

174546

T. C.


İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
Biyokimya Kürsüsü

**Dictyostelium discoideum'un  
YAŞAM SÜRECİ ÜZERİNE STEROİD  
HORMONLARIN ETKİSİ.**

**Ömer GÜZEL**

**Doktora Tezi**

**1981**



Tezimin hazırlanması ve kazandığım deneyimlerde yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm Prof.Dr.Nevzat Baban, Doç.Dr. Ahmet Araz, Prof.Dr. Suat Vural, Prof.Dr. H.V. Riçkenberg ve Ass.Prof.Dr. Claude Tihon'a teşekkürü borç bilirim.



I - G İ R İ Ő	1
1. Dictyostelium discoideum'un Yaşam S¼reci	2
2. Ameboid AŞama	3
a- Vejetatif oğalma Koşulları	3
b- Dictyostelium discoideum'un Ameboid Hareketleri	6
c- Beslenme	7
3. K¼melenme AŞaması	8
a- Kemotaksis	8
b- Peryodik Hareketler	9
c- H¼cre-H¼cre ekimi	10
4. Yalancı Plazmoidal AŞama	12
5. En Y¼ksek Tepe Noktaya Ulaşma AŞaması	15
a- Sap Oluşumu	15
b- Sporların Oluşumu	16
c- Filizlenme	18
6. Genetik Açıdan Değerlendirme	21
a- Paraseks¼alite	21
b- Seks¼alite	22
7. H¼crelerin Korunması	24
8. Farklılaşmanın Makromolek¼ler İncelenmesi	24
9. Farklılaşmanın Enzimatik Açıdan Değerlendirilmesi	26
10. Amaç	29

II - G E R E Ç	V E	Y Ö N T E M L E R	31
A- Gereçler			31
1. Çalışma Materyali			31
2. Kimyasal Maddeler			31
3. Aygıtlar			31
B- Yöntemler			32
1. Dictyostelium discoideum'un Vejetatif Çoğalması			32
2. Hücre Farklılaşması			34
3. Hücrelerin Saklanması			35
4. Çalkalanın Kültür Sistemi			37
5. Enzim Analiz Yöntemleri			39
III - B U L G U L A R			43
1. Vejetatif Çoğalma Süreci Üzerine Steroid Hormonların Etkileri			43
2. Farklılaşma Süreci Üzerine Steroid Hormonların Etkisi			47
a) Steroid Hormonların Morfolojik Değişmeler Üzerine Etkisi			47
b) Steroidlerin Enzim Düzeyleri Üzerindeki Etkileri ve İlâçlarla Değişimi			54
IV - İ R D E L E M E	V E	S O N U Ç	60
Ö Z E T			68
S U M M A R Y			70
K A Y N A K L A R			72

## K I S A L T M A L A R :

cAMP	Adenozin 3':5'- Siklik Monofosfat
DNA	Dezoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik Asit
MES	2-(N-morfolino) etan sulfonik Asit, Monohidrat
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
OD	Optik Dansite
rpm	Dakikada Devir Sayısı
SM	Standart ortam
Tris.	(tris(hidroksimetil)-aminometan, hidroklorit)

### Steroid Hormonların UIPAC adlandırılmaları:

Aldosteron	.....	$\Delta^4$ -Pregnen-18-al-11 $\beta$ ,21-diol-3,20-dione; $\Delta^4$ -Pregnen-18,20-diol-11 $\beta$ ,18-epoxy-3,20-dione.
Androstendion	....	$\Delta^4$ -Androsten-3,17-dione
Kortizon	.....	$\Delta^4$ - Pregnen-17 $\alpha$ ,21-diol-3,11,20-trione
Östradiol	.....	17 $\beta$ -Estradiol; $\Delta^{1,3,5,(10)}$ -Estratrien-3,17 $\beta$ -diol.
Östriol	.....	$\Delta^{1,3,5,(10)}$ -Estratrien-3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ ,triol
Östron	.....	$\Delta^{1,3,5,(10)}$ -Estratrien-3-ol-17-one.
Pregnandiol	.....	3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -pregnan <del>e</del>
Pregnantriol	.....	3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan <del>e</del>
Progesteron	.....	$\Delta^4$ -Pregnen-3,20-dione
Testosteron	.....	$\Delta^4$ -Androsten-17 $\beta$ -ol-3-one

## I- G İ R İ Ő

Dictyostelium discoideum, eukaryotik sistem olarak ilginç bir model yapı olabilme niteliği ve kendine özgü karakteristikleriyle her geçen gün sayıları gittikçe artan araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Organizmanın en belirgin özelliği, temel filogenetik kategorilerin ara geçiş sınırlarında yer almasıdır. Botanikçiler tarafından ilksel bir bitki olarak kabul edilirken zoologlar da ilksel bir hayvan türü olduğunu ileri sürmektedirler (71). Hızlı yaşam siklusu nedeniyle sitolojik incelemeler açısından çok uygun olmasının yanı sıra uyumlu farklılaşma süreci de biokimyasal incelemelere büyük olanaklar sağlamaktadır. Mikroorganizmaların birçok özelliklerine ve deneysel açıdan kolaylıklarına sahip olmasıyla birlikte çok hücreli organizmaların genel karakteristiklerini de göstermesi Dictyostelium discoideum'un evrimsel açıdan önemini bir kat daha arttırmaktadır (45). Bir anlamda tek hücreli yaşamdan çok hücreli düzeye geçiőin anahtar organizmalarından birisidir diyebiliriz.

Tek hücreli organizmalarda milyarlarca yıl önce oluşan biokimyasal proseslerin günümüz yüksek organizmalarında da belirli ölçülerde korunmuő olması ilginç bir olgudur. Çok hücreli organizmaların morfolojik özelleőmeleri dışında enerji üretim süreçleri ve biosentez yolları hemen hemen deđiőmemiőtir. Genetik kod'un evrenselliği ve protein sentezlerinin özgül mekanizması bize Şu gerçeği kanıtlamaktadır ki, genetik bilginin temel oluşturacak duyarlılığa

ulaşması gerçekleştiikten sonra bu aşamadan öte oluşan değişimler çok sınırlı sayıda olmuştur (71).

Yüksek yapılı organizmaların yaklaşık olarak bir milyar yıl önce var olmaya başladıkları göz önüne alınırsa bu oluşum süreci içerisinde kendi başına yepyeni bir yapının oluşmasından çok, daha alt düzeydeki canlı organizmaların sahip oldukları fizyolojik fonksiyonların daha üst düzeydeki yeni kombinasyonlarının söz konusu olduğunu görürüz. Bu nedenle evrimin alt basamaklarında yer alan organizmalar üzerinde yapılan ve bir süreci açıklamaya yönelik temel çalışmaların ortaya çıkardığı gerçekler, zincirin üst basamaklarında yer alan organizmaların anlaşılmasına da ışık tutmaktadır (71). Dictyostelium discoideum'un bu güne kadar gereğince üzerinde durulmamış bir yönü olan steroid hormonların etki mekanizmalarının incelenmesinin organizmanın yaşam sürecinin daha detaylı anlaşılmasına yardımcı olacağına inanmaktayım.

### 1- Dictyostelium Discoideum'un Yaşam Süreci

Akrasia orderinin miksomikofita filumuna ait olan Dictyostelium discoideum doğal ortamda ormanların nemli topraklarında, yapraklar arasında yaşamını sürdürür (100). İlk olarak 1935 yılında Raper, Kuzey Carolina ormanlarında bu türü saptamış ve daha sonraları da dünyanın çeşitli yerlerinde, benzer ekolojik koşullarda rastlanılmıştır (18,21). Hücreler orman zemininde bakterilerle beslenirler ve diğer ameboid canlılar gibi ikiye bölünerek çoğalırlar. Buldukları zemin üzerindeki besin kaynağı tükenince D.discoideum'u benzeri organizmalardan ayıran kendine özgü, karakteristik bir farklılaşma süreci başlar (71). Hücreler ağaç dalları görünümünde ve  $10^5$  hücre sayısına ulaşan kümeler oluştururlar (Şekil.1). Bu kümeler tüm kütleli kaplayacak bir zar oluşturarak bir araya

toplanırlar. Tek tek hücreler halinde başlayan süreç çok hücreli bir aşamaya geçmeye başlamıştır. Tek bir organizma gibi davranarak buldukları zemine dik bir düzlemde yükselmeye başlarlar (Şekil.2). Kabuksuz bir sümüklü böcek görünümündedirler, yalancı plazmodyum diye adlandırılırlar (45).

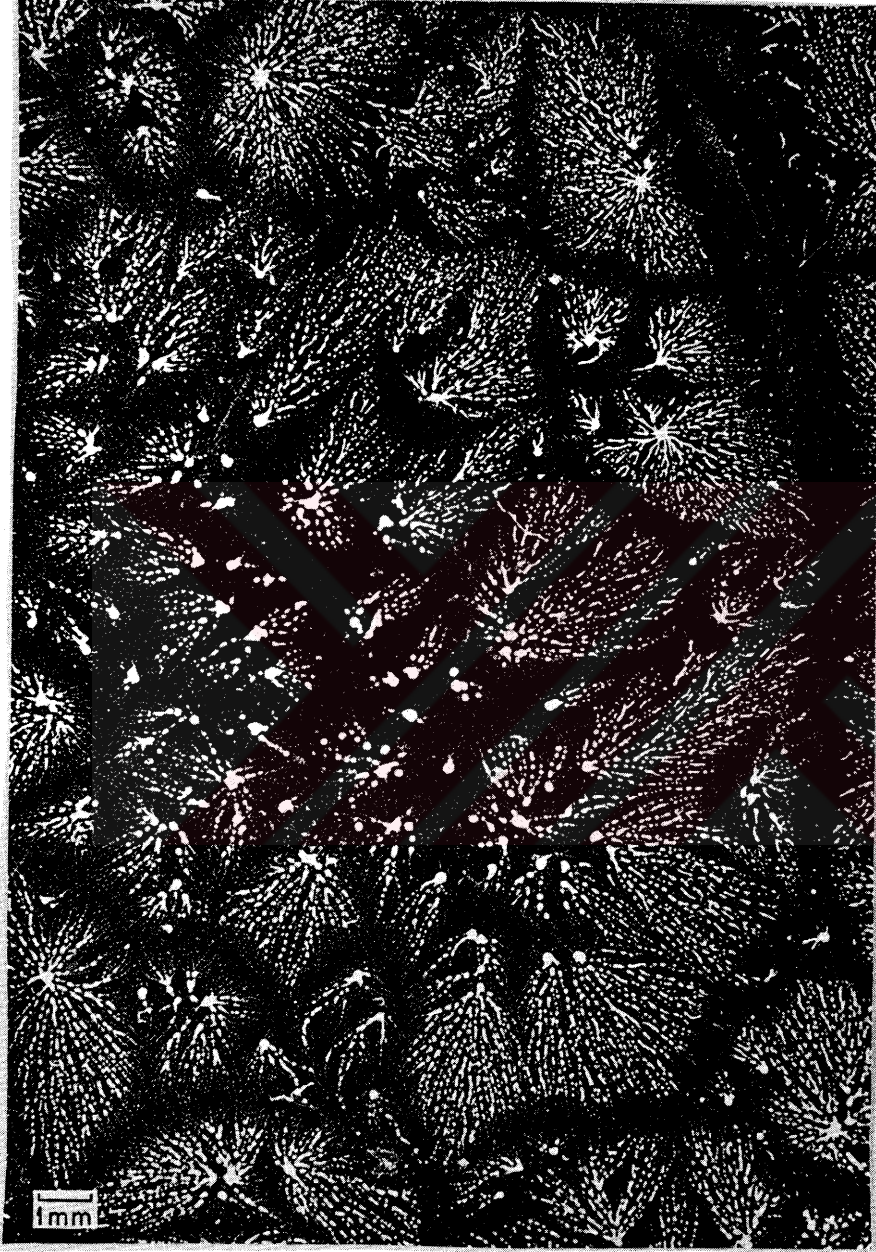
Yükselmeye başladıktan bir süre sonra yalancı plazmodyumun hareketi durur ve ön ucunda meyvalı gövdeyi oluşturacak bir seri farklılaşmalar başlar. Bu aşamada ana kütlede uca yakın hücreleri, artan miktarlarda selüloz sentez etmeye başlarlar (71). Oluşan bu selüloz kabuk içerisinde, hücreler genişleyerek vakuolize olurlar ve spor kesesini taşıyacak olan sapı meydana getirirler. Yükselen sapın açık ucunda gittikçe artan sayıda hücreler birikmeye başlar (9). Sapın içerisindeki hücreler genişlemeye başlayarak tüm kütlede yukarıya doğru kaldırırken uçtaki hücrelerde kapsüller bir yapı oluşturmaya başlarlar. Bu süreç, hücrelerin bir kısmının sap içinde yer alması ve geri kalanların da sporları oluşturmasıyla sonlanır (71). Meyvalı gövde oluşmuştur (Şekil.3).

Sapı oluşturan hücreler genişleyerek vakuolize olduktan sonra canlılıklarını daha fazla devam ettiremezler. Fakat sporlar açlık, su kaybı, ısının yükselmesi koşulları altında da uzun süre canlılıklarını devam ettirirler. Dış etkenlerle patlayan spor kesesinden etrafa yayılan sporlar besli ortamı bulduklarında filizlenerek yaşam süreçlerini devam ettirirler (9).

## 2- Ameboid Aşama

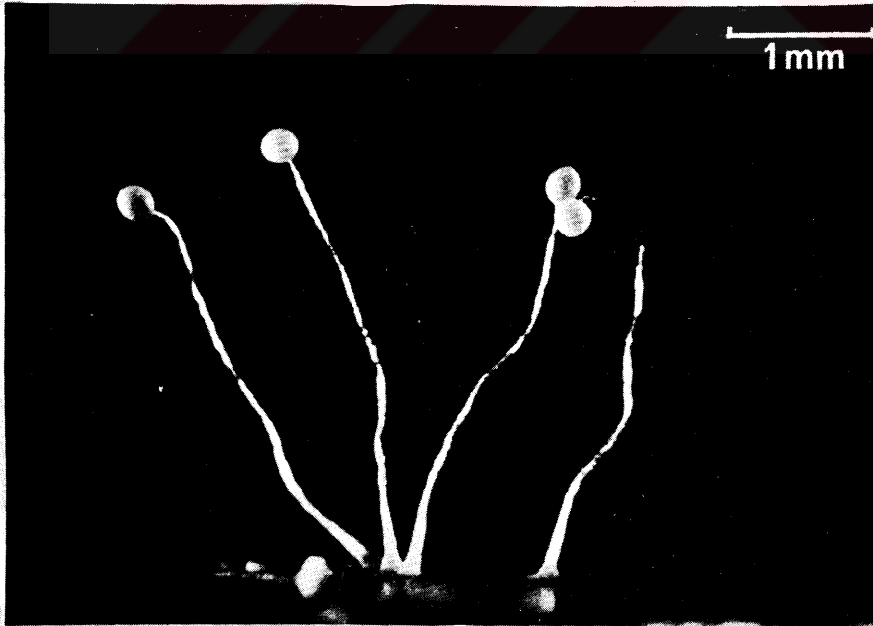
### a) Vejetatif Çoğalma Koşulları:

*Dictyostelium discoideum*'un doğadan yabani olarak elde edilen türü laboratuvar koşullarında değişik bakterilerle beslenerek yetiştirilebilmektedir (9). Bu amaçla *Escherichia coli* B/r veya Aerogen bakteriler kullanılmak-



Şekil.1.- Kümelenme aşamasındaki birçok hücrenin kemotaktik merkezlere doğru hareketleri ağaç dalları şeklinde bir görünüm vermektedir. Tek amipler çok küçük noktalar halinde aralarda görülmektedir (71).

Şekil.2.- Hareket halindeki bir yalancı plazmodyumun yukarıdan görünüşü. İnce- lerek yükselmeye başlayan üst uç ve zemin üzerinde kalan yüzey kılıf ta- bakası açıkça görülmektedir (71).



Şekil.3.- Meyvalı Gövde oluşumu. En yüksek tepe noktaya ulaşma aşamasının sonucunda oluşan spor kesesi ve üzerinde yer aldığı sap oluşumu (71).

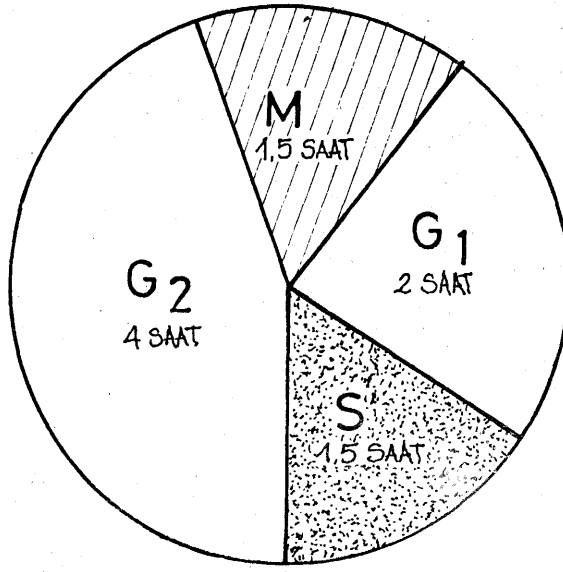
tadır (100). Bakteri süspansiyonları, gerek canlı gerekse de otoklavlandıktan sonra amiplerin çoğalması için en uygun besin kaynağını teşkil ederler (56). Doğadan alınan türün bakterilerin bulunmadığı, yapay bir ortamda yetiştirilmesi ilk zamanlar mümkün olmamışsa da, değişik türetmelerle uygun bir likid ortamda çoğalabilen NC-4 tipi elde edilebilmiştir (9). R. Sussman 1967 yılında ilk kez proteoz pepton, dekstroz, maya ekstraktı, karaciğer ekstraktı ve fetal sığır serumu içeren bir ortamda çoğalabilen Ax-1 tipini izole etmiştir (105). Daha sonraları HL-5 adı verilen daha basit besi ortamında çoğalabilen Ax-2 tipi de izole edilmiştir (107).

Laboratuvarda geliştirilen bu türler  $2 \times 10^6$  hücre/ml yoğunluğuna kadar, iki misli olma zamanı 8-10 saat olmak üzere eksponansiyel olarak çoğalırlar.  $2 \times 10^6$  -  $2 \times 10^7$  hücre/ml arasında çoğalma kararlıdır (98).  $2 \times 10^7$  hücre/ml değerinin üzerine çıkıldığında ortamda konsantrasyonu artan bir transkripsiyon inhibitörü nedeniyle çoğalma yok denilecek kadar azalır (35,112).

Türetilmiş tiplerle yapılan çalışmalarda, HL-5 besi ortamında çoğalma esnasında hücre siklusu da incelenmiştir (58)(Şekil.4).

#### b) Dictyostelium discoideum'un Ameboid Hareketleri:

Solid bir zemin üzerine terkedilen D. discoideum hücreleri diğer eukaryotik hücrelerinkine benzer şekilde lokomotor hareketler yaparlar (96). Birçok organizmaların ameboid davranışları için kabul edilen değişik teoriler olmakla birlikte kassız sistemler için en geçerli olasılık, çizgili kasların kullandığı aktomiyosin kontraktıl sistemine benzer bir sistemin geçerli



Şekil.4.- Hücre siklusu, A3 tipi hücreler ile HL-5 besi ortamında 22°C'da incelenmiştir. Mitoz 1.5 saatlik bir periyotta oluşur (M). Büyüme Fazını (G<sub>1</sub>) DNA sentezinin olduğu faz takip eder (S). İkinci büyüme fazı ise 4 saat sürelidir (G<sub>2</sub>) (58).

olmasıdır (54, 71). *D. discoideum*'un ameboid hareketleri esnasında benzer bir kontraktıl sistemin geçerli olduğunun kanıtı hareket halindeki hücrelerde aktin ve miyosinin bulunmuş olmasıdır (24). Elektron mikroskopisiyle yapılan çalışmalarda da *D. discoideum*'un hücre membranına yakın mesafede ince filamentlerin dizilmiş olduğu görülmüştür (37). Bu gözlemlerin ışığı altında ameboid hareketin, hücre içinde bulunan bağlı ve serbest aktin moleküllerinin relatif hareketiyle sağlandığı kabul edilmektedir (99).

c) Beslenme:

*Dictyostelium discoideum* hücrelerinin besinlerini alması fagositöz yo-

luyla olmaktadır. Bakteriler, besin vakuollerine lisosomların füzyonu ile ortaya çıkan enzimler aracılığı ile vakuollerde sindirilmektedir. Bakteriyel besinlerin çoğu sindirim sırasında parçalanarak kullanılmakta, pek azı sindirilmeden kalmaktadır (17).

### 3- Kümelenme Aşaması

On binlerce hücrenin belirli bir merkeze doğru akışları ile başlayan ilginç süreç, akrasia orderi dışında pek az sayıda organizmada görülmektedir. *D. discoideum* hücreleri nemli bir yüzey üzerinde açlığa terkedildikleri zaman başlangıçta hareketleri rastgeledir. Açlık başlangıcından 6-10 saat sonra çevredeki hücreleri kendilerine çeken merkezler oluşmaya başlar. Hücre yoğunluğu ile bağıntılı olarak 10 saate kadar çıkabilen bir sürede tek tek hücreler halkalı bir görünüm içerisinde merkezlere doğru dalgalı bir akışla hareket ederler. Merkeze doğru akış tamamlandığında yaklaşık 0.5 mm çapında hücre kümeleri oluşur (71).

#### a) Kemotaksis:

Otuz yıla yakın bir süre önce John Bonner tarafından yapılan ilginç bir gözlem, *D. discoideum* hücrelerinin kümelenmesinin bazı hücreler tarafından yayınlanan bir bileşiğe bağlı kemotaksis ile ilgili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bonner bu bileşiğe "Akraşin" adını vermiştir (6,7). Aradan geçen uzun yıllar boyunca akraşin bileşiğinin yapısı araştırılmış ve 1969 yılında aranılan cevabın Siklik Adenozin Monofosfat, cAMP olduğu saptanmıştır (13).

Aç kalan D. discoideum hücrelerinin çok hücreli yapıya geçişinde gerekli temel bilgi, hücreler arasında cAMP pulslarıyla iletilmektedir (9, 92, 97). Kimyasal mesaja cevap olarak hücreler kümelenmeye yatkın konuma geçmek üzere farklılaşmaya başlarlar ve kendi başlarına, ritmik olarak cAMP yayınladıkları varsayılan merkez hücrelere doğru hareket ederler (9, 91). cAMP aracılığıyla iletilen mesaj hücreler tarafından plazma membranındaki reseptörler aracılığı ile tanınmaktadır (37,40,41,49,52,60). D.discoideum da hücreyel adenil siklaz enziminin bir kısmı plazma membranına bağlı olduğundan dış ortamdaki cAMP konsantrasyon değişiklikleri süratli bir biçimde hücre içine yansımaktadır(27,74,93,94).

