.*, 1975) deneysel olarak açıklığa kavuşmuş değildir. Oluşan porlar aracılığıyla özellikle yüklü gruba sahip olan lipidlerin geçip geçemeyeceği şuna kadar bilinmemektedir. Yapılan bilgisayar simülasyonları ile (Gurtovenko, Vattulainen, 2007) ve elektroporasyona tabi tutulmuş eritrosit ve lenfosit membranlarındaki geçirgenlik/flip-flop verileri ile por aracılı lipid transferi hipotezi ortaya atılmıştır (Haest *ve ark.*, 1983a; Haest *ve ark.*, 1983b; Vernier *ve ark.*, 2006). Bu hipotezin deneysel olarak gösterilebilmesi ve biyolojik membranlarda gözlenen asimetri kaybı hızı ile karşılaştırılabilmesi için gerekli teknik bu araştırma kapsamında geliştirilmiştir.

Membranlarda oluşabilen non-bilayer yapıların, transbilayer lipid transferi ile ilişkisinin en iyi şekilde aydınlatılabilmesi, çok iyi tanımlanmış model sistem olan “bilayer lipid membranes (BLM)” ler ile çalışılmıştır. BLM’lerde lokal olarak non-bilayer yapılar hücrede olduğu gibi yüksek elektrik alanı etkisinde oluşabilmektedir (Needham, Hochmuth, 1989). Bu porların PS geçişine izin verip vermediği ve transfer hızını ölçmek üzere IFC tekniği modifiye edilerek uygulanmıştır. Geliştirilen bu teknik sayesinde teorik olarak çizilen por yapısında gösterilen monolayer’ların birbiri ile bağlantısının olduğu ilk kez deneylerle tespit edilmiştir. Birbirine bağlı olan monolayerlardan lateral difüzyon kuralları ile açıklanabilen miktarda lipid transferinin olduğu ölçülmüştür. Transbilayer lipid transfer hızı, sperm hücresinde meydana gelen membran asimetri kaybı ve sonucu olan PS transfer hızı ile paralellik göstermektedir. Oluşan bu porlar analiz edildiğinde aynı anda kapanmasına da dayanılarak tek kaynaktan köken alan porlar olduğu düşünülmektedir. Asimetrik membranlarda oluşan porlar ile simetrik membran porları arasındaki karşılaştırma araştırmanın ilerleyen aşamalarında daha detaylı olarak ele alınacaktır.

Daha öncede belirtildiği gibi pek çok fizyolojik olay hücrede membranların yeniden düzenlenmesini gerektirmektedir. BLM' de elektrik alanı etkisi ile oluşan por çapı, membran üzerindeki tension sebebiyle belli bir düzeyden sonra membranın tamamen parçalanmasına sebep olup, porun genişlemesine imkân sağlamamaktadır. Ancak hücrede bu durum tam tersine işlemektedir. 1-2nm'den fazla çapa sahip porlar stabil olarak hücre membranlarda açık olarak kalabilmektedir (Sun *ve ark.*, 2006; Zhelev ,Needham, 1993). Bu durum transbilayer lipid transferini kolaylaştıracaktır.

Hücre membranında por oluşumu düzenleyen faktörler membran asimetrisinin kaybını da düzenleyici rol oynayabilir. Bu faktörler arasında endo-ekzositoz, peptid insersiyonu, kalsiyum aracılı membran faz değişimi, “lateral phase seperation” gibi faktörler sayılabilir (Devaux ,Morris, 2004; Kol *ve ark.*, 2004).

Literatürde şimdiye kadar hiç uygulanmayan bu teknik, membran asimetrisinin kaybından sorumlu olduğu düşünülen proteinlerin tek tek test edilmesinde, proteinlerin por oluşturan yapılarının aydınlatılmasında ve daha farklı alanlarda kullanılabilir niteliktedir. Biyolojik membranlardaki por oluşumu kontrol eden faktörlerin bu model sistem kullanılarak karakterize edilmesine yönelik çalışmalarımız devam etmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Deneyle neticesinde elde ettiğimiz veriler su sonuçlara varmamızı sağlamıştır:

- PS'in sperm hücre membranında “ transbilayer” yer değiştirmesinin ve hücrenin dışı bakan monolayer'ına transferi akrozomal vezikülün ekzositozunu takiben gerçekleşmekte ve PS, füzyon yeteneği olan spermde gözlenmektedir.

- Membran asimetrisinin kaybı, aşamalı olarak gerçekleşmekte ve önce aktive olan spermde, heterojen olarak, daha sonra da ölmek üzere olan spermde homojen olarak gözlenmektedir. Apoptotik spermde PS asimetri kaybı mitokondi deformasyonu ve membran geçirgenliğinin artışı ile birlikte gitmektedir.

- PS transferi ilk 15 saniye içerisinde gerçekleşmekte, bu kadar kısa surede membran asimetrisinin kaybı membranda oluşan non-bilayer yapılarla açıklanabilmektedir. PI ile tespit edildiği şekilde membran geçirgenliğinde artış gözlenmesi de bu görüşü güçlendirmektedir.

- Dış bakan membranda yer alan PS, sperm-yumurta membranlarının füzyonunda fizyolojik öneme sahiptir. PS'in inhibisyonu, füzyonunda inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır.

Bu bulgulardan yola çıkarak membran asimetrisinin kaybına sebep olacak mekanizmalara yönelik olarak araştırmalara başlanmıştır.

