

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

136120

**META-TOPOLİN VE OLOMİSİNİN HÜCRE DEVRİ-
POLİAMİN İLİŞKİSİNE ETKİSİ**

Mehmet Ali TÜFEKÇİ

(Biyolog)

(141100620010032)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Meral ÜNAL**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Narçın PALAVAN-ÜNSAL**

İSTANBUL 2003

136120

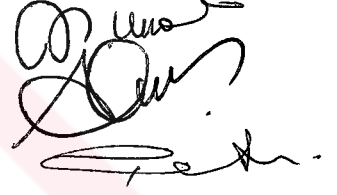
T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABUL VE ONAY BELGESİ

META-TOPOLİN VE OLOMİSİNİN HÜCRE DEVRİ-POLİAMİN İLİŞKİSİNE ETKİSİ

Mehmet Ali TÜFEKÇİ'nin "Meta-Topolin Ve Olomisinin Hücre Devri-Poliamin İlişkisine Etkisi" isimli Lisansüstü tez çalışması, M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28.Temmuz.2003 tarih ve 2003/15.2 sayılı kararı ile oluşturulan jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı YÜKSEK LİSANS Tezi olarak Kabul edilmiştir.

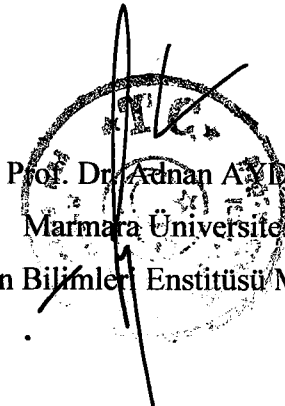
Danışman : Prof. Dr. Meral ÜNAL (Marmara Üniversitesi)
Üye : Prof. Dr. Ali ÇIRPICI (Marmara Üniversitesi)
Üye : Yard. Doç. Dr. Ergül ÇETİN (İstanbul Üniversitesi)



Tezin Savunulduğu Tarih : 21.Ağustos.2003

ONAY

M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ~~28.07.2003~~ tarih ve ~~2003/15-2~~ sayılı kararı ile Mehmet Ali TÜFEKÇİ'nin Biyoloji Anabilim Dalı'nda Y.Lisans (MSc.) derecesi alması onanmıştır.


Prof. Dr. Adnan AYDIN
Marmara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
SUMMARY	iii
YENİLİK BEYANI	iv
KISALTMALAR	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	viii
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER	2
II.1. POLİAMİNLER	2
II.1.1. Yapı ve Özellikleri	2
II.1.2. Poliamin Biyosentezi	3
II.1.3. Poliamin Yıkımı	7
II.1.4. Poliamin Taşınması	9
II.1.5. Fizyolojik Roller	9
II.1.5.1. Bitki Büyümesine etkileri	9
II.1.5.2. DNA-Poliamin Etkileşimi	11

II.1.5.3. DNA ve Protein Sentezine Etkileri	12
II.1.5.4. Apoptosis	12
II.2. SİTOKİNİNLER	14
II.2.1. Sitokinlerin Biyolojik Rollerini	16
II.2.2. Sitokinler ve Poliaminler Arasındaki İlişki	19
II.3. OLOMİSİN	20
BÖLÜM III. TEZ ÇALIŞMALARI	22
III.1. ARAŞTIRMA MATERYALİ	22
III.2. ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ	22
III.2.1. Tohum Çimlenmesinde Kullanılan Yöntem	23
III.2.2. Sitolojik Çalışmalarda Kullanılan Yöntem	23
III.2.3. Poliamin Miktar Tayini	24
III.2.3.1. Kök Uçlarının Poliamin Tayini İçin Ekstraksiyonu	24
III.2.3.2. Poliamin Standartlarının Hazırlanışı	24
III.2.3.3. Benzoilasyon İşlemi	24
III.2.3.4. HPLC Kolonunun Standardizasyonu	24
III.2.3.5. HPLC Analizi	25
III.2.4. Total Protein Miktarını Tayin Etmek İçin Kullanılan Yöntem	25
III.2.5. Peroksidaz Aktivitesini Tayin Etmek İçin Kullanılan Yöntem	26
III.2.6. Diamin Oksidaz (DAO) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	26
BÖLÜM IV. SONUÇLAR	27
IV.1. <i>META</i> -TOPOLİN VE OLOMİSİNİN KÖK UCU HÜCRELERİNDE MİTOTİK ETKİLERİ	27

IV.1.1. <i>Meta</i> -Topolin Ve Olomisinin Kök Ucu Hücrelerinde Mitotik İndekse Etkileri	27
IV.1.2. <i>Meta</i> -Topolin Ve Olomisinin Kök Ucu Hücrelerinde Neden Olduğu Mitotik Anormallikler	29
IV.2. <i>META</i> -TOPOLİN VE OLOMİSİNİN KÖK UCU HÜCRELERİNDE POLİAMİN MİKTARINA ETKİLERİ	31
IV.3. <i>META</i> -TOPOLİN VE OLOMİSİNİN KÖK UCU HÜCRELERİNDE TOTAL PROTEİN MİKTARINA ETKİLERİ	33
IV.4. <i>META</i> -TOPOLİN VE OLOMİSİNİN KÖK UCU HÜCRELERİNDE PEROKSİDAZ (POD) ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİLERİ	35
IV.5. <i>META</i> -TOPOLİN VE OLOMİSİNİN KÖK UCU HÜCRELERİNDE DİAMİN OKSİDAZ (DAO) AKTİVİTESİNE ETKİLERİ	37
BÖLÜM V. TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRMELER	44
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan ve benden moral ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, beni çalışmaya teşvik edip rehberlik eden Prof. Dr. Meral ÜNAL'a teşekkür eder ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca destek ve yardımlarımı benden hiçbir zaman esirgemeyen, laboratuvar imkanlarımı sonuna kadar kullanmama izin veren, Haliç Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı ve ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Narçın PALAVAN-ÜNSAL'a benim için harcadığı tüm enerji ve emekleri için minnetlerimi borç bilir ve teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, hem maddi ve hem de manevi açıdan desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen ve her koşulda yanımda olduklarını düşündüğüm aileme teşekkür ederim. Özellikle tez çalışmalarım sırasında özel özveride bulunan ve hakkını teşekkürlerle ödeyemeceğim abim Osman TÜFEKÇİ'ye tüm desteği için teşekkür ederim.

Tezimin bitmesinde önemli katkısı olan yakın arkadaşım Oya KOZANOĞLU'na ve her an yanımda olan ve moral ve teknik destek sağlayan Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Bölümünde görevli saygıdeğer hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ağustos/2003

Mehmet Ali TÜFEKÇİ

ÖZET

META- TOPOLİN VE OLOMİSİNİN HÜCRE DEVRİ-POLİAMİN İLİŞKİSİNE ETKİSİ

Bu çalışmada aromatik bir sitokin olan *mT* ve bir antisitokin olan ve aynı zamanda CDK inhibitörü olan OLO in *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde hücre bölünmesi-PA ilişkisine etkisi ve bu ilişkiyle ilgili olarak total protein miktarına, peroksidaz aktivitesine ve diaminoksidaz aktivitesine etkileri araştırıldı. *mT* 10 µM ve OLO 100 µM olacak şekilde 14 ve 28 saat olmak üzere iki farklı zaman diliminde uygulandı.

Araştırma sonucunda *mT* nin uygulanan doz ve sürelerde mitotik indeks üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı, OLO in ise her iki süre zarfında da mitotik indekse ket vurduğu tespit edildi. Bunun yanında, her iki maddenin de kromozom köprüleri, mikronukleus ve 2-26 nukleuslu hücreler gibi mitotik anormalliklere neden olduğu gözlemlendi.

PA miktarı üzerine etkileri incelendiğinde *mT* in PA miktarında kayda değer bir etkisinin olmadığı, OLO in 14 saat süreli uygulamada PA miktarını arttırdığı, ancak 28 saat süreli uygulamada ise önemli bir oranda azalmaya neden olduğu gözlemlendi.

mT ve OLO in tüm uygulama sürelerinde total protein miktarında azalmaya neden oldukları tespit edildi. Peroksidaz aktivitesi 28 saat *mT* uygulaması ile azalırken 14 saat *mT* ve tüm uygulama sürelerinde OLO tarafından teşvik edildiği belirlendi. OLO her uygulama süresinde diaminoksidaz aktivitesinde bir artışa neden olurken *mT* in 14. saatte etkili olmayıp 28. saatte bir artışa yol açtığı saptandı.

SUMMARY

THE EFFECT OF *META-TOPOLIN* AND *OLOMOUCINE* ON THE CELL CYCLE-POLYAMINE RELATION

In this study, the effect of aromatic cytokinin *mT* and anticytokinin *OLO* which is an inhibitor of CDK, on the relation of the cell division-PA amount was investigated and total protein, peroxidase activity and diaminoxidase activity were measured in the root tips of *Allium cepa*. *mT* at 10 μM and *OLO* 100 μM concentrations were applied for 14 and 28 hours to the root tips.

Mitotic index was not effected by *mT* but it was inhibited by *OLO* at the treatment times. They caused some irregularities such as chromosomes bridges, micronuclei, 2-26 nucleated cells.

It was observed that *mT* had no significant effect on the amount of P A, whereas *OLO* increased PA amount at 14 hours, whereas it sharply decreased at 28 hours. *mT* and *OLO* caused an decrement at the total protein amount at both treatment times. The activity of peroxidase was inhibited by *mT* at 28 hours stimulated at 14 hours. The peroxidase activity was also enhanced by *OLO* at both treatment times. *OLO* caused an increment at the activity of diaminoxidase at both times, whereas *mT* had no effect at 14 hours but it was increased at 28 hours.

Ağustos, 2003

Mehmet Ali TÜFEKÇİ

YENİLİK BEYANI

META-TOPOLİN VE OLOMİSİNİN HÜCRE DEVRİ-POLİAMİN İLİŞKİSİNE ETKİSİ

Yeni bir aromatik sitokin olan *meta*-topolin ve bir siklin-bağımlı kinaz inhibitörü olan olomisinin hücre bölünmesi sırasınca poliamin miktarı üzerine olan etkileri ilk kez bu çalışmada incelendi. Ayrıca olomisinin bitki hücrelerinde mitoz bölünme sırasında meydana getirdiği anormalliklerin tespiti de ilk kez bu çalışmada gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda olomisinin daha yüksek dozlarda ve uzun süre uygulanması ile bitki hücre bölünmesine ket vuracağını ve buna bağlı olarak kanserli hücre bölünmesinin kontrol altına alınmasında kullanılabileceği, ancak pratikte kullanılmadan önce bu yönde daha fazla çalışma yapılarak, sonuçların daha fazla verilerle desteklenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Ağustos, 2003

Prof. Dr. Meral ÜNAL
Prof. Dr. Narçın PALAVAN-ÜNSAL

Mehmet Ali TÜFEKÇİ

KISALTMALAR

μM	: Mikromolar
4-PU-30	: N ₁ -(2-kloro-4-piridil)-N ₂ -fenilüre
ADC	: Arginin dekarboksilaz
Agm	: Agmatin
BA	: Benziladenin (N ⁶ -benzil adenin)
BAP	: Benzilaminopurin
BSA	: Sığır serum albumin
Cad	: Kadaverin
CDK	: Sikline-bağımlı kinaz
CHA	: Sikloheksilamin
cm	: Santimetre
CPP	: 4-siklopentilamino-2-metilpirrolo[2,3-d]pirimidin
DAO	: Diamin oksidaz
Dap	: Diaminopropan
DFMA	: α -difluorometilarginin
DFMO	: α -difluorometilornitin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dSAM	: Dekarboksile S-adenozilmetiyonin
HPLC	: Yüksek basınç sıvı kromatografisi
LCD	: Lisin dekarboksilaz
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MPF	: Olgunlaşma hızlandırıcı faktör ya da M faz hızlandırıcı faktör
mT	: <i>Meta</i> -Topolin [6-(3-hydroxybenzylamino)purine]
N	: Normal
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
ODC	: Ornitin dekarboksilaz
OLO	: Olomisin (6-benzilamino-2-(hidroksietilamino)-9-metilpurin)
PA	: Poliamin
PAO	: Poliamin oksidaz
PC	: N-(4-piridil-O-4klorofenil)-karbamat
ppm	: Milyonda bir
Put	: Putresin
RNA	: Ribonükleik asit

SAM	: S-Adenozilmetiyonin
SAMDC	: S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz
SDS	: Sodyumdodesilsulfat
SDS-PAGE	: Sodyumdodesilsulfat poliakrilamid jel elektroforezi
Spd	: Spermidin
Spm	: Spermin
SSAT	: Spermidin/Spermin N ¹ -asetil transferaz
TCA	: Trikloroasetik asit
TEMED	: (N, N, N ² ,N ² -tetrametilenetilendiamin)
V	: Volt



ŞEKİL LİSTESİ

		<u>SAYFA NO</u>
Şekil II.1	PA lerin genel yapı formülleri	3
Şekil II.2	Bitkilerde putresin sentezi	4
Şekil II.3	Bitkilerde putresinden spermidin ve spermin sentezi	6
Şekil II.4	Poliamin yıkımı	8
Şekil II.5	Benzil adenin ve <i>meta</i> -Topolin'in yapısal formülleri	15
Şekil II.6	Sitokininlerin hücre devri üzerindeki etkileri	18
Şekil II.7	Olomisinin kimyasal formülü	20
Şekil II.8	Olomisinin bitki hücre devrinde etkili olduğu evreler	21
Şekil IV.1.1.1	<i>Meta</i> -topolin ve olomisinin <i>Allium cepa</i> kök ucu hücrelerinde mitotik indekse etkileri	28
Şekil IV.1.2.1	<i>Allium cepa</i> tohumlarının kontrol grubunun kök uçlarından hazırlanan ezme preparatlardan çekilmiş a. interfaz ve b. profazdaki hücreler	39
Şekil IV.1.2.2.A	<i>Allium cepa</i> tohumlarının 28 saat süreyle, 10 µM <i>meta</i> -topolin uygulanan kök uçlarında. a. 3 nukleuslu hücre ve b. çok nukleuslu hücre	40
Şekil IV.1.2.2.B	<i>Allium cepa</i> tohumlarının 28 saat süreyle, 10 µM <i>meta</i> -topolin uygulanan kök uçlarında. a. ve b. çok nukleuslu hücreler	41
Şekil IV.1.2.3	<i>Allium cepa</i> tohumlarının 28 saat süreyle, 100 µM olomisin uygulanan kök uçlarında. a. profazda kromozomları tek kutba doğru yönelmiş hücre, b. metafazda tek kutba doğru yönelmiş kromozomlar	42
Şekil IV.1.2.4	<i>Allium cepa</i> tohumlarının 28 saat süreyle, 100 µM olomisin uygulanan kök uçlarında. a. anafaz, B. anafazda kromozom köprüsü	43
Şekil IV.2.1	<i>Meta</i> -topolin ve olomisinin uygulamasının <i>Allium cepa</i> kök ucu hücrelerinde poliamin miktarına etkisi	32
Şekil IV.3.1	<i>Meta</i> -topolin ve olomisinin <i>Allium cepa</i> kök ucu hücrelerinde total protein miktarına etkisi	34
Şekil IV.4.1	<i>Meta</i> -topolin ve olomisinin <i>Allium cepa</i> kök ucu hücrelerinde peroksidaz aktivitesine etkisi	36
Şekil IV.5.1	<i>Meta</i> -topolin ve olomisinin <i>Allium cepa</i> kök ucu hücrelerinde diammin oksidaz aktivitesine (DAO) etkisi	38