Bir cAMP pulsu ile uyarılan hücre, ilk bir iki dakika içerisinde hücreyel cAMP düzeylerini arttırarak bir kısmını hücre dışına yayımlarlar (62,75,92,97). Pulslar halinde cAMP yayınlaması, çok sayıda hücrenin işbirliği içinde kümelmesine neden olur (9,91).

#### b) Peryodik Hareketler:

D. discoideum'un yoğun olarak kümelenen hücre grupları mikrosinematografi ile incelendiğinde, kemotaksis süresince hücrelerin ne şekilde davrandıklarının anlaşılabilmesi mümkün olmuştur. Kemotaksise uğrayan hücreler, dışarıdan içeriye doğru merkezi dairesel dalgalar şeklinde ve 5-7 dakikalık periyotlarda yayılmaktadırlar (38,91). Hücreyel yer değiştirme hareketinin yön değiştirmeksizin merkeze doğru devam etmesi, hücrelerin 5-7 dakika süren ve cAMP yayınlamadıkları cevapsız bir sürece girmeleriyle açıklanmaktadır (99). Adenil siklaz enzim aktivitesinde ve cAMP'nin hücreyel reseptörlere bağlanmasında meydana gelen uyumlu dalgalanmalar, söz konusu cevapsız sürecin moleküler düzeyde anlaşılmasına yardımcı olmaktadır (60).

D. discoideum hücreleri için cAMP cevapsız bir sürecin var olmaması koşulunda hücreler sürekli olarak cAMP üretecek ve yayınlayacak, böylece de hücreler arası uyumlu birlik bozulacak, periyodik hareketler gerçekleşemeyecekti (71).

Peryodik hareketlerle belirli merkezlere doğru ilerleyen hücreler kümelenecek hücre gruplarını oluştururlar. Peryodik hareketler, tek tek D.discoideum hücrelerinin birlikte hareket ederek çok hücreli aşamaya geçiş süreçlerinin ilk basamağıdır.

### c) Hücre-Hücre Çekimi:

Farklılaşma başladıktan kısa bir süre sonra eğer hücreler tuz çözeltilerine konulup karıştırılırsa kümecikler oluşarak çökme başlar (14). Bu koşullar altında ortama eklenecek olan 1 mM EDTA kümeleşmeyi önler (43). Hücrelerin açlığa terkedilmelerinden 8-10 saat sonra fosfat tamponuna konulup karıştırıldıklarında ortamda 1 mM EDTA bulunsa bile kümecikler oluştururlar (3,71,101).

Hücre hücre çekimi büyük bir olasılıkla hücreler arası köprüler oluşturan  $Ca^{++}$  iyonu tarafından uyarılmaktadır (14). Bu nedendir ki ortama eklenen EDTA, hücre yüzeylerine bağlanmış olan  $Ca^{++}$  iyonlarını kelatlaştırmakta ve hücre hücre çekimi engellenmektedir (71).

Hücre yüzeyindeki iyonik denge değişmesinin yanı sıra daha başka faktörlerin de hücre hücre çekimi üzerine olan etkileri incelenmiştir. D. discoideum'un kümelenmiş hücrelerinin yüzeylerindeki komponentlere karşı spesifik bir antiseranın hazırlanması mümkün olmuştur (4). Hazırlanan seradaki antikorlar farklı-

laşmaya uğrayan hücreleri kümelenendirip çöktürebilmelerine karşılık vejetatif hücreler üzerinde etkisiz kalmışlardır. Bu antikorlarla etkileşime giren hücre yüzeyindeki özgül komponentler, farklılaşmanın başlamasından ancak 9 saat sonra ortaya çıkmaktadırlar (3). Bu süreden sonra EDTA etkisiz kalmaktadır. Yüzey antijenlerinin ortaya çıkmasıyla artan kohezyon gücü arasında yakın bir ilişki vardır (71).

Farklılaşmanın ilk 6-12 saatleri arasında hücre yüzeyinde meydana gelen farklılıkların yanı sıra membranın ultrastrüktürel yapısında da birtakım değişikliklerin olduğu gözlemlenmiştir (1). cAMP'nin bulunduğu inkubasyon ortamında membran strüktüründe meydana gelen değişikliklerin çok daha önce başladığı görülmüştür (49). Kümelenme aşamasında cAMP sadece kemotaktik bir ajan olarak kalmıyor, aynı zamanda hücre-hücre çekimini arttırıcı bir takım değişikliklere de sebep oluyor (49,59).

Kümelenme aşamasında söz konusu olan prosesleri çok sınırlı ve özet olarak açıklamaya çalıştık. Ortaya çıkan görüntüyü toparlıyacak olursak: Açlığa terk edilen hücreler, hücre dışı cAMP konsantrasyonunu sınırlı tutacak fosfo diesteraz enzimini yayınlamaya başlarlar (89). Birkaç saat sonra yine hücrelerin yayınladığı özgül bir inhibitör fosfo diesterazı etkisiz hale getirir ve bir cAMP gradiyenti oluşur (39,90). Ortamdaki birkaç hücre sürekli olarak cAMP yayınlarken çevredeki hücrelerde bu uyarana doğru harekete geçerler. Harekete geçen bu hücrelerde aynı zamanda düşük konsantrasyonlarda cAMP yayınladıkları görülür. Bir cAMP pulsu yayınladıktan sonra ikinci pulsa kadar hücreler, 5-7 dakikalık cevapsız peryoda girerler. Hücreler giderek merkezlerde birikmeye başladıklarında, plazma membranını içine de girebilen spesifik bir protein sentezlemeye başlarlar. Böylece giderek artan hücre çekimi sağlanır. Sonuçta hücreler çok sıkı kümecikler oluştururlar ve giderek yalancı plazmoidal aşamaya dönüşüm gerçekleşir (71).

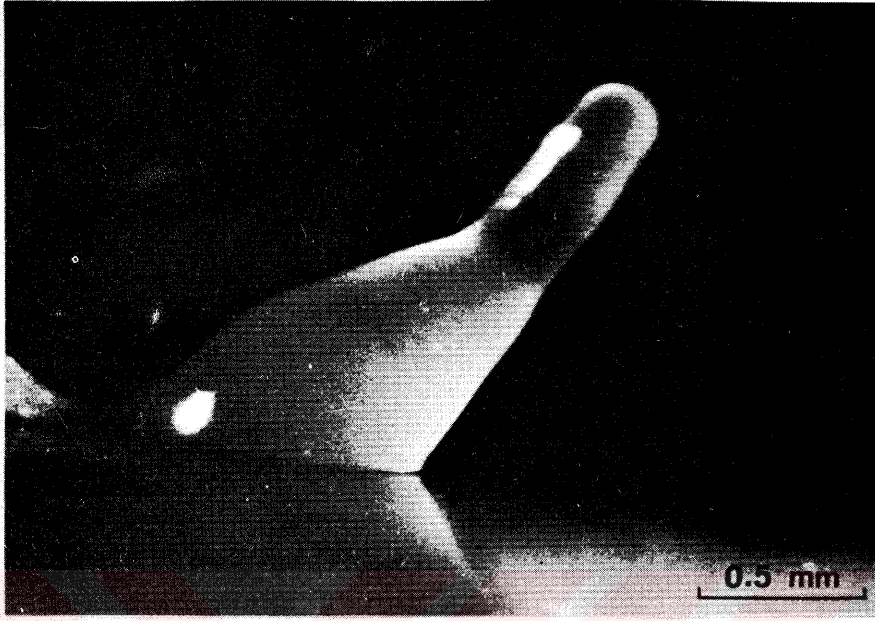
#### 4- Yalancı Plazmoidal Aşama

D. discoideum'un morfogenezi esnasında yalancı plazmoidal aşama zorunlu bir basamaktır. Bu aşamada, kümelenmiş olan hücrelerin selüloz bir tabakayla kaplı, parmak görünümünde bir yapı oluşturmaları söz konusudur (71) (Şekil.5.). Yalancı plazmoidal yapıyı oluşturan hücrelerin sayısı 100 ile 100 000 arasında değişir. Bu saptama kümelenme alanındaki hücreler sayılarak yapılmıştır (11).

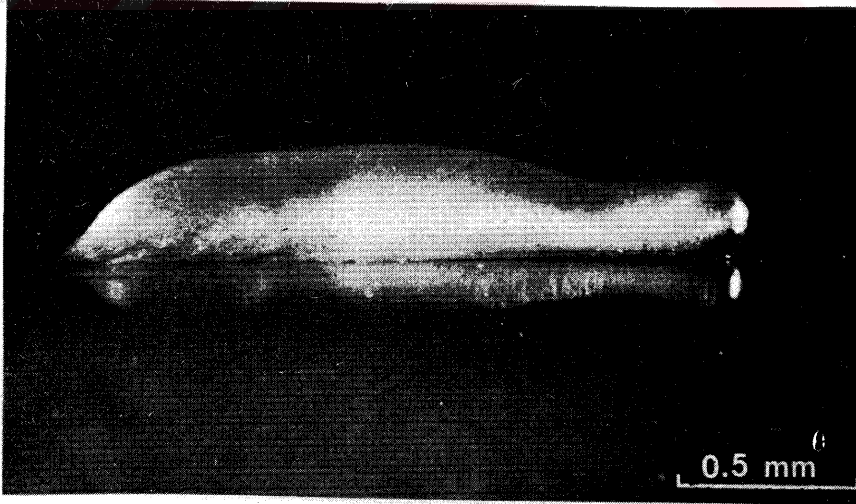
Yalancı plazmoidin zaman zaman kayda değer uzaklıklara göç etmesi söz konusu ise de, bu aşamada göç etme fonksiyonu temel bir özellik taşımamaktadır.

Hücrelerin yalancı plazmoidal aşamaya geçişleri, yüzey koruyucu kılıfın zemine kadar uzanması ve en son hücreleri de kapsamasına kadar devam eder. Yalancı plazmoidal yapının dış görünüş olarak sınırlarını belirleyen etkenler, hücre hareketleri nedeniyle ortaya çıkan hücre-hücre çekimi ve üstteki koruyucu kılıfın özellikleridir (71). Çok geniş kümeler oluştuğunda bu yapı parçalara bölünür ve ayrı ayrı yalancı plazmodyumlar oluşarak kendi bireysel farklılaşmalarını sürdürürler. Geniş bir kümeden oluşmuş büyük hacimli bir yalancı plazmodyumun göç etme anında daha küçük parçalara bölünmesi de söz konusu olabilir (71).

Parmak benzeri bir yapının oluşmasından sonra yalancı plazmodyum bükülerek yatay konuma geçer (71) (Şekil.6). Yalancı plazmodyum bu konumunu birkaç gün devam ettirerek zemin üzerinde yer değiştirebilir, santimetrelerce yol alabilir. Bu şekilde yer değiştirip göç edebilmeyi kolaylaştıran koşullar, yüksek nem oranı ve düşük iyonik konsantrasyondur (83). Herhangi bir tek veya çift değerlikli iyonun ortamda bulunması göçetmeye engel olur ve kümelenmenin olduğu yerde en yüksek tepe noktaya ulaşma aşamasının başlamasına neden olur (76).



Şekil.5.- Yalancı Plazmodyum. Kümelenmiş hücreler bir yüzey kılıfla çevrelenmiş ve zemin üzerinde yükselmeye başlamıştır (71).



Şekil.6.- Yalancı Plazmodyumun hareket etmeye başlaması. Yalancı plazmodyum zemin üzerine uzanır ve yatay olarak hareket etmeye başlar (71).

Yalancı plazmoidal aşamada, tüm kütle göçetmeye başlayıp yer değiştirirken sadece uç kısımda uzamaya başlayan yeni bir kılıf tabakasının oluşumu söz konusudur. Hücreler devamlı ileriye doğru hareket ettiklerinden yeni kılıfın içine yerleşirler ve eski kılıf yapısı zemin üzerinde kalır (33). Yeni oluşan kılıf, uç noktası dışında hareketsizdir, hücreler ileriye doğru hareket ederek içine yerleşirler. Yalancı plazmodyumun göç etme sürecinde sağa, sola ve arkaya doğru hareketi söz konusu değildir, ön ucu doğrultusunda ilerler (34). Farklı yönlerdeki hareketleri sınırlayan yüzey kılıf tabakasının var olması, tek yönlü hareketin nedeni olarak kabul edilmektedir. Mikro cerrahi ile uç kısımdan kılıf tabakası çıkarıldığında yalancı plazmoidal aşamadaki hücrelerin her yönde hareket edebildikleri gözlemlenmiştir (70).

Yalancı plazmodyumun göçedebilme hızı kütleli büyüklükle doğru orantılı olarak değişir. Daha büyük kütleler daha hızlı hareket edebilmektedir. Küçük hacimli yalancı plazmodyumlarda göç etme hızını sınırlayan neden bilinmemekle birlikte, yüzey kılıf oluşumun etkin bir rolü olduğu düşünülmektedir (31,71).

Dictyostelium'un yalancı plazmoidal aşamada ışıktan etkilendiği ve bunun kanıtı olarak ta ışık kaynağına doğru göç ettiği bilinmektedir (8,78). Işığa karşı duyarlılık gösteren bütün sistemlerde dış kaynaklı ışık, duyarlılık cevabını oluşturacak biokimyasal bir süreci harekete geçirir. Bu süreci açıklamaya yönelik çalışmalarda, etkin fotopigment'in (fototaksin) % 90 saflaştırılarak izole edilmesi başarılmıştır (79). Işık etkisiyle fototaksin reversibl bir fotooksidasyona uğramaktadır. Okside olan fototaksin yalancı plazmodyumun hareketine neden olacak reaksiyonu başlatması gerekir. Molekülün mitokondiriyel yapıda lokalizasyonu, ışık uyarımında bu organeldeki bazı biokimyasal süreçlerin etkilendiğini düşündürmektedir (71). Fakat tüm proses

detaylarıyla birlikte henüz aydınlatılamamıştır.

Isı gradiyentinin söz konusu olduğu bir ortamda yalancı plazmodyumun daha ılık bölgelere göç ettiği de gözlemlenmiştir (12). Tek tek hücrelerin ısı gradiyentinde herhangi bir yönlenme ve göç etme eğiliminde olmadıkları göz önüne alınırsa yalancı plazmoidal aşamadaki bu hassasiyetin yüzey kılıfın birleştirici ve yönlendirici özelliklerinden kaynaklandığı varsayımı ortaya çıkar (12,71).

#### 5- En Yüksek Tepe Noktaya Ulaşma Aşaması

Yalancı plazmoidal aşamanın sonunda kütlenin üst ucundaki hücreler yükselmeye başlarlar ve bir dizi farklılaşma sonucu meyvalı gövdenin oluşumu tamamlanır (71). En yüksek tepe noktaya ulaşma aşamasına geçiş koşulları henüz tam anlamıyla anlaşılammış olmakla birlikte, göç etme olasılığını ortadan kaldıran bir takım süreçlerin bu aşamada yer aldıkları açıktır. Düşük nem oranı, yüksek ısı ve ışık bu aşamaya geçişi hızlandıran etkenlerin en belli başlılarıdır (76).

##### a) Sap Oluşumu:

En yüksek tepe noktaya ulaşma aşaması başlarken ana kütle ile ucun yükselmeye başladığı boyun bölgesinde selüloz içeren bir halka oluşur (84). Gerek küçük gerekse büyük hacimli yalancı plazmodyumlarda oluşan bu halka, boyun bölgesindeki periferik hücreler tarafından üretilir. Varsayıldığına göre hücrelerin yüzey kılıfla temasta olmaları selüloz yayınlanması için gerekli ön koşuldur (36, 46). Boyun bölgesinde oluşan selüloz yapıli halka

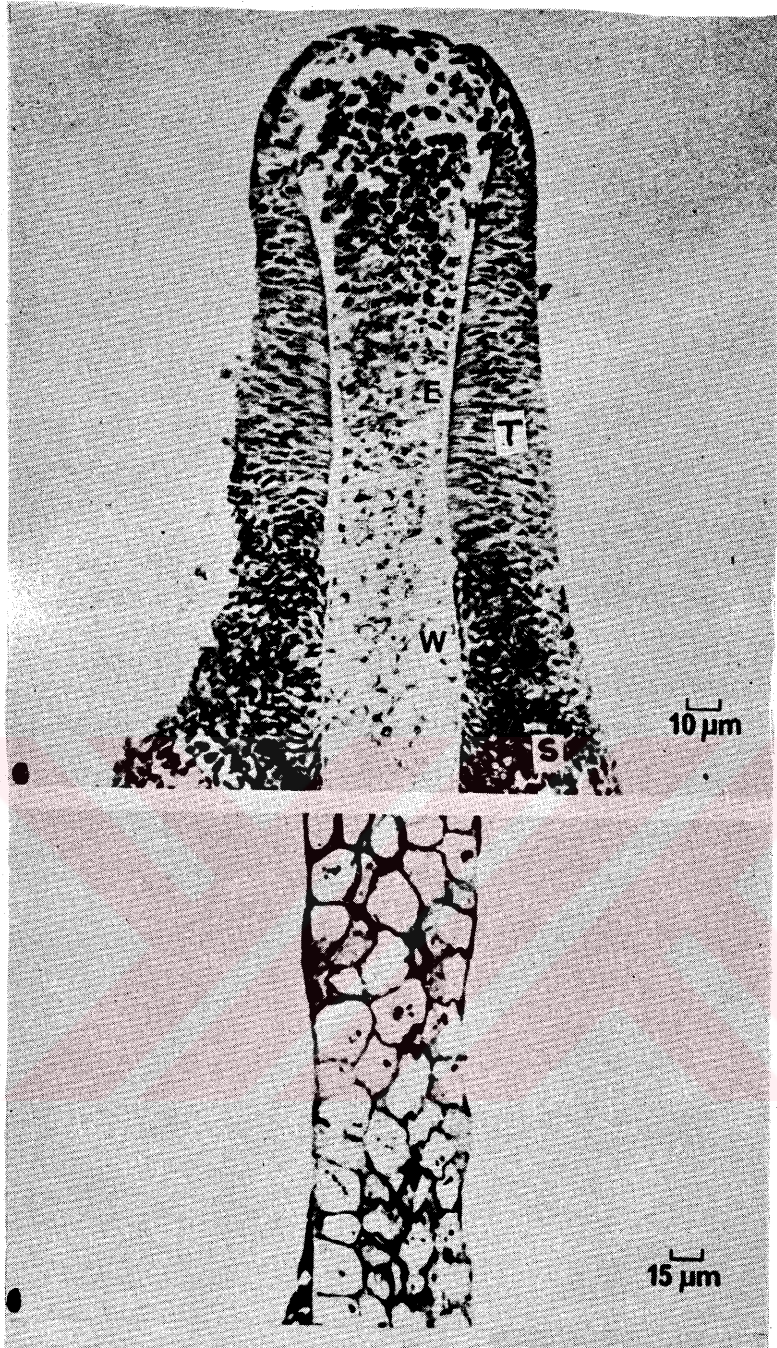
giderek uzar ve tüm kütleyi kapsayacak tubuler bir tabaka oluşturur. Oluşan sap kılıfının içine yerleşen hücreler vakuolize olurlar ve hacimleri 3-4 kat artar. Hücre-hücre adezyonu hücrelerin bir kısmını yükselen saptan aşağıya doğru iterken bir kısım hücreler de sapın orta kısmı etrafında içbükey bir yüzey oluştururlar (71).

Uzayan sap, hücrelerin üzerinde yükseldikleri zemine ulaştığında bu yöndeki gelişme sınırlanmış olur. Sap ile zemin arasında bir destek oluşturmak üzere az sayıda hücre temas yüzeyinde birikir. Sapın yukarıya doğru uzaması devam ederken yukarı uçtaki hücreler sap kanalı içine yerleşip vakuolize olurlar ve yan duvarları oluşturmak üzere selüloz yayınlarlar (Şekil.7) (109). Bu aşamada oluşan sapın temel yapı maddesi selülozdur. Dayanıklılığı sağlayan iç matriksteki selüloz duvarları da sap içine dahil olan hücreler oluştururlar.

#### b) Sporların Oluşumu:

Spor hücrelerinin keseciklenmesi, yükselen hücre kütlelerinin ucunda başlar (84). Kalın hücre duvarlı sporların oluşması bir seri sitolojik değişiklikler sonucudur. Sapın yapısına girmemiş olan bütün hücrelerin keseciklenmesi tamamlandığında en yüksek tepe noktasına ulaşma aşaması da sonlanmış olur.

Sporları çevreleyen duvarlar protein ve selüloz içeren çok tabakalı bir yapıya sahiptirler. Spor duvarlarının "Spor öncesi vesiküller" denilen organelerden oluştuğu ileri sürülmektedir (73). Yapılan incelemelerde bu vesiküllerin yalancı plazmodyumun uç kısmındaki hücrelerinde bulunduğu saptanmıştır. Varsayıldığına göre bu kalın duvarlı vesiküller, spor hücrelerinin plazma zarı ile füzyona uğramakta ve kendi içeriklerini spor keseciklerinin dış duvarlarına aktarmaktadırlar (47,73).



Şekil.7.- Üst karede hücrelerin sap içine girişleri görülmektedir. Uçtaki hücreler (T) çok sıkışık olarak bir arada bulunmaktadırlar. Sporları oluşturacak hücrelerin (S) aralarında daha fazla boşluk vardır. Oluşmakta olan sapın borucuk kanalına giren hücreler (E) ise genişlemeye başlar ve vakuolize olarak selüloz duvarlar üzerine yerleşirler (W).

Alt resimde ise olgunlaşmış bir sapın kesiti görülmektedir. Hücreler daha katı bir konum almışlardır (71).