- Model membran sistemi BLM kullanarak asimetric membran oluşturulup, “ ramp yöntemi” adını verdiğimiz yöntem geliştirilerek model membranda PS asimetrisindeki değişiklikler ölçülebilmektedir. Literatürde şimdiye kadar hiç uygulanmayan bu teknik, membran asimetrisinin kaybindan sorumlu olduğu

düşünülen proteinlerin tek tek test edilmesinde, proteinlerin por oluşturan yapılarının aydınlatılmasında ve daha farklı alanlarda kullanılabilir niteliktedir.

- Geliştirilen bu teknik sayesinde teorik olarak çizilen por yapısında gösterilen monolayer'ların birbiri ile bağlantısının olduğu ilk kez deneylerle sağlanmıştır. Birbirine bağlı olan monolayerlardan lateral difüzyon kuralları ile açıklanabilen miktarda lipid transferinin olduğu ölçülmüştür.

- Transbilayer lipid transfer hızı, sperm hücresinde meydana gelen membran asimetri kaybı ve sonucu olan PS transfer hızı ile paralellik göstermektedir.

Bundan sonraki aşamalarda non-spesifik lipid hareketlerinin biyolojik membranlarda nasıl oluşabileceği, non-bilayer yapılanmalara nelerin, hangi faktörlerin sebep olabileceğinin anlaşılması önem taşımaktadır. Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen teknik sayesinde biyolojide membran asimetrisinin kayıptaki önemi saptanan moleküller, iyonlar ve proteinlerin test edilmesi ve zamana bağımlı asimetri kaybının hesaplanması planlanmaktadır. Aynı zamanda bu teknik, “ toroidal por” oluşturduğu ileri sürülen iyon kanallarının yapısının açıklanmasında da kullanılacaktır (Örneğin Bcl-2 ailesi üyeleri, Colicin, Mellitin gibi).

Tez çalışmasına yon veren hipotez; “ biyolojik membranlarda çok hızlı olarak gerçekleşen membran asimetri kaybı, membranda oluşan non-bilayer veya lipid por olarak da adlandırılan yapılanmalar neticesinde, lateral difüzyon ile gerçekleşebileceği” seklindedir. Bu hipotezi test etmek amacıyla öncelikle biyolojik model olarak çok hızlı asimetri kaybı gerektiren sperm kullanılmış, daha sonra model sistem üzerinde yapılan transbilayer lipid transfer ölçümleri ile biyolojik ölçümler modellenerek amaca ulaşılmıştır. Hücre modeli ve model membran sisteminden elde edilen verilen birbirine uyum göstermektedir.

ÖZET

Spermden Model Membranlara Lipit Asimetrisinin Kaybı

Fertilizasyon, birkaç aşamadan oluşan membran füzyon sürecidir. İlk olarak, bir akrozomal vezikül, sperm plazma membranı ile füzyona girer ve bu aşama akrozomal vezikül ekzositozu olarak adlandırılır. Ekzositoz neticesinde sperm plazma membranının lipit ve protein içeriğinde meydana gelen değişiklikler, sperm ve yumurta plazma membranlarının füzyonuna izin verir. Bu tez çalışmasında denizkestanesi sperm hücreleri kullanılmış ve akrozomal vezikül ekzositozu sonrasında negatif yüklü Fosfatidilserin (PS) 'in spermin dışa bakan membran yüzeyine transfer olduğu gösterilmiştir. 4.5 collidal gold ile hazırlanmış ve PS'e spesifik bağlanan AnnexinV ile, bu lipidin özellikle sperm membranının yumurta membranı ile füzyona girecek bölgesinde yoğunlaştığı elektron mikroskobu yardımı ile belirlenmiştir. PS'in baş kısmına bağlanan proteinlerin sperm-yumurta füzyonunu inhibe ettiği gösterilmiş ve fertilizasyondaki önemli rolü aydınlatılmıştır.

Plazma membran asimetrisinin nasıl çok hızlı şekilde bozulabildiği (spermde 15 saniye) , bunu sağlayan mekanizmanın ne olduğu hücre biyolojisinde hala aydınlığa kavuşmamış sorulardan birisidir. Hızlı asimetri kaybından sorumlu veya bu mekanizmayı düzenleyen protein adayları mevcut değildir. Membran lipitlerinin non-bilayer yapılanmalar olarak da adlandırılabilen, porlar aracılığı ile çok çabuk transferinin gerçekleşebileceği hipotez olarak ortaya atılsa da, kantitatif olarak ölçülememiştir. Por aracılı membran asimetri kaybını modellemek amacıyla Montal-Mueller tekniği ile oluşturulmuş asimetric lipit bilayer' lar kullanılmış, asimetric membran dinamiklerinin daha detaylı olarak izlenip özellikle por aracılı lipit transfer hızının saptanmasını sağlayacak yeni bir ölçüm sistemi geliştirilmiştir. Negatif yüklü PS'in, por oluşumunu takiben her iki monolayer da değişen miktarının zamana bağımlı ölçümü sonucu lipit por aracılı membran asimetri kaybı ilk kez kantitatif olarak gösterilmiştir. Yeni geliştirdiğimiz bu yöntem ile ölçülen lipit transfer hızı hücrelerde saptanan hıza uyum göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Membran asimetrisi, fosfatidilserin, lipit por, fertilizasyon

SUMMARY

The Loss of Membrane Asymmetry: from Sperm to Lipid Bilayers

Fertilization is a dual level membrane fusion process. In the first, acrosomal vesicle fuses with the sperm plasma membrane, which is called acrosomal vesicle exocytosis. The resulting changes in the lipid and protein content of the sperm plasma membrane allow sperm and egg fusion. We have studied the loss of membrane asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine (PS) in viable sea urchin sperm cells before and during acrosomal vesicle exocytosis. We demonstrated that PS is localized on the sperm head in less than 15sec following acrosome reaction by using fluorescent and 4, 5 colloidal gold conjugated Annexin V. Our results further indicate that blocking of PS inhibits sperm and egg membrane fusion.