TABLO LİSTESİ

	<u>SAYFA NO</u>
Tablo III.2.1	Araştırma düzeni 22
Tablo IV.1.1.1	<i>Meta</i> -topolin ve olomisinin kök ucu hücrelerinde mitotik indekse etkileri 28
Tablo IV.1.2.1	<i>Meta</i> -topolin ve olomisinin <i>Allium cepa</i> kök ucu hücrelerinde meydana getirdiği mitotik anormallikler 30
Tablo IV.2.1	<i>Meta</i> -topolin ve olomisin uygulamasının <i>Allium cepa</i> kök ucu hücrelerinde poliamin miktarına etkisi 31
Tablo IV.3.1	<i>Meta</i> -topolin ve olomisin kök ucu hücrelerinde total protein miktarına etkileri 33
Tablo IV.4.1	<i>Meta</i> -topolin ve olomisin kök ucu hücrelerinde peroksidaz (POD) enzim aktivitesine etkileri 35
Tablo IV.5.1	<i>Meta</i> -topolin ve olomisin kök ucu hücrelerinde diaminoksidaz (DAO) aktivitesine etkileri 38

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Poliaminler (PA) tüm canlı organizmaların hücrelerinde bulunan düşük moleküler ağırlıklı, polikasyonik maddelerdir. Bitkilerde diamin putresin (Put), diamin kadaverin (Cad), triamin spermidin (Spd) ve tetraamin spermin (Spm) olmak üzere 4 tiptir. PA ların nükleik asit sentezi, hücre bölünmesi, senesensin inhibisyonu ve tohum çimlenmesi gibi büyüme ve gelişme ile ilgili birçok olayda etkili oldukları bilinmektedir (Martin-Tanguy 2001)

Sitokininler fitohormonlar olarak da adlandırılan bitki büyüme düzenleyicilerinin bir grubudur. Bitki hücre devrinin spesifik evrelerinde önemli etkilere sahiptirler. Son yıllarda Çek araştırmacılar Strnad ve ark. (1997) kavak bitkisinden yeni bir aromatik sitokinin izole etmişler ve Çek dilinde kavak anlamına gelen topol kelimesinden esinlenerek *meta-topolin (mT)* adını vermişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar sikline-bağımlı kinazların spesifik inhibitörü aromatik sitokinin analogu olomisini (OLO) keşfetmişlerdir (Vesely ve ark. 1994). Hücre büyümesi ve bölünmesinde zıt etkilere sahip bu iki maddenin hücre devri-PA ilişkisine etkisi kök uçlarında araştırılacaktır.

Önemli bir bitki büyüme düzenleyicisi olan sitokininlerden benzil adenine alternatif olarak sunulan *mT* bitki büyüme ve gelişmesindeki etkinliğini ortaya koyabilmek bu araştırmanın hedeflerinden birini oluşturmaktadır. Ayrıca sikline bağımlı kinazların spesifik inhibitörü olomisinin de hücre büyüme ve bölünmesindeki aktivitesini belirleyerek, bu verilerin kanserojenik doku büyümesini kontrolde uygulanabilirliğini saptayabilmek de amaçlandı. Bu çalışmanın esas önemli amacı ise literatürde boşluk teşkil eden, mitotik aktivite ile çok yakından ilişki gösteren PA ların bu aromatik sitokinin ve antisitokinin ile etkileşimlerini ortaya koyabilmektir.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. POLİAMİNLER

II.1.1 Yapı ve Özellikleri

Poliaminler (PA) düşük moleküler ağırlıklı, amino ve imino grubu içeren alifatik hidrokarbonlardır. En yaygın formları; diamin putresin (Put), triamin spermidin (Spd) ve tetraamin spermin (Spm) dir (Şekil II.1.). PA ler hücre farklılaşması ve normal hücre büyümesi için gerekli organik polikasyonlardır ve fizyolojik pH da birincil ve ikincil amino grupları protonlanmış haldedir. Put ve Spd hemen hemen tüm yaşayan canlılarda bulunmasına rağmen Spm pekçok prokaryotta bulunmaz. PA ler hücre içerisinde DNA, RNA ve fosfolipidler gibi negatif yük taşıyan moleküllerle elektrostatik olarak etkileşim halindedirler. Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi inorganik kasyonlarla karşılaştırıldığında, pozitif yüklü olmalarının yanında, onlardan farklı olarak yapılarında bulundurdıkları metilen grupları arasında da hidrofobik etkileşimler olduğu görülmüştür. Bu özelliklerinden dolayı inorganik kasyonlardan daha kuvvetli ve spesifik bağlanmalar meydana getirirler (Marton ve Pegg 1995, Thomas ve Thomas 2001)

Putresin



Kadaverin



Spermidin



Spermin

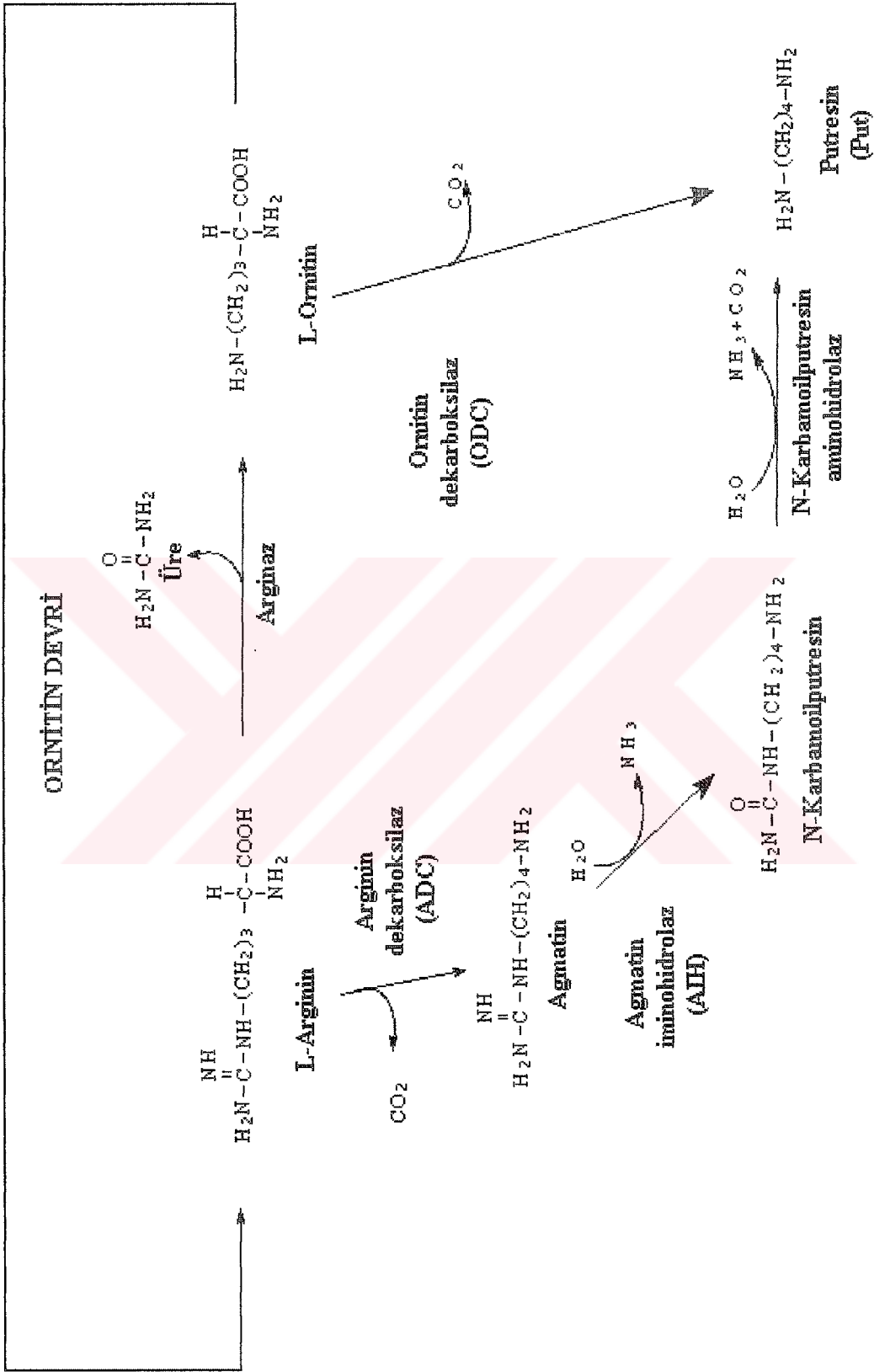


Şekil II.1.: PA lerin genel yapı formülleri.

Hücrenin büyüme ve diğer görevlerini yerine getirebilmesi için PA lerin belirli konsantrasyonlarda bulunması gereklidir. Hücre içi PA düzeyi sentez, yıkım ve dışarıdan alımla düzenlenmektedir. Hücre içi PA düzeyi azaldığında, hücre büyümesi ve bölünmesi durmaktadır, fakat bu düşüşün sonucu olarak hücre ölümü meydana gelmemektedir (Balasundaram ve ark. 1993). Hormonlar ya da büyüme faktörleri ile uyarılma, hücre içi PA konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır, hızlı bölünen hücrelerde PA düzeyi oldukça yüksektir. Genellikle Spd ve Spm milimolar konsantrasyonda bulunurken, Put düzeyi daha düşüktür (Morgan 1990, Watanabe ve ark. 1991, Igarashi ve Kashiwagi 2000). Bununla birlikte hücre içerisindeki PA lerin çoğunluğu nükleik asitler ve diğer negatif yüklü yapılara bağlı olarak bulunmaktadır. Bu nedenle, serbest ve reaktif PA konsantrasyonu total konsantrasyona göre çok daha düşüktür.

II.1.2. Poliamin Biyosentezi

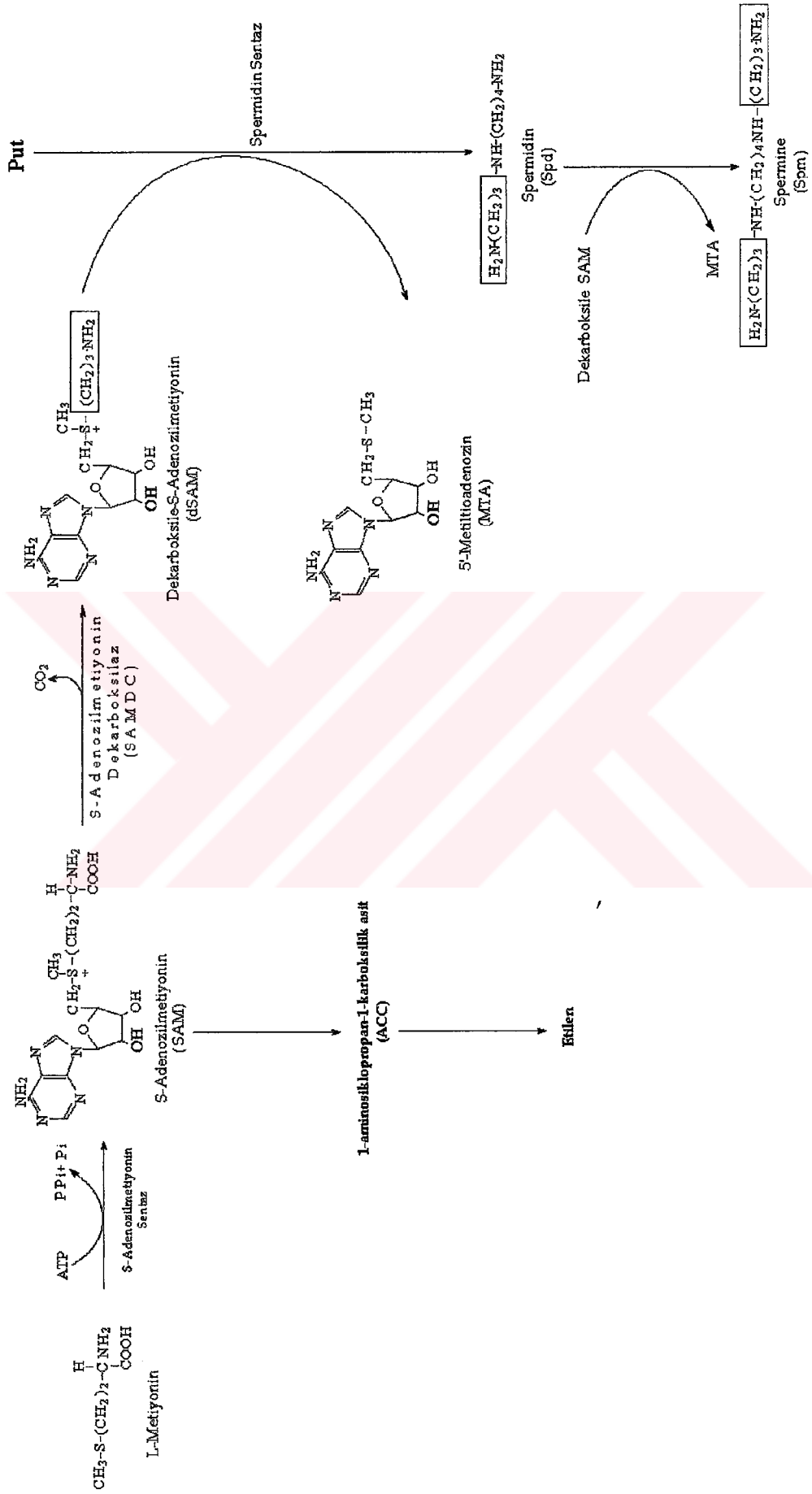
Memelilerde ve mantarlarda PA lerin biyosentezinin kontrolü iki anahtar enzim tarafından kontrol edilmektedir. Bunlardan birincisi, ornitin dekarboksilazdır (ODC; EC 4.1.1.17) ve ornitinden bir karboksil grubunu ayırarak Put oluşumunu katalizler (Şekil II.2). İkinci enzim S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz ise (SAMDC; EC 4.1.1.50), S-adenozil metiyoninin dekarboksile formunun (dSAM)



Şekil II.2.: Bitkilerde putresin sentezi (Tiburcio 1997 den değiştirilerek).

oluşumunu katalizler. dSAM, Put in Spd ve Spm ye dönüşümünde aminopropil alıcısı olarak işlev görür. Amino propil grubunun transferi Spd sentaz (EC 2.5.1.16) ve Spm sentaz (EC 2.5.1.22) enzimleri tarafından kataliz edilmektedir (Şekil II.3). Bakterilerdeki PA metabolizması mantarlar ve memelilerinkinden farklı ancak bitkilerdeki ile aynıdır. Bakteri ve bitkilerde Put in üretimi için iki farklı yol kullanılmaktadır. Bunlardan ilki ODC nin katalizörlüğünde meydana gelir ve diğeri ise argininin arginin dekarboksilaz (ADC; EC 4.1.1.19) enzimi tarafından dekarboksile edilmesiyle gerçekleşir. Bitkilerde ilk olarak agmatin (Agm) agmatin iminohidrolaz katalizörlüğünde N-karbamoil putresine dönüşür ve sonuç olarak N-karbamoilputresin amidohidrolaz katalizörlüğünde Put oluşturulur. Ayrıca S-adenosil metiyonin (SAM) hem PA biyosentezinde metil grup alıcısı ve hem de 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit yoluyla etilenin öncü maddesi olma özelliği taşımaktadır. Heriki mekanizma da SAMDC tarafından düzenlenmektedir (Evans ve Malmberg 1989). Bundan başka bazı bitkilerde SAM ın metil grubu, Put-N-metil-transferaz tarafından Put a aktarılmakta ve N-metil-Put oluşmaktadır (Tiburcio ve ark. 1990, Hibi ve ark. 1994).