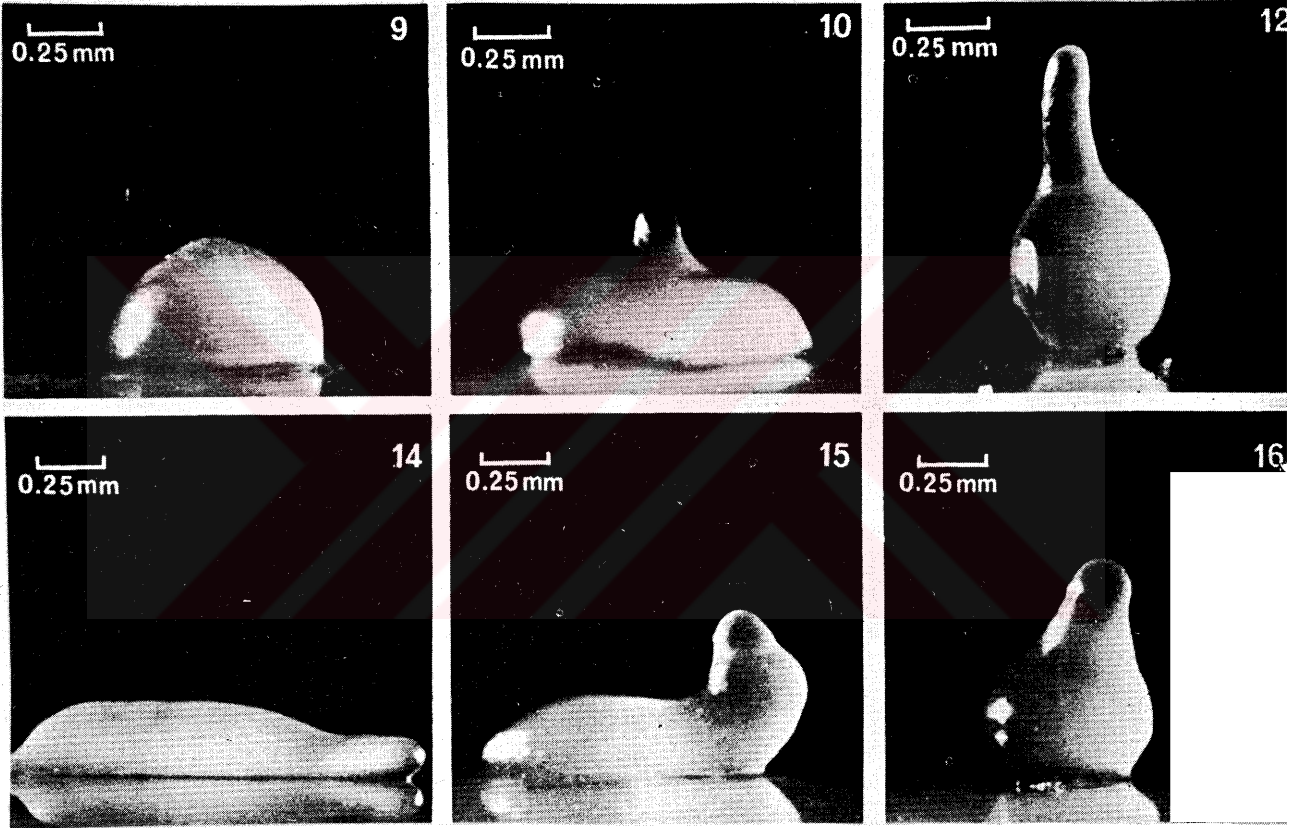
Farklılaşmanın sonuna doğru, spor öncesi vesiküllerin oluşmasından birkaç saat sonra, yuvarlak zarlarla çevrili, heterogen vesikül grupları meydana gelir. Spor öncesi vesiküllerle plazma zarının füzyonunu başlatan mekanizma henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte belirli bir miktar spor öncesi hücrenin keseciklenme için gerekli olduğu bilinmektedir (47).

c) Filizlenme :

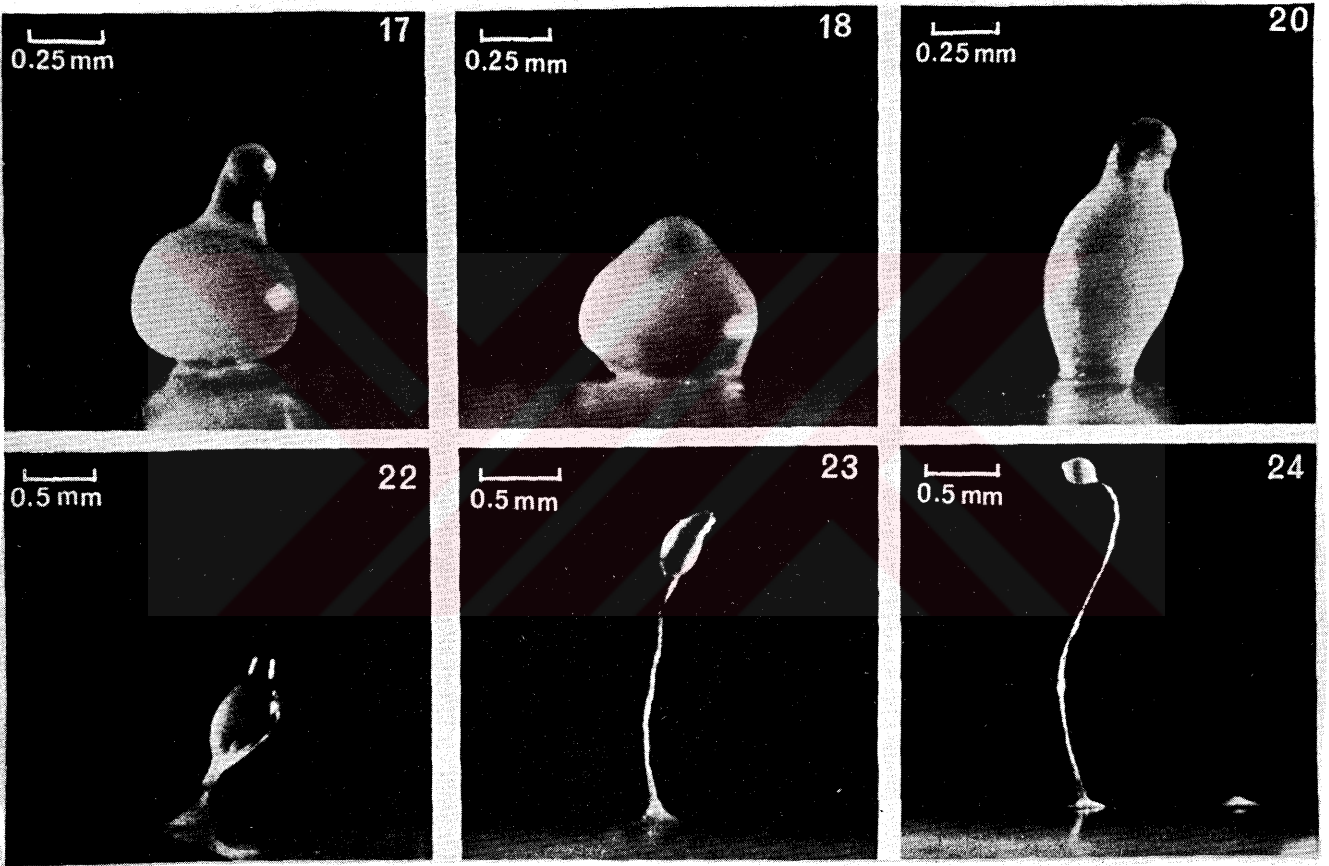
Keseciklenme tamamlandıktan sonra sporlar aylarca açlığa, susuzluğa ve canlı amiplerin dayanamayacağı sıcaklıklara (45°C'ye kadar) dayanıklılık gösterirler. Bunların yanı sıra sporlar, ultrasonik titreşimlere dayanıklıdırlar (68). Sporlar, kesecikler dağılıp içerikleri çevreye yayılincaya kadar uzun süre bir tür uyku haline benzer konumlarını devam ettirirler. Kesecikler içindeki bu uzun süreli kararlı halin korunmasını Filizlenme İnhibitörü denilen faktör sağlamaktadır (22). Gerek vejetatif aşamada, gerekse de farklılaşmanın filizlenme aşamasına gelinceye kadar hücreler bu inhibitörü yayınlamazlar.

Üzerinde spor kesesi bulunan meyvalı gövde rüzgârın, yağmurun veya fiziksel bir dokunuşun etkisiyle devrildiğinde sporlar etrafa saçılırlar ve böylece Filizlenme inhibitörü de etkinliğini yitirmiş olur. Bundan sonra bir dizi basamaklardan geçilerek sporların filizlenmesi tamamlanır (26). Filizlenme inhibitörünün etkisinden kurtularak aktive olan sporlar, yaklaşık bir saat sonra şişmeye başlarlar. Kısa bir süre sonra sitoplazmik granüller ortaya çıkar ve kontraktıl vakuoller fonksiyon görmeye başlarlar. Aktivasyondan yaklaşık dört saat sonra ana kesenin içinden çıkan küçük keseciklerde patlayarak etrafa yayılırlar. Böylece ameboid yaşantı tekrar başlar ve yaşam sürecinin vejetatif aşamasına geçilmiş olur.

Dictyostelium discoideum'un yaşam sürecinde vejetatif amiplerden başlayarak farklılaşma aşamaları ve tekrar vejetatif aşamaya geçiş özetlenmeye çalışıldı. Kümelenme aşamasını takibeden farklılaşma aşamaları Şekil 8 ve 9'da birbirlerini takibeder şekilde görülmektedir.



Şekil.8.- Solid bir zemin üzerinde açlığa terk edilen hücreler kümelenme aşamasını tamamladıktan sonra sol üst karede görüldüğü gibi yalancı plazmoidal aşamaya geçerler. Açlık başlangıcından bu aşamaya gelinceye kadar geçecek olan süre yaklaşık sekiz saattir. 12.saatte "ilk parmak oluşumu" gerçekleşmektedir. Resimde 9-16. saatler arasındaki aşamalar görülmektedir (71).



Şekil.9.- Farklılaşmanın, açılığa terkediliştten 17-24 saat sonraki aşamaları. 17.saatte "ikinci parmak oluşumu" gerçekleşir. 20-22. saatlerde başlayan sap oluşumu 24. saatte tamamlandığında spor kesesinin oluşumu da tamamlanır ve morfolojik değişmeler yeni bir filizlenme gerçekleşinceye kadar sona ermiş olur (71).

## 6- Genetik Açıdan Değerlendirme

Bakteri ve viruslarda metabolizma olaylarının kontrol mekanizmalarının açıklığa kavuşturulmasında genetik analizlerin temel bir rol oynadığı bilinen bir gerçektir (55). Benzer yaklaşımların farklılaşmaya uğrayan sistemlerde de uygulanması, bu sistemlerde programlanmış sentezlerin ve morfogenezin temel basamaklarının açıklığa kavuşturulması çalışmalarına ışık tutmaktadır. Böyle bir yaklaşımda bulunmak için model seçilecek organizmaların başında da *Dictyostelium discoideum* gelmektedir. Haploid oluşu, tek hücreli çoğalma fazını takiben çok hücreli bir farklılaşma aşamasının yer aldığı özgül bir yaşam süreci olması meseleyi daha ilginç kılmaktadır.

*Dictyostelium discoideum*'un genetik analizlerinin gerçekleştirilmesinden sonra ortaya konulan çeşitli yaklaşımlar, farklılaşma sürecini aydınlatma çalışmalarına ışık tutmuştur. Bu yaklaşımların birisinde çok sayıda farklı morfolojik değişimler gösteren mutantların izolasyonu amaçlanmıştır (111). Böylece farklılaşma sürecinde etkin rol oynayan değişkenlerin saptanması ve süreç içerisindeki değişik basamaklar arası ilişkilerin ortaya konması mümkün olmuştur. Yapılan gözlemlerde, devamlı olarak yinelendiği görülen bir nokta, kümelenme yetisini kaybetmiş mutantlarda spor kesesi ve sap oluşturabilme olanağının ortadan kalkmış olmasıdır. Daha açık bir deyişle çok hücreli kümelerin oluşmasında yer alan bazı süreçler, hücrelerin daha ilerideki farklılaşma aşamalarını gerçekleştirebilmelerinde etkin bir rol oynamaktadırlar.

### a) Paraseksüalite:

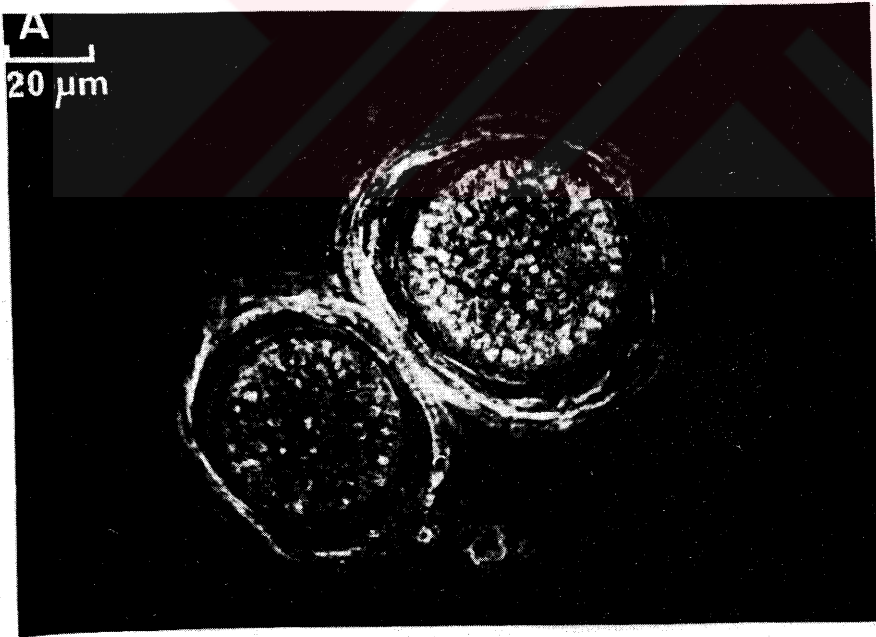
D. *discoideum*un normal yaşam sürecinde zorunlu bir seksüel faz yoktur. Hemen hemen bütün haploid hücreler küme haline geçebilir ve morfogenez esna-

sında haploid sporeler üretebilirler. Ara sıra bazı hücrelerin bir diğeri yuttuğu görülmüştür (53). Uygulanan sitolojik yöntemlerle asimile edilmiş nükleusun akibetinin ne olduğu anlaşılammıştır. Olasılıklar ya parçalanacağını, ya da karyogamiye uğrayarak diploid bir hücre ortaya çıkacağını göstermektedir. Sussman ve Sussman'ın çalışmalarında karışık iki popülasyondan hareket edilerek diploid bir serinin elde edilmesi mümkün olmuştur (104).

b) Seksüalite :

NC-4 serisinin seksüel çiftleşme yapabilen bir tipine bugüne kadar rastlanmamış olmasına rağmen, değişik yörelerden izole edilmiş serilerle bir araya getirilip karıştırıldığında, çiftleşme benzeri bir reaksiyonla Makrosist denilen oluşumların meydana geldiği görülmüştür (23, 30). Bu oluşum şekil 10. da görülmektedir.

NC-4 ve V-12 serilerinin hücreleri, besi maddelerinin bulunmadığı bir ortamda karıştırılarak bir arada bekletilirse küre biçiminde kümecikler oluştururlar ve bu kümeciklerin içinde de makrosistler oluşur. Bu oluşum yaklaşık olarak 100 hücreyi içerir ve çift katlı bir zarla çevrilidir. Oluşumun ortasında dev bir hücrenin geliştiği ve bu dev hücrenin geriye kalanları yuttuktan sonra kararlı bir uyku devresine girdiği gözlenmiştir (29,30). Bir hafta veya biraz daha fazla bir süre sonra dev hücrenin bölünmeye başlayarak bir endosit popülasyonu oluşturduğu görürükür. Bu güne kadar elde edilen kanıtlara göre, çiftleşmenin makrosistler içinde olduğu ve endositlerin de meiotik bölünmenin ardından oluşan mitotik bölünmelerin ürünü olduğu bilinmektedir (29,30).



Şekil.10.- *D. discoideum*'un makrosist yapısı. Farklı serilerin hücreleri karıştırılarak bir araya getirildiklerinde küresel kümecikler oluştururlar. Bunların çapı 100 μm kadardır (71).

### 7- Hücrelerin Korunması

Özgül mutant serilerle fizyolojik süreçlerin analizi ve detaylı genetik haritaların çıkarılabilmesi, yüzlerce seri iyi karakterize edilebilmiş hücrelerin sağlıklı korunmasına bağlıdır. Farklılaşma yeteneğini yitirmemiş serilerin sporları dondurulup kurutularak veya vakum altında uzun süre saklanılabilir (71). Daha kısa süreli saklamalar için sporlar silikajel üzerinde korunulabilir. Sporların bozulmadan saklanmaları için bir başka yöntemde % 10 luk dimetil sulfoksit içerisinde  $-70^{\circ}\text{C}$  de bekletmektir. Bu yöntemde kümelenme yeteneğini yitirmiş serilerin hücreleri bir yıla yakın süre rahatlıkla korunabilir (56).

### 8- Farklılaşmanın Makromoleküler İncelenmesi

*Dictyostelium discoideum*'un farklılaşma aşamasına geçebilmesi için dış kaynaklı besinlerden uzak kalması gerektiğini biliyoruz. Farklılaşma aşamasındaki tüm aktiviteyi sağlayan ve makromoleküler sentezler için gerekli temel maddeler ve enerji, endojen kaynaklardan karşılanmaktadır. O nedenle *Dictyostelium*'un farklılaşma aşamasında kuru ağırlığı % 50 oranında azalır (50). Bakteri üzerinde çoğalan amiplerin kuru ağırlığı  $10^8$  hücre/8 mg'a karşı gelmekte iken, farklılaşma aşamasında  $10^8$  hücre/4 mg değerine düşer (108).

Farklılaşma aşamasında oksijen tüketiminde de bir azalma görülür (67). Oksijen tüketimi durgun aşamaya girmiş sporlarda önemsenmeyecek kadar azdır, filizlenmeye bağlı olarak artar.

Besi ortamında çoğalmaya terkedilen hücrelerin içerdikleri protein miktarının kayda değer nitelikte farklılıklar gösterdiği bilinmektedir.  $10^8$  hücreye karşı gelmek üzere 2 ile 5 mg protein arasında değişen değerler bulunmuştur (108).

Bu değerler farklılaşma sürecinde düzgün azalan değerler şeklinde 2 mg'a düşer, ki bu da yaklaşık olarak kuru ağırlığın % 50 sini oluşturur (50). Farklılaşma sonucunda ortaya çıkan kuru ağırlık azalması protein miktarındaki azalma ile paralellik göstermektedir (35). Farklılaşma aşamasında toplam protein içeriğinin azalmasının yanı sıra yeni protein sentezlerinin de devam ettiği unutulmamalıdır (71,106).

Besi ortamında çoğalan hücreler  $10^8$  hücreye karşı gelmek üzere 500 µg karbonhidrat içerirler (108). Toplam karbonhidrat miktarı farklılaşma aşamasında hemen hemen değişmeden kalır. Meyvalı gövdenin oluşum sürecinde glikojen miktarı yarıya düşer (71). Bunun nedeni büyük bir olasılıkla glikojenin diğer yapı elemanı polisakkaritlere dönüşmesidir. Selüloz, vejetatif hücrelerde eser miktarda bulunmasına karşılık Meyvalı Gövde oluşumunun kuru ağırlık üzerinden % 4'ünü oluşturmaktadır (71,102).

*Dictyostelium discoideum*, eukaryotik organizmalar içinde en düşük DNA içeriğine sahiptir. Bakteri içeren besi ortamında çoğalan hücreler 0.36 pg DNA/hücre içerirler (2). Bu miktarın bir kısmı bakteriyel kaynaklı olabilir. Bir karşılaştırma yapabilmek için insanda hücre başına 6 pg DNA bulunduğunu hatırlamamız yeterli (107). Farklılaşmanın ilk birkaç saati içerisinde DNA miktarında % 16'lık bir azalma olduğu saptanmıştır. Leach ve Ashworth bu azalmanın besin vakuollerinde birikmiş olan bakteriyel kaynaklı DNA'nın degradasyonundan ileri geldiğini kanıtlamışlardır (63). Farklılaşmanın diğer aşamalarında DNA miktarında bir değişim gözlenememiştir (71).

Çoğalmakta olan amiplerin  $10^8$  hücresinde yaklaşık olarak 1 mg RNA bulunur. Farklılaşma sürecinde bu değer yaklaşık 0.4 mg'a düşer (108).

Farklılaşmanın herhangi bir aşamasındaki protein sentezlerinin niteliği, kısmen o aşamada mevcut olan mRNA moleküllerinin niteliğine bağlıdır. Farklılaşma sürecinde, değişik aşamalarda farklı protein molekülleri sentezlendiğinden her aşamada kendine özgü mRNA moleküllerinin üretildiği varsayılmaktadır. Bu varsayımın tek alternatifi, önceden sentezlenmiş mRNA karışımından belirli miktarların belirli aşamalarda translasyona uğraması olasılığıdır ki, bugüne kadar *D. discoideum* da transkripsiyon sonrası böyle bir kontrol mekanizmasının var olduğu henüz kanıtlanamamıştır (71).

#### 9- Farklılaşmanın Enzimatik Açından Değerlendirilmesi

Farklılaşmanın değişik aşamalarında sentezlenen proteinlerin bir çoğu, spesifik reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Vejetatif hücrelerde varlığı saptanan enzimlerin bir kısmı, farklılaşmanın başlamasından kısa bir süre sonra kaybolurlar (48,71). *D. discoideum*'un yaşam sürecinde amino asit metabolizması dramatik değişikliklere uğrar (80,81). Çoğalma sürecinde biosentezler için amino asit gereksinimi fazla olduğu halde farklılaşma aşamasında sadece temel enerji kaynağı gereksinimi karşılanmış olur. Bu dramatik değişikliklere örnek olarak farklılaşma sürecinde Tironin deaminaz-I enziminin çok süratli bir biçimde kaybolması gösterilebilir (81).

$\beta$ -glukosidaz-I enzimi, bakteriyel bozunmaya yardımcı olan lizozomal bir enzimdir (25). Bu enzim farklılaşma aşamasında önemli bir rol oynamaz. Çoğalma sürecinde sentezlenir, farklılaşma aşamasında sentezi durur. Spesifik aktivitesi de farklılaşmanın dördüncü saatından sonra süratli bir düşüş gösterir. Farklılaşma sürecinde ortaya çıkan  $\beta$ -glukosidaz-II enzimi ise kümelenme aşamasının sonuna doğru artmaya başlar ve sporlarda en yüksek düzeyine ulaşır (25). Çalış-

mamızda incelediğimiz  $\beta$ -glukosidaz enzimi, farklılaşma sürecinde ortaya çıkan ikinci enzimdir.

Enzimlerin bir kısmı hem çoğalma hem de farklılaşma aşamalarında sentezlenirler. cAMP'nin sentezinden sorumlu Adenilat Siklaz enziminin her iki aşamada da, az veya çok fonksiyon gördüğü saptanmıştır (95). Vejetatif hücrelerde, fosfolipid yıkımına sebep olan Fosfolipaz A ve Lizofosfolipaz enzimlerinin çok yüksek düzeyde buldukları saptanmıştır. Aynı enzimler farklılaşma sürecinde de yüksek aktivite göstermektedirler (32).

Farklılaşmanın değerlendirilmesi açısından önemli ölçütlerden birisi de aşamalara özgü enzimlerin değerlendirilmesidir. Bu enzimler biokimyasal süreçlerin açıklığa kavuşturulma çabalarında anahtar moleküller olarak izlenilebilir. *D. discoideum* yaşam sürecinde çok önemli bir rol oynayan cAMP molekülünün inaktivasyonunu sağlayan fosfodiesteraz enzimi vejetatif çoğalma sürecinde çok yüksek değerlere ulaşırken farklılaşmanın başlamasıyla birlikte dramatik bir düşüş kaydeder. Bu düşüşün nedeni, spesifik bir enzim inhibitörünün sentezlenmesidir (71, 74). O nedenle farklılaşma aşamasındaki enzimatik değişikliklerin karmaşık yapıya basit süreçlerle açıklamak oldukça güçtür. Sabırlı ve çok yönlü çalışmaları gerektirmektedir.