Understanding how membrane lipids lose their asymmetric transmembrane distribution and achieve their nonrandom distribution in cells is a key challenge in cell biology. We hypothesized that the formation of a transient hydrophilic lipidic pore in the membrane leads to rapid diffusive translocation of negatively charged lipids through the pore to the opposite membrane leaflet. To test this hypothesis, we used asymmetric model membranes and established a variation of the inner field compensation technique for the time resolved measurements of membrane boundary potentials. External application of electric fields across the bilayer induced transient conductive states. We observed fast transitions between these different conductance levels, reflecting opening and closing of meta-stable lipidic pores. Comparison of the capacitance minimization potential for different asymmetric membranes before and after pore formation confirmed negatively charged lipids transfer across the bilayer. We also constructed a model governing lipid flow rate based on pore analysis and lipid lateral diffusion rate. This rate was matching with the PS exposure time in the sperm cells. Together, our study provides a new tool to monitor loss of membrane asymmetry and our results indicate that lipid transfer can occur through lipidic pores.

Key Words: Membrane asymmetry, phosphatidylserine, lipid pore, fertilization

KAYNAKLAR

- ABIDOR, I. G., ARAKELIAN, V. B., PASTUSHENKO, V. F., TARASEVICH, M. R., CHERNOMORDIK, L. V. (1978). [Electrical breakdown of lipid bilayer membranes]. *Dokl Akad Nauk SSSR* **240**, 733-6.
- ACHARYA, U., EDWARDS, M. B., JORQUERA, R. A., SILVA, H., NAGASHIMA, K., LABARCA, P., ACHARYA, J. K. (2006). *Drosophila melanogaster* Scramblases modulate synaptic transmission. *J Cell Biol* **173**, 69-82.
- ALVAREZ, O., LATORRE, R. (1978). Voltage-dependent capacitance in lipid bilayers made from monolayers. *Biophys J* **21**, 1-17.
- AUGEREAU, O., ROSSIGNOL, R., DEGIORGI, F., MAZAT, J. P., LETELLIER, T., DACHARY-PRIGENT, J. (2004). Apoptotic-like mitochondrial events associated to phosphatidylserine exposure in blood platelets induced by local anaesthetics. *Thromb Haemost* **92**, 104-13.
- AVALOS-RODRIGUEZ, A., ORTIZ-MUNIZ, A. R., ORTEGA-CAMARILLO, C., VERGARA-ONOFRE, M., ROSADO-GARCIA, A., ROSALES-TORRES, A. M. (2004). Fluorometric study of rabbit sperm head membrane phospholipid asymmetry during capacitation and acrosome reaction using Annexin-V FITC. *Arch Androl* **50**, 273-85.
- BALASUBRAMANIAN, K., CHANDRA, J., SCHROIT, A. J. (1997). Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem* **272**, 31113-7.
- BASANEZ, G., NECHUSHTAN, A., DROZHININ, O., CHANTURIYA, A., CHOE, E., TUTT, S., WOOD, K. A., HSU, Y., ZIMMERBERG, J., YOULE, R. J. (1999). Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5492-7.
- BASANEZ, G., SHARPE, J. C., GALANIS, J., BRANDT, T. B., HARDWICK, J. M., ZIMMERBERG, J. (2002). Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem* **277**, 49360-5.
- BASANEZ, G., ZHANG, J., CHAU, B. N., MAKSAEV, G. I., FROLOV, V. A., BRANDT, T. A., BURCH, J., HARDWICK, J. M., ZIMMERBERG, J. (2001). Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J Biol Chem* **276**, 31083-91.
- BASSE, F., STOUT, J. G., SIMS, P. J., WIEDMER, T. (1996). Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca²⁺-dependent transbilayer movement of phospholipid. *J Biol Chem* **271**, 17205-10.
- BELEZNAY, Z. Z., A. DEVAUX, P. F., NAVAZO, M. P., OTT, P. (1993). ATP-dependent aminophospholipid translocation in erythrocyte vesicles: stoichiometry of transport. *Biochemistry* **32**, 3146-52.
- BITBOL, M. F., P. ZACHOWSKI, A. DEVAUX, P. F. (1987). Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **904**, 268-82.
- BORN, G. V., RICHARDSON, P. D. (1980). Activation time of blood platelets. *J Membr Biol* **57**, 87-90.
- BRETSCHER, M. S. (1972). Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol* **236**, 11-2.