Bitkilerde Put sentezi için iki alternatif yolun (ADC/ODC) bulunuşu, bitkinin farklı olayları için özel düzenlemelere bağlı olarak, iki enzimin farklı bölgelerde yerleşmesinin sonucu olduğu şeklinde açıklanmaktadır (Galston ve Kaur-Sawhney 1995). ADC aktivitesinin hayvanlarda da görüldüğü saptanmıştır (Li ve ark. 1994, Gilad ve ark. 1996) fakat ADC hayvanların özel dokularında Put sentezi için pek de önemli olmayan bir üretim yoludur. PA ler vakuollerde, mitokondrilerde ve kloroplastlarda yer alırlar (Slocum 1991). Son yıllarda, PA lerin ıspanağın tilakoid membranlarında, light-harvesting complex ve fotosistem II (Borrell ve ark. 1995) ile bağlantılı olarak bulunduğu gözlenmiştir. Yulaf ADC enzimine karşı üretilmiş bir antikor ile yapılan araştırmada, bu enzimin kloroplastın tilakoid membranlarında yer aldığı gösterilmiştir (Borrell ve ark. 1995). Ayrıca aynı araştırmada ADC nin kloroplastlarda yerleşmesini göz önünde bulundurarak, PA lerin osmotik stres kaynaklı senesensten korunmak amacıyla fotosentetik aktiviteye bağlı olarak üretildiği sonucunu ortaya atmışlardır. SAMDC ve Spd in genellikle sitoplazmada, ODC nin ise nukleusta bulunduğu saptanmıştır (Slocum 1991). ODC nin biyolojik yarı ömrü genelde 1 saatten daha az, bazen ise birkaç dakikadır. Tütünde bulunan SAMDC oldukça kısa bir yarı ömre sahiptir. SAMDC sentezinin PA ler (Spd ve Spm) tarafından baskılanması, bitkinin PA biyosentezinin düzenlenmesinde



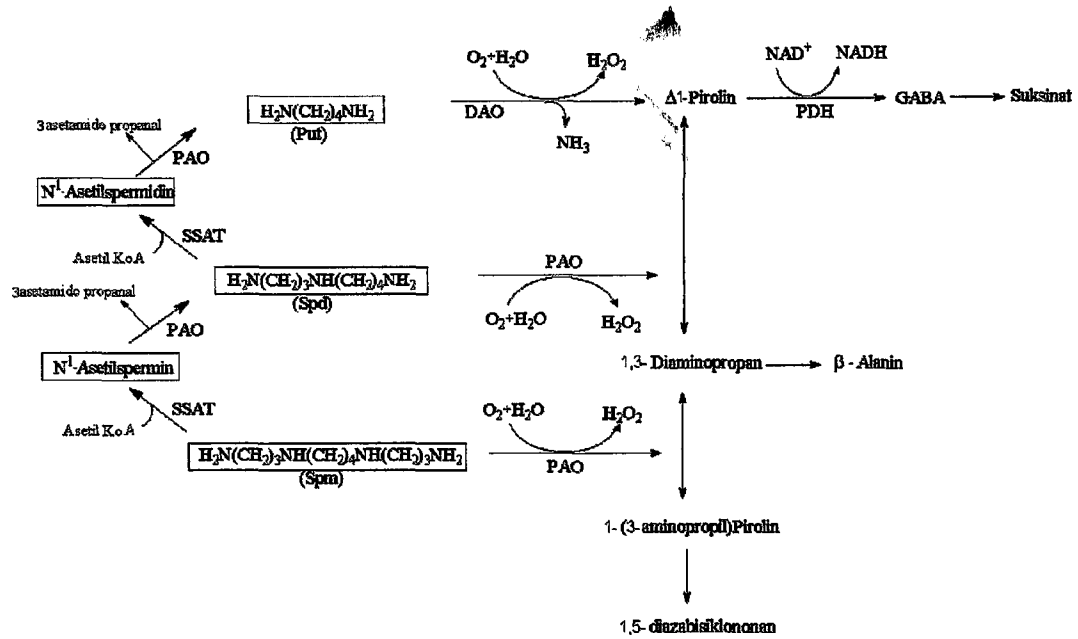
Şekil II.3.: Bitkilerde putresinden spermidin ve spermin sentezi (Tiburcio 1997 den değiştirilerek).

oldukça önemlidir (Slocum 1991). Hayvan sistemlerinde bazı PA biyosentez enzimlerinin nasıl düzenlendikleri belirlenmiştir (Heby ve Persson 1990). Örneğin, ODC transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel olarak düzenlenmektedir (Hayashi ve Murakami 1995). Bitkilerde SAMDC ve ADC post-translasyonel olarak düzenlenmektedir (Malmberg ve Cellino 1994, Borrell ve ark. 1996). Bu sebeple SAMDC öncü protein olarak sentezlenir ve daha sonra aktif enzim haline getirilir ancak bu aşamada memeliler ya da mayalardakinden farklı olarak enzim aktivitesi Put tarafından uyarılmaz (Schröder ve Schröder 1995). Bununla birlikte, yulafta ADC öncü madde olarak sentezlenir ve Spm tarafından inhibe edilen bir reaksiyonla parçalanarak aktif enzim haline dönüştürülür (Borrell ve ark. 1996). Son yıllarda *Arabidopsis thaliana*'da yapılan çalışmalarda potasyum eksikliğinde ADC aktivitesinin arttığı ancak protein ve mRNA düzeyinde bir değişiklik olmadığı bulunmuştur (Watson ve Malmberg 1996).

Diamin kadaverinin (Cad) (Şekil I.1.) dahil olduğu diğer bazı PA lerin de bitkilerde bulunduğu tespit edilmiştir. Cad, lisinden lisin dekarboksilaz (LDC; EC 4.1.1.18) aktivitesi ile meydana gelir. LDC aktivitesinin kloroplastın stromasında yer aldığı bulunmuştur (Slocum 1991). Bazı az rastlanan uzun zincirli PA lerinde (kaldin, termin, kaldopentamin) bitkilerdeki varlığı tespit edilmiştir. Ancak bu PA ler uygun olmayan ortamlarda büyüyen bitkilerde kuraklık ve/veya sıcaklık stresine karşı korunmak amacıyla üretilmektedir (Philipps ve Kuehn 1991). Uzun zincirli PA ler, mikrobiyal sistemlerde osmotik parçalanmaya karşı koruma amaçlı olarak üretilmektedir ve enzimleri denatürasyona karşı korumaktadırlar (Philipps ve Kuehn 1991).

II.1.3. Poliamin Yıkımı

Günümüze kadar PA biyosentezi ile ilgili birçok çalışma olmasına rağmen, yıkımları hakkında çok daha az veri bulunmaktadır. PA lerin katabolizması için iki temel yol bulunmaktadır: Birincisi PA lerin birbirlerine dönüştürülmesi, diğeri ise tekrar PA leri oluşturamayacak şekilde amino aldehitlere okside olmalarıdır. (Şekil II.4) (Casero ve Pegg 1993, Seiler 2000). PA lerin birbirlerine dönüşümü, spermidin/spermin N¹-asetiltransferaz (SSAT, EC 2.3.1.57) ın katalize ettiği asetilasyon reaksiyonu ile başlar. Bu reaksiyonda asetil koenzim A nın asetil grubu, Spd ya da Spm in aminopropil grubuna transfer edilir. Meydana gelen N¹-asetil



Şekil II.4.: Poliamin yıkımı (Tiburcio 1997 den değiştirilerek).

spermidin ya da N¹-asetil spermin daha sonra flavinadenindinukleotid içeren poliamin oksidazlar (PAO, EC 1.4.3.4.) tarafından okside edilir. Bu oksidasyon sırasında ikinci amino grubunun ayrılması ile 3-asetamidopropanal ve subsrata bağlı olarak Put ya da Spd meydana gelir. PA ler ve asetile formları bakır içeren diamin oksidazlar (DAO, 1.4.3.6.) için substrat teşkil ederler. Bu enzimler lignifikasyon ve süberizasyon görülen dokuların hücrelerinin, hücre duvarlarına bağlı olarak bulunurlar (Federico ve Angelini 1991).

DAO nun Put ile olan reaksiyonun ürünleri pirolin, hidrojen peroksit ve amonyaktır. PAO nun ürünleri Spd ile olan reaksiyondan pirolin, diaminopropan (Dap) ve hidrojen peroksit, Spm ile olan reaksiyonun ise 1,5 diazabisisklononan, Dap ve hidrojen peroksittir. Dap β-alanine ve pirolin de pirolin dehidrogenaz katalizörlüğünde γ-aminobütirik aside dönüştürülebilir (Şekil II.4). γ-aminobütirik asit devam eden transaminasyon ve oksidasyon reaksiyonlarıyla Krebs devrinde rol alan suksinik asite dönüştürülür. PA katabolizmasında görevli enzimlerin ve ayrıca bu enzimlerin aktivitesi sonucunda oluşan ürünler hücre içi PA lerin eliminasyonundan başka diğer bazı önemli fizyolojik olaylarda da etkili oldukları gösterilmiştir (Aribaud ve Martin-Tanguy 1994; Martin-Tanguy 1997).

Hücre içi PA miktarı PA yıkımının dışında biyosentez enzimlerinin aktivitesinin durdurulması ya da yıkımı ile de düzenlenir. Hücre içi PA miktarı arttığında, hücrede antizim adı verilen proteinler sentezlenir. Antizimler, ODC ye

spesifik olarak bağlanarak ODC aktivitesini inhibe ederler. Böylece hücre içi PA miktarı dengelenir (Hayashi ve ark. 1995).

II.1.4. Poliamin Taşınması

Hücreler, ihtiyaçları oldukları zaman PA leri üretme yeteneğinde olmalarına rağmen, hücreler dış kaynaklı PA leri hücre içine alabilmek için taşıma sistemlerine sahiptirler. Yüksek bitkilerde, hücresel düzeyde PA alımı oldukça hızlıdır. PA alım mekanizması oksin tarafından uyarılan aktif bir mekanizmadır ve hücre içine alınan PA ler çoğunlukla vakuol içerisinde depolanırlar (Bagni ve Pistocchi 1991). PA lerin organellere taşınması sırasında tonoplasttan ve mitokondrilere geçişleri sırasında membran potansiyeline bağlı olarak aktif taşınma ile matrikse alındıkları bulunmuştur (Pistocchi ve Bagni 1990). Plazmalemmadan PA geçişi enerji gerektiren bir olaydır ve ayrıca bu mekanizmanın işleyişi için kalsiyum gereklidir (Pistocchi ve ark. 1990). Kalmoduline antogonize ya da protein kinazları ve fosfatazların aktivitesini inhibe eden kimyasalların uygulanması ile Ca^{2+} ye bağlı Put alımının önemli derecede azaldığı Antognoni ve ark. (1995) tarafından gösterilmiştir.

II.1.5 Fیزیolojik Roller

II.1.5.1. Bitki Büyümesine Etkileri

PA lerin bitkilerin pekçok büyüme evresinde etkili oldukları bilinmektedir. Bu olaylardan bazıları şunlardır; embriyogenez, kök oluşumu ve büyümesi, çiçeklenme, meyve gelişimi, polen tüpü oluşumu ve senesens.

Montague ve ark. (1978) havuç doku kültürü sisteminde kallusları, embriyo oluşturmak üzere aktardıkları besiyerlerine aldıklarında ADC aktivitesinde ve Put miktarında artış olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmaya paralel olarak yapılan bir araştırmada ADC inhibitörü α -difluorometil arginin (DFMA) kullanılarak somatik embriyogenezin engellendiği, DFMA ile birlikte Put uygulandığında embriyo oluşumunun tekrar başladığı bulunmuştur (Feirer ve ark. 1984).

PA lerin kök oluşumu ve büyümesi üzerindeki etkileri birçok bitkide çalışılmıştır. En fazla çalışılan bitkiler ise *Phaseolus* ve *Vigna* dır. Bitkiden parçalar alınarak indol bütirik asit muamele edildiğinde, köklenmenin başlamasından hemen önce, hipokotillerde Put, Spd ve Spm düzeyinde bir artış meydana geldiği, ayrıca

eksojenik Spm muamelesi ile kök sayısının arttığı gösterilmiştir. Ayrıca *Phaseolus*'un kök büyümesinde, Put sentezinde önemli bir eleman olan ADC nin oldukça aktif olduğu gösterilmiştir (Palavan-Ünsal 1987). ADC nin inhibisyonu ile kök büyümesinin durduğu ve Put ilavesi ile tekrar büyümesine devam ettiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Ünal ve ark (2002) arpada yaptıkları çalışmada Put muamelesi ile kök uzamasının teşvik edildiğini, Put biyosentez inhibitörü olan α -diflorometil ornitin (DFMO) ise kök uzamasına ket vurduğunu göstermişlerdir.

Kaur-Sawhney ve ark. (1988) çiçek tomurcuğu ve vejetatif tomurcuk oluşturmak üzere kurdukları iki farklı doku kültürü sisteminde yaptıkları çalışmada, çiçek tomurcuğu oluşturmak üzere kullandıkları eksplantlarda, Spd miktarının 4.5 kat daha fazla olduğunu kaydetmişlerdir. Bu sonucu desteklemek amacıyla ortama Spd biyosentez inhibitörü olan sikloheksil amin (CHA) eklendiğinde çiçek tomurcuğu oluşumu, vejetatif tomurcuk oluşumuna yönelmiştir.