Dış etkenlerin enzimatik değişiklikler üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesinde temel ölçüt, söz konusu etkinin enzim sentezini arttırıcı yönde mi yoksa yıkımını azaltıcı yönde mi olduğunun saptanmasıdır. Enzim sentezini arttırıcı yönde bir etkinin gerçekleşmesi için de novo protein sentezlenmesi gerekmektedir. De novo protein sentezi bazı inhibitörlerle durdurulunca elde edilen sonuçlar, dış etkenin enzim düzeyleri üzerine ne yönde etki yaptığını saptamaya

olanak sağlayacaktır. Sikloheksimid translasyon düzeyinde protein sentezlerini inhibe eden bir antibiyotiktir (65). Ortama eklendiğinde de novo protein sentezlerini kısa bir süre içerisinde inhibe edebilmektedir. Dış etkenin transkripsiyon düzeyinde bir etki yaratıp yaratmadığının saptanması için de Aktinomisin-D kullanılabilir. Aktinomisin-D mRNA sentezini engelleyen bir transkripsiyon inhibitörüdür (64).

Sözünü ettiğimiz protein sentezi inhibitörleri yardımcılığı ile farklılaşma sürecindeki enzimatik değişmelerin mekanizmasının açıklanmasına yönelik çalışmalar yapmak mümkündür.

10- Amaç:

*Dictyostelium discoideum* üzerinde günümüze kadar yapılan çalışmalarda steroid yapılı bileşiklerin yapısal eleman olarak bulunup bulunmadığı incelenmiş ve bir kısmının varlığı kanıtlanmıştır (44,57). Fakat yüksek yapılı organizmalarda hormonal görev yapan steroidler açısından yeterli bir değerlendirme ve inceleme yapılmamış ve çok az sayıdaki çalışmada ise bazı steroid bileşiklerini belirli dozları kullanılarak hem çoğalma hem de farklılaşma süreçlerinde inhibitör etkilerinin söz konusu olduğu belirtilmiştir (15,59,110).

Genel olarak prokaryotların sterol sentezlemedikleri varsayımı uzun yıllar kabul edilmiş, (66) fakat ileriki yıllarda mavi-yeşil alglerle ve bazı bakterilerle yapılan çalışmalarda kolesterol ve çeşitli türevlerinin var olduğu saptanmıştır (5,28,85). Prokaryotlardan daha üst evrim basamağında bulunan *D.discoideum*' ise ana sterol bileşiğinin stigmast-22-en-3 $\beta$ -ol olduğu bilinmektedir (51). Fakat organizmada diğer steroid bileşiklerinin sentezinin yapıp yapılmadığı veya steroid hormonların organizmanın çeşitli metabolik süreçleri üzerinde ne yönde etkide oldukları moleküler düzeyde henüz açıklığa kavuşturulmamış ve üzerinde düşünülmesi gereken önemli noktalardır.

*D.discoideum*'da yapısal komponent olma dışında hormonal etkinlik taşıyan steroidlerin bulunup bulunmadığı yönünde yaptığım öncül deney sonuçlarının tatmin edici olmaması ve olanakların sınırlı oluşu nedeniyle prekürsörler vererek direkt steroid biosentezleri incelenememiştir. Bu nedenle çalışmaların ağırlığının dışarı kaynaklı steroidal etkinin incelenmesi ve bu etkiler üzerine çeşitli ilâçların yaratacağı değişimlerin değerlendirilmesi yönünde olması amaçlanmıştır.

Steroid bileşiklerinin *D. discoideum*'un farklılaşma süreci üzerinde kesin bir inhibisyon etkisi yarattığı çeşitli çalışmacılar tarafından gösterilmiştir (15,59,110). Fakat söz konusu bulgular dikkatlice incelendiğinde kullanılmış olan dozların yüksek konsantrasyonlarda oluşu dikkati çekmekte ve meydana gelmesi olası toksik etki nedeniyle de farklılaşmanın inhibe olacağı akla gelmektedir. Öncül çalışmalardan elde ettiğim bulgular uygun konsantrasyonlardaki bazı steroid bileşiklerinin farklılaşma sürecini uyardığını göstermiştir. Bugüne kadar bilinenlerin ötesinde elde ettiğim bu uyarımın açıklığa kavuşturulabilmesi amacıyla yönelik çalışmalar şu şekilde plânlanmıştır. İlk grup çalışmalarda çeşitli konsantrasyonlardaki steroid bileşiklerinin *Dictyostelium discoideum*'un yaşam süreci üzerine etkileri morfolojik değişmeler açısından incelenecektir. İkinci grupta ise steroid bileşiklerinin etkisi biokimyasal açıdan incelenecek ve meydana gelmesi olası değişmeler üzerine bazı ilâçların etkileri araştırılacaktır.

## II - G E R E Ç ve Y Ö N T E M L E R

### A- Gereçler:

#### 1) Çalışma Materyali:

Deneylerde *Dictyostelium discoideum*'un AX-3<sup>(x)</sup> nesli kullanılmıştır.

#### 2) Kimyasal Maddeler:

Proteoz pepton, Bacto pepton, Bacto agar, Maya ekstresi (Difco), Non-iyonik deterjan Cemusol NPT-12 (Rhone-Poulenc), MES [2-(N-morfolino) etan sulfonik asid, monohidrat] , p-nitrofenil fosfat substratı, p-nitrofenil- $\beta$ -d-glukopiranozid, östriol, östradiol , östriol-3-sulfat, östron-3-sulfat,  $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion, Aldosteron, Kortizon, Testosteron, Progesteron, 5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ , 20 $\alpha$  triol, 5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$  , 20  $\alpha$ -diol, sikloheksimid, aktinomisin-D, streptomisin (Sigma Chem. Comp.). Kullanılan diğer kimyasal maddeler laboratuvar saflığında olup Merck firmasından temin edilmiştir.

#### 3) Aygıtlar:

Çalkalayıcı inkübatör (Scientific Products), Soğutmali santrifüj (Sorvall), Fraksiyon toplayıcısı (LKB 7000 Ultra rac), Peristaltik pompa (Pharmacia), UV-Visible Spektrofotometre (Pye Unicam) ve diğer laboratuvar aygıtları kullanılmıştır.

---

(x) *Dictyostelium discoideum* AX-3 türü Dr.D. Soll'un hediyesidir.  
University of Iowa.

B- Yöntemler:1) Dictyostelium discoideum'un Vejetatif Çoğalması

Çalışmanın tümünde AX-3 nesli Dictyostelium discoideum kullanıldı. Vejetatif AX-3 nesli amiplerin çoğalması için kültür ortamı olarak HL-5 hazırlanmıştır (105).

HL-5

5,0 g	Difco maya ekstraktı,	
10,0 g	Difco proteoz pepton,	
10,0 g	Glukoz	(önceden sterilize edilmiş)
2,05 g	MgSO <sub>4</sub> .7HO	"
1,9 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	"
0,6 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	"

Yukarıdaki çözelti distile su ile hazırlanarak 1 lt.ye tamamlandı. pH 6.4'e 5M NaOH ile ayarlandı. Erlenlere konularak 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Karamelizasyonu önlemek için süre sonunda hemen otoklavdan çıkarıldı. Çözeltiler hazırlanırken daima aynı seri difco ürünleri kullanıldı.

Kültür ortamında en uygun havalandırmayı sağlamak amacıyla HL-5 çözeltileri erlenlere aşağıdaki miktarlarda konuldu (56).

<u>Erlen kapasitesi:</u>	<u>HL-5 Hacmi:</u>
125 ml	35 ml
250 ml	80 ml
500 ml	140 ml
1 litre	340 ml
2 litre	800 ml
6 litre	1040 ml

HL-5 otoklavda sterilize edilip oda ısısına soğutulduktan sonra, yukarıda belirtilen hacımlarda erlenlere konulması, steril odada yapıldı. Vejetatif çoğalma ortamında bakteriyel kontaminasyonun önlenilmesine dikkat edildi.

Steril koşullarda bir Pastör pipetinin ucuyla toplanılan 3-4 spor keseciği HL-5 içeren erlene konuldu. Çoğalmaya terkedilecek kültür 130-150 rpm'e ayarlanmış bir çalkalayıcı inkübatöre yerleştirildi. Ortam temperaturünün 22<sup>o</sup> C olması sağlandı. Devir sayısı erlen büyüklüğüne göre ayarlandı. Hücre çoğalması, rutin olarak hemasitometre'de sayım yapılarak kontrol edildi.

Vejetatif çoğalmanın karakteri  $2-4 \times 10^6$  hücre/ml ile  $2 \times 10^7$  hücre/ml arasında logaritrik olmasıdır.  $2 \times 10^7$  hücre/ml'den sonra stasyonere girer ki bu sınırdan sonra bölünme zamanına göre çoğalma oranı çok çok azalır (98). Bu sınıra ulaşıldıktan sonra gerekli seyreltmeler yapılarak tekrar  $2 \times 10^6$  hücre/ml düzeyine inilir ve böylece logaritmik fazda çoğalma tekrar sağlanmış olur.

## 2) Hücre Farklılaşması:

Dictyostelium discoideum hücreleri besi ortamından ayrılıp katı bir zemin üzerinde açlığa terkedildiği zaman, meydana gelen morfolojik değişmeler, bize hücrelerin normal yaşam süreçlerini devam ettirip ettirmediklerini gösteren en sağlıklı ölçüttür.

HL-5 ortamında vejetatif çoğalmaya devam eden hücrelerin deney için gereken miktarı inkübatörden alınıp + 4°C de çevrilerek çöktürüldü. Çevirme işlemi Sorvall santrifüjünün GSA veya GS-3 başlığı kullanılarak 2000 rpm'de 5 dakikada tamamlandı. Üst faz atılarak hücreler 2 defa soğuk M-tamponu ile yıkandı.

### M- tamponu

10 mM KCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren çözelti NaOH çözeltisi ile pH 6.0'ya

ayarlandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra hücreler taze M-tamponuna alındı. İşlem tamamlanıncaya kadar hücreler buz üzerinde korundu. 15 dakikadan fazla buz üzerinde tutulması ve tüm işlemin tamamlanması için 45 dakikadan fazla zaman harcaması, hücrelerin zarar görmesine neden olduğu için bu sınırlamalara dikkatle uyuldu. Ayrıca zaman kazanılması açısından, Petri kutuları önceden hazırlandı ve işaretlendi. Kutu başına 3 ml M-tamponunda çözülmüş,  $1 \times 10^7$  hücre konuldu.

Yukarıdaki işlemler tamamlandıktan sonra Falcon petri kutuları çalkalama ve sert darbelerden sakınılarak karanlık ve 22°C'lik bir ortamda bekleme-ye bırakıldı(16). İleriki saatlerde de farklılaşma mikroskop altında incelendi.

M-Tamponu kutuları, kutulara hücrelerin yayılmasından itibaren kümelenmenin bitim zamanı olan 12. saate kadar, saat başlarına rastlamak üzere 8 kez mikroskop altında incelenmiştir.

Bir grup örnek hiçbir ekleme yapılmadan farklılaşmaya terkedildi. Bunlar deneyimizin kontrol grubunu oluşturdu. Diğer gruplarda da etkileri incelenecek steroid hormonlar, hücre süspansiyonu Falcon petri kutularına yayılmadan önce süspansiyona ilâve edildi.

Steroid hormonların sudaki çözünürlüklerinin çok zayıf olması nedeniyle standard çözeltilerin hepsi alkolde hazırlanmış ve sonuç alkol konsantrasyonları % 1 olacak şekilde uygun tamponlarla kademeli olarak seyreltilmiştir. % 1'lik alkol konsantrasyonunun, kontrol örnekleriyle yaptığımız karşılaştırmada ve diğer çalışmalarda (15,59), deney sonuçlarını etkilemediği görülmüştür. Hormonlar  $10^{-4}$  M ile  $10^{-9}$  M konsantrasyon aralığında olmak üzere 1/10 oranında seyreltilerek 6 ayrı konsantrasyonda hazırlandı. Her hormon konsantrasyonu ikili örneklerle çalışıldı ve bu şekilde hazırlanmış deney serileri üç kez tekrarlandı.

### 3) Hücrelerin Saklanması :

*Dictyostelium discoideum* besi ortamında vejetatif çoğalma ile sürekli olarak taşınabilmesine karşılık bu işlem hem pratik açıdan hem de eldeki neslin sağlamlılığını açısından fazla uzun süre devam ettirilmemelidir. Kültürler en fazla 3-4 hafta yaşlandıktan sonra, tekrar spor keseciklerinden başlamak en sıhhatli yoldur.

SM Agar (1 litre için)

10 g	Glukoz
10 g	Difco Bacto pepton
1 g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
2.2g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1 g	Difco maya ekstraktı
20 g	Difco Bacto agar

Yukarıdaki formüle göre agar hazırlanır. 15 dakika otoklavda bekletildikten sonra büyük petri kutularına uygun miktarlarda dökülür. Soğuduktan sonra oluşan homojen tabaka kısa süreli hücre saklanması için kullanılan zemindir.

Hücrelerin uzun süreli korunması için, spor kesecikleri liyofilize edilerek, silikajel üzerinde veya dondurularak saklanılabilir (86). Hücrelerin daha kısa süreli (2-5 ay) korunması ise SM Agar üzerinde Aerobakter aerojenler veya E.coli B/R mevcudiyetinde sağlanıldı. Çoğalmaya terk edilen bakterilerden bir gecelik inkübasyondan sonra 0.2 ml alındı, eşit oranda Dictyostelium discoideum hücreleri veya sporlarıyla karıştırılarak önceden hazırlanmış SM Agar içeren petri kutularına yayıldı. Bakteriyel tabaka üzerinde amiplerin bulunduğu yerlerde zamanla boşluklar açılır. Ortamdaki bakterileri yemeye devam eden amiplerin zamanla etrafları boşalacak, agar üzerinde açlığa terk edilmiş olacaklardır, böylece farklılaşma da başlamış olacaktır. Agar üzerinde herbiri yaklaşık  $5 \times 10^4$  spor içeren spor kesecikleri oluşur. Spor keseciklerinin oluşumu sağlanıncaya kadar hücrelerin yayıldığı agarlı

petri kutuları 22°C'de saklandı. Kutulardaki nemin kaybolarak sporların kurumasına neden olması olasılığı, kutu ağızlarının yapıştırıcı bantlarla çok sıkı kapatılmasıyla bertaraf edildi (10). Spor kesecikleri oluştuktan sonra petri kutuları buz dolabında saklandı. Yeni vejetatif inkübasyonlara başlanılacağı vakit petri kutuları buzdolabından alındı. Kutu içindeki nemin spor keselerine zarar vermemesine dikkat edilerek kutu ağzındaki izolasyon steril koşullar altında açıldı ve steril Pastör pipeti ile birkaç spor kesesi toplanılarak HL-5 besi ortamına eklendi. Spor kesecikleri toplanırken bakteriyel kontaminasyondan kesinlikle kaçınıldı.

#### 4) Çalkalanan Kültür Sistemi :

Açlığa terkedilecek hücreler vejetatif çoğalma ortamında  $4 \times 10^6$  hücre/ml yoğunluğunda iken çevrilerek çöktürüldü. Soğuk inkübasyon tamponu ile iki defa yıkandı. Her yıkamadan sonra üst faz atılır. Yıkamalardan sonra hücreler  $10^7$  hücre/ml yoğunluğunda inkübasyon ortamı olan MES [2-(N-morfolino) etan sulfonik asid, monohidrat] tamponunda süspande edildi. Kullanılan tampon MES;

1.5 g/l MES

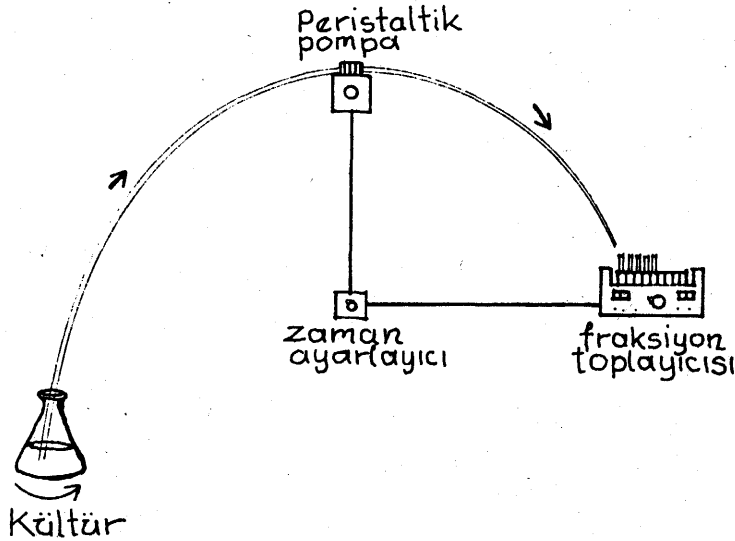
5 mM  $MgCl_2$  pH:6 bileşimindedir.

20 mM KCl

İncelenecek her koşul için 300 ml hücre süspansiyonu erlen başına hazırlandıktan sonra bütün örnekler 22°C deki çalkalayıcılı inkübatöre yerleştirildi. Hücrelerin HL-5 ortamından alınarak inkübatöre yerleştirilmesine kadar geçen hazırlık süresinin minimuma indirilmesi gereklidir. Bu süre kesinlikle 45 dakikayı aşmamalıdır. İnkübatörlere yerleştirilen hücre süspansiyonlarının Fraksiyon Toplayıcısı ile olan bağlantıları sağlandıktan sonra hücrelerin fazla ışığa maruz kalmamaları için gereken önlem alındı. Bağlantılar sağlanırken sterili-

teye dikkat edildi. Bakteriyel kontaminasyonu önlemek için ortalama 100 µg/ml Streptomisin ilâve edildi (87). Deney süresi içerisinde 3-4 kez hücre süspansiyonlarından örnekler alınarak bakteriyel kontaminasyonun kontrolü yapıldı.

Fraksiyon toplayıcısı için hazırlanan tüplerin hepsine toplanılacak örnek hacminin 1/10 u kadar % 4'lük Cemusol önceden konuldu. Cemusol iyonik olmayan bir deterjandır. Deney koşullarımız altında hücrelerin eritilmesi bu deterjan ile tam olarak sağlandı ve saptanan enzim aktivitelerinin dondurma-ısıtma tekniğiyle eritilen hücrelerdekiyle aynı olduğu görüldü. Fraksiyon toplayıcısının bağlantı tüplerindeki "ölu hacmi" bertaraf etmek için her zaman noktasında birbirini takip eden üç örnek toplandı ve üçüncü tüpler analizlendi. Deneylerde kullanılan düzenek şekil 11'de görülmektedir.



Şekil.11.- Çalkalanan kültürlerden fraksiyon toplayıcısı ile örnek toplanılan düzenek.

İnkübasyon ortamına eklenen steroidler sıfır başlangıç anında konuldu.

Aktinomisin-D (125 µg/ml) ve Sikloheksimid (350 µg/ml) gibi ilâçlarda etkilerini saptamak üzere 0 ve 15. saatlerde ilgili örneklere eklendi. Fraksiyon toplayıcısında toplanan örnekler enzim analizleri için buz dolabında +4°C'de saklandı.

İnkübasyon süresince, belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak M-Tamponlu petri kutularında hücrelerin kümelenebilme kapasiteleri ölçüldü. Alınan sonuçlar kontrollerle uygunluk gösterdi.

#### 5- Enzim Analiz Yöntemleri:

Fraksiyon toplayıcısı ile toplanan örnekler deney süresi sonuna kadar +4°C'de buzdolabında saklandı. Deney süresi sona erdikten sonra tüm örnekler vorteks karıştırıcıda iyice karıştırıldı. Enzim analizleri için tüplere 100'er µl örnek alındı. Örnekleri içeren tüpler 0°C buzlu su içeren küvetlere yerleştirildi. Reaksiyon karışımının da buzlu su soğukluğunda olması sağlandı. Her tüpe analizlenecek enzimin reaksiyon karışımından 400 µl eklendi. Bu işlem inkübasyon süresi kısa olan Alkali Fosfataz için 25 saniyelik aralarla yapıldı. Reaksiyon karışımı ilâve edilen her tüp çalkalanarak 25°C'lik su banyosunda inkübasyona terkedildi. İnkübasyon süresi Alkali Fosfataz için 25 dakikadır. Analiz Loomis'e göre yapılmıştır (69). β-Glukosidaz için ise inkübasyon süresi 2 saattir. Yine tüplere reaksiyon karışımı eklendikten sonra çalkalanarak 25 °C'lik su banyosunda inkübasyona terkedilir. Analiz Coston ve Loomis'e göre yapılmıştır (25). Bizim modifikasyonumuz ise inkübasyon temperaturünün

35°C yerine 25°C olmasıdır. Öncül deneylerimizde modifiye temperatürde daha sağlıklı sonuçlar alındığı görülmüştür.

İnkübasyon süreleri sonunda tüpler tekrar buzlu su üzerine alındıktan sonra 500 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ilâvesiyle reaksiyon durduruldu ve vortekslenerek spektrofotometrede okununcaya kadar buzlu su üzerinde saklandı. Oluşan sarı renkler 420 nm'de okundu. Her iki enzim için de hesaplama şu şekilde yapılır:

Bölüm Faktörü = 1.4 x inkübasyon süresi (dakika)

$$\frac{O.D_{420}}{B.F.} = n \text{ moles p-nitrofenil/dakika}/10^7 \text{ hücre}$$

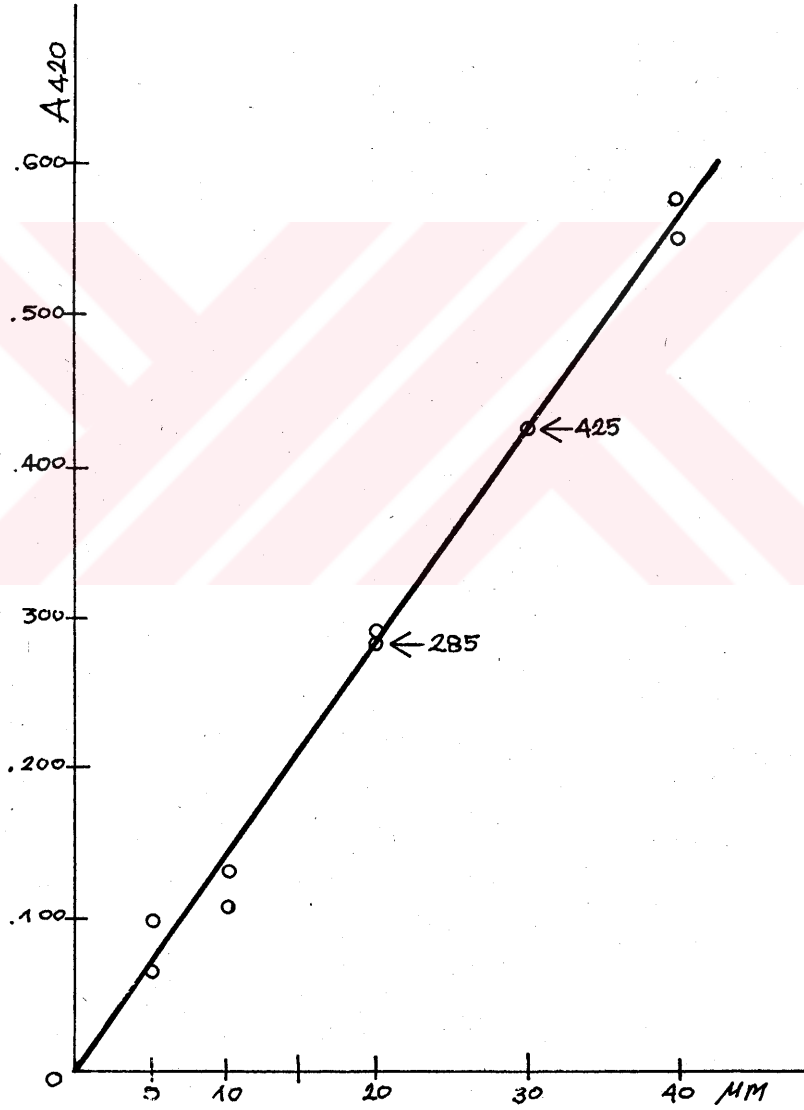
p-nitrofenil Fosfat substratı için hazırlanan OD/konsantrasyon grafiği şekil.12'de verilmiştir.