- CHEN, X., WINTERS, C., AZZAM, R., LI, X., GALBRAITH, J. A., LEAPMAN, R. D., REESE, T. S. (2008). Organization of the core structure of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4453-8.
- CHERNOMORDIK, L. (1996). Non-bilayer lipids and biological fusion intermediates. *Chem Phys Lipids* **81**, 203-13.
- CHERNOMORDIK, L., CHANTURIYA, A. N., SUSS-TOBY, E., NORA, E., ZIMMERBERG, J. (1994). An amphipathic peptide from the C-terminal region of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein causes pore formation in membranes. *J Virol* **68**, 7115-23.
- CHERNOMORDIK, L. V., ZIMMERBERG, J., KOZLOV, M. M. (2006). Membranes of the world unite! *J Cell Biol* **175**, 201-7.
- CONNOR, J., SCHROIT, A. J. (1990). Aminophospholipid translocation in erythrocytes: evidence for the involvement of a specific transporter and an endofacial protein. *Biochemistry* **29**, 37-43.
- CONNOR, J. S., A. J. (1988). Transbilayer movement of phosphatidylserine in erythrocytes: inhibition of transport and preferential labeling of a 31,000-dalton protein by sulfhydryl reactive reagents. *Biochemistry* **27**, 848-51.
- COOPER, G. M. (2004). *The Cell: A Molecular Approach*, Third edition. ASM Press, Washington, DC.
- DANIELLI, J. F., DAVSON, H. (1935). A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell Comp. Physiol.* **5**, 495-508.
- DAS, M., XU, B., LIN, L., CHAKRABARTI, S., SHIVASWAMY, V., ROTE, N. S. (2004). Phosphatidylserine efflux and intercellular fusion in a BeWo model of human villous cytotrophoblast. *Placenta* **25**, 396-407.
- DEKKERS, D. W., COMFURIUS, P., SCHROIT, A. J., BEVERS, E. M., ZWAAL, R. F. (1998). Transbilayer movement of NBD-labeled phospholipids in red blood cell membranes: outward-directed transport by the multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Biochemistry* **37**, 14833-7.
- DEVAUX, P. F. (1988). Phospholipid flippases. *FEBS Lett* **234**, 8-12.
- DEVAUX, P. F. (1991). Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* **30**, 1163-73.
- DEVAUX, P. F. (2000). Is lipid translocation involved during endo- and exocytosis? *Biochimie* **82**, 497-509.
- DEVAUX, P. F., MORRIS, R. (2004). Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic* **5**, 241-6.
- EICHMAN, P. (2009). From the Lipid Bilayer to the Fluid Mosaic: A Brief History of Membrane Models. University of Rio Grande, Rio Grande, Ohio.
- ENGELMAN, D. M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**, 578-80.
- ERMAKOV IU, A., CHERNYI, V. V., TATULIAN, S. A., SOKOLOV, V. S. (1983). [Boundary potentials of lipid membranes in the presence of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate ions]. *Biofizika* **28**, 1010-3.
- FADOK, V. A., BRATTON, D. L., FRASCH, S. C., WARNER, M. L., HENSON, P. M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* **5**, 551-62.
- FLESCH, F. M., GADELLA, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* **1469**, 197-235.

- GADELLA, B. M., HARRISON, R. A. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* **127**, 2407-20.
- GLASER, R. W., LEIKIN, S. L., CHERNOMORDIK, L. V., PASTUSHENKO, V. F., SOKIRKO, A. I. (1988). Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochim Biophys Acta* **940**, 275-87.
- GORDESKY, S. E., MARINETTI, G. V., LOVE, R. (1975). The reaction of chemical probes with the erythrocyte membrane. *J Membr Biol* **20**, 111-32.
- GORTER, E., GREDEL, F. (1925). On biomolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* **41**, 439-443.
- GREENHUT, S. F., ROSEMAN, M. A. (1985). Cytochrome b5 induced flip-flop of phospholipids in sonicated vesicles. *Biochemistry* **24**, 1252-60.
- GRUNEWALD, S., BAUMANN, T., PAASCH, U., GLANDER, H. J. (2006). Capacitation and acrosome reaction in nonapoptotic human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci* **1090**, 138-46.
- GURTOVENKO, A. A., VATTULAINEN, I. (2007). Molecular mechanism for lipid flip-flops. *J Phys Chem B* **111**, 13554-9.
- HAEST, C. W., ERUSALIMSKY, J., DRESSLER, V., KUNZE, I., DEUTICKE, B. (1983a). Transbilayer mobility of phospholipids in the erythrocyte membrane. Influence of the membrane skeleton. *Biomed Biochim Acta* **42**, S17-21.
- HAEST, C. W., HELLER, K., SCHWISTER, K., KUNZE, I., DRESSLER, V., DEUTICKE, B. (1983b). Concomitant changes of membrane leak permeability and phospholipid dynamics in erythrocytes subjected to chemical and physical membrane perturbation. *Biomed Biochim Acta* **42**, S127-9.
- HAGGE, S. O., WIESE, A., SEYDEL, U., GUTSMANN, T. (2004). Inner field compensation as a tool for the characterization of asymmetric membranes and Peptide-membrane interactions. *Biophys J* **86**, 913-22.
- HARRISON, R. A., GADELLA, B. M. (2005). Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* **63**, 342-51.
- ISRAELACHVILI, J. N. (1977). Refinement of the fluid-mosaic model of membrane structure. *Biochim Biophys Acta* **469**, 221-5.
- JANEL, N., LEROY, C., LAUDE, I., TOTI, F., FRESSINAUD, E., MEYER, D., FREYSSINET, J. M., KERBIRIOU-NABIAS, D. (1999). Assessment of the expression of candidate human plasma membrane phospholipid scramblase in Scott syndrome cells. *Thromb Haemost* **81**, 322-3.
- KAZAMA, M., ASAMI, K., HINO, A. (2006). Fertilization induced changes in sea urchin sperm: mitochondrial deformation and phosphatidylserine exposure. *Mol Reprod Dev* **73**, 1303-11.
- KELLER, S. H., VACQUIER, V. D. (1994). The isolation of acrosome-reaction-inducing glycoproteins from sea urchin egg jelly. *Dev Biol* **162**, 304-12.
- KOL, M. A., DE KROON, A. I., KILLIAN, J. A., DE KRUIJFF, B. (2004). Transbilayer movement of phospholipids in biogenic membranes. *Biochemistry* **43**, 2673-81.
- KOL, M. A., DE KRUIJFF, B., DE KROON, A. I. (2002). Phospholipid flip-flop in biogenic membranes: what is needed to connect opposite sides. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 163-70.