Domates çiçeklerinin gelişen ovaryumlarında ODC aktivitesinin oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (Heimer ve ark. 1982). Bu gelişim sırasında Put düzeyi artmakta, Spd ve Spm düzeyinde önemli bir değişiklik meydana gelmemektedir.

PA lerin meyve gelişiminde de etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Biasi ve ark. (1988) elma ile yaptıkları çalışmada, meyve gelişiminin erken evrelerinde PA düzeyinin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı bitki üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise meyveler üzerine Put püskürtüldüğünde meyve gelişim hızında bir artış kaydedilmiştir (Costa ve Bagni 1983).

Polen tüpü oluşumu sırasında PA üretiminin arttığı, radyoaktif arginin kullanılarak gösterilmiştir. Prakash ve ark. (1988) *Catharanthus*'un *in vitro* polen tüpü büyümesinin 0,01 mM Spd uygulaması ile arttığını, ancak konsantrasyonun 0,1 mM a ulaştığında ket vurucu etkisinin olduğu saptanmıştır.

SAM kullanımından dolayı PA ler ve etilen üretimi rekabet içerisindedir. Etilen ve PA lerin bu özelliğinden yola çıkarak, PA lerin meyve gelişimi ve senesens üzerine etkili oldukları saptanmıştır. Bu veriye dayanarak, eksojenik PA uygulamasının senesensi geciktirdiği, PA düzeyindeki bir düşüşün ise senesensi başlattığı bulunmuştur. Ayrıca yulaf yaprakları kesilerek karanlıkta bekletilmiş ve ortama PA eklendiğinde senesensde gecikme olduğu görülmüştür (Galston ve ark. 1983). Bu gecikmenin PA ler tarafından klorofil yıkımının engellenmesi ve RNaz ve proteazların inhibisyonundan kaynaklandığı tespit edilmiştir.

II.1.5.2. DNA-Poliamin Etkileşimi

Poliaminlerin en önemli özelliklerinden biri nükleik asitlerle etkileşim göstermeleri ve özellikle DNA ya bağlanmalarıdır. Çift sarmal yapının dar ve geniş boşlukları arasına girip, nükleik asit bazlarıyla etkileşirler, DNA'nın fosfat gruplarının nötralizasyonunu sağlarlar ve (Feuerstein ve ark. 1991, Tippin ve Sundaralingam 1997, Deng ve ark. 2000). konsantrasyona bağlı olarak DNA'nın erime ısisını arttırlar (Thomas ve Bloomfield 1984). Fizyolojik Spm konsantrasyonu, erime ısisını 10-20 °C arttırmaktadır. Bu veri PA lerin *in vivo* da DNA yapısının kararlılığını arttırmakta önemli olabileceklerini göstermektedir. PA lerin DNA ya bağlanmasının diğeri bir sonucu ise çıplak DNA ya (Gosule ve Schellman 1976, Pelta ve ark. 1995) ve kromatine bağlandığında (Sen ve Crothers 1986) DNA kondensasyonunu sağlamasıdır. Spd ve Spm ile yapılan immünoisitokimyasal çalışmalar, PA lerin oldukça kompakt yapıda olan mitotik kromozomlarla bağlantılı olduğunu göstermiştir (Hougaard ve ark. 1987, Sauve ve ark. 1999). Bu nedenle PA ler hücre devri sırasında kromatin yapısı üzerinde düzenlemeden daha çok stabilizasyon etkisine sahiptir (Laitinen ve ark. 1998).

PA ler DNA'nın konformasyonel değışimlerine de sebep olmaktadır. Bağlanmalarıyla sağı dönümlü B-DNA'nın sola dönümlü Z-DNA ya dönüşümünü hızlandırdıkları (Thomas ve ark. 1991, Hasan ve ark. 1995) ya da sağı dönümlü heliksin alternatifi olan A-DNA dönüşümü (Jain ve ark. 1989) sağladıkları gözlenmiştir. Z-DNA purin-primidin dizilerinin değışimiyle meydana gelir ve transkripsiyonel kontrolde önemlidir (Hebert ve ark. 1999). Diğeri yandan DNA sarmalının geniş boşluğuna bağlanarak, DNA'nın konformasyonel değışimini sağladıkları ve böylece transkripsiyonu düzenledikleri saptanmıştır (Feuerstein ve ark. 1986, Rouzina ve Bloomfield 1998). PA ler DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarını nötralize ederek DNA'nın konformasyonel değışimini hızlandırır ve bu değışim için gerekli enerjiyi düşürürler, ayrıca DNA-protein etkileşimini arttırlar. DNA'nın konformasyonel değışimi gen ekspresyonunun transkripsiyonel düzenlenmesi için oldukça önemlidir (Coulombe 1999). PA konsantrasyonunun birkaç transkripsiyon faktörünün DNA ya bağlanmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Thomas ve Thomas 1993, Desiderio ve ark. 1999). PA lerin transkripsiyon faktörlerinin sentezini düzenlediğı ya da fosforilasyon yoluyla DNA ya bağlanma

aktivitesinin ayarlandığı sinyal iletilmesinde yer aldıkları gösterilmiştir (Wang ve ark. 1999, Pfeffer ve ark. 2000, Wang ve ark. 2001).

II.1.5.3. DNA ve Protein Sentezine Etkileri

Hücreler PA lerdan yoksun bırakılacak olursa, bu durumdan ilk olarak DNA ve protein sentezinin etkilendiği görülür. PA biyosentez inhibitörleri uygulamasında (Fredlund ve Oredsson 1996a, Fredlund ve Oredsson 1996b) ya da PA biyosentezi yapamayan kültür hücrelerinin dış kaynaklı PA lerin yokluğunda (Laitinen ve ark. 1998) DNA replikasyonu olumsuz yönde etkilenmektedir. Koza ve Herbst (1992) PA lerdan yoksun hücrelerden izole ettikleri nukleusların, kontrollere göre % 70-80 oranında daha az DNA sentezleyebildiklerini bildirmişlerdir. Bu tip hücreler Okazaki fragmentlerine eşit boyutta DNA fragmentleri üretebilmektedirler (Pohjanpelto ve Hölttä 1996). PA eksikliği uzun süren hücrelerin kromatinleri nukleazlara karşı oldukça hassastırlar (Snyder 1989, Basu ve ark. 1992, Laitinen ve ark. 1998). Protein sentezinde PA eksikliği polizom oluşumunu zayıflatır (Hölttä 1985), bunun sonucunda protein sentezinin başlaması ve/veya uzaması azalır (Takemoto ve ark. 1983). Tüm bu etkiler PA lerin bağlanma yetenekleriyle ve mRNA, tRNA ve rRNA nın sekonder yapısı üzerindeki etkileri ile açıklanmıştır (Yoshida ve ark. 1999, Igarashi ve Kashiwagi 2000).

II.1.5.4. Apoptosis

Programlanmış hücre ölümü olan apoptosis ve hücre büyümesi birbirinin zıttı iki olaydır. PA ler hücre büyümesinin yanında apoptosisin düzenlenmesinde de görevlidirler. Paradoksal olarak apoptosiste hızlandırıcı, ayarlayıcı ya da koruyucu ajanlar olarak hareket ederler (Schipper ve ark. 2000).

Uzun yıllardır uygun olmayan koşullarda PA lerin hücre üzerinde toksik etkileri olduğu bilinmektedir (Gahl ve Pitot 1979). Aşırı yüksek PA konsantrasyonunun hücre büyümesi üzerinde zararlı olduğu ve hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Poulin ve ark. 1993). Bu ölümün doğal bir olay olan apoptosis olduğu kanıtlanmıştır (Tome ve ark. 1994, Tobias ve Kahana 1995, Xie ve ark. 1997). Spd ve Spm nin serum amin oksidazları ile oksidasyonu sonucu meydana gelen hidrojen peroksit ve amino aldehitler kuvvetli apoptotik ajanlardır (Parchment ve ark. 1989). Bununla birlikte, PA lerin oksidasyon olmadan da apoptosise yol

açtıkları (Bruton ve ark. 1991, Mitchell ve ark. 1992, Alhonen ve ark. 2000) fakat bunu hangi mekanizmayla gerçekleştirdikleri tam olarak bilinmemektedir.



II.2. SİTOKİNİNLER

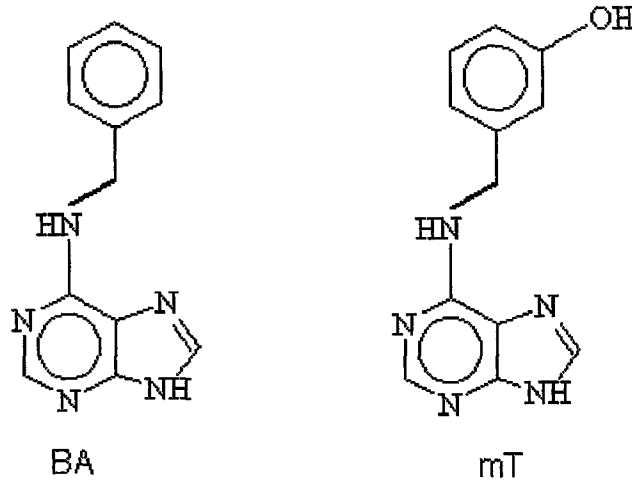
Bitkilerin büyüme ve gelişmesinde birçok etkinlikleri kontrol altına alan önemli içsel faktörlerden biri bitki hormonlarıdır (fitohormonlar). Bitki hormonları, bitkinin belli bir yerinde üretilip başka bir yapı ya da organa taşınarak orada etkinliğini gösteren organik maddeler olarak tanımlanabilirler. Büyüme ve gelişme olaylarındaki etkinliklerinden ve onları düzenleyici rollerinden dolayı bitki hormonları birçok araştırmacı tarafından daha geniş kapsamlı olarak **Bitki Büyüme Maddeleri** veya **Bitki Büyüme Düzenleyicileri** olarak da adlandırılır. Bu geniş tanımların içine bitki tarafından meydana getirilmeyip, hormon aktivitesine sahip maddeler de girmektedir.

Bitki hormonlarının bir grubunu da sitokinler oluşturmaktadır. Sitokinler, ilk olarak bitkilerde bölünmeyi teşvik edici faktörleri araştırma çalışmaları sırasında keşfedilen bitki hormonlarıdır. 1913 te Gottlieb Haberlandt, floemde bulunan bir bileşiğin hücre bölünmesini teşvik ettiğini saptamıştır. 1941 de Johannes van Overbeek, hindistan cevizi endosperm sıvısının da benzer bir etkide bulunduğunu ve pekçok bitki türünde de hücre bölünmesini teşvik eden bileşikler olduğunu gözlemiştir. 1954 yılında, Jablonski ve Skoog, Haberlandt'ın çalışmalarından esinlenerek yaptıkları araştırmada vaskular dokularda hücre bölünmesini tetikleyici bileşikler bulunduğunu göstermiştir. İlk sitokinin 1955 te, Miller ve ark. tarafından ringa balığı spermlerinden izole edilmiş ve sitokineze neden olmasından dolayı bu bileşiği kinetin olarak isimlendirmişlerdir.

Doğal sitokinlerin en yaygın olanı, ilk kez *Zea mays*'tan izole edilen zeatindir. Sitokinler hemen hemen tüm yüksek bitkilerde, yosunlarda, cıvık mantarlarda, bakteriler ve pekçok prokaryot ve ökaryotta tRNA türevi olarak bulunmaktadır. Günümüzde bilinen 200 den fazla doğal ve sentetik sitokinin varlığı bilinmektedir. Sitokinin düzeyi meristematik bölgelerde, kök, genç yapraklar, gelişen meyve ve tohumlar gibi büyümenin olduğu organlarda oldukça yüksektir

Sitokinler bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda yaygın olan ve serbest halde veya tRNA nın bir komponenti olarak bulunan büyüme regülatörleridir. Transkripsiyon, translasyon ve membran fonksiyonları üzerine hızlı etkileri olmasına rağmen, etkilerinin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Strnad ve ark. 1997).

Sitokininler bitki doku kültürü çalışmalarında oldukça yaygın olarak kullanılan bitki hormonlarıdır. Pekçok mikropropagasyon sisteminde, oldukça etkili ve kolay ulaşılabilir olduğundan en yaygın olarak kullanılan N⁶-benzil adenindir (BA) (Şekil II.5). Fakat *Spathiphyllum floribundum* gibi bazı bitkilerde heterojen büyüme ve köklenmeyi inhibe etmek gibi dezavantajları bulunmaktadır (Werbrouck ve ark. 1995). Bu nedenlerden dolayı, BA e alternatif oluşturacak büyüme maddeleri bulmak amacıyla yürütülen çalışmalar N⁹-türevleri üzerinde yoğunlaşmıştır. BA in hidroksillenmiş türevlerinin, BA e alternatif olabileceği düşünülmüştür. Horgan ve ark. (1975), bu grubun ilk üyesi olan N⁶-(2-hidroksibenzil)adenin-9-ribosidi, kavak yapraklarından izole etmeyi başarmışlardır. Ayrıca daha sonra bu bileşiğin, *Zantedeschia aethiopica* meyvelerinde de bulunduğu saptanmıştır (Das Neves ve Pais 1980). 1992 yılında Strnad ve ark. kavak yapraklarından N⁶-(2-hidroksibenzil)adenin ve N⁶-(3-hidroksibenzil)adenin i (*meta*-topolin, *mT*) saflaştırmışlardır (Şekil II.5). Horgan ve ark (1975) bu grup sitokininleri populinler olarak isimlendirmiştir. Populin terimi salisin bezoat için kullanıldığından, Strnad ve ark. (1994) alternatif bir isim olarak “topolin” terimini kullanmayı önermişlerdir. Holub ve ark. (1991) yaptıkları çalışmalarda *mT* in, ribosid türevlerinden daha etkili olduğunu göstermiştir. Böylece, *mT* in BA tip sitokininlerden farklı bir metabolizmaya sahip olduğu ve BA ya alternatif olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.



Şekil II.5.: Benzil adenin ve *meta*-Topolin'in yapısal formülleri.

II.2.1 Sitokininlerin Biyolojik Rollerini

Sitokininler yüksek bitkilere uygulandıklarında; hücre devrinin kontrolü, filiz oluşumu, yaprak ve kök farklılaşması, kloroplast oluşumu, strese karşı tolerans ve senesensin geciktirilmesi gibi pekçok fizyolojik, metabolik, biyokimyasal ve gelişim olaylarını etkilerler ve bu olayların düzenlenmesinde önemli rol oynarlar.