Standart hazırlanırken enzim analizlenmesinde söz konusu olacak sonuç 1 ml hacim esas alınmıştır. Ortamda enzimatik reaksiyonları durdurmak için kullanılan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> da mevcuttur.

Alkali Fosfataz için Reaksiyon karışımı:

(54 Örnek için)

270	µl	.....	1 M Tris. Tamponu
270	µl	.....	1 M MgCl <sub>2</sub>
100	mg	.....	p-nitrofenil fosfat substratı
21 000	µl	.....	H <sub>2</sub> O



Şekil.12: p-nitrofenil fosfat bileşiğinin standart olarak hazırlanmış OD/konsantrasyon grafiği.

$\beta$ -glukosidaz için reaksiyon karışımı:

(170 örnek için)

8.3	ml	.....	0.5 M Asetat Tamponu	pH = 5.0
58.1	ml	.....	H <sub>2</sub> O	
250	mg	.....	p-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid	

Bu çözeltiler enzim analizlerine başlamadan önce hazırlanarak buzdolabında saklandı. Taze hazırlanmaları gerekir.

Aktinomisın-D içeren örneklerde ilâcın sarı renginin yaratacağı komplikasyonu önlemek için deney standartlarına da örneklerin içerdiği konsantrasyonda ilâç ilâve edildi.

### III - B U L G U L A R

Dictyostelium discoideum'un yaşam süreci üzerine steroid hormonların etkilerinin incelendiği bu çalışmada bulgular iki temel grupta değerlendirilmiştir. Birinci grupta steroid hormonların vejetatif çoğalma süreci üzerine olan etkileri, ikinci grupta ise farklılaşma süreci üzerine olan etkileri ele alınmıştır.

#### 1- Vejetatif Çoğalma Süreci Üzerine Steroid Hormonların Etkileri.

Sporlardan itibaren vejetatif çoğalmaya terkedilmiş olan hücreler logaritmik olarak çoğalırken, yaklaşık  $2 \times 10^5$  hücre/ml yoğunluğuna ulaştıklarında ikili örnekler halinde deneye alındı. Çözeltide son konsantrasyonları  $10^{-5}M$  ve  $10^{-7}M$  olmak üzere steroid hormonlar örneklere ilâve edildi. Deneyin 1,10,26 ve 50. saatlerinde hücre sayımları yapıldığında kontrole oranla testosteronun ve progesteronun hücre çoğalması üzerine inhibitör etkileri gözlemlendi (Tablo.1.).

$10^{-5}M$  Testosteron ve Progesteron şekil 13 ve 14'de görüldüğü gibi deneyin 50. saatinde hücre çoğalmasını kontrole oranla % 80 ve % 63 inhibe etti.  $10^{-7}M$  gibi daha düşük testosteron ve progesteron konsantrasyonlarının doza bağımlı olarak hücre çoğalmasını daha az oranda inhibe ettikleri görüldü (Şekil.13 ve 14.).

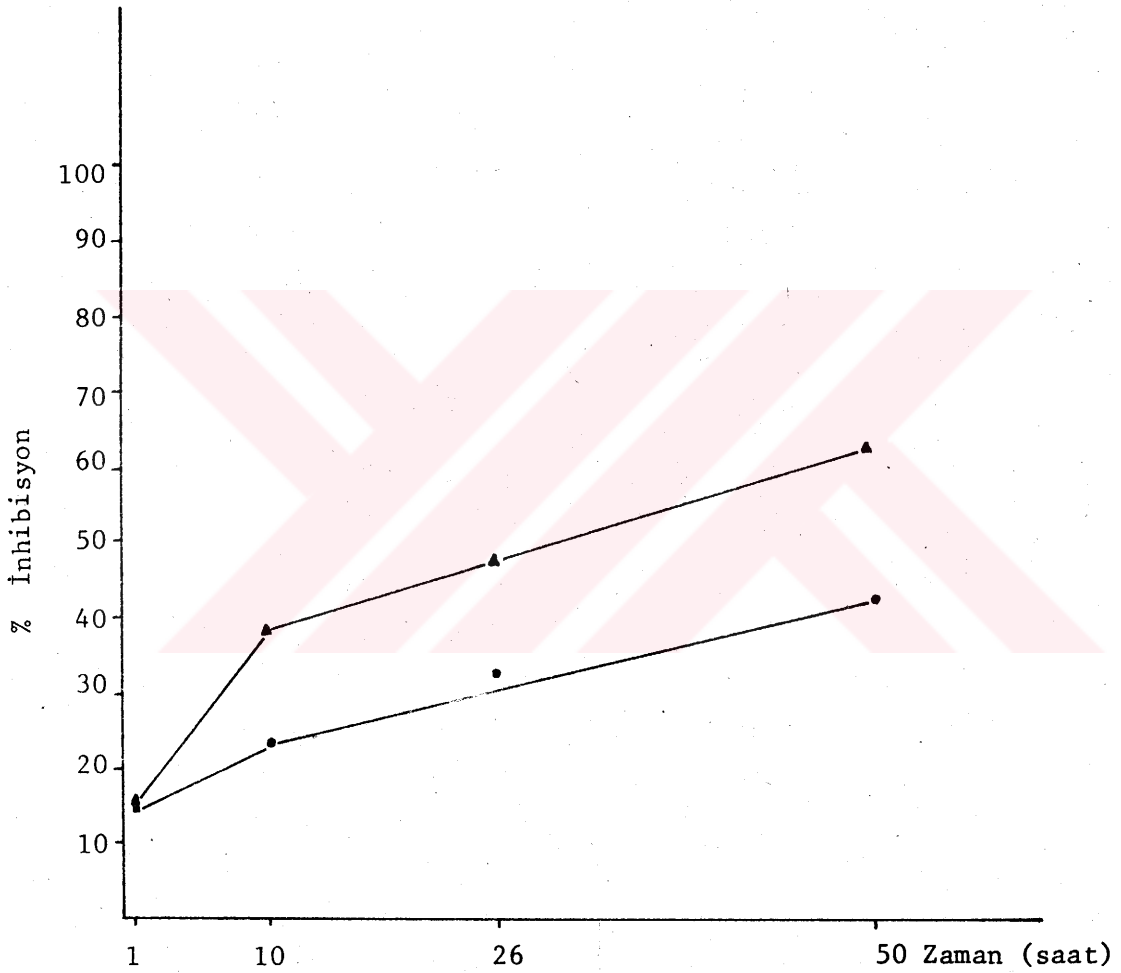
TABLO 1.

ÇEŞİTLİ ZAMAN ARALIKLARINDA VEJETATİF ÇOĞALMA FAZINDAKİ HÜCRE SAYIMLARI.

	1 <sup>x</sup>	10	26	50
KONTROL	20.4 ± 0.5	40.2 ± 2	65.2 ± 3	245 ± 10
PROGESTERON 10 <sup>-7</sup> M	17.5 ± 1	31 ± 2	44.5 ± 3	143 ± 6
PROGESTERON 10 <sup>-5</sup> M	17.8 ± 0.8	25.1 ± 0.2	34.6 ± 2	88 ± 8
TESTOSTERON 10 <sup>-7</sup> M	20 ± 0.8	32.7 ± 3	45.7 ± 1.5	124 ± 14
TESTOSTERON 10 <sup>-5</sup> M	20.4 ± 1.8	24.6 ± 2.2	30.4 ± 2	48 ± 2

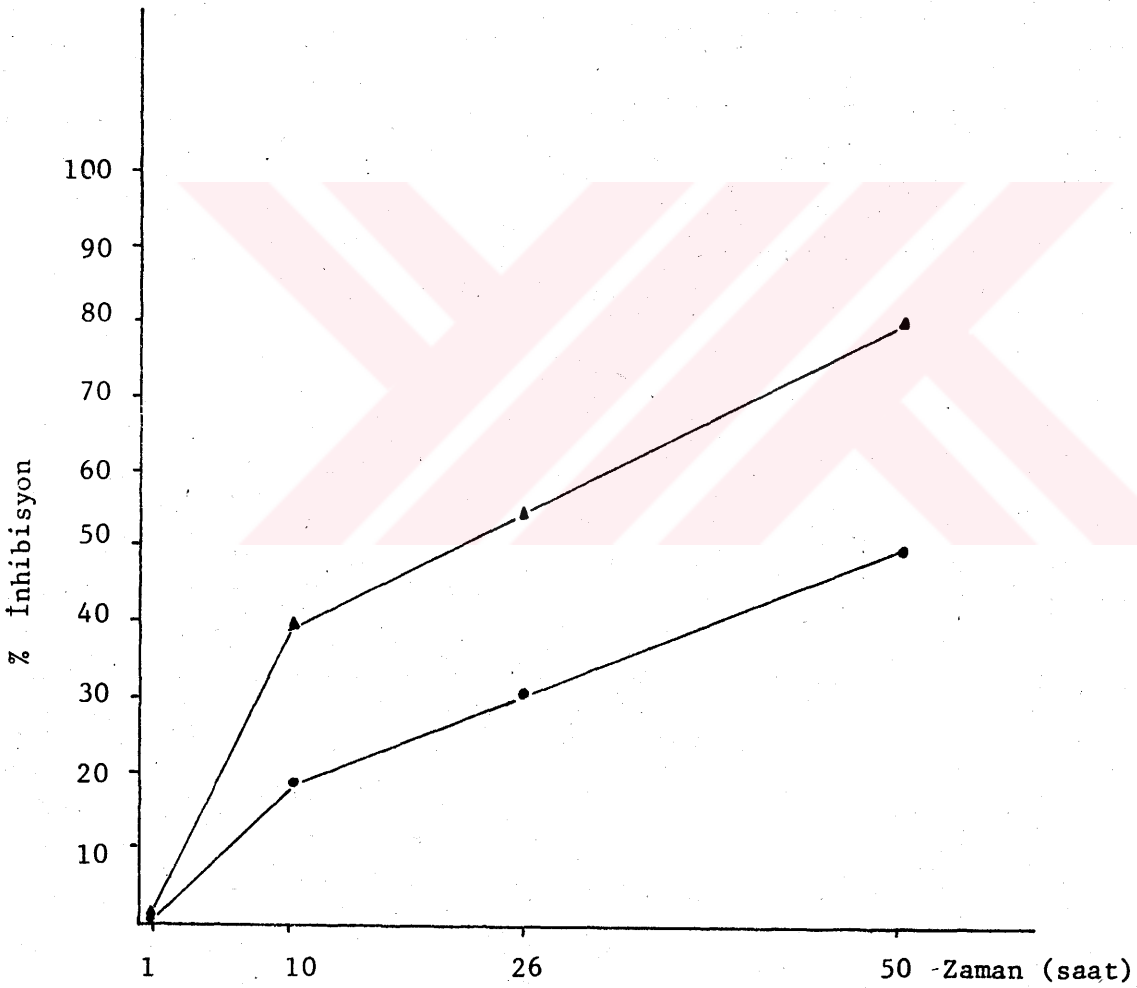
Hücre sayımları hiçbir steroid hormonun konmadığı ortamlardan (kontrol), progesteron ve testosteron içeren ortamlardan alınan örneklerde gerçekleştirildi. İkili örneklerden her biri için iki seyreltmede (1/10, 1/20) beşer alanda sayım yapıldı. Ortalamaları değerlendirildi ( n = 20 ). Sap-  
tanan bu değerler 10<sup>4</sup> faktörü ile çarpılarak hücre/ml düzeyleri elde edildi.

\* Yaklaşık  $2 \times 10^5$  hücre/ml yoğunluğu ile başlayan deneyin saat olarak inkübasyon süreleri.



Şekil.13.-  $10^{-5}$  M ve  $10^{-7}$  M konsantrasyonlarındaki progesteronun vejetatif aşamadaki hücre çoğalması üzerine olan inhibitör etkisi.  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$   $10^{-5}$  M Progesteron,  $\bullet$ — $\bullet$   $10^{-7}$  M Progesteron.

Her bir nokta için iki ayrı seyreltmede (1/10,1/20) hücre sayımı yapılmıştır. Örnekler ikili olarak çalışılarak ortalamaları alınmıştır. Bulgular tekrarlanılabilir niteliktedir.



Şekil.14.-  $10^{-5}$  M ve  $10^{-7}$  M konsantrasyonlarındaki testosteronun vejetatif aşamadaki hücre çoğalması üzerine olan inhibitör etkisi.

▲—▲  $10^{-5}$  M Testosteron, ●—●  $10^{-7}$  M Testosteron.

Her bir nokta için iki ayrı seyreltmede (1/10, 1/20) hücre sayımı yapılmıştır. Örnekler ikili olarak çalışılarak ortalamaları alınmıştır. Bulgular tekrarlanılabilir niteliktedir.

## 2- Farklılaşma Süreci Üzerine Steroid Hormonların Etkisi.

Steroid hormonların farklılaşma süreci üzerine olan etkilerinin incelenmesi farklı iki yöntemle gerçekleştirildi. Birinci yöntemde morfolojik değişimler üzerine steroidlerin etkisi M-Tamponlu petri kutularında incelendi. İkinci yöntemde morfolojik değişmelerin engellendiği çalkalanan kültür sistemlerinde çalışıldı. Bu sistemde morfolojik değişmeler üzerine etkin uyarımları olduğu saptanan testosteron ve progesteronun Alkali fosfataz ve  $\beta$ -glukosidaz düzeylerine etkileri ve söz konusu etkilerin bazı ilâçlarla değişimi incelendi.

### a) Steroid Hormonların Morfolojik Değişmeler Üzerine Etkisi:

M-Tamponlu petri kutularında belirli konsantrasyonlardaki steroid hormonların morfolojik değişmeleri etkilediği saptandı. Bu deneylerde androstendion, östradiol, östriol-3-sülfat, östron-3-sülfat, kortizon, aldosteron, pregnandiol, pregnantriol bileşiklerini  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M konsantrasyonlarında içeren örneklerde kontrollere oranla belirgin bir farklılık gözlenememesine rağmen  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M ve  $10^{-5}$  M konsantrasyonlarda içeren örneklerde kontrollere oranla doza bağımlı inhibisyon görüldü.  $10^{-4}$  M Testosteron ve Progesteron içeren örneklerde kontrollere oranla kesin bir inhibisyon görüldü. Yani bu örneklerde hücrelerin açlığa terkinin 12. saatinde hücrelerin konumu halen başlangıçtaki konumları ile aynı idi.  $10^{-5}$  M Testosteron ve Progesteron içeren örneklerde ise kontrole oranla herhangi bir inhibisyon ya da stimülasyon gözlenemedi.  $10^{-6}$  M ve  $10^{-7}$  M Testosteron ve progesteronlu örneklerde kontrole oranla stimülasyon görüldü.  $10^{-8}$  M ve  $10^{-9}$  M konsantrasyonlardaki örneklerde ise kontrole oranla herhangi bir değişme saptanamadı.

Progesteron ve testosteronun yüksek dozlarda farklılaşma sürecini inhibe etmeleri, düşük dozlarda etkisiz kalmaları ve  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M konsantras-

yonlarda da uyarıcı etkide bulunmaları bu hormonların *D.discoideum*'un yaşam süreci üzerine etkilerinin incelenmesini ilginç kılmaktadır. Yukarıda sözü edilmiş olan diğer steroid hormonların düşük konsantrasyonlarda cevapsız kalmaları ve yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon yaratmaları daha önceki bilgilerin ışığı altında değerlendirildiğinde ilginç bir durum göstermemektedir. Bu nedenle ilgili bulgular ayrıca tablolar halinde gösterilmemiştir.

Progesteron ve testosteron için saptanan bulgular Tablo.2 ve 3'de özetlendi. Tablolarda adı geçen tek tek hücreler, kümelenme, akış başlangıcı, erken akış, orta akış, geç akış ve yüzen kümeler kavramlarının anlaşılabilmesi için deney sırasında laboratuvarında çekilen fotoğraflar örnek olarak şekil 15-A,B,C,D,E,F'de gösterildi.

Molarite	1 <sup>x</sup>	2	4	6	9	10	11	12
10 <sup>-4</sup>	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler
10 <sup>-5</sup>	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Kümelenme Hücreler	Akış Başlangıcı	Orta Akış	Geç Akış	Çok geç Akış	Yüzen Kümeler
10 <sup>-6</sup>	Tek Tek Hücreler	Kümelenme Hücreler	Akış Başlangıcı	Orta Akış	Geç Akış	Çok geç Akış	Yüzen Kümeler	Yüzen Kümeler
10 <sup>-7</sup>	Tek Tek Hücreler	Kümelenme Hücreler	Akış Başlangıcı	Orta Akış	Geç Akış	Çok geç Akış	Yüzen Kümeler	Yüzen Kümeler
10 <sup>-8</sup>	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Kümelenme Hücreler	Akış Başlangıcı	Orta Akış	Geç Akış	Çok geç Akış	Yüzen Kümeler
10 <sup>-9</sup>	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Kümelenme Hücreler	Akış Başlangıcı	Orta Akış	Geç Akış	Çok geç Akış	Yüzen Kümeler
KONTROL	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Kümelenme Hücreler	Akış Başlangıcı	Orta Akış	Geç Akış	Çok geç Akış	Yüzen Kümeler

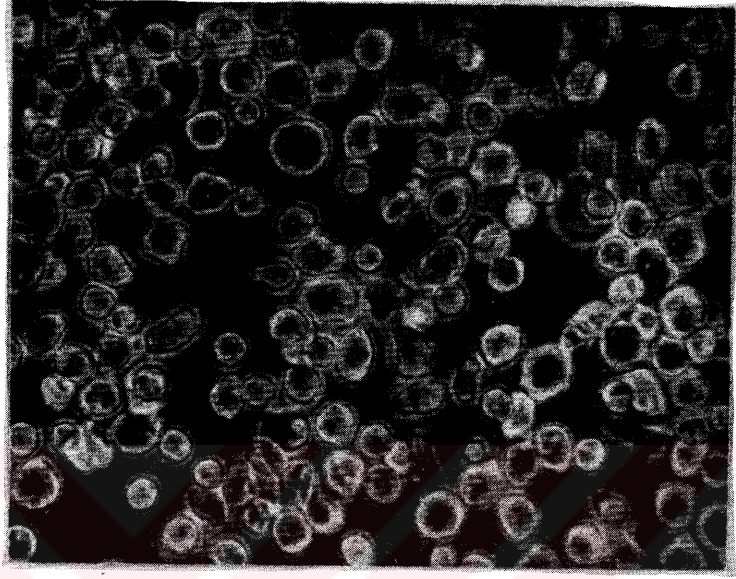
TABLO-2: Steroid hormonların D.discoideum'un farklılaşma süreci üzerine etkilerinin incelendiği M-Tamponlu petri kutularında testosteronun çeşitli konsantrasyonları için saptanan bulgular. Her konsantrasyon için deney en az üç kez tekrarlanmış olup örnekler ikili seriler halinde çalışılmıştır.

\*Örneklerin açığa terkedilişlerinden itibaren zaman birimi olarak saat.

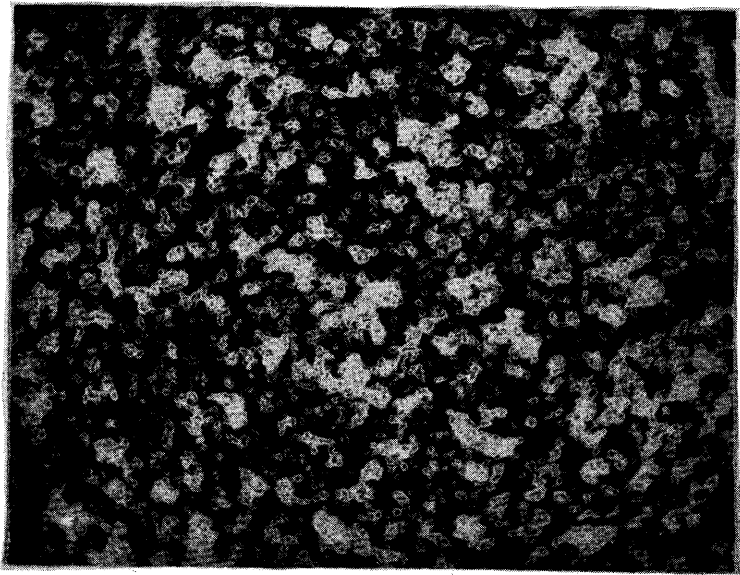
Molarite	1 <sup>x</sup>	2	4	6	9	10	11	12
10 <sup>-4</sup>	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler
10 <sup>-5</sup>	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler
10 <sup>-6</sup>	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler
10 <sup>-7</sup>	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler
10 <sup>-8</sup>	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler
10 <sup>-9</sup>	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler
KONTROL	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler	Tek Tek Hücreler

**TABLO-3:** Steroid hormonların D.discoideum'un farklılaşma süreci üzerine etkilerinin incelendiği M-Tamponlu petri kutularında progesteronun çeşitli konsantrasyonları için saptanan bulgular. Her konsantrasyon için deney en az üç kez tekrarlanmış olup örnekler ikili seriler halinde çalışılmıştır.