- KOZLOV, M. M. ,CHERNOMORDIK, L. V. (1998). A mechanism of protein-mediated fusion: coupling between refolding of the influenza hemagglutinin and lipid rearrangements. *Biophys J* **75**, 1384-96.
- KRASSOWSKA, W. ,NEU, J. C. (1994). Response of a single cell to an external electric field. *Biophys J* **66**, 1768-76.
- KURZ, A., VIERTEL, D., HERRMANN, A. ,MULLER, K. (2005). Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. *Reproduction* **130**, 615-26.
- KUYPERS, F. A. (1998). Phospholipid asymmetry in health and disease. *Curr Opin Hematol* **5**, 122-31.
- LANGE, Y., YE, J. ,STECK, T. L. (2007). Scrambling of phospholipids activates red cell membrane cholesterol. *Biochemistry* **46**, 2233-8.
- LANGMUIR, I. (1917). The constitution and fundamental properties of solids and liquids.II.Liquids. *J.Am.Chem.Soc.* **39**, 1848-1906.
- MARTIN, G., SABIDO, O., DURAND, P. ,LEVY, R. (2005). Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum Reprod* **20**, 3459-68.
- MARTINEZ, P. ,MORROS, A. (1996). Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosci* **1**, d103-17.
- MATSUZAKI, K., SUGISHITA, K., ISHIBE, N., UEHA, M., NAKATA, S., MIYAJIMA, K. ,EPAND, R. M. (1998). Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry* **37**, 11856-63.
- MCLAUGHLIN, S. G., SZABO, G., EISENMAN, G. ,CIANI, S. M. (1970). Surface charge and the conductance of phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**, 1268-75.
- MELIKOV, K. C., FROLOV, V. A., SHCHERBAKOV, A., SAMSONOV, A. V., CHIZMADZHEV, Y. A. ,CHERNOMORDIK, L. V. (2001). Voltage-induced nonconductive pre-pores and metastable single pores in unmodified planar lipid bilayer. *Biophys J* **80**, 1829-36.
- MITEVA, M., ANDERSSON, M., KARSHIKOFF, A. ,OTTING, G. (1999). Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Lett* **462**, 155-8.
- MONTAL, M. (1974). Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers. *Methods Enzymol* **32**, 545-54.
- MORISAWA, S. ,CHERR, G. N. (2002). Acrosome reaction in spermatozoa from hagfish (Agnatha) *Eptatretus burgeri* and *Eptatretus stouti*: acrosomal exocytosis and identification of filamentous actin. *Dev Growth Differ* **44**, 337-44.
- MOROZ, J. D. ,NELSON, P. (1997). Dynamically stabilized pores in bilayer membranes. *Biophys J* **72**, 2211-6.
- MURATORI, M., PORAZZI, I., LUCONI, M., MARCHIANI, S., FORTI, G. ,BALDI, E. (2004). AnnexinV binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *J Androl* **25**, 797-810.
- NANAVATI, C., MARKIN, V. S., OBERHAUSER, A. F. ,FERNANDEZ, J. M. (1992). The exocytotic fusion pore modeled as a lipidic pore. *Biophys J* **63**, 1118-32.

- NEEDHAM, D., HOCHMUTH, R. M. (1989). Electro-mechanical permeabilization of lipid vesicles. Role of membrane tension and compressibility. *Biophys J* **55**, 1001-9.
- NILES, W. D., LEVIS, R. A., COHEN, F. S. (1988). Planar bilayer membranes made from phospholipid monolayers form by a thinning process. *Biophys J* **53**, 327-35.
- PAULUSMA, C. C., OUDE ELFERINK, R. P. (2006). Diseases of intramembranous lipid transport. *FEBS Lett* **580**, 5500-9.
- PRIOR, I. A., PARTON, R. G., HANCOCK, J. F. (2003). Observing cell surface signaling domains using electron microscopy. *Sci STKE* **2003**, PL9.
- RATINOV, V., PLONSKY, I., ZIMMERBERG, J. (1998). Fusion pore conductance: experimental approaches and theoretical algorithms. *Biophys J* **74**, 2374-87.
- REYES, J., LATORRE, R. (1979). Effect of the anesthetics benzyl alcohol and chloroform on bilayers made from monolayers. *Biophys J* **28**, 259-79.
- ROBERTSON, J. D. (1957). New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol* **3**, 1043-1047.
- SAFFMAN, P. G., DELBRUCK, M. (1975). Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3111-3.
- SAHU, S. K., GUMMADI, S. N., MANOJ, N., ARADHYAM, G. K. (2007). Phospholipid scramblases: an overview. *Arch Biochem Biophys* **462**, 103-14.
- SCHICK, P. K., KURICA, K. B., CHACKO, G. K. (1976). Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane. *J Clin Invest* **57**, 1221-6.
- SCHLEGEL, R. A., WILLIAMSON, P. (2007). P.S. to PS (phosphatidylserine)--pertinent proteins in apoptotic cell clearance. *Sci STKE* **2007**, pe57.
- SCHOCH, P., SARGENT, D. F., SCHWYZER, R. (1979). Capacitance and conductance as tools for the measurement of asymmetric surface potentials and energy barriers of lipid bilayer membranes. *J Membr Biol* **46**, 71-89.
- SEIGNEURET, M. D., P. F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3751-5.
- SIMS, P. J., WIEDMER, T. (2001). Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost* **86**, 266-75.
- SINGER, S. J., NICHOLSIN, G.L. . (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.
- SOKOLOV, V. S., CHERNYI, V. V., MARKIN, V. S. (1984). [Measurements of the potential difference during adsorption of phloretin and fluorescein on the surface of lipid membranes using the method of inner field compensation]. *Biofizika* **29**, 424-9.
- SOKOLOV, V. S., KUZ'MIN, V. G. (1980). [Measurement of differences in the surface potentials of bilayer membranes according to the second harmonic of a capacitance current]. *Biofizika* **25**, 170-2.
- STREY, H., PETERSON, M., SACKMANN, E. (1995). Measurement of erythrocyte membrane elasticity by flicker eigenmode decomposition. *Biophys J* **69**, 478-88.
- SUKHAREV, S. I., CHERNOMORDIK, L. V., ABIDOR, I. G. (1983). [Reversible electrical breakdown of cholesterol-containing lipid bilayer membranes modified with holothurin A]. *Biofizika* **28**, 423-6.