Sitokininler, pekçok bitki hücre kültüründe, hücre bölünmesi için oksinlerle birlikte gereklidir. Ayrıca, sitokininlerin *in vivo* da hücre bölünmesini teşvik için gerekli olduğunu gösteren deliller bulunmaktadır. Yapılan immünositokimyasal ve direkt sitokinin ölçümlerinde, mitotik olarak aktif bölgelerde sitokininlerin yüksek konsantrasyonda buldukları, mitotik olarak inaktif dokularda ise düşük seviyede buldukları gösterilmiştir (Mok ve Mok 1994, Dewitte 1999). Doğal olarak sitokinin içermeyen organlara, eksojenik sitokinin uygulamasının hücre bölünmesini tetiklediği bilinmektedir. Sitokininler hücre devrinin her aşaması ile ilgilidirler, ancak son dönemlerde bulunan bazı deliller, sitokininlerin hücre devrinin bazı spesifik evrelerine etki ederek hücre bölünmesini sağladıklarını göstermektedir.

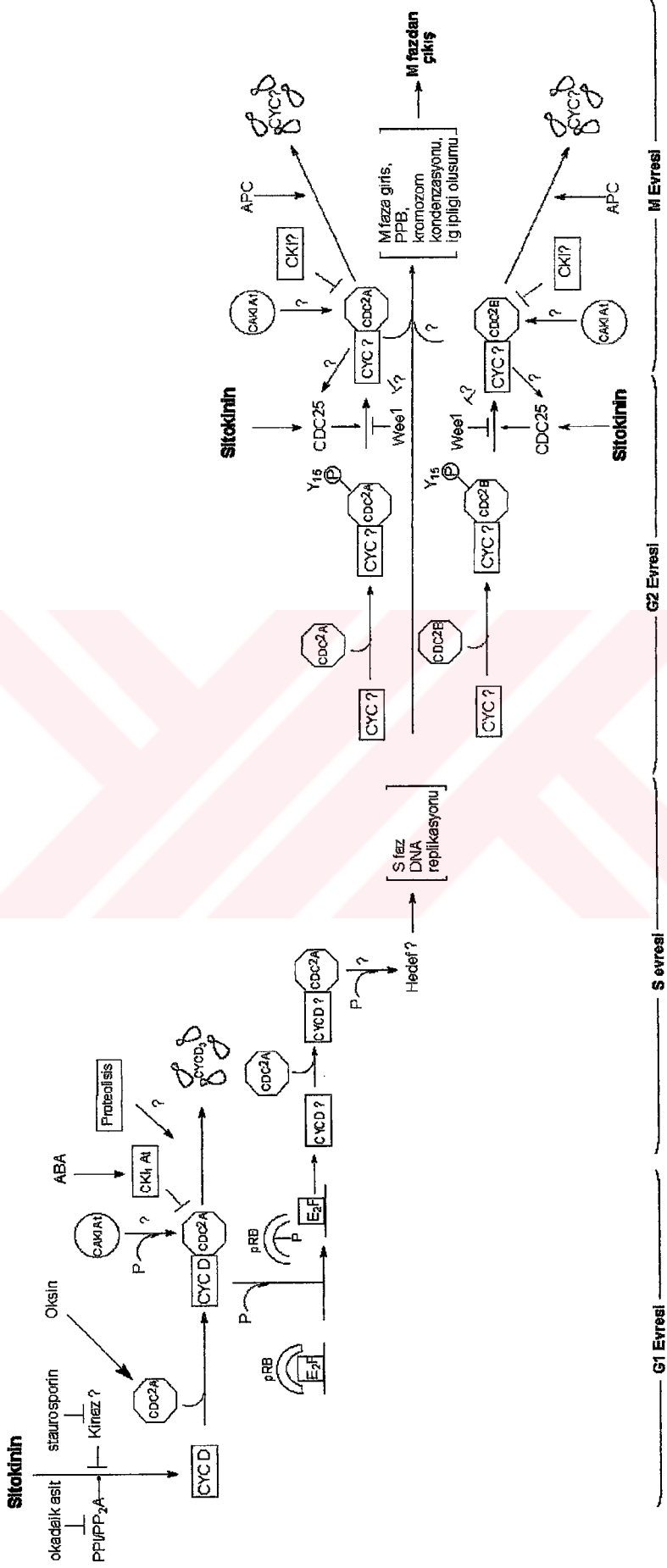
Hücre devri kendi içerisinde, genomunun replikasyonunun gerçekleştiği sentez evresi (S fazı) ve genomun yavru hücrelere eşit olarak paylaştırıldığı bölünme evresi (M fazı) ve bu iki evreyi birbirlerinden ayıran, hücrenin büyümesinin ve organellerin sayısının arttırıldığı, M ve S evresi arasında yer alan G1 ve S ve M evresi arasında yer alan G2 evrelerine ayrılarak incelenebilir.

Hücre devrinin ilerlemesi G1-S ve G2-M geçişlerinde yer alan kontrol noktaları tarafından kontrol edilir. Bu kontrol noktalarının aşılmasını sağlayan 2 sınıf protein bulunmaktadır. Bunlar siklinler ve sikline-bağımlı kinazlar (CDK) olarak isimlendirilir. Kontrol noktalarından geçişin sağlanması için CDK ların aktivasyonu gereklidir. CDK ların aktivasyonu siklinlerle bağlanmasına ve fosforilasyon durumunun değişmesiyle gerçekleşmektedir (Solomon 1993). CDK ların farklı tip siklinlerle birleşmesiyle G1-S ve G2-M geçişleri mümkün olmaktadır. Siklin ailesinden B-tip siklinler mitotik siklinler olarak bilinirler ve CDK larla birleştiklerinde G2-M geçişini sağlarlar. D-tip siklinler ise G1-S geçişini düzenlerler. Bunun yanında CDK inhibitörlerinin hücre devri ilerlemesini G1-S ve G2-M geçişlerinde bloke ettiği *Arabidopsis* ve *Petunia* hücrelerinde gösterilmiştir (Glab ve ark. 1994, Trehin ve ark. 1998).

Yapılan çalışmalar sonucunda sitokininlerin G2-M geçişinde rol oynadıkları düşünülmüştür (Şekil II.6) (Hare ve van Staden 1997) *Arabidopsis* köklerinde yapılan çalışmalarda sitokininlerin *cdc2* geninin ekspresyonunu tetiklediği (Hemerly ve ark. 1993) ve *Nicotiana tabacum*'un kesilmiş gövde parçalarında, oksin etkisiyle üretilmiş ve inaktif halde bulunan *cdc2*-benzeri kinazların aktivasyonunu sağlamaktadır. Sitokininlerin bu aktivasyondaki rolü, Cdc25 fosfatazların üretimini sağlayarak, *cdc2*-benzeri kinazların fosforilasyon durumunun değişimine neden olmaktadır (Zhang ve ark. 1996) Son yıllarda sitokininlerin D tip siklin ailesinden D3-tip siklinin ekspresyonunu sağlayarak G1-S geçişini de sağladıkları kanıtlanmıştır (Şekil II.6) (Riou-Khamlichi ve ark. 1999). Siklin D3'ün düzenlenmesindeki bir bozukluk tümör gelişimine neden olmaktadır, bu nedenden dolayı bir proto-onkogen olarak kabul edilebilir (Frank ve Schmölling 1999).

Bitkilerin normal gelişme süreci içerisinde bazı hücre, doku ya da organların gelişmenin amacına uygun olarak ölmesine senesens denir. Koparılmış yapraklar üzerinde yapılan senesens çalışmalarında, sitokinin uygulamasının senesensi geciktirdiği saptanmıştır (Leopold ve Kawase 1964). Palavan ve ark. (2002) buğday yapraklarına 0,25-1 mM konsantrasyon aralığında sitokinin uygulandığında senesensin geciktiğini göstermişlerdir.

Sitokininler bazı doku ve organlarda hücrenin enine büyümesini teşvik ederler. Bu etki en iyi hardal, salatalık ve ayçiçeği gibi bitkilerin kotiledonlarında görülür. Bu türlerin kotiledonları fidelerin gelişimi sırasında, hücrelerin enine büyümesi sonucunda genişlerler. Sitokinin muamelesinin kuru ağırlıkta bir artış yapmadan hücrenin enine büyümesinde bir artışa neden olduğu turp kotiledonlarında gösterilmiştir (Çağ ve ark. 2003). Sitokininin bu etkisi, oksinlerin etki tarzı olan çeperin asitleştirilmesinden farklıdır (Ross ve Rayle 1982).



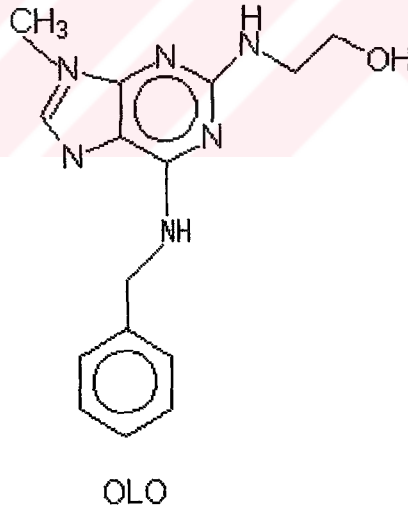
Şekil II.6: Sitokininlerin hücre devri üzerindeki etkileri.

II.2.2 Sitokinler ve Poliaminler Arasındaki İlişki

Sitokinler ve PA lerin; hücre bölünmesini teşvik etmek, senesensin geciktirilmesi ve proteaz aktivitesinin inhibisyonu gibi pekçok fizyolojik olayda benzer etkilerde buldukları bilinmektedir (Altman 1989, Iliev 1989). PA ve sitokinlerin bu benzer etkilerinden dolayı birçok araştırmacı tarafından, PA lerin sitokinlerin meydana getirdiği etkilerde “sekonder mesajcı”lar olabilecekleri ileri sürülmüştür (Galston 1983). Sitokinlerin marul kotiledonları (Cho 1983), *Cucumber* kotiledonları (Walker ve ark. 1988) ve arpa endospermelerinde (Hemantarangan ve Gang 1984) Put düzeyini arttırdığı ve ADC aktivitesini teşvik ettiği bildirilmiştir (Prasad ve Adiga 1985, Palavan ve ark. 1984). Ancak günümüze kadar sadece purin sitokinlerin (kinetin, BA ve ribosid formları) etkileri incelenmiştir. Sergiev ve ark. (1994) sitokin ve anti-sitokinlerin PA düzeyi üzerine etkilerini inceledikleri araştırmada, turp kotiledonlarında sitokinlerin serbest Put ve Spd düzeyini arttırdığını, ancak serbest Spm e rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bunun yanında anti-sitokin olan 4-cyclopentilamino-2-metiltiopirrol[2,3-d]pirimidin (CPP) ve N-(4-piridil)-O-4-klorofenil-karbamat (PC) uygulamalarında Put ve Spd miktarında azalış kaydetmişlerdir.

II.3 OLOMİSİN

Bir önceki bölümde anlatıldığı gibi sitokinler hücre devrinin ilerlemesindeki rolleri, onların CDK lar ile ilişkide olabileceklerini düşündürmüş ve bundan yola çıkılarak, doğal sitokinler olan dimetilaminopürin ve N⁶-izopentiladenin'in CDK1/Siklin B kinaz kompleksini spesifik olmayan bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Neant 1988). Diğer yandan, sentetik aromatik sitokinin analoglarının CDK1/Siklin B kinaz kompleksi üzerinde inhibisyon etkisi göstermesi, spesifik CDK inhibitörü olan 6-benzilamino-2-(2-hidroksietilamino)-9-metil pürin (olomisın, OLO) in keşfine neden olmuştur (Şekil II.7). OLO nun CDK lar üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, 35 kinaz üzerinde denenmiş ve bunların arasından CDK1/Siklin B1, CDK2/Siklin A, CDK2/Siklin E, CDK5/p35 ve ERK1/Map kinazlar inhibisyona uğramıştır (Vesely ve ark. 1994). CDK-siklin kompleksi üzerindeki bu ket vurucu etkinin, OLO nun aromatik halkasının 6. karbonuna yerleşmiş olan benzilamino grubundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Vermeulen ve ark. 2002). OLO. CDK ların ATP bağlanma bölgelerine yerleşerek, ATP ye kompetitif inhibitör olarak etki etmektedir (Vesely ve ark. 1994).

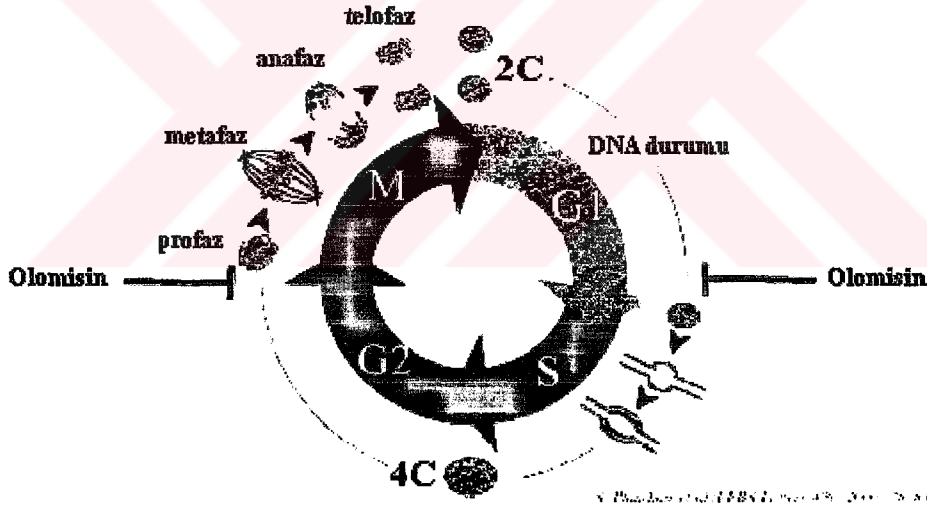


Şekil II.7.: Olomisinin kimyasal formülü.

OLO pekçok deney sisteminde test edilmiş ve hücrenin CDK larla ilgili olduğu bilinen birçok fonksiyonunun inhibe olduğu görülmüştür. Bunlardan bazıları şunlardır; *Xenopus* yumurta ekstraktlarında olgunlaşma hızlandırıcı faktörün (MPF) inhibisyonu, *in vitro* da, *Xenopus* yumurta ekstraktlarında interfazda DNA sentezinin inhibisyonu ve bir hücre bölünmesi sırasında DNA nın sadece bir kez replike

olmasını düzenleyen lisans faktörünün inhibisyonudur (Meijer 1996). OLO nun tümör hücrelerinde, hücre bölünmesine ket vurduğu ve apoptosise yol açtığı belirtilmiştir (Abraham ve ark. 1995, Schutte ve ark. 1997). Farklı sürelerde ve farklı konsantrasyonlarda OLO uygulanmış lösemi hücre hattı olan KG1 de apoptosise belirtisi olarak bilinen DNA kondensasyonu ve DNA fragmentlerinin meydana geldiği tespit edilmiştir (Vermeulen ve ark. 2002). Buna karşın, Papazisis ve ark. (1999) sitozin-arabinosid tarafından meydana getirilen apoptosise OLO tarafından engellendiğini bildirmişlerdir.