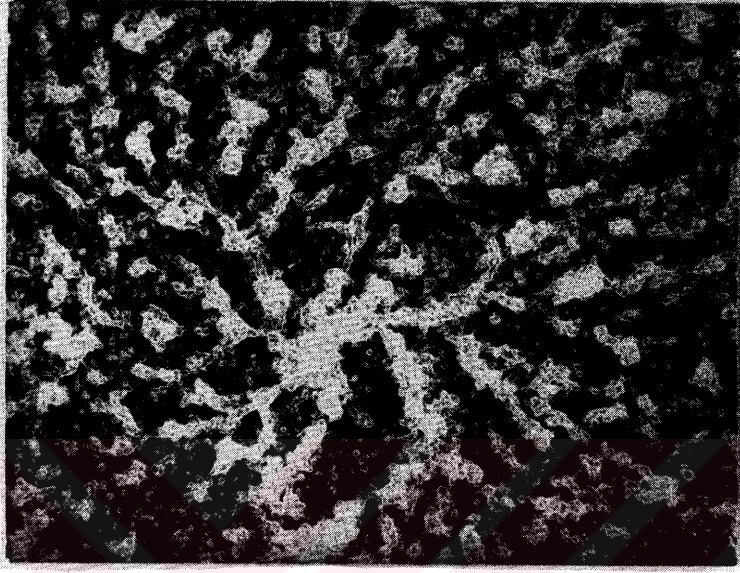
**x** Örneklerin açlığa terk edilmişlerinden itibaren zaman birimi olarak saat.



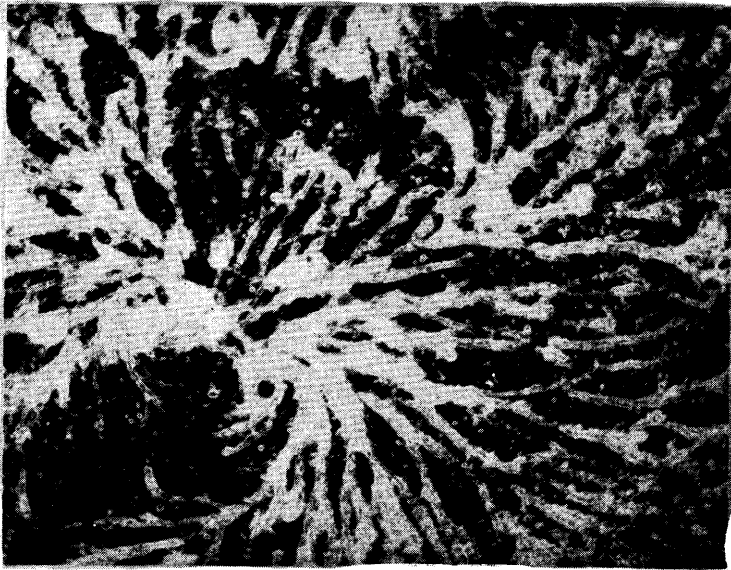
Şekil.15 A.- D.discoideum hücreleri filtreler üzerinde açlığa terkedildiklerinde gözlenen tek tek hücreler.



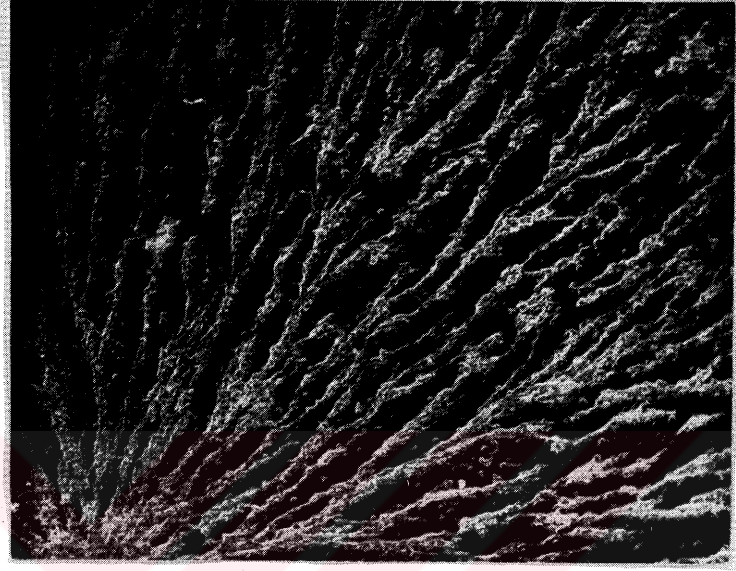
Şekil.15 B.- İlerleyen zaman içinde tek tek hücrelerin birbirleri ile kontakt kurmaları sonucu oluşan kümeleme.



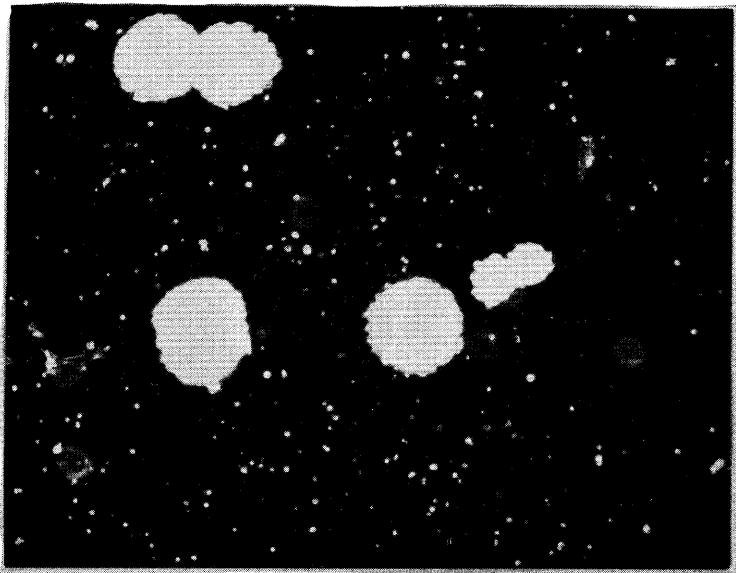
Şekil.15 C.- Hücre hücre kontaktı ile oluşan kümeciklerin birbirleri ile temasa gelmesi sonucu belirli merkezlere doğru akışın başlangıcı.



Şekil.15 D.- Belirli merkezlere doğru hücre akışının başlamasından sonra ağaç dalları görünümünün oluşması. Orta Akış.



Şekil.15 E.- Hücre akışlarının yöneldikleri merkezlere doğru ilerlemesi sonucu merkezlerde birikmenin başlaması, geç akış.

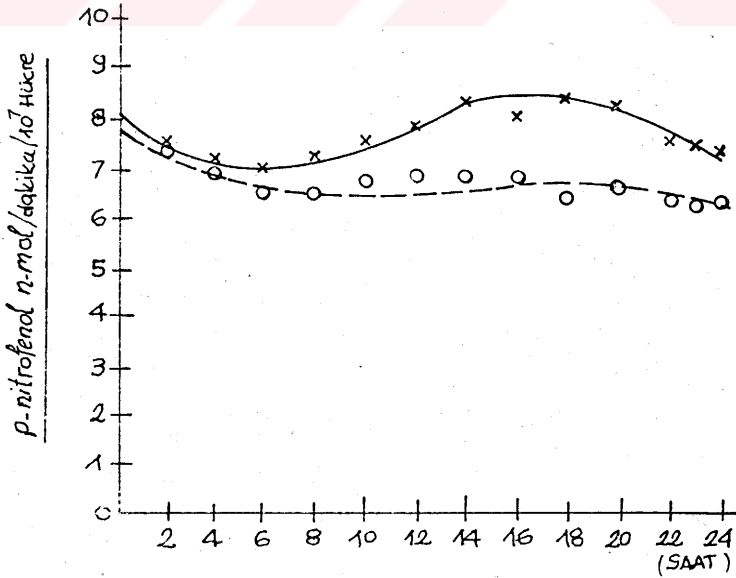


Şekil.15 F.- Hücre akışının sona ermesi ile merkezlerde biriken hücrelerin oluşturduğu yüzen kümeler.

b) Steroidlerin Enzim Düzeyleri Üzerindeki Etkileri ve İlaçlarla Değişimi.

Farklılaşma süreci üzerine steroidal etkinin incelenmesi için ikinci bir ölçüt olarak Alkali fosfataz ve  $\beta$ -glukosidaz enzim düzeylerindeki değişimler ele alındı.

$10^7$  hücre/ml yoğunluğunda MES tamponu içinde suspanse edilerek çalkalanan kültür sisteminde açlığa terk edilmiş hücrelerin,  $10^{-7}$  M testosteronun bulunduğu ve ortama birşey eklenilmediği, normal koşullarda gösterdikleri enzimatik değişimler şekil 16'da gösterilmiştir. Ortama hiç bir ekleme yapılmamış örneklerdeki hücrelerin enzim düzeyleri, deney için bazal değerleri yansıtmaktadır. Bu değerler ile yapılan karşılaştırmada testosteron içeren örneklerin enzim düzeylerinin 16. saatte maksimum % 20 stimülasyon gösterdiği ve ilerleyen saatlerde stimülasyonun artmadığı saptandı.

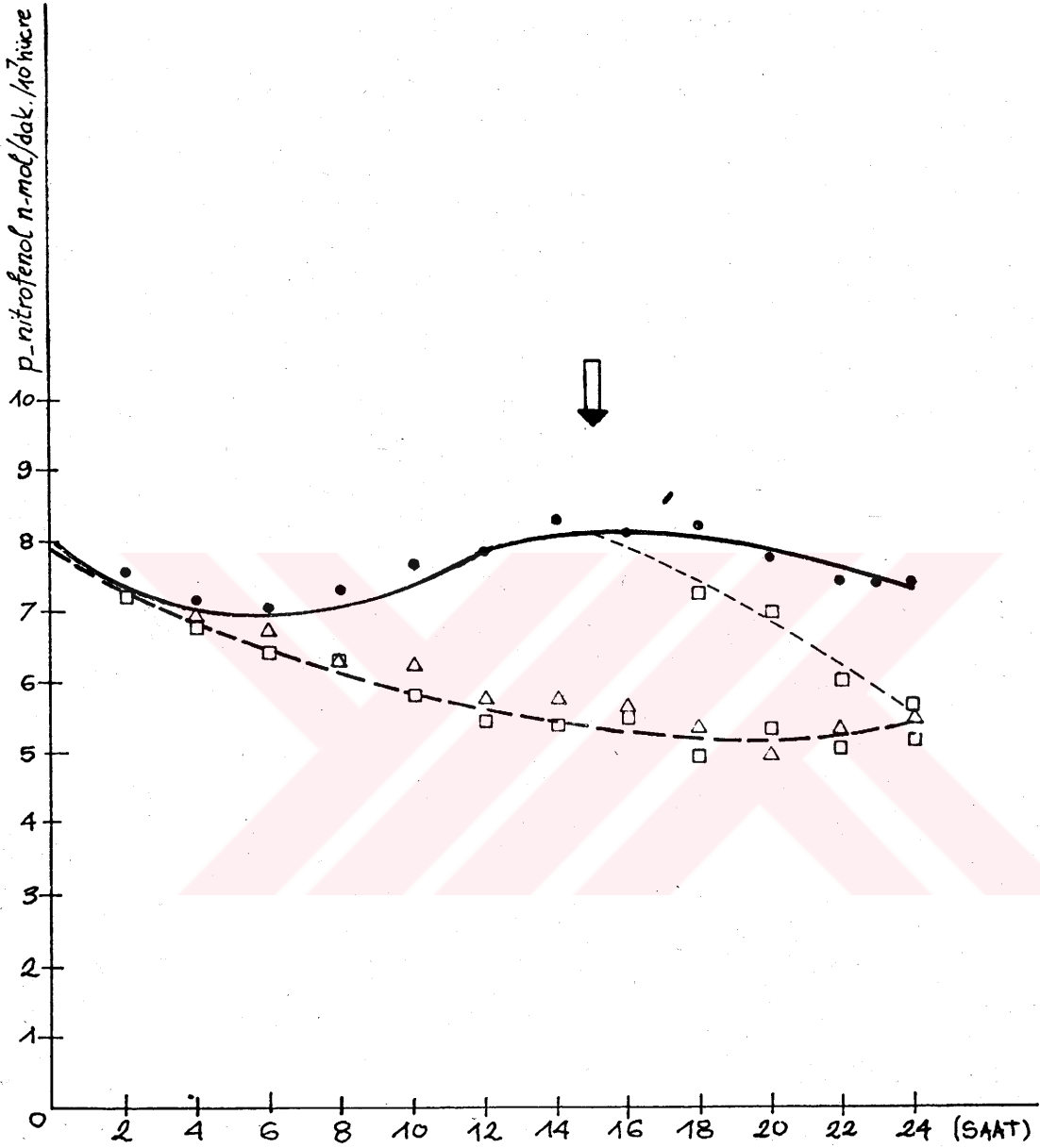


Şekil.16.- Alkali fosfataz aktivitesi üzerine  $10^{-7}$  M testosteronun etkisi.  
 O - - - O Kontrol , x - - - x  $10^{-7}$  M Testosteron  
 Her bir nokta ikili örneklerin ortalamasıdır. Bulgular tekrarlanılabilir niteliktedir.

$10^{-7}$  M Testosteron'un sebep olduğu stimülasyonun enzimin de novo sentezini arttırmak yolu ile olup olmadığını saptamak amacı ile bir translasyon inhibitörü olan siklohekzimid (350 µg/ml) kullanıldı. Testosteron ile elde edilen stimülasyonun 15. saatte ortama siklohekzimid eklenmesi ile kesin bir engellenmeye uğradığı görüldü (Şekil 17). Siklohekzimidin yarattığı inhibisyonun hücrelerin açılığa terk edilmiş süreleri ile bağıntılı olup olmadığını saptamak amacıyla inkübasyonun başlangıç anında testosteron + siklohekzimid eklenen örnekler incelendiğinde inhibisyonun zamana bağlı bir değişme göstermediği saptandı.

Testosteronun neden olduğu stimülasyonun serbestleşen mRNA'lerin translasyonu düzeyinde mi, yoksa transkripsiyon düzeyinde mi olduğunu anlamak için de deney başlangıcında testosteron içeren örneklere aktinomisin-D (125 µg/ml) eklenmiştir. Şekil 17'de görüldüğü gibi aktinomisin-D'nin neden olduğu inhibisyon, testosteronun stimulan etkisinin transkripsiyon düzeyinde olduğunu kanıtlamıştır.

Farklılaşma sürecini morfolojik değişmeler açısından stimüle edebildiği saptanan progesteron için de benzer incelemeler yapıldı.  $10^{-7}$  M konsantrasyondaki progesteronun kontrol örneklerine göre alkali fosfataz düzeylerini 16. saatte % 20 stimüle ettiği saptandı. Siklohekzimid ve Aktinomisin-D eklenmesiyle gözlemlenen stimülasyon inhibisyonu da şekil 18'de görülmektedir.



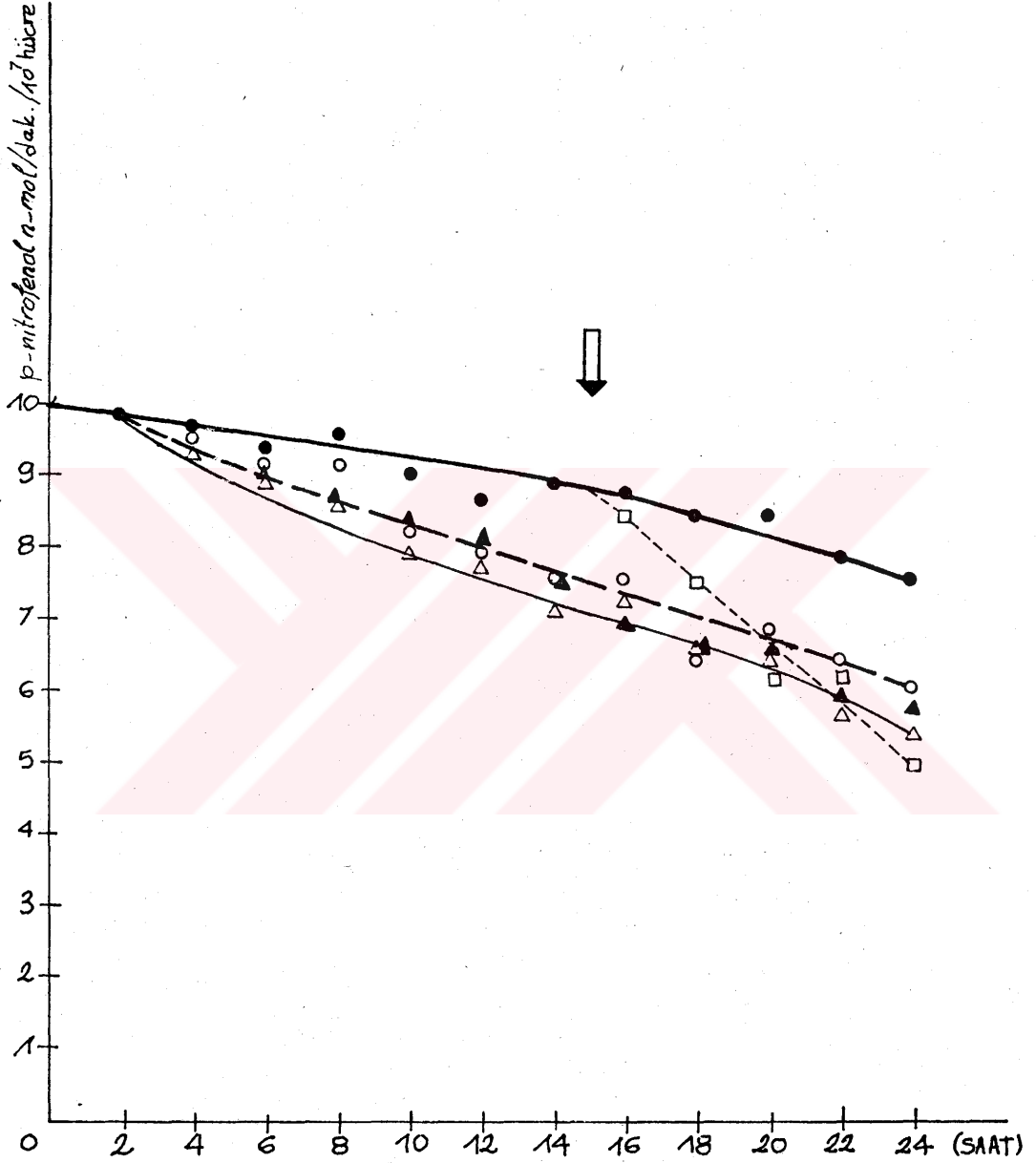
Şekil.17.- Alkali fosfataz enzimi üzerine testosteronun ( $10^{-7}$  M) tek başına ve ilâçlarla birlikte etkisi.

●—●  $10^{-7}$  M Testosteron, △---△ Testosteron + Aktinomisin-D

□---□ Testosteron + Sikloheksimid.

Ok işareti, 15. saatte testosteron içeren ortama sikloheksimid eklenmesini belirtmektedir.

Deneyler tekrarlanılabilir nitelikte olup her bir nokta ikili örneklerin ortalamasıdır.



Şekil.18.- Alkali fosfataz enzimi üzerine progesteronun ( $10^{-7}$  M) etkisi ve bu etkinin ilâçlarla değişimi.

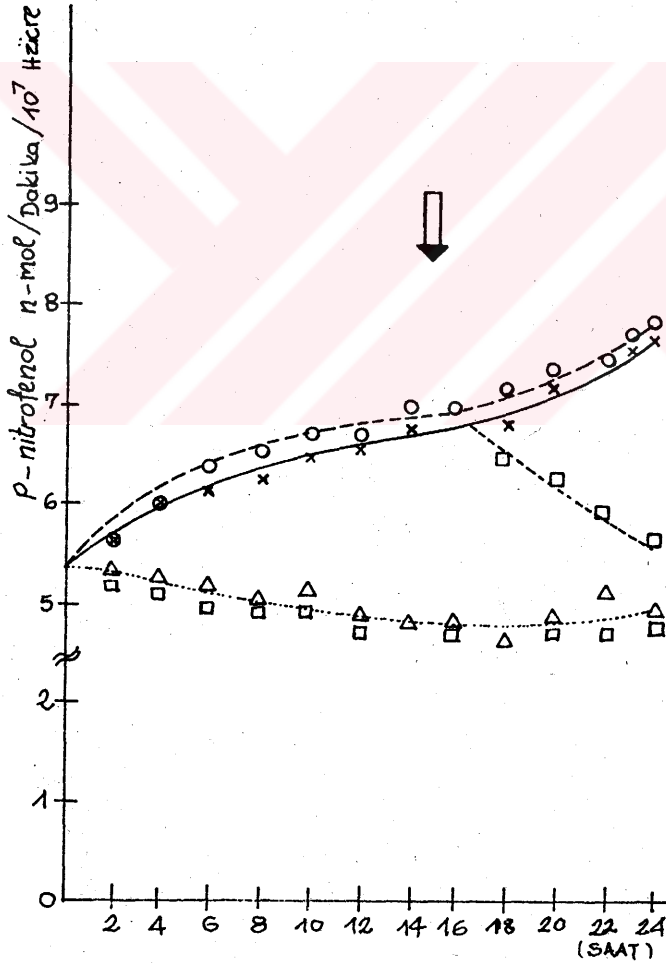
●—●  $10^{-7}$  M Progesteron , ○---○ Kontrol

□---□ Progesteron + 15. saatte Sikloheksimid

△---△ Progesteron + Aktinomisin-D, ▲---▲ Progesteron + Sikloheksimid.

Deneyler tekrarlanılabilir nitelikte olup her bir nokta ikili örneklerin ortalamasıdır.