- SUN, Y., VERNIER, P. T., BEHREND, M., WANG, J., THU, M. M., GUNDERSEN, M., MARCU, L. (2006). Fluorescence microscopy imaging of electroperturbation in mammalian cells. *J Biomed Opt* **11**, 024010.
- TANFORD, C. (1989). *Ben Franklin Stilled the Waves: An Informal History of Pouring Oil on Water with Reflection on the Ups and Downs of Scientific Life in General*. Duke University Press, Durham, NC.
- TANG, X. H., M. S. SCHLEGEL, R. A. WILLIAMSON, P. (1996). A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* **272**, 1495-7.
- TAUPIN, C., DVOLAITZKY, M., SAUTEREY, C. (1975). Osmotic pressure induced pores in phospholipid vesicles. *Biochemistry* **14**, 4771-5.
- THOMAS, A. D., MEYERS, S. A., BALL, B. A. (2006). Capacitance-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* **65**, 1531-50.
- TYURINA, Y. Y., TYURIN, V. A., ZHAO, Q., DJUKIC, M., QUINN, P. J., PITT, B. R., KAGAN, V. E. (2004). Oxidation of phosphatidylserine: a mechanism for plasma membrane phospholipid scrambling during apoptosis? *Biochem Biophys Res Commun* **324**, 1059-64.
- VACQUIER, V. D. (1998). Evolution of gamete recognition proteins. *Science* **281**, 1995-8.
- VAN DEN EIJNDE, S. M., VAN DEN HOFF, M. J., REUTELINGSPERGER, C. P., VAN HEERDE, W. L., HENFLING, M. E., VERMEIJ-KEERS, C., SCHUTTE, B., BORGERS, M., RAMAEKERS, F. C. (2001). Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *J Cell Sci* **114**, 3631-42.
- VERNIER, P. T., SUN, Y., GUNDERSEN, M. A. (2006). Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization. *BMC Cell Biol* **7**, 37.
- VOGEL, S. S., LEIKINA, E. A., CHERNOMORDIK, L. V. (1993). Lysophosphatidylcholine reversibly arrests exocytosis and viral fusion at a stage between triggering and membrane merger. *J Biol Chem* **268**, 25764-8.
- VOGT, T. C., BECHINGER, B. (1999). The interactions of histidine-containing amphipathic helical peptide antibiotics with lipid bilayers. The effects of charges and pH. *J Biol Chem* **274**, 29115-21.
- WEAVER, J. C., VAUGHAN, T. E., CHIZMADZHEV, Y. (1999). Theory of electrical creation of aqueous pathways across skin transport barriers. *Adv Drug Deliv Rev* **35**, 21-39.
- WHALLEY, T., TERASAKI, M., CHO, M. S., VOGEL, S. S. (1995). Direct membrane retrieval into large vesicles after exocytosis in sea urchin eggs. *J Cell Biol* **131**, 1183-92.
- WIEDMER, T., ZHAO, J., NANJUNDAN, M., SIMS, P. J. (2003). Palmitoylation of phospholipid scramblase 1 controls its distribution between nucleus and plasma membrane. *Biochemistry* **42**, 1227-33.
- WILHELM, C., WINTERHALTER, M., ZIMMERMANN, U., BENZ, R. (1993). Kinetics of pore size during irreversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes. *Biophys J* **64**, 121-8.
- WILLIAMSON, P., BEVERS, E. M., SMEETS, E. F., COMFURIUS, P., SCHLEGEL, R. A., ZWAAL, R. F. (1995). Continuous analysis of the mechanism of activated transbilayer lipid movement in platelets. *Biochemistry* **34**, 10448-55.