OLO nun bitki CDK ları üzerindeki etkisi *Petunia* mezofil hücrelerinde ve *Arabidopsis* süspansiyon kültürlerinde incelenmiştir. *Petunia* protoplast kültüründe 10 µM OLO uygulaması ile S ve G2 evresindeki hücre sayısında bir azalma meydana gelmekte ve konsantrasyon 50 µM-100 µM a çıkartıldığında hücrelerin bölünmesine ket vurulmaktadır (Glab ve ark. 1994).OLO bitki hücrelerinde, hem G1/S ve hemde G2/M geçişini engellemektedir (Şekil II.8) (Glab 1994).



Şekil II.8.: Olomisinin bitki hücre devrinde etkili olduğu evreler (Planchais 2000).

BÖLÜM III

TEZ ÇALIŞMALARI

III.1. ARAŞTIRMA MATERYALİ

Bu çalışmada materyal olarak *Allium cepa* L. cv Valenciana (mutfak soğanı) tohumları kullanıldı. Tohumlar May Tohumculuk Ltd. Şti. den temin edildi.

III.2. ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

Araştırma 3 grup halinde yürütüldü. 1. grupta kullanılan tohumlar kontrol olarak distile su ile birlikte hücre zarından geçirgenliği arttırmak amacıyla Tween 20 içeren çözeltiyle, 2. gruptakiler aromatik bir sitokin olan *mT* ile ve 3. gruptaki yer alan tohumlar aromatik bir sitokin analogu ve CDK inhibitörü olan OLO ile muamele edildi. *mT* 10 µM olarak, OLO ise 100 µM olarak uygulandı. Bu konsantrasyonlar daha önce yapılan çalışmalarda belirlenen en etkili değerlerden seçilmiştir (Glab ve ark. 1994, Huyluoğlu 2002). Deneyle Tablo III.2.1 de özetlendi

Tablo III.2.1: Araştırma düzeni.

Gruplar	Uygulama	Uygulanan Dene Çözeltilisi		Uygulama süreleri (saat)
1. Grup	Kontrol	Distile su + Tween 20	-	14
				28
2. Grup	Doğal sitokin	<i>mT</i>	10 µM	14
				28
3. Grup	CDK inhibitörü	OLO	100 µM	14
				28

III.2.1 Tohum Çimlenmesinde Kullanılan Yöntem

Her grup için 50 şer adet tohum kullanıldı. Tohumlar 25 ml deiyonize su içerisinde +4 °C de 24 saat süre ile bekletildi (Bennett ve ark. 2000). Bu işlemin ardından tohumlar deiyonize suyla ıslatılmış filtre kağıtları ile kaplı petri kapları içerisine aktarıldı. Tohumların çimlenmesi için petri kapları 23 °C ye ayarlanmış inkübatörde 5-6 gün bekletildi. Bu sürenin sonunda 1-2 cm uzunluğa erişen kökler deney çözeltilerine daldırıldı. Bu işlem için küçük petri kaplarının üzerine delikli plastik bir ağ gerilerek özel bir düzenek hazırlandı ve tohumlar kökleri bu deliklerden geçecek şekilde dizildi. Deney solüsyonları ile muamele 14 ve 28 saat olmak üzere iki farklı sürede gerçekleştirildi.

III.2.2 Sitolojik Çalışmalarda Kullanılan Yöntem

Sitolojik çalışmalar için öncelikle, deney solüsyonlarıyla muamele edilmiş kökler 1 cm uzunluğunda kesilerek 24 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyon için kullanılan fiksatif, glasiyal asetik asit absöü alkol 1:3 oranında karıştırılarak hazırlandı. Fiksasyonun ardından kökler % 96 lık etil alkol ile 3 defa iyice yıkandıktan sonra, % 70 lik etil alkol içeren küçük şişelere alınarak buzdolabında depo edildi.

Mitoz bölünmeyi incelemek üzere, % 70 alkol içerisinde bekletilen kökler filtre kağıtları ile iyice kurutulduktan sonra, hidroliz işlemi için 5 N HCl de oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Hidrolizin ardından kökler bazik fuksine alınarak 1.5 saat karanlıkta tutuldu. Materyaller % 2 lik aseto-orsein içerisinde ezilerek binoküler araştırma mikroskobunda incelendi.

Çalışmamızdaki kontrol ve uygulamalı grupların mitotik indeksini aşağıdaki formüle göre hesaplamak için her deney grubundan 10 adet preparat hazırlandı ve her preparattan 5 er bölge seçilerek bölünen ve bölünmeyen hücreler sayıldı. Her deney grubu için ortalama 5000 hücre sayıldı. Ayrıca bölünen hücrelerin yanında, uygulamalı gruplarda görülen mitotik anormallikler de sayılarak sonuçlar tablo halinde gösterildi (Tablo IV.1.2.1).

$$\text{Mitotik indeks} = \frac{\text{Bölünen hücrelerin toplamı}}{\text{Toplam hücrelerin toplamı}} \times 100$$

Yapılan preparatlardan deney solüsyonlarının mitoz bölünme ve kromozom davranışları üzerindeki etkilerini göstermek için Olympus binoküler araştırma

mikroskobuna dijital kamera takılarak x100 immersiyon objektifinde fotoğraflar çekildi.

III.2.3 Poliamin Miktar Tayini

III.2.3.1 Kök Uçlarının Poliamin Tayini için Ekstraksiyonu

Kök uçları yaklaşık 50 mm uzunlukta kesildi ve 100 mg/ml olacak şekilde. % 5 perklorik asit (PCA) ile soğutulmuş havanlarda ekstraksiyon yapıldı (Redmond ve Tseng 1979). Örnekler, protein ve hücre atıklarını uzaklaştırmak amacıyla 11000 rpm de 30 dakika süre ile santrifüj edildi. Üst sıvı yeni bir tüpe alınarak -20 °C de saklandı.

III.2.3.2 Poliamin Standartlarının Hazırlanışı

Standart olarak 1 mM Put, Spd, Spm ve her üç PAmın karışımı kullanıldı.

II.2.3.3 Benzoilasyon İşlemi

Ekstre edilen köklerden elde edilen üst sıvıdan ve hazırlanan PA standartlarından 500' er µl alınarak cam tüplere aktarıldı ve üzerine 1000 µl 2N NaOH eklendi. 10 µl benzoilklorit eklendikten sonra ağzı sıkıca kapatıldı ve iyice karıştırıldı. 20 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildikten sonra, ağzı kapalı cam tüpler yeniden karıştırıldı ve 2000 µl doymuş NaCl eklenip, iyice karıştırılan örneklerin üzerine 2000 µl dietileter eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra fazların ayrılması için 2 dakika boyunca 3000 rpm de santrifüj edildi. İçinde PA ların bulunduğu dietileter fazından 500 µl alınarak başka bir kapaklı tüpe aktarıldı. Tüplerin kapakları açık bırakılarak dietileterin uçması sağlandı. HPLC öncesinde her bir tüpün dibindeki poliamin ekstreleri mobil faz olan 100 µl metanol-su (60:40) karışımında çözdürüldü.

II.2.3.4 HPLC Kolonunun Standardizasyonu

Benzoilasyon prosedüründen geçmiş her bir PA standardından 50 µl alınıp su ile 500 µl ye tamamlandı. Detektör 254 nm ye ayarlandıktan sonra. 0.1 absorbans birimleri full-scale sapma şeklinde kuruldu. Her bir poliamin standardı için 10, 20 ve 50 µl ve akış hızı 1 ml/dakika olacak şekilde pik noktalarının belirlenmesi için enjekte edildi.

Her bir kromatogram 25 dakika yürütüldü. Son pikten 10 dakika sonra mobil faz pompalanarak kolonun dengesi sağlandı. Her bir standardın çıkış zamanı ve alanı kaydedildi (Morgan 1998)

II.2.3.5 HPLC Analizi

Her bir analiz için çalışma standartı enjekte edilir. Kromatogramın güvenilirliği kontrol edildikten sonra 10-25-50 µl olacak şekilde ilk örnek enjekte edilerek en uygun sonucun alındığı hacim tespit edildi. Her 5-10 örnekte bir standart karışım yürütüldü. Çalışma bittikten sonra kolonun temizlenmesi için mobil faz bütün gece pompalandı.

III.2.4 Total Protein Miktarını Tayin Etmek için Kullanılan Yöntem

Kökler 1 cm uzunluğunda kesilerek 1 ml de 100 mg materyal olacak şekilde pH 7.0 sodyum tamponunda, soğutulmuş porselen havanlarda ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen homojenat, 4 °C 11000 rpm de 30 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant alınarak -20 °C de ölçüm yapılana kadar muhafaza edildi.

Total protein miktarının belirlenmesi için örneklere Bradford'un (1976) keşfettiği ve kendi ismiyle anılan Bradford Total Protein Tayin yöntemi uygulandı. Standart olarak sığır serum albümin (BSA) kullanıldı. % 10 luk BSA dan 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4 ve 1.6 ml lik hacimlerde alındı ve pH 6 fosfat tamponu ile 2 ml ye tamamlandı. Üzerine 1.5 ml Commasie Brilliant Blue içeren Bradford reaktifi eklenerek, 15 dakika karanlıkta bekletildi ve ardından 595 nm deki absorbans değerleri ölçüldü. Ölçümlerde kör olarak Bradford rektifi ile fosfat tamponu karışımı kullanıldı. Elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri grafiği hazırlandı.

Örnekler ölçümden bir süre önce oda ısısına çıkarılarak çözünmeleri beklendi. Çözünen örneklerden 500 µl alınarak, üzerine 1.5 ml Bradford reaktifi eklenip iyice vortekslemenin ardından, 15 dakika karanlıkta inkübe edildi ve daha sonra 595 nm deki absorbans değerleri ölçüldü. Standart eğriden yararlanarak absorbans değerlerine karşılık gelen protein miktarları belirlendi. Her bir grup için 3 farklı örnek hazırlandı ve her örnek için ikişer kez ölçüm yapıldı.

III.2.5 Peroksidaz Aktivitesini Tayin Etmek için Kullanılan Yöntem

Kökler 1 cm uzunluğunda kesilerek 1 ml de 100 mg materyal olacak şekilde pH 7.0 sodyum tamponunda, soğutulmuş porselen havanlarda ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen homojenat, 4 °C 11000 rpm de 30 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant alınarak -20 °C de ölçüm yapılana kadar muhafaza edildi.

Ölçüm tamponu olarak 5 mM H₂O₂ ve 15 mM guayakol içeren pH 5.8 fosfat tamponu kullanıldı. Ölçüm tamponu, ölçümden hemen önce hazırlandı ve soğuk olarak kullanıldı. Blank olarak ölçüm tamponu kullanıldı. Örneklerin peroksidaz aktivitesini belirlemek için, 1.5 ml ölçüm tamponuna 25 µl örnek eklenerek, iyice karıştırılıp spektrofotometrede 470 nm de 2 dakika boyunca 10 ar saniye ara ile toplam 12 ölçüm yapıldı. ΔA/taze ağırlık dakika olacak şekilde peroksidaz aktivitesi hesaplandı. Her bir grup için 3 farklı örnek ve her örnek için ikişer ölçüm yapıldı.

III.2.6 Diamin Oksidaz (DAO) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Kök uçları 100 mg/ml olacak şekilde, pH 7.0 0.1M KH₂PO₄ tamponu ile ekstre edildi. Hücre artıklarının homojenattan uzaklaştırılması amacıyla 4 °C, 11000 rpm de 15 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı alınarak -20 °C da muhafaza edildi. Toplam hacim 4ml olacak şekilde, 3420 µl homojenat üzerine 40 µl (40 mg/ml) *orto*-aminobenzaldehit ve 0,2 M Put çözeltisinden 40 µl eklendikten sonra 2 saat oda sıcaklığında beklendi. Bu süre sonunda sarı renk meydana geldi. Reaksiyonu durdurmak için 500 µl % 10 Trikloro asetik asit (TCA) eklendi ve spektrofotometrede 430 nm dalga boyundaki absorbanslar belirlendi (Palavan-Ünsal 1997).

BÖLÜM IV

SONUÇLAR

IV.1 *META*-TOPOLİN ve OLOMİSİNİN KÖK UCU HÜCRELERİNDE MITOTİK ETKİLERİ

IV.1.1 *Meta*-Topolin ve Olomisinin Kök Ucu Hücrelerinde Mitotik İndekse Etkileri

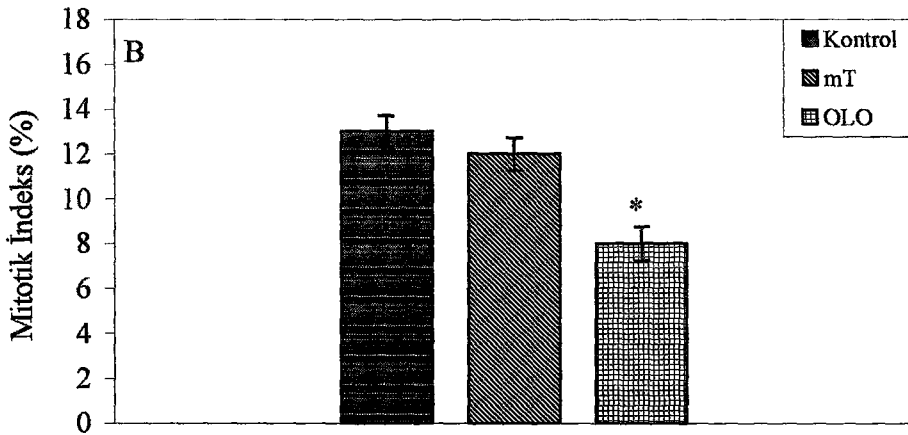
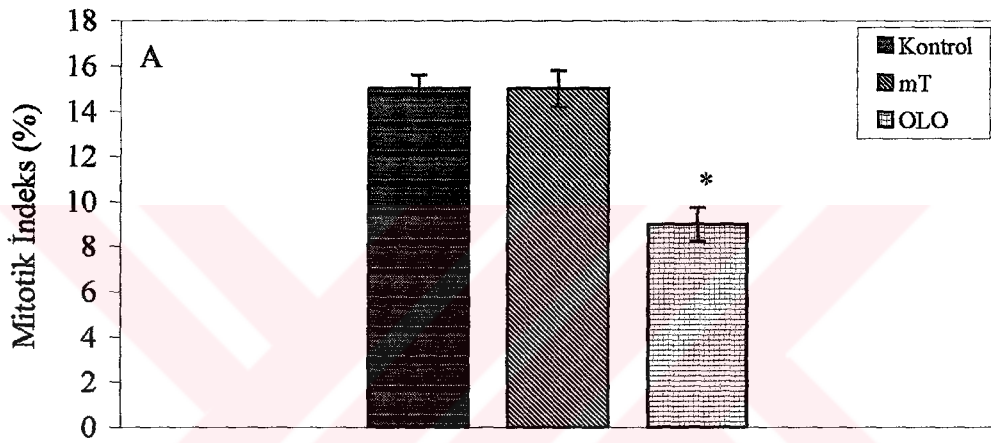
Meta-topolin ve olomisinin kök ucu hücrelerinde mitotik indekse etkilerini araştırmak için, kök uçlarına 14 ve 28 saat olmak üzere iki farklı sürede deney çözeltileri ve kontrol olarak distile su uygulandı. Mikroskopik inceleme için kök uçlarına Feulgen ezme preparasyon tekniği uygulandı. Yapılan preparatlarda bölünen hücrelerin sayısının, gözlenen toplam hücre sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla mitotik indeks hesaplandı. Elde edilen veriler Tablo IV.1.1.1 de özetlendi.