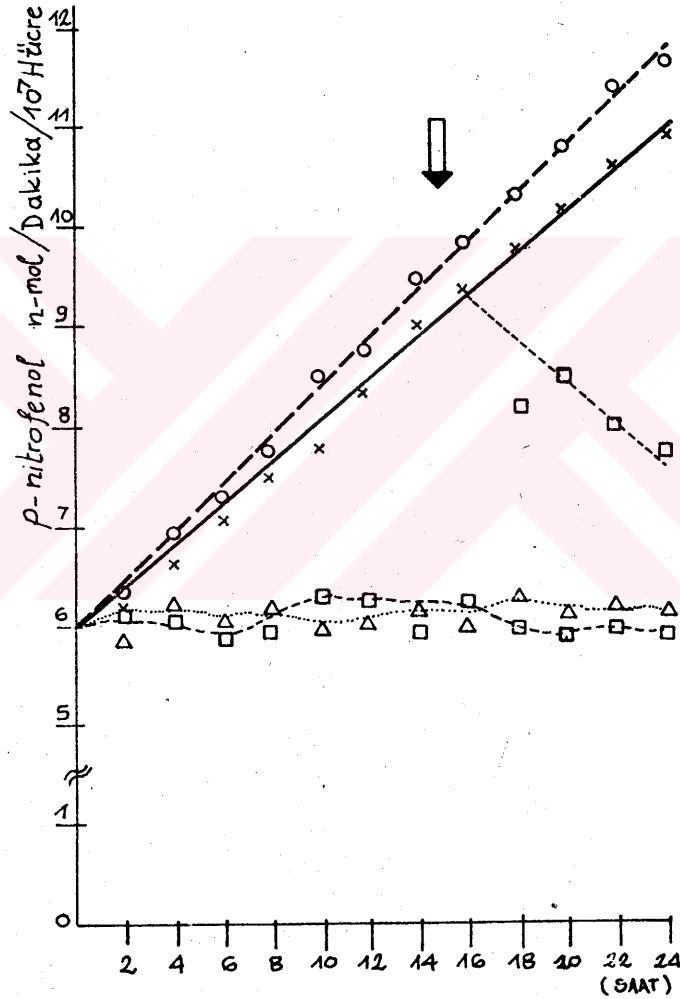
Çalkalanan kültür sisteminde morfolojik değişmeler engellenerek açlığa terk edilen hücrelerin, ortama eklenen steroid hormonlara cevabını belirlemek amacıyla değerlendirmesi yapılan ikinci enzim  $\beta$ -glukosidaz'dır. Ortamda testosteron, progesteron içeren ve içermeyen hücre kültürlerinden alınan örneklerde Alkali fosfataz ve  $\beta$ -glukosidaz enzim düzeyleri birlikte saptandığından deney koşullarının detayları tekrar edilmeyecektir. Bulgular şekil 19 ve 20'de österildi.



Şekil.19.-  $\beta$ -glukosidaz enzim düzeylerine  $10^{-7}$  M testosteronun etkisi.

—x—  $10^{-7}$  M Testosteron, o---o Kontrol, □---□ Testosteron+15. saatte Sikloheksimid  
 .....Δ Testosteron + Aktinomisin-D, □.....□ Testosteron + Sikloheksimid.  
 Deneyler tekrarlanılabilir nitelikte olup her bir nokta ikili örneklerin ortalamasıdır.

$10^{-7}$  M Testosteronun ve  $10^{-7}$  M Progesteronun  $\beta$ -glukosidaz enzim düzeyleri üzerine % 5 civarında değişen ve belirgin olmayan bir inhibisyona sebep oldukları saptandı. Deney başlangıcında ortama eklenen Aktinomisin-D ve siklohekzimid gibi transkripsiyon ve translasyon inhibitörü ilâçların  $\beta$ -glukosidaz sentezini tümüyle inhibe ettikleri görüldü.



Şekil.20.-  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerine  $10^{-7}$  M progesteronun etkisi.

x — x  $10^{-7}$  M Progesteron, o — o Kontrol,

Δ — Δ Progesteron + Aktinomisin-D

□ — □ Progesteron + Siklohekzimid

Ok işareti 16. saatte ortama eklenen siklohekzimidi göstermektedir.

Deneyler tekrarlanılabilir nitelikte olup her bir nokta ikili örneklerin ortalamasıdır.

#### IV- İ R D E L E M E V E S O N U Ç

Dictyostelium discoideum'un farklılaşma süreci içerisinde tek hücreli-den çok hücreli yapıya geçiş aşamasında temel rolü oynayan kemotaktik ajanın tanımlanması uzun yıllar almıştır. "Acrasin" diye adlandırılan bu kemotaktik ajanın bir hormon olabileceği düşünülerek bu yönde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. 1967 yılında Konijn ve çalışma grubu acrasinin Adenozin 3'5'-siklik monofosfat (cAMP) olduğunu kanıtlamışlardır (61). Bu noktaya gelinceye kadar çeşitli hormon preparatları değişik testlerle değerlendirilmeye çalışılmıştır.

1958 yılında Wright, B.E. (110) "Dictyostelium'da Kümelenme Üzerine Steroidlerin Etkisi" başlıklı çalışmada gebe kadın idrarının çok yüksek bir etkinlik gösterdiğini saptamıştır. Bu bulguya göre acrasinin idrardaki komponentlerden birisi olacağı ihtimalinden hareket edilerek çeşitli steroid hormonların kümelenme üzerine etkileri incelenmiştir.

Steroid hormonların çoğalma fazındaki Dictyostelium discoideum hücreleri üzerine etkilerini inceleyen Brachet ve Klein çalışmalarında (15,59) ortamına eklenen  $2 \times 10^{-5}$  M konsantrasyondaki progesteronun hücre çoğalmasını kontrol grubuna göre % 70 inhibe ettiğini ve konsantrasyonun iki katına çıkarılmasıyla da inhibisyonun % 90'a ulaştığını saptamışlardır. Kendi çalışmamızda da bu bulgularla uygunluk içinde olmak üzere  $10^{-5}$  M konsantrasyondaki progesteronun

% 63 oranında inhibisyon yarattığı ve inhibisyonun değişen hormon konsantrasyonu ile bağıntılı olarak değişimler gösterdiği saptanmıştır.

$10^{-5}$  M konsantrasyondaki testosteronun ise % 80 oranında inhibisyon yarattığı saptandı. Bu sonuç da Brachet ve Klein (15) çalışması ile uygunluk içindedir.

Progesteron ve testosteron bileşiklerinin çoğalma süreci üzerinde sebep oldukları inhibisyonun doza bağımlı olduğu şekil 13 ve 14'de görülmektedir.

Sunulan bu çalışmada progesteron ve testosteronun çoğalma süreci üzerindeki etkilerinin özellikle ele alınması ve diğer steroid bileşiklerinin çalışmaya dışı bırakılması nedeni, ilk deneylerde farklılaşma süreci üzerine sadece bu iki steroid hormonun belirli konsantrasyonlarda stimulan etkisinin görülmüş olmasıdır.

Brachet ve Klein çalışmalarında progesteron ve testosteronun çoğalma fazındaki *Dictyostelium discoideum* hücreleri üzerindeki inhibisyon etkilerini bu bileşiklerin lipide çözünabilir olmasıyla açıklamaktadırlar (15). Etkinin temelde membran düzeyinde olacağı ve steroidlerin membran yapısına girdikleri ileri sürülmektedir.

Çalışmamızda hücreler sadece logaritmik fazda çoğalırken steroidal etki incelemesine tabi tutulmuştur. Stasyoner faza geçildiğinde kontrol örneklerinde bile hücre çoğalmasını inhibe eden bir proteinin sentezi başladığından steroidal etki değerlendirmesi anlamlılığını yitirmiş olacaktır. Bu nedenle deneyler kontrol örneklerinde hücre yoğunluğu yaklaşık  $2 \times 10^6$  hücre/ml değerine ulaşıldığında durdurulmuştur.

Steroid al etkinin incelendiği öncül çalışmalardan Wright (110 )ın bulgularını ele alacak olursak, gebe kadın idrarının *Dictyostelium discoideum*'un farklılaşma sürecini aktive ettiği gözleminden yararlanarak çeşitli steroid bileşiklerinin süreç üzerine etkilerinin incelenmiş olduğunu görürüz. Estradiol-estron sulfat , $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion, progesteron ve testosteronun aktif steroid bileşikleri olduğu, kolesterol, androstendiol dietilstilbesterol, 17- $\alpha$ -metil-19-nor-testosteron, pregnandiol ve hidrokortizon'un inaktif steroid bileşikleri olduğu belirtilmektedir. Aynı metin içerisindeki açıklayıcı bir nokta da aktif oldukları belirtilen steroid bileşiklerinin, estron sulfat dışında sudaki güç çözünlükleri nedeniyle tam etkilerinin saptanamadığı belirtilmektedir. Etkinin var olduğundan bahsedilmesi ve bulguların açıklıkla belirtilmiş olmaması çalışma sonuçlarını kesin bir kanıt olarak değerlendirmeye engel olmakta ise de öncül bir çalışma olması nedeniyle değer taşımaktadır. Daha sonraki yıllarda yapılan iki çalışmada da (15,59) steroid bileşiklerinden progesteron, estradiol, estron, testosteron, nortestosteron, dehidroepiandrosteron, aldosteron ve kortizonun *Dictyostelium discoideum*'un farklılaşma süreci üzerine etkileri incelenmiştir.

*Dictyostelium discoideum*'un farklılaşma süreci üzerine steroidlerin etkisi konusunda bugüne kadar yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda değerlendirmeye alınmış olan konsantrasyon aralıklarının çok sınırlı olması ve  $10^{-4}$  M, gibi canlı organizmaların çoğunda toksik etkisi görülebilecek yüksek bir düzeyde olmaları bizi bu konuda detaylı bir incelemeye yöneltmiştir.

Besi ortamından uzaklaştırılarak farklılaşma sürecine terkedilen *Dictyostelium discoideum* hücrelerinin morfolojik değişmelerinin incelendiği

ortamda çeşitli steroid hormonların geniş bir konsantrasyon taraması yapılmıştır.

Bu amaçla androstendion, östradiol, östriol, östriol-3-sülfat, östron-3-sülfat, kortizon, aldosteron, pregnandiol, pregnantriol, progesteron ve testosteron bileşiklerinin  $10^{-3}$  M ile  $10^{-9}$  M konsantrasyon aralığında 6 ayrı konsantrasyonda farklılaşma süreci üzerine etkileri M-Tamponlu petri kutularında incelenmiştir. Progesteron ve testosteron dışındaki bileşikleri  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M ve  $10^{-8}$  M konsantrasyonlarda içeren örneklerde kontrollere göre belirgin bir farklılık gözlenilememesine karşılık  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M ve  $10^{-5}$  M konsantrasyonlarda içeren örneklerde kontrollere oranla doza bağımlı bir inhibisyon görüldü. Yukarıda sayılan steroid bileşiklerinin yüksek konsantrasyonlarında farklılaşma sürecini kıs veya tamamen inhibe ettikleri olgusu Brachet ve Klein bulgularıyla uyum içindedir (15). Oysa testosteron ve progesteron bileşikleri için yapılan doz taraması sonuçları bugüne kadar bildiklerimizin dışında ilginç bir olguyu ortaya çıkarmıştır.  $10^{-4}$  M konsantrasyonlardaki testosteron ve progesteron çözeltilerini içeren M-Tamponlu petri kutularındaki örnekler, kontrollere göre kesin bir inhibisyon göstermiş ve farklılaşma yönünde hiçbir gelişme kaydetmemişlerdir. Konsantrasyon 10 kez seyreltildiğinde yani  $10^{-5}$  M konsantrasyonda herhangi bir inhibisyon veya stimülasyon görülememesinin nedeni sınır düzeye erişilmiş olduğunu göstermektedir.  $10^{-6}$  M ve  $10^{-7}$  M konsantrasyonlarda ise testosteron ve progesteron içeren örneklerde belirgin bir stimülasyonun varlığı kaydedildi. (Tablo 2 ve 3).

Böylece bugüne kadar steroid hormonların farklılaşma sürecini kesin olarak inhibe ettikleri yönündeki bilgimiz belirli değişikliklere uğramış olmaktadır. Testosteron ve progesteron  $10^{-8}$  M ve  $10^{-9}$  M konsantrasyonlarda ise azalan

dozla orantılı olarak stimulan etkilerini yitirmiş ve kontrolle belirgin bir farklılıkları olmadığı görülmüştür. Bulgularımızın ışığı altında testosteronun ve progesteronun yüksek konsantrasyonda farklılaşmayı inhibe ettiği, düşük konsantrasyonda herhangi bir etkilerinin görülmediği ve  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M gibi uygun konsantrasyonlarda ise farklılaşma sürecini stimule ettikleri sonucu ortaya çıkmaktadır.

Biokimyasal incelemeler açısından herhangi bir organizmanın dış kaynaklı bir uyarana cevabının anlaşılmasında göz önüne alınan önemli kriterlerden biri de organizmanın normal koşullar altında ürettiği fonksiyonel ve yapısal protein miktarlarında meydana gelebilecek değişimlerdir. Dictyostelium discoideum'da morfolojik değişmelerin gerçekleştiği koşullar altında farklılaşma sürecinde Alkali fosfataz ve  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin artışlar gösterdikleri diğer çalışmacılar tarafından saptanmıştır (42,71,72,77,82). Bu çalışmada farklılaşma sürecinde yansımalarının saptandığı Alkali fosfataz ve  $\beta$ -glukosidaz enzimleri inceleme kriterleri olarak seçilmiştir.

Farklılaşma sürecine özgün enzimatik değişmelerin incelenebilmesi için modifiye ettiğimiz çalkalanan kültür sistemi geliştirilmiştir (88). Kullanılan modifiye sistemin temel özelliği farklılaşma sürecindeki morfolojik değişmelerin inhibe edilmiş olması ve bu nedenle petri kutularında söz konusu olabilecek kompleks parametrelerin belirli ölçülerde minimuma indirilmiş olmasıdır. Deneylerimizde steroid içeren örneklerimizin yanı sıra incelenmiş olan kontrol grupları da organizmanın söz konusu koşullar içindeki normal enzim düzeylerini saptamamıza yardımcı olmuştur.

Alkali fosfataz enzimi, kontrol gruplarında başlangıça göre büyük sapmalar göstermeden kararlı bir azalma kaydederken  $10^{-7}$  M konsantrasyondaki testosteronun ortama eklenmesiyle altıncı saatte başlayan ve 14. saatte maksimuma ulaşan bir artış göstermiştir (Şekil.16). Benzer bir stimülasyon progesteron örnekleri içinde geçerlidir. Kontrol gruplarında enzim düzeylerinin azalması, hücrelerin farklılaşma süreçlerinin inhibe edilmesinin doğal bir sonucudur. Ortama eklenen  $10^{-7}$  M konsantrasyondaki testosteron ve progesteron ile elde edilen stimülasyon, bu hormonların biokimyasal açıdan hücreleri normal farklılaşma konumlarına yaklaştırdığını göstermektedir.

$\beta$ -glukozidaz enzimi ise kontrol gruplarında inkübasyon başlangıcından itibaren kararlı bir artış gösterirken ortama  $10^{-7}$  M konsantrasyonlardaki testosteron ve progesteronun eklenmesiyle % 5 civarında değişen ve belirgin olmayan bir inhibisyon göstermiştir (Şekil 19 ve 20).

Kümelenme aşaması üzerine stimulan etkilerini saptadığımız belirli konsantrasyonlardaki progesteron ve testosteronun Alkali fosfataz ve  $\beta$ -glukozidaz enzimleri üzerinde yarattıkları birbirlerine zıt etkiler, söz konusu steroidal etkinin bir regülasyon mekanizmasını kontrol ettiğini ortaya koymaktadır.

Çalkalanan kültür sisteminde ortama eklenen steroidlerin yarattıkları etkilerin moleküler düzeyde değerlendirmesini yapabilmek için sikloheksimid ve aktinomisin-D gibi ilâçlardan yararlanılmıştır. Söz konusu etkilerin bir protein sentezi uyarımı yönünde olup olmadığını ortaya çıkarmak için inkübasyon başlangıcında ve 15. saatlerde ortama sikloheksimid eklenmiştir. Bir protein sentezi

inhibitörü olan siklohekzimidin (65) steroid uyarımlı enzimatik değişimleri inhibe etmesi, söz konusu etkilerin birer protein sentezini gerektirdiğini kanıtlamaktadır (Şekil 17, 18). Steroidal etkinin birikmiş mRNA serbestleşmesini uyarıcı yönde mi olduğu yoksa DNA transkripsiyonu ile mRNA üretimini mi başlattığının saptanması da önemli bir noktadır. Bu noktayı açıklığa kavuşturmak için ortama bir transkripsiyon inhibitörü olan aktinomisin-D (64,103) eklenmiştir. Şekil.17,18,19,20'de görüldüğü üzere enzim düzeylerini uyarıcı ve inhibe edici yöndeki etkiler, ortama aktinomisin-D eklenmesiyle durdurulabilmektedir.

Elde ettiğimiz bu bulgular ışığı altında farklılaşma süreci üzerine söz konusu olan steroidal etkinin somut bir gerçek olduğunu ve bu olgunun enzim düzeyleri üzerindeki değişimlerle biokimyasal açıdan da kanıtlandığını söyleyebiliriz.

Günümüze kadar yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, steroidlerin *Dictyostelium discoideum*'un çoğalma ve farklılaşma süreçlerini inhibe ettiği olgusu ortaya çıkmaktadır. Çoğalma sürecinde steroid bileşiklerinin düşük ve yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon yarattığı yönündeki olguyu çalışma bulgularımızda desteklemektedir. Fakat farklılaşma süreci üzerine steroidal etki konusunda bulgularımız değişik bir bakış açısı kazandırmaktadır.

Bugüne kadar steroid bileşiklerinin *Dictyostelium discoideum*'un farklılaşma sürecini inhibe ettikleri noktasında birleşen bulgular, yüksek konsantrasyonların kullanıldığı çalışma sonuçlarıdır. Daha düşük konsantrasyonlardaki steroid bileşiklerinin ne yönde etki edecekleri gözden kaçmış çok önemli bir

noktadır ve konunun yanlış yorumuna neden olmuştur. Bulgularımıza göre uygun konsantrasyonlardaki progesteron ve testosteronun farklılaşma süreci üzerinde inhibisyon yerine stimülasyon yaptığı ortaya çıkmıştır. Bu olgu farklılaşma sürecine özgün enzim düzeylerindeki değişmelerle de desteklenmektedir.

Çalışmanın ortaya çıkardığı bir başka önemli sonuç da morfolojik değişmelerin engellendiği çalkalanan kültür sisteminde farklılaşma sürecinin biokimyasal ölçütlerinin de incelenebilirliğidir. Çalkalanan kültür sistemi ile yaptığımız incelemeler *Dictyostelium discoideum* üzerinde steroidal etkinin farklılaşma sürecindeki biokimyasal yansımalarını değerlendiren ilk çalışmadır. Ayrıca bazı steroid bileşiklerinin enzim düzeylerinde yarattığı değişmeler üzerine bazı ilâçların etkisi de ilk kez bu çalışmada incelenmiştir.

Uygulamasını yaptığımız bu model sistemin, gelecekte steroidlerin ve diğer bileşiklerin *Dictyostelium discoideum* üzerine olan etkilerinin moleküler mekanizmasını açıklayıcı yöndeki çalışmalara ışık tutacağı inancındayım.

### ÖZET

Dictyostelium discoideum'un yaşam süreci üzerine bazı steroid hormonların etkileri ve söz konusu etkilerin ilâçlarla değişimi, bu tez çalışmasının kapsamında farklı bir yaklaşımla değerlendirilmiştir. M-Tamponlu petri kutularında yapılan deneyler sonucu elde edilen bulgular testosteron ve progesteronun  $10^{-6}$ M ve  $10^{-7}$ M konsantrasyonlarda Dictyostelium discoideum'un farklılaşma sürecini stimule ettikleri, daha yüksek konsantrasyonlarda inhibe ettikleri ve düşük konsantrasyonlarda da etkisiz kaldıklarını kanıtlamıştır. Çalışmalarda androstendion, östradiol, östriol-3-sulfat, östron-3-sulfat, kortizon, aldosteron, pregnandiol ve pregnantriol gibi diğer bazı steroid bileşiklerinin çeşitli konsantrasyonlarda farklılaşma süreci üzerine etkileri incelenmiş, yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon ve düşük konsantrasyonlarda da kayda değer bir etki göstermedikleri saptanmıştır.

Farklılaşma süreci üzerine stimulan etkileri saptanan  $10^{-7}$ M konsantrasyondaki testosteron ve progesteronun vejetatif çoğalma süreci üzerine olan etkileri de incelemeye alınmıştır. Bulgular, diğer steroid hormonlar gibi testosteron ve progesteron'un da  $10^{-7}$ M konsantrasyonda vejetatif çoğalma sürecini inhibe ettiklerini göstermektedir. İnhibitör etki doza bağımlı olarak değişmektedir.

Farklılaşma sürecindeki morfolojik değişmelerin engellendiği modifiye çalkalanan kültür sistemi ile yapılan deneylerde alkali fosfataz ve  $\beta$ -glukosidaz enzim düzeyleri üzerine  $10^{-7}$ M konsantrasyondaki testosteron ve progesteronun

etkileri incelenmiştir. Alkali fosfataz düzeyleri 24 saatlik süreç içerisinde hormonların etkisiyle kontrole kıyasla yaklaşık % 20 düzeyinde stimülasyon göstermiştir.  $\beta$ -glukosidaz düzeyleri ise testosteron ve progesteron varlığında yaklaşık % 5 düzeyinde değişen ve belirgin olmayan inhibisyon göstermiştir.  $10^{-7}$  M konsantrasyondaki testosteron ve progesteronun farklı enzimleri değişik biçimlerde etkilemeleri, bir biyolojik regülasyon mekanizmasını harekete geçirdiklerini göstermektedir.

Progesteron ve testosteronun uygun konsantrasyonlarda *Dictyostelium discoideum*'un farklılaşma sürecini uyarıcı yönde etkiledikleri bu çalışma sonucunda ortaya çıkmış bulunuyor. Çalkalanan kültür sistemi ile yapılan bu incelemeler, *Dictyostelium discoideum* üzerine steroidal etkinin farklılaşma sürecindeki biyokimyasal yansımalarını değerlendiren ilk çalışmadır.

Testosteron ve progesteronun çalkalanan kültür sisteminde deneye alınan *Dictyostelium* hücrelerinin enzim düzeyleri üzerinde yarattıkları değişimler aktinomisin-D (125  $\mu$ g/ml) ve sikloheksimid (350  $\mu$ g/ml) gibi ilâçlarla engellenmektedir. Bu olgu bize, çalışılmış olan steroidlerin neden oldukları değişimlerin de novo enzim sentezini etkileyici yönde olduğunu kanıtlamaktadır.

### SUMMARY

Alterations in steroidal hormone effects by various drugs has been studied in this work employing a different approach than the conventional methods. The tests using M-buffer plates have shown that testosterone and progesterone stimulate the differentiation of *Dictyostelium discoideum* at the  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M concentration range. An inhibition was observed at higher concentrations whereas lower concentrations proved to be ineffective. Parallel results have been obtained at higher concentrations of other steroids including androstenedione, estradiol, estriol-3-sulphate, estrone-3-sulphate, cortisone, aldosterone, pregnanediol and pregnanetriol. The stimulative effects for the latter steroids were observed to be nil.

The effects of testosterone and progesterone on vegetative growth at  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M concentrations were then studied. The results have confirmed the inhibitor effects at this concentration range as observed with the other steroids employed. The course of inhibition was observed to be dose dependent.

Conflicting results were observed when effects of testosterone and progesterone on alkaline phosphatase and  $\beta$ -glucosidase levels were studied using a modified shaking culture system. Alkaline phosphatase levels were stimulated 20 % whereas  $\beta$ -glucosidase levels were inhibited insignificantly (5 %) at the presence of  $10^{-7}$  M testosterone and progesterone. The differing effects of testosterone and progesterone on alkaline phosphatase and  $\beta$ -glucosidase is suggestive of a biological regulation mechanism.