- WILSCHUT, J., PAPAHAADJOPOULOS, D. (1979). Ca²⁺-induced fusion of phospholipid vesicles monitored by mixing of aqueous contents. *Nature* **281**, 690-2.
- WINTERHALTER, M., HELFRICH, W. (1987). Effect of voltage on pores in membranes. *Phys Rev A* **36**, 5874-5876.
- ZACHOWSKI, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* **294 (Pt 1)**, 1-14.
- ZACHOWSKI, A. F., E. CRIBIER, S. HERVE, P. DEVAUX, P. F. (1986). Outside-inside translocation of aminophospholipids in the human erythrocyte membrane is mediated by a specific enzyme. *Biochemistry* **25**, 2585-90.
- ZHELEV, D. V., NEEDHAM, D. (1993). Tension-stabilized pores in giant vesicles: determination of pore size and pore line tension. *Biochim Biophys Acta* **1147**, 89-104.
- ZHOU, Q., SIMS, P. J., WIEDMER, T. (1998). Expression of proteins controlling transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in the B lymphocytes from a patient with Scott syndrome. *Blood* **92**, 1707-12.
- ZHOU, Q., ZHAO, J., STOUT, J. G., LUHM, R. A., WIEDMER, T., SIMS, P. J. (1997). Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem* **272**, 18240-4.
- ZIMMERBERG, J. (2006). Membrane biophysics. *Curr Biol* **16**, R272-6.
- ZIMMERBERG, J., COORSSEN, J. R., VOGEL, S. S., BLANK, P. S. (1999). Sea urchin egg preparations as systems for the study of calcium-triggered exocytosis. *J Physiol* **520 Pt 1**, 15-21.
- ZIMMERBERG, J., GAWRISCH, K. (2006). The physical chemistry of biological membranes. *Nat Chem Biol* **2**, 564-7.
- ZWAAL, R. F., COMFURIUS, P., BEVERS, E. M. (2005). Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* **62**, 971-88.
- ZWAAL, R. F., SCHROIT, A. J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* **89**, 1121-32.

ÖZGEÇMİŞ

Gülçin Pekkurnaz

Doğum yeri: Ankara, 09.Ağustos.1978
Uyruğu: T.C.
Medeni durumu: Bekar
Yabancı dili: İngilizce

Araştırma Enstitüsünün adresi:

Laboratory of Cellular and Molecular Biophysics,
National Institutes of Child Health and Human Development (NICHD),
National Institutes of Health(NIH)
Building 10 Room 10D10
Bethesda, MD 20892-1855

Telefon: 001- 301-594-2659

e-mail: pekkurng@mail.nih.gov

EĞİTİM

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (2004-)

Tıbbi Biyoloji Doktora Programı

National Institutes of Health Graduate Student Partnership Program

NIH, NICHD Program of Physical Biology

NIH Doktora tez danışmanı: Prof. Dr. Joshua Zimmerberg

Ankara Üniversitesi Doktora tez danışmanı: Prof.Dr. Asuman Sunguroğlu

Tez: Sperm-Yumurta Füzyonunda Fosfatidilserin Salınımı ve Rolü

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (2000-2003)

Tıbbi Biyoloji Master Programı

Danışman: Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu

Tez: Apoptotik Cisimciklerle BCR-ABL Füzyon Geninin Fagositer Hücreye Transferi

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi (1996-2000)

Biyoloji bölümü

Ankara Üniversitesi İngilizce Hazırlık (1995-1996)

ÖDÜLLER VE BURSLAR

Seyahat Ödülü, NIH Graduate Student Partnership Program (2007)

Doktora Bursu, National Institutes of Health Intramural Research (2004-)

Eğitim Bursu, Türkiye Cumhuriyeti Başbakanlık (1997-2000)

ÖĞRETME DENEYİMİ VE VERİLEN DERSLER

Introduction to Laboratory Techniques, **FAES Graduate School, NIH** (Güz dönemi, 2007) Lecturer: “Basic Principles of Optical Microscopy”

Becoming an Effective Scientist: Tools for NICHD Fellows, **NIH** (Güz dönemi, 2007) Lecturer: “Membranes of the world unite: Formation, Electrophysiological Measurements, and Incorporation of Components to Bilayer Lipid Membranes”

Neurobiology Course, **Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA** (Yaz dönemi, 2005 ve 2006) Teaching Assistant at Imaging Section (with instructor Josh Zimmerberg).

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvar Uygulamaları, **Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi** (2002-2004) Araştırma Görevlisi.

YAYINA HAZIRLANAN MAKALELER

Gülçin Pekkurnaz, Konstantine Pavlov, Vadim Frolov, Paul S. Blank, Joshua Zimmerberg. Breakdown of charged lipid asymmetry as a result of lipid pore formation.

Gülçin Pekkurnaz, Christine A. Winters, Paul S. Blank, Thomas S. Reese, Joshua Zimmerberg. Membrane fusion correlates with the surface appearance of anionic phospholipids on the sea urchin sperm membrane.

YABANCI DERGİLERDEKİ BİLİMSEL YAYINLAR

Gümüş-Akay G, Özkal P, Rustemov A, Varol N, Akcora D, Oskay S, Altınok B, Karadağ A, Ozkan T, **Pekkurnaz G**, Gökmen D, Sunguroğlu A,. Imatinib Causes Fragile Site Expression in CML Patients and Chromosome Breakage in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. (2008) (degiye gonderilmistir.)

Fen T., **Pekkurnaz G.**, Sunguroğlu A. Eosinophilic leukaemia with clonal t(5;14)(q31;q32) chromosomal anomaly. Haema (2006): 9(1); 136-140

SÖZLÜ SUNUMLAR

Pekkurnaz G. Lipid asymmetry and its loss: from lipid bilayer to sperm. Harvard Medical School, Department of Neurology (Prof. Thomas Schwarz tarafından davetli olarak). March, 2009, Boston, MA, USA

Pekkurnaz G. Lipid asymmetry and its loss: from lipid bilayer to sperm. Massachusetts General Hospital, Department of Neurology/Alzheimer Disease

Research Unit (Prof. Brian Backsai tarafından davetli olarak). February, 2009, Boston, MA, USA

Pekkurnaz G., Winters C., Zimmerberg J. Exposure and Fusogenic Role of Anionic Phospholipids on the Outer Surface of Sea urchin Sperm Plasma Membrane. Second Annual Graduate Student Partnership Program Symposium, May 2006, NIH, Bethesda, MD, USA