14 saat uygulamasının kontrol grubunda % 15 olan mitotik indeks, 100 mM OLO uygulamasından sonra % 9 a düştü. Böylece OLO nun kontrole göre % 40 lük bir indirgenmeye neden olduğu belirlendi. *mT* uygulanmış kök uçlarında mitotik indeks kontrol grubu ile aynı sonucu verdi (% 15) (Şekil IV.1.1.1.A).

28 saat uygulamasının kontrol grubunda mitotik indeks % 13 tür. Bu sürede OLO Bölünme frekansını % 8 e düşürdü ve böylece 14 saat uygulamasına benzer olarak kontrole göre mitotik indeksi % 39 oranında indirgediği saptandı. Mitotik indeks *mT* muamelelerinde % 12 olarak tespit edildi ve kontrole göre % 8 lik indirgenmeye neden olduğu belirlendi (Şekil IV.1.1.1.B).

Tablo IV.1.1.1: *Meta-topolin* ve *olomisin*in kök ucu hücrelerinde mitotik indekse etkileri. Kontrol: Distile su + Tween 20, *meta-topolin*: 10 μ M, *olomisin*: 100 μ M.

Uygulama	Mitotik İndeks (%)	
	14 Saat	28 Saat
Kontrol	15	13
<i>Meta-topolin</i>	15	12
<i>Olomisin</i>	9	8



Şekil IV.1.1.1: *Meta-topolin* ve *olomisin*in *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde mitotik indekse etkileri. Kontrol: Distile su + Tween 20, mT: 10 μ M *meta-topolin*, OLO: 100 μ M *olomisin*. A: 14 saat süreli uygulama, B: 28 saat süreli uygulama. *Kontrol değerinden önemli derecede farklı ($P < 0,025$).

IV.1.2 *Meta-Topolin ve Olomisinin Kök Ucu Hücrelerinde Neden Olduğu Mitotik Anormallikler*

Doğal bir sitokin olan *mT* ve bir CDK inhibitörü ve aynı zamanda aromatik sitokin analogu olan OLO'nun bölünen hücre sayısına etkilerinin yanında mitotik kromozomların davranışları üzerindeki etkileri de incelendi. Gözlenen tüm anormallikler Tablo IV.1.2.1 de toplu olarak gösterildi.

14 saat uygulamalı gruplarda Kontrol grubunda mitoz bölünme sırasında herhangi bir anormallik olmadığı tespit edildi *mT* ve OLO'nun 14 saat uygulanması kromozom davranışlarında bazı düzensizliklere neden olmasına rağmen, bu düzensizliklerin yüksek oranda ve çok çeşitli olmadıkları görüldü. *mT* uygulamasının neden olduğu anormallikler; profazda tek kromozomların tek kutba doğru yönelmesi, kromozomlarda aşırı kontraksiyon ve iki nukleuslu hücreler olarak sıralanabilir. OLO uygulaması da anafazda kromozom köprülerinin oluşumuna ve iki nukleuslu hücrelerin oluşumuna neden oldu.

28 saat uygulaması muameleli gruplarda hem bozukluk yüzdelerini hem de bozukluk çeşitliliğini arttırdı. *mT* uygulamasından sonra çok nukleuslu hücrelerin varlığı en dikkat çekici anormalliktir. Bu anormallik incelenen hücrelerin % 75 inde görüldü. Sayıları 2-26 arasında değişen ve farklı hacimlerde nukleuslar içeren hücreler tespit edildi. Böylece hücrelerde sitoplazmanın çok az yer tuttuğu ve bazı nukleusların birleşerek düzensiz şekilli büyük nukleusların oluşumuna yol açtıkları belirlendi (şekil IV.1.2.2.A-şekil IV.1.2.2.B). 28 saat OLO uygulaması, deney gruplarımız içinde en fazla çeşitte bozukluğun görüldüğü gruptur. Bu bozuklukları; profazda kromozom kollarının bir yöne yönelmesi, metafazda ekvator tablasındaki kromozomların tek kutba doğru sıralanması ve ya düzensiz dizilmeleri, anafazda kromozomların tüm iğ ipliği üzerine yayılmaları ve kromozom köprülerinin oluşumu, normal nukleusun yanında mikronukleus oluşumu, iki nukleuslu hücrelerin varlığı şeklinde sıralayabiliriz (şekil IV.1.2.3, şekil IV.1.2.4).

Tablo IV.1.2.1: *Meta-topolin* ve *olomisin*'in *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde meydana getirdiği mitotik anormallikler. Kontrol: Distile su + Tween 20, mT: 10µM *meta-topolin*, OLO: 100µM *olomisin*.

Mitotik Anormallikler	Kontrol (%)		mT (%)		OLO (%)	
	14. saat	28. saat	14. saat	28. saat	14. saat	28. saat
Profazda tek kutba yönelme			12			30
Metafazda tek kutba yönelme						4
Düzgün olmayan ekvator tablası						7
Kromozomlarda aşırı kontraksiyon			7			
Anafazda iğ ipliğine yayılmış kromozomlar						2
Kromozom köprüsü					4	9
Mikronukleuslu						1
Çift nukleuslu hücre			13		3	8
Çok nukleuslu hücre				75		

IV.2 META-TOPOLİN ve OLOMİSİNİN KÖK UCU HÜCRELERİNDE POLİAMİN MİKTARINA ETKİLERİ

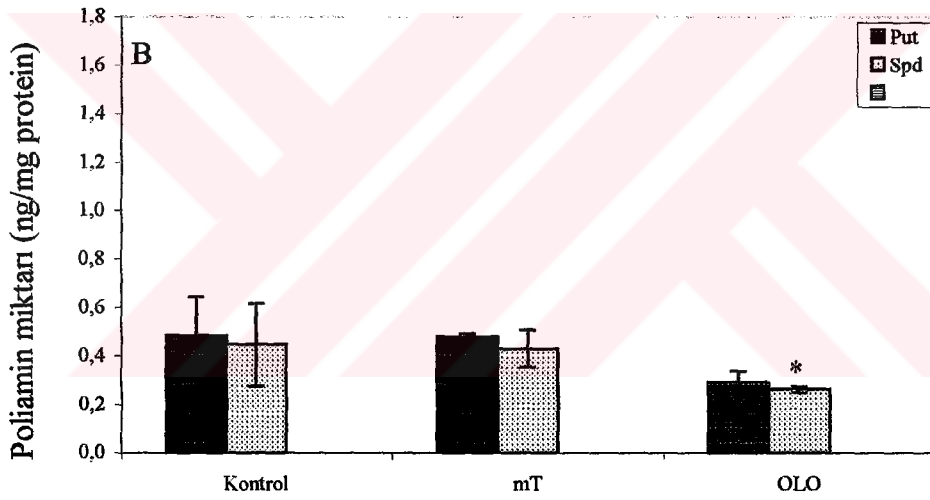
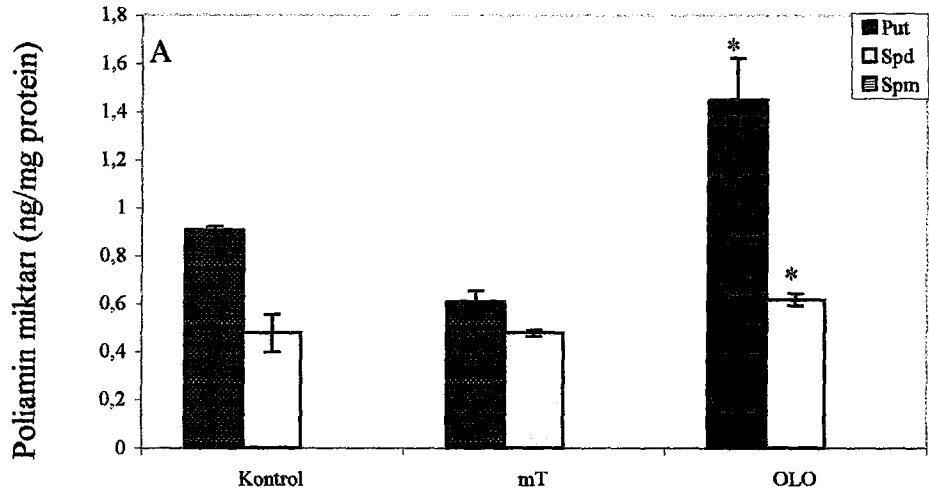
Bitki örnekleri %5 perklorik asitte homojenize edildikten sonra benzoilasyon işlemi yapıldı ve yüksek basınç sıvı kromatografisinde protein ve taze ağırlık bazında PA miktarları ng değerinde saptandı. Tüm sonuçlar toplu olarak Tablo IV.2.1 de gösterildi.

14 saat süreli uygulamada OLO muamelesinde kontrole göre Put miktarında bir artış meydana geldiği, *mT* muamelesinde ise bir azalma meydana geldiği gözlemlendi. OLO uygulaması Put miktarında % 59 luk bir artışa neden olarak en etkili uygulama oldu, bunun yanında *mT* uygulaması ise % 34 oranında bir azalmaya sebep oldu. 14 saat süreli uygulamalarda, kontrol grubu ile *mT* uygulaması arasında Spd miktarı bakımından herhangi bir farklılık gözlenmezken, OLO uygulamasının % 29 luk bir artışa neden olduğu gözlemlendi. Put ve Spd miktarındaki bu değişikliklerin yanında hiçbir uygulamada Spm olmadığı gözlemlendi (Şekil IV.2.1.A).

28 saat uygulamasında *mT* muamelesi kontrol grubu ile kıyaslandığında Put miktarında herhangi bir değişime sebep olmazken, Spd miktarında % 10 oranında bir azalmaya neden oldu. OLO muamelesinin ise Put ve Spd miktarında sırası ile % 40 ve % 42 oranlarında bir azalışa sebep olduğu gözlemlendi. Elde edilen sonuçlara bakıldığında etkili muamele maddesinin OLO olduğu tespit edildi. (Şekil IV.2.1.B).

Tablo IV.2.1: *Meta-topolin* ve *olomisin* uygulamasının *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde poliamin miktarına etkisi. Kontrol: Distile su, *meta-topolin*:: 10 µM, *olomisin* 100 µM.

Uygulama	Zaman (Saat)	Poliamin Miktarı (ng/mg protein)	
		Put	Spd
Kontrol	14	0,91	0,48
	28	0,48	0,45
<i>Meta-topolin</i>	14	0,60	0,48
	28	0,48	0,43
<i>Olomisin</i>	14	1,45	0,62
	28	0,29	0,26



Şekil IV.2.1: *Meta-topolin* ve *olomisin*'in uygulamasının *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde poliamin miktarına etkisi. Kontrol: Distile su + Tween 20, mT: 10 μ M *meta-topolin*, OLO: 100 μ M *olomisin*. A: 14 saat süre ile uygulama, B: 28 saat süre ile uygulama. *Kontrol değerinden önemli derecede farklı (P<0,025).

IV.3 *META*-TOPOLİN ve OLOMİSİNİN KÖK UCU HÜCRELERİNDE TOTAL PROTEİN MİKTARINA ETKİLERİ

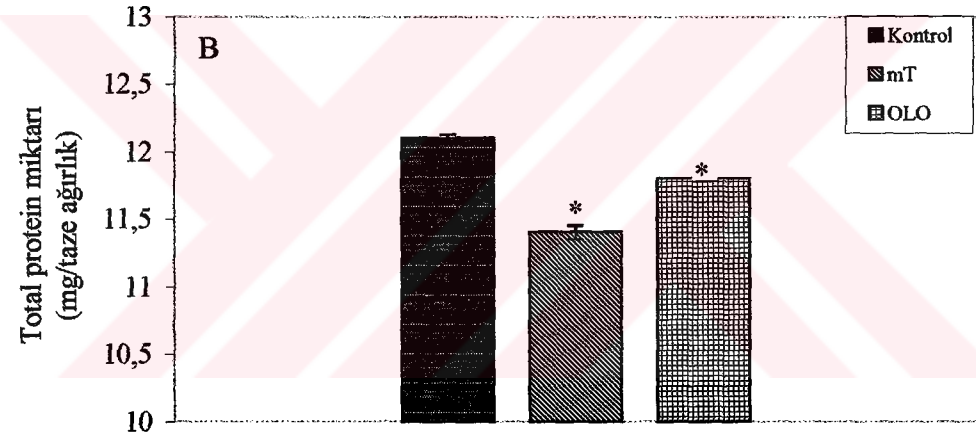
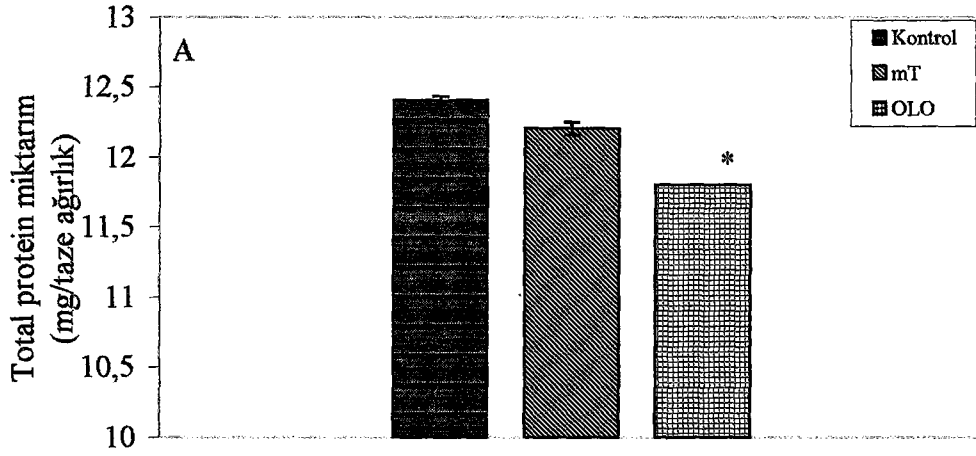
Meta-topolin ve olomisinin kök ucu hücrelerindeki protein miktarına etkilerini belirlemek üzere Bradford total protein tayini metodu uygulandı. Tüm sonuçlar Tablo IV.3.1 de gösterildi.