The modified shaking culture system developed has proven to be proficient in determining the steroidal effects on the differentiation of Dictyostelium discoideum. The results obtained using this approach have clearly shown the stimulative effects of testosterone and progesterone at the  $10^{-7}$ M concentration. The effects on enzyme levels have been observed to be blocked by Actinomycin-D (125  $\mu$ g/ml) and Cycloheximide (350  $\mu$ g/ml) confirming the potency of these steroidal effects on de novo enzyme synthesis.

K A Y N A K L A R

1. Aldrich, H.C. ve Gregg, J.H.  
Unit membrane structural changes following cell association in Dictyostelium.  
Exp. Cell Res. 81, 407-412, 1973.
2. Ashworth, J.M. ve Watts, D.J.  
Metabolism of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum grown in axenic culture. Biochem.J., 119, 175-182, 1970.
3. Beug, H. ve Gerisch, G.  
A micromethod for routine measurement of cell agglutination and dissociation.  
J.Immunol.Methods, 2, 49-57, 1972.
4. Beug, H., Katz, F.E., ve Gerisch, G.  
Dynamics of antigenic membrane sites relating to cell aggregation in Dictyostelium discoideum. J.Cell Biol., 56, 647-658, 1973.
5. Bird, C.W., Lynch, J.M., Pirt, F.J., Reid, W.W., Brooks, C.J.W. ve Middleditch, B.S  
Steroids and squalene in Methylococcus capsulatus grown on methane. Nature (London) 240, 473, 1971.
6. Bonner, J.T.  
Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold Dictyostelium discoideum. J.Exp.Zool. 106, 1-26, 1947.

7. Bonner, J.T.  
The demonstration of acrasin in the later stages of the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J.Exp.Zool.*, 110, 259-271, 1949.
8. Bonner, J.T.  
Observations on polarity in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biol.Bull.*, 99, 143-151, 1950.
9. Bonner, J.T.  
The Cellular Slime Molds. 2. Basım. Princeton Univ. press Princeton, New Jersey, 1967.
10. Bonner, J.T., ve Shaw, M.J.  
The role of humidity in the differentiation of the cellular slime molds. *J.Cell Comp. Physiol.*, 50, 145-154, 1957.
11. Bonner, J.T. ve Dodd, M.R.  
Aggregation territories in the cellular slime molds. *Biol.Bull.*, 122, 13-24, 19
12. Bonner, J.T., Clarke, W.W.Jr., Neely, C.L.Jr., ve Slifkin, M.K.  
The orientation to the light and the extremely sensitive orientation to temperature gradients in the slime mold *Dictyostelium*. *J.Cell.Comp.Physiol.*, 36, 149-158, 1950.
13. Bonner, J.T., Barkley, D.S., Hall, E.M., Konijn, T.M., Mason, J.W., O'Keefe, C. III., ve Wolfe, P.B.  
Acrasin, Acrasinase and the sensitivity to acrasin in *Dictyostelium discoideum* *Develop.Biol.*, 20, 72-87, 1969.

14. Born, G.V.R. ve Garrod, D.  
Photometric demonstration of aggregation of slime mould cells showing effects of temperature and ionic strength. *Nature (London)* 220, 616-618, 1968.
15. Brachet, P. ve Klein, C.  
Inhibition of growth and cellular aggregation of *Dictyostelium discoideum* by steroid compounds. *Exp. Cell Res.*, 93, 159-165, 1975.
16. Bradley, S.G., Sussman, M., ve Ennis, H.L.  
Environmental factors effecting the aggregation of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Protozool.*, 3, 33-38, 1956.
17. Braun, V., Hautke, K., Wolf, H., ve Gerisch, G.  
Degradation of the murein lipoprotein complex of *Escherichia Coli* cell walls by *Dictyostelium amoebae*. *Eur. J. Biochem.*, 27, 116-125, 1972.
18. Cavender, J.C. ve Raper, K.B.  
The Acrasieae in nature. I. Isolation. *Amer. J. Bot.*, 52, 294-296, 1965.
19. Cavender, J.C. ve Raper, K.B.  
The Acrasieae in nature. II. Forest Soil as a primary habitat. *Amer. J. Bot.* 52, 297-302, 1965.
20. Cavender, J.C. ve Raper, K.B.  
The Acrasieae in nature. III. Occurrence and distribution in forest of Eastern North America. *Amer. J. Bot.* 52, 302-308, 1965.
21. Cavender, J.C. ve Raper, K.B.  
The Occurrence and distribution of Acrasieae in forest of subtropical America. *Amer. J. Bot.* 55, 504-513, 1968.

22. Ceccarini, C. ve Cohen, A.  
Germination inhibitor from the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*  
*Nature*, (London) 214, 1345, 1967.
23. Clark, M.A., Francis, D., ve Eisenberg, R.  
Mating types in cellular slime molds. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 52,  
672-678, 1973.
24. Clarke, M. ve Spudich, J.  
Biochemical and structural studies of cell movement. *J.Mol.Biol.*, 86,  
209-222, 1974.
25. Coston, M.B. ve Loomis, W.F.  
Isozymes of  $\beta$ -glucosidase in *Dictyostelium discoideum*.  
*J.Bacteriol.* 100, 1208-1217, 1969.
26. Cotter, D.A. ve Raper, K.B.  
Spore germination in *Dictyostelium discoideum*. *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.*  
56, 880-887, 1966.
27. Cutler, L.S. ve Rossomando, E.F.  
Localization of Adenylate Cyclase in *Dictyostelium discoideum*. II. Cytochemi  
studies on whole cells and isolated plasma membrane vesicles. *Exp.Cell Res.*  
95, 79-87, 1975.
28. deSouza, N.J. ve Nes, W.R.  
Sterols: Isolation from a blue-green algae. *Science*, 162, 363, 1968.
29. Erdos, G.W., Nickerson, A.W. ve Raper, K.B.  
The fine structure of macrocyst germination in *Dictyostelium*. *Develop.Biol.*  
32, 321-330, 1973.

30. Erdos, G.W., Raper, K.B., ve Vogen, L.K.  
Mating types and macrocyst formation in *Dictyostelium discoideum*.  
*Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.*, 70, 1828-1830, 1973.
31. Farnsworth, P. ve Loomis, W.F.Jr.  
A barrier to diffusion in pseudoplasmodia of *Dictyostelium discoideum*.  
*Develop.Biol.* 41, 77-83, 1974.
32. Ferber, E., Munder, P.G., Fischer, H., ve Gerisch, G.  
High phospho lipase activities in amoebae of *Dictyostelium discoideum*.  
*Eur.J.Biochem.*, 14, 253-257, 1970.
33. Francis, D.W.  
The movement of pseudoplasmodia of *Dictyostelium discoideum*.  
Ph.D.Thesis, Univ. Wisconsin, Madison, Wisconsin, 1962.
34. Garrod, D.R.  
The cellular basis of movement of the migrating grex of the slime mould  
*Dictyostelium discoideum*. *J.Cell Sci.*, 4, 781-798, 1969.
35. Garrod, D.R., ve Ashworth, J.M.  
Effect of growth conditions on development of the cellular slime mould,  
*Dictyostelium discoideum*. *J.Embryol.Exp.Morphol.*, 28(2), 463-479, 1972.
36. George, R.  
Cell organization and ultrastructure during culmination of cellular slime  
molds. Ph.D. Thesis, Univ. of Hawaii, 1968.

37. George, R.P., Hohl, H.R., ve Raper, K.  
Ultra structural development of stalk-producing cells in *Dictyostelium discoideum*. A cellular slime mould. *J.Gen. Microbiol.*,70, 477-489, 1972.
38. Gerisch, G.  
Cell aggregation and differentiation in *Dictyostelium*. In "Current Topics in Developmental Biology" (Moscana, A., ve Monry,A., eds.) Vol.3, Academic Press, New York, 1968, s.157-197.
39. Gerisch, G., Malchow,D., Riedel, V., Müller, E., ve Every,M.  
Cyclic AMP phosphodiesterase and its inhibitor in slime mould development. *Nature (London)*, *New Biol.* 235, 90-92, 1972.
40. Gerisch,-G., Beug, H., Malchow, D., Schwarz, H. ve Stein,A.  
Receptors for intercellular signals in aggregating cells of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. In:*Biology and Chemistry of Eukaryotic Cell Surfaces*, 1974.
41. Gerisch, G., Maeda, Y., Malchow, D., Roos, W., Wick, U. ve Wurster, B.  
Cyclic AMP signals and the control of cell aggregation in *Dictyostelium discoideum*. In: *Developments and Differentiation in the Cellular Slime Moulds*. (P.Cappucinelli ve J.M.Ashworth, eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1977, s.105-124.
42. Gezelius, K. ve Wright, B.E.  
Alkaline phosphatase in *Dictyostelium discoideum*. *J.Gen.Microbiol.* 38, 309-327, 1965.

43. Gingell, D., ve Garrod, D.R.  
Effect of EDTA on electrophoretic mobility of slime mould cells and its relationship to current theories of cell adhesion. *Nature(London)*, 221, 192-193, 1969.
44. Goodwin, T.W.  
Sterols in eukaryotic microorganisms. *Cell Biology: Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms*. (Erwin, J.A. ed.) Academic Press, New York, London, 1973, s.20-21.
45. Gregg, J.H.  
Organization and synthesis in the cellular slime molds. In: *The Fungi The fungal organism*. Vol.II (Ainsworth, G.C. ve Sussman, A.J. eds.) Academic Press, N.Y., 1966, s.235-281.
46. Gregg, J.H.  
Prestalk cell isolates in *Dictyostelium*. *Exp.Cell Res.* 51, 633-642, 1968.
47. Gregg, J.H., ve Badman, W.S.  
Morphogenesis and ultra structure in *Dictyostelium*. *Develop.Biol.*, 22, 96-111, 1970.
48. Gregg, J.H. ve Badman, W.S.  
Transitions in differentiation by the cellular slime molds. In: *Developmental Regulation* (J.Stuart ed.) Academic Press, New York, 1973.
49. Gregg, J.H. ve Nesom, M.G.  
Response of *Dictyostelium* plasma membranes to adenosine 3':5'-monophosphate. *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.*, 70, 1630, 1973.

50. Gregg, J.H., Hackney, A.L., ve Krivanek, J.O.  
Nitrogen metabolism of the slime mold *Dictyostelium discoideum* during growth and morphogenesis. *Biol.Bull.*,107, 226-235, 1954.
51. Heftman, E., Wright,B.E. ve Liddel, C.V.  
The isolation of  $\Delta^{22}$ -stigmasten-3 $\beta$ -ol from *Dictyostelium discoideum*. *Arch.Biochem.Biophys.*,91, 266, 1960.
52. Henderson, E.J.  
The Cyclic Adenosine 3':5'-Monophosphate receptor of *Dictyostelium discoideum*. *J.Biological Chemistry*, 250, 4730, 1976.
53. Huffman, D.M., Kahn, A.J., ve Olive, L.S.  
Anostomosis and cell fusions in *Dictyostelium*. *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.*, 48,1160-1164, 1962.
54. Huxley, H.  
Muscular contraction and cell mobility. *Nature*, 243, 445-449, 1973.
55. Jacob, F. ve Monod, J.  
On the regulation of gene activity. *Cold Spring Harbour Symp. Quant.Biol.*, 26, 193-212, 1961.
56. Jacobson, A.  
Analysis of mRNA transcription in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryotes at the subcellular level*. (Last,J. Ed.) Marcel Dekker Inc., 1973, s.161-2
57. Johnson, D.F., Wright, B.E., ve Heftmann, E.  
Biogenesis of  $\Delta^{22}$ -stigmasten-3 $\beta$ -ol in *Dictyostelium discoideum*. *Arch.Bioche Biophys.*,97, 232-235, 1962.

58. Katz, E.R., ve Bourguignon, L.

The cell cycle and its relationship to aggregation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Develop.Biol.*, 36, 82-87, 1974.

59. Klein, C., ve Bracket, P.

Effects of progesterone and EDTA on cyclic AMP and phosphodiesterase in *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 254 (5499), 432-434, 1975.

60. Klein, C., Brachet, P. ve Darmon, P.

Periodic changes in adenylate cyclase and cAMP receptors in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 76(2), 145-147, 1977.

61. Konijn, T.M., Van de Meene, J.G.C., Bonner, J.T., ve Barkley, D.S.

The acrasin activity of adenosine-3'5'-cyclic phosphate. *Proc.Nat. Acad.Sci. U.S.* 58, 1152-1154, 1967.

62. Konijn, T.M., Chang, Y.Y., ve Bonner, J.T.

Synthesis of cyclic AMP in *Dictyostelium discoideum* and *Polysphondylium pallidum*. *Nature(London)*, 224, 1211-1212, 1969.

63. Leach, C.K., ve Ashworth, J.M.

Characterization of DNA from the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* after growth of the amoebae in different media. *J.Mol.Biol.*, 68, 35-48, 1972.

64. Lehninger, A.L.

Replication and Transcription of DNA. *Biochemistry*, Worth Pub.Inc., 5 th ed., Chapter 29, 1971, sh.680.

65. Lehninger, A.L.  
Ribosomes and Replication. Biochemistry, Worth Pub.Inc., 5 th. ed.  
Chapter,30, 1971, sh.704.
66. Levin, E.Y. ve Bloch, K.  
Absence of sterols in blue-green algae. Nature (London) 202,90, 1964.
67. Liddel, G.U., ve Wright, B.E.  
The effect of glucose on respiration of the differentiating slime mold.  
Develop. Biol., 3, 265-276, 1961.
68. Loomis, W.F.Jr.  
The relation between cytodifferentiation and inactivation of a  
developmentally controlled enzyme in Dictyostelium discoideum. Exp.Cell Res  
53, 282-282, 1968.
69. Loomis, W.F.Jr.  
Developmental regulation of alkaline phosphatase in Dictyostelium discoideum  
J.Bacteriol., 100, 417-422, 1969.
70. Loomis, W.F.Jr.  
Role of the surface sheath in the control of morphogenesis in Dictyostelium  
discoideum. Nature(London),New Biol., 240, 6-9, 1972.
71. Loomis, W.F.Jr.  
Dictyostelium discoideum. A Developmental System.Academic Press,  
New York, 1975.
72. Loomis, W.F.Jr. ve Sussman, M.  
Commitment to the synthesis of a specific enzyme during cellular slime  
mold development. J.Mol.Biol., 22, 401-404, 1966.

73. Maeda, Y. ve Takeuchi, I.

Cell differentiation and fine structures in the development of the cellular slime molds. *Develop. Growth Differen.* II, 232-245, 1969.

74. Malchow, D. ve Gerisch, G.

Short-term binding and hydrolysis of cyclic-3':5'-adenosine monophosphate by aggregating *Dictyostelium* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 71, 2423, 1974.

75. Malkinson, A.M. ve Ashworth, J.M.

Extracellular concentrations of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate during axenic growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. J.* 127, 611-612, 1972.

76. Newell, P.C., Telser, A., ve Sussman, M.

Alternative developmental pathways determined by environmental conditions in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *J. Bacteriol.* 100, 763-768, 1969.

77. Newell, P.C., Franke, J., ve Sussman, M.

Regulation of four functionally related enzymes during the shifts in the developmental program of *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.*, 63, 373-382, 1972.

78. Poff, K., Butler, W. ve Loomis, W.F. Jr.

Light induced absorbance changes associated with phototaxis in *Dictyostelium*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 70, 813-816, 1973.

79. Poff, K., Loomis, W.F. Jr., ve Butler, M.

Isolation and purification of the photoreceptor pigment associated with phototaxis in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 249, 2164-2168, 1974.

80. Pong, S.S. ve Loomis, W.F.Jr.  
Multiple nuclear RNA polymerases during development of *Dictyostelium discoideum*. *J.Biol.Chem.*, 248, 3933-3939, 1973.
81. Pong, S.S. ve Loomis, W.F.Jr.  
Replacement of an anabolic threonine deaminase by a catabolic threonine deaminase during development of *Dictyostelium discoideum*. *J.Biol.Chem.*, 248, 4867-4873, 1973.
82. Quance, J. ve Ashworth, J.M.  
Enzyme synthesis in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* during the differentiation of myxamoebae grown axenically. *Biochem.J.* 126, 609-615, 1972.
83. Raper, K.B. Pseudoplasmodium formation and organization in *Dictyostelium discoideum*. *J.E. Mitchell Sci.Soc.*, 56, 241-282, 1940.
84. Raper, K.B. ve Fennell, D.I.  
Stalk formation in *Dictyostelium discoideum*. *Bull.Torrey Bot.Club*, 79, 25-51, 1952.
85. Reitz, R.C. ve Hamilton, J.G.  
The isolation and identification of two sterols from two species of blue-green algae. *Comp.Biochem.Physiol.*, 25, 401, 1968.
86. Rickenberg, H.V.  
Kişisel konuşma ve yazışmalar.
87. Rickenberg, H.V., Rahmsdorf, H.J., Campbell, A., North, M.J., Kwasniak, J., ve Ashworth, J.M.

Inhibition of development in *Dictyostelium discoideum* by sugars.

J.Bacteriol.,124(I) 212-219, 1975.

88. Rickenberg, H.V., Tihon, C., ve Güzel, Ö

Effect of pulses of 3'5' cyclic adenosine monophosphate on enzyme formation in non-aggregated amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *Developments and Differentiation in the Cellular Slime Moulds* (P.Cappuccinelli ve J.M. Ashworth, Eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1977, sh.173-187.

89. Riedel, V. ve Gerisch, G.

Regulation of extracellular cyclic AMP phosphodiesterase activity during development of *Dictyostelium discoideum*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 42, 119-124, 1971.

90. Riedel, V., Malchow, D., Gerisch, G. ve Nagele, B.

Cyclic AMP phosphodiesterase interaction with its inhibitor of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 46, 279-287, 1972.

91. Robertson, A., Drage, D.J. ve Cohen, M.H.

Control of aggregation in *Dictyostelium discoideum* by external periodic pulse of cyclic adenosine monophosphate. *Science*, 175, 333-335, 1971.

92. Roos, W., Nanjundiah, V., Malchow, D. ve Gerisch, G.

Amplification of cyclic AMP signals in aggregating cells of *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 53(2), 139-142, 1975.

93. Rossomando, E.F.

Preparation of a membrane bound adenyl cyclase from *Dictyostelium discoideum* using amphotericin B. *Fed.Proc.Fed.Amer.Soc.Exp.Biol.*, 33, 1362, 1974.

94. Rossomando, E.F., ve Cutter, L.S.  
Localization of Adenylate Cyclase in *Dictyostelium discoideum*, I. Preparation and Biochemical characterizations of cell fractions and isolated plasma membrane vesicles. *Exp.Cell Res.* 95, 67-78, 1975.
95. Rossomando, E.F. ve Sussman, M.  
Adenyl cyclase in *Dictyostelium discoideum*: A possible control element of the chemotactic system. *Biochem.Biophys. Res.Comm.*, 47, 604-610, 1972.
96. Shaffer, B.M.  
Intracellular movement and locomotion of cellular slime mold amoebae. In: *Primitive Motile systems in Cell Biology* (R.D.Allen ve Koniva,N. eds.) Academic Press, 1964, s.387-405.
97. Shaffer, B.M.  
Secration of cyclic AMP induced by cyclic AMP in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 255, 549-552, 1975.
98. Soll, D.R., Yarger, J. ve Mirick, M.  
Stationary phase and the cell cycle of *Dictyostelium discoideum* in Liquid Nutrient Medium. *J.Cell Sci.*, 20, 513-523, 1976.
99. Spudich, J.  
Biochemical and structural studies of actomyosin-like proteins from non muscule cells. II- Purification, Properties and membrane association of actin from amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *J.Biol.Chem.*, 249, 6013, 1974.
100. Sussman, M.  
Biochemical and genetic methods in the study of cellular slime mold developme  
In: *Methods in Cell Physiology*. Vol.II. (Prescott, D.M. ed.) Academic Press N.Y., 1966, s.397-410.

101. Sussman, M. ve Boschwitz, Ch.  
An increase of calcium/manganese binding sites in cell ghosts associated with the acquisition of aggregative competence in *Dictyostelium discoideum*. *Exp.Cell Res.*, 95, 63-66, 1975.
102. Sussman, M. ve Sussman, R.R.  
Patterns of RNA synthesis and of enzyme accumulation and disappearance during cellular slime mould cytodifferentiation. *Symp.Soc.Gen.Microbiol.* 19, 403-435, 1969.
103. Sussman, M., Loomis, W.F.Jr., Ashworth, J.M. ve Sussman, R.R.  
The effect of actinomycin-D on cellular slime mold, morphogenesis. *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 26, 353-359, 1967.
104. Sussman, R.R. ve Sussman, M.  
Ploidal inheritance in the slime mould *Dictyostelium discoideum*: Haploidization and genetic segregation of diploid strains. *J.Gen.Microbiol.* 30, 349-355, 1963.
105. Sussman, R.R. ve Sussman, M.  
Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic medium. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 29, 53-55, 1967.
106. Tuchman, J., Alton, T. ve Lodish, H.  
Preferential synthesis actin during early development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Develop. Biol.*, 40, 116-129, 1974.
107. Watts, D.J. ve Ashworth, J.M.  
Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* 119, 171-174, 1970.

108. White, G.J. ve Sussman, M.  
Metabolism of major cell constituents during slime mold morphogenesis.  
Biochim.Biophys.Acta, 53, 285-293, 1961.
109. Wittingham, W.F. ve Raper, K.B.  
Non-viability of stalk cell in Dictyostelium. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.  
46, 642-649, 1960.
110. Wright, B.E.  
Effects of steroids on aggregation in the slime mould Dictyostelium  
discoideum. Bacteriol.Proc., 87, 115-116, 1958.
111. Yanagisawa, K., Loomis, W.F.Jr. ve Sussman, M.  
Developmental regulation of the enzyme UDP-Galactose Polysaccharide  
Transferase. Exp.Cell Res., 46, 328-334, 1967.
112. Yarger, J. ve Soll, D.R.  
Transcription and division inhibitors in the medium of stationary  
phase cultures of the slime mold Dictyostelium discoideum. Biochim.  
Biophys. Acta, 390, 46-55, 1975.

## ÖZGEÇMİŞ

B.S. Kimya Müh. İstanbul Devlet Mimarlık Mühendislik Akademisi,  
1975,

National Institutes of Health Research Fellowship (NIH-Grant,AM-11046)  
University of Colorado Medical Center, Department of Molecular Biology and  
Genetics, Denver, 1976-1977.

International Workshop, European Molecular Biology Organization,  
University of Sassari, Porto Conte, Sardinia, April, 1977.

III. International Conference on Cyclic Nucleotides , University of Tulane  
New Orleans, July, 1977.

Türkiye Bilimsel Teknik Araştırma Kurumu  
Grant, ÇAĞ-18 , 1979

III. Ulusal Biokimya Kongresi, Mayıs, 1979

XVIII. Türk Pediyatri Kongresi, Haziran, 1979.