Pekkurnaz G., Gümüş G., Yürür K.N., Akçay R., Kaya A.I., Tükün A., Sunguroğlu A. Structural and Numerical Chromosomal Abnormalities of Haematological Malignancies. Vth National Congress of Prenatal Diagnosis and Medical Genetics, October 2002, Konya, TURKEY

Akçay R., Karabulut H.G., **Pekkurnaz G.**, Tükün A., Bökesoy I. Williams-Beuren Syndrome: A New Chromosomal Abnormalities. Vth National Congress of Prenatal Diagnosis and Medical Genetics, October 2002, Konya, TURKEY

Özer L., Kutlay N.Y., Tuncalı T., Aydos S., Karabulut H.G., Sayın B., Gümüş G., **Pekkurnaz G.**, Ruhi H.I., Kaya A.I., Akçay R., Çabuk F., Tükün A. Angelman Syndrome: Clinical Synopsis and Microdeletion. Vth National Congress of Prenatal Diagnosis and Medical Genetics, October 2002, Konya, TURKEY

POSTER SUNUMLARI

Pekkurnaz G., Pavlov K., Frolov V., Blank P.S., Zimmerberg J. Breakdown of charged lipid asymmetry as a result of lipid pore formation. Biophysical Society Meeting, Boston, MA, USA. Biophys. J. (2009):96(3); 152a

Pekkurnaz G., Winters C., Zimmerberg J. Loss of Plasma Membrane Asymmetry: Mechanism and Requirement for Sperm and Egg Fusion. Fourth Annual Graduate Student Partnership Program Meeting, May 2007, NIH, Bethesda, MD

Mazar J., **Pekkurnaz G.**, Zimmerberg J. Detachment of Mesenchymal Detachment of Stem Cells Triggers Fas-dependent Apoptosis. First Annual NICHD Meeting of Postdoctoral Fellows, Visiting Fellows, Clinical Fellows and Graduate Students. May 2005, NIH, Bethesda, MD

Pekkurnaz G., Tükün A, Elhan A, Okur H, Sunguroğlu A. Transfer of BCR/ABL fusion gene to phagocyte cell by apoptotic bodies. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, November 2003, Boston, MA. Clinical Cancer Research (2003): 9 (16); 6167S

Gümüş G., **Pekkurnaz G.**, Sunguroğlu A. Chromosomal Abnormalities Detected in Acute Myeloid Leukemia Patients. European Human Genetics Conference, May 2003, Birmingham, UK. Eur. J. Hum. Genet. (2003): 11 (suppl 1); 90

Pekkurnaz G., Gümüş G., Tükün A, Sunguroğlu A. Cytogenetic Response to STI571 Treatment in Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients. European Human Genetics Conference, May 2003, Birmingham, UK. Eur. J. Hum. Genet. (2003): 11 (suppl 1);87

Çabuk F., Karademir S., **Pekkurnaz G.**, Gümüş G., Sayın D.B., Tükün A. A Search for Chromosome 22q11 Deletion in Non-Syndromic Tetralogy of Fallot Patients. European Human Genetics Conference, May 2003, Birmingham, UK. Eur. J. Hum. Genet. (2003): 11 (suppl 1); 104

Karabulut H.G., Sayın B., **Pekkurnaz G.**, Güven A., Tükün A. A Cornelia De Lange Syndrome Case With 45,X[21]/46,X,+mar.ish der(X)[29] Chromosomal Abnormalities. Vth National Congress of Prenatal Diagnosis and Medical Genetics, October 2002, Konya, TURKIYE

Rustemov A., Gümüş G., Karabulut H.G., Kaya A.I., **Pekkurnaz G.**, Kadıkıran A., Bökesoy I. Y Chromosome Ploymorphism in Central Anatolian Region of Turkey. 10th International Congress of Human Genetics', Austrian Congress Center, May 2001, Wien, Austria. European Journal of Human Genetics (2001):9 (suppl. 1); 293

TÜRKÇE DERGİLERDEKİ YAYINLAR

Gümüş G., **Pekkurnaz G.**, Sunguroğlu A. Chromosomal Abnormalities Detected in Acute Myeloid Leukemia Patients. The Journal of Clinical Laboratory Research, Cancer Cytogenetic Issue. (2002):6; 107-110

Pekkurnaz G., Gümüş G., Sunguroğlu A. Cytogenetic Abnormalities of Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. The Journal of Clinical Laboratory Research, Cancer Cytogenetic Issue. (2002):6; 103-106

Pekkurnaz G., Gümüş G., Kutlay Y.N., Akçay R., Kaya A.I., Aydos S., Burhan B., Özer L., Özkal P, Rustamov A., Tükün A., Sunguroğlu A. Chromosomal Abnormalities of Myeloproliferative Disorders. The Journal of Clinical Laboratory Research, Cancer Cytogenetic Issue(2002):6; 124-128

Pekkurnaz G., Sunguroğlu A. Chromosomal Abnormalities of Myelodysplastic Syndromes. The Journal of Clinical Laboratory Research, Cancer Cytogenetic Issue. (2002):6; 115-119

Pekkurnaz G., Sunguroğlu A. Chromosomal Abnormalities in Lymphomas. The Journal of Clinical Laboratory Research, Cancer Cytogenetic Issue. (2002):6; 120-123.

Pekkurnaz G., Sunguroğlu A. Gene Therapy Strategies of Leukemias. The Journal of Optimal Medicine, (2003):6(3);84-92.