14. saat uygulamasında kontrol grubunda total protein miktarı 12,4 mg/taze ağırlık olarak belirlendi. *mT* protein miktarında % 2 lik bir azalışa, OLO muameleli grupta ise % 5 azalma gözlemlendi. 14 saat süreli uygulamalarda protein miktarında en fazla azalışa neden olan uygulamanın OLO olduğu tespit edildi (Şekil IV.3.1.A).

28 saat uygulamasında kontrol grubunda total protein miktarı 12,1 mg/taze ağırlık olarak belirlendi. *mT* ve OLO uygulamalarında, kontrole göre bir azalma olduğu belirlendi (Şekil IV.3.1.B). azalış oranları *mT* de % 6, OLO da ise % 2 olarak tespit edildi.

Tablo IV.3.1: *Meta*-topolin ve olomisinin kök ucu hücrelerinde total protein miktarına etkileri. Kontrol: Distile su + Tween 20, *meta*-topolin: 10 µM, olomisin: 100 µM.

Uygulama	Total Protein Miktarı (mg/taze ağırlık)	
	14 Saat	28 Saat
Kontrol	12,4	12,1
<i>Meta</i>-topolin	12,2	11,4
Olomisin	11,8	11,8



Şekil IV.3.1: *Meta-topolin* ve *olomisin*'in *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde total protein miktarına etkisi. Kontrol: Distile su + Tween 20, mT: 10 μ M *meta-topolin*, OLO: 100 μ M *olomisin*. A: 14 saat süreli uygulama, B: 28 saat süreli uygulama. *Kontrol değerinden önemli derecede farklı ($P < 0,025$).

IV.4 META-TOPOLİN ve OLOMİSİNİN KÖK UCU HÜCRELERİNDE PEROKSİDAZ (POD) ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİLERİ

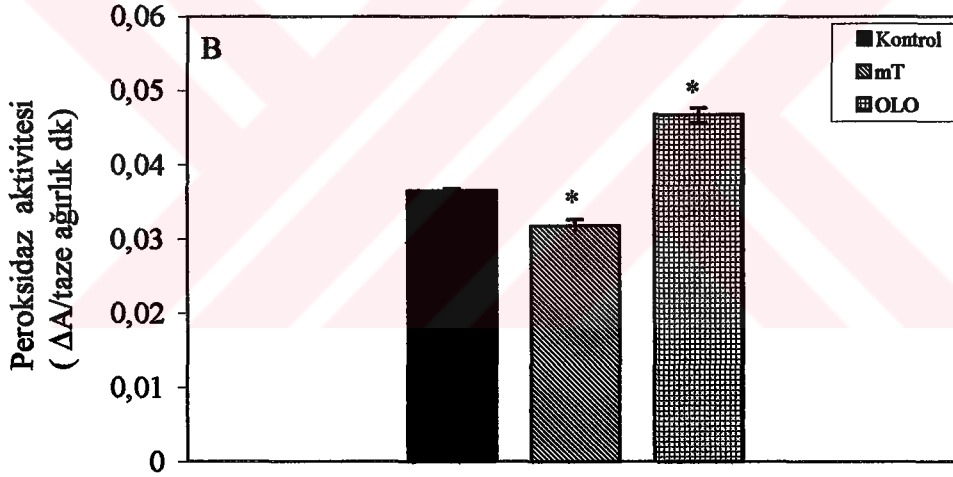
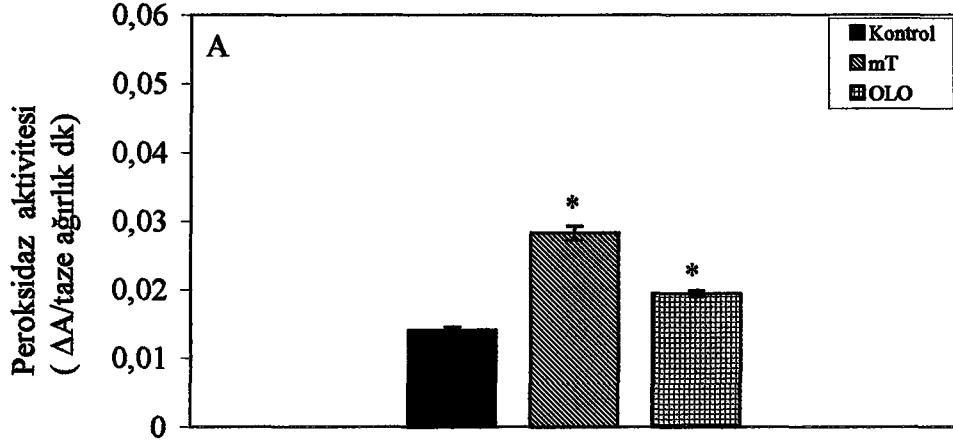
H₂O₂, PAlerin katabolizması sonucunda meydana gelen ürünlerden biridir. Hücre içinde bulunan serbest H₂O₂ hücre için toksik etkide bulunmaktadır. H₂O₂ in hücreden eliminasyonu için peroksidaz aktivitesi (POD) gereklidir. *mT* ve *OLO* nun POD aktivitesine etkisi spektrofotometrik yöntem ile belirlendi. Uygulama gruplarında meydana gelen değişiklikler Tablo IV.4.1 de gösterildi.

14 saat uygulamasında, *mT* ve *OLO* grupları POD aktivitesinde kontrole kıyasla, sırasıyla % 101 ve % 39 luk artışa sebep oldu. Buna karşın. POD aktivitesinde en fazla artışa neden olan muamele maddesinin *mT* olduğu tespit edildi. (Şekil IV.4.1.A).

28 saat uygulamasında, kontrol grubunun POD aktivitesi 0,032 A₄₇₀/mg taze ağırlık x dak olarak tespit edildi. Kontrol ile karşılaştırıldığında *mT* de düşüş, *OLO* muameleli grupta ise POD aktivitesinde yükselme olduğu görüldü. *mT* % 13 lük bir azalma, *OLO* ise % 28 lik bir artışa sebep oldu. Böylece en etkili olan uygulamanın *OLO* olduğu tespit edildi (Şekil IV.4.1.B).

Tablo IV.4.1: *Meta-topolin* ve *olomisin*in kök ucu hücrelerinde peroksidaz (POD) enzim aktivitesine etkileri. Kontrol: Distile su, *meta-topolin*: 10 µM, *olomisin*: 100 µM.

Uygulama	Peroksidaz Aktivitesi (A ₄₃₀ /mg taze ağırlık x dak)	
	14 Saat	28 Saat
Kontrol	0,014	0,0365
<i>Meta-topolin</i>	0,0282	0,0317
<i>Olomisin</i>	0,0194	0,0467



Şekil IV.4.1: *Meta*-topolin ve olomisinin *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde peroksidaz aktivitesine etkisi. Kontrol: Distile su + Tween 20, mT: 10 µM *meta*-topolin, OLO: 100 µM olomisin. A: 14 saat süreli uygulama, B: 28 saat süreli uygulama. *Kontrol değerinden önemli derecede farklı ($P < 0,025$).

IV.5 META-TOPOLİN ve OLOMİSİNİN KÖK UCU HÜCRELERİNDE DİAMİN OKSİDAZ (DAO) AKTİVİTESİNE ETKİLERİ

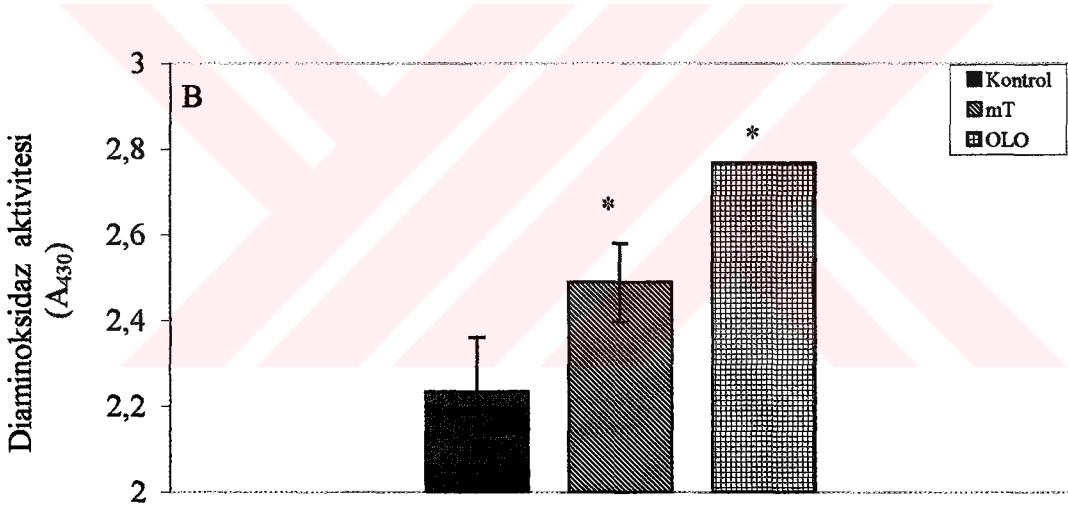
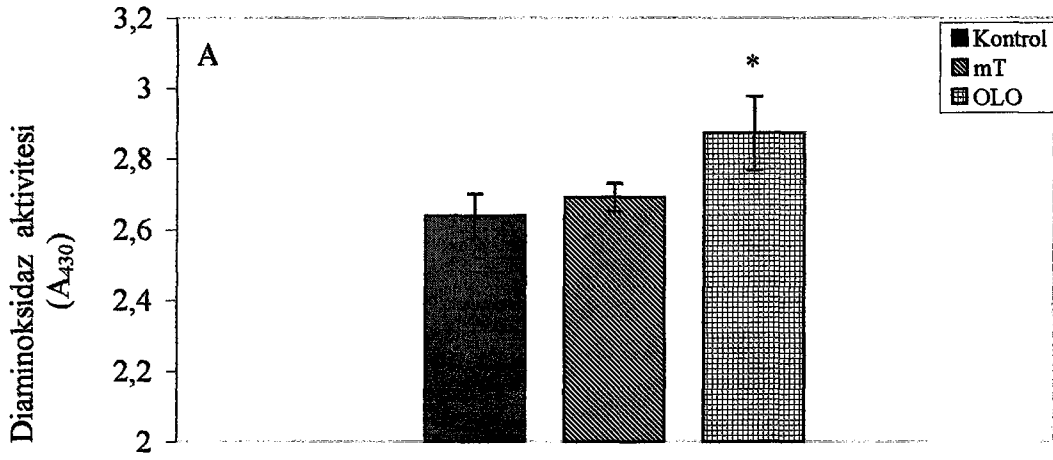
Araştırmanın bu kısmında, *mT* ve *OLO*'nun bir diamin olan Put'un katabolik enzimi olan DAO aktivitesi üzerindeki etkisi incelendi. Kök uçlarından yapılan ekstrede bulunan DAO aktivitesini ölçmek için örnek üzerine Put ve *o*-aminobenzaldehit eklenerek enzim aktif hale getirildi ve oluşan renk spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü. 14 ve 28 saat süreli muamelelerin etkileri Tablo IV.5.1 de özetlendi.

14 saat uygulamasında, kontrol ile kıyaslandığında *mT* % 2 lik bir artışa, *OLO* ise % 9 oranında arttırarak uygulamalar arasında en etkili ajan oldu. (Şekil IV.5.1.A).

28 saat uygulamasında da 14 saat uygulamalarına benzer sonuçlar elde edildi. Kontrol ile karşılaştırıldığında *mT* % 11 lik bir yükselişe, *OLO* ise % 24 lük bir artışa neden olarak en etkili uygulama maddesi oldu (Şekil IV.5.1.B).

Tablo IV.5.1: *Meta*-topolin ve olomisin kök ucu hücrelerinde diaminoksidaz (DAO) aktivitesine etkileri. Kontrol: Distile su + Tween 20, *meta*-topolin: 10 µM, olomisin: 100 µM.

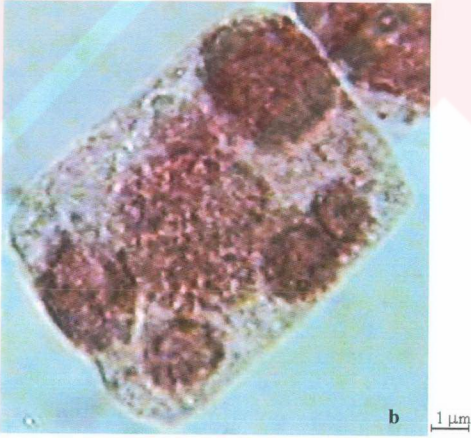
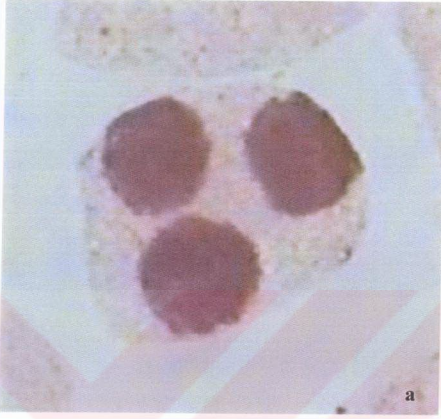
Uygulama	Diaminoksidaz Aktivitesi (A ₄₃₀)	
	14 Saat	28 Saat
Kontrol	2,637	2,232
<i>Meta</i>-topolin	2,691	2,487
Olomisin	2,873	2,767



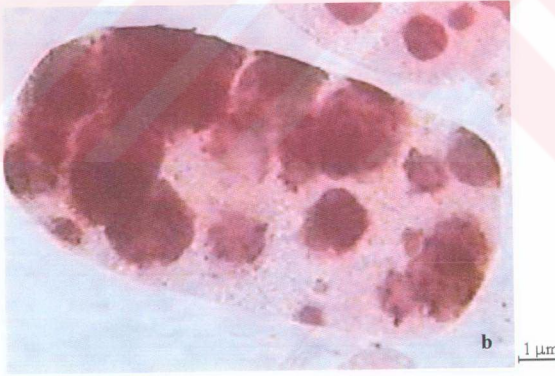
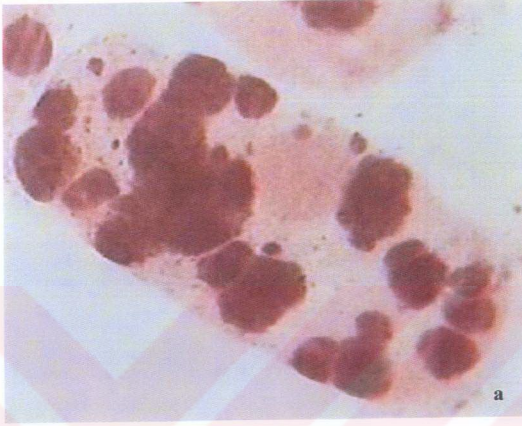
Şekil IV.5.1: *Meta*-topolin ve olomisinin *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde diamin oksidaz aktivitesine (DAO) etkisi. Kontrol: Distile su + Tween 20, mT: 10 µM *meta*-topolin, OLO: 100 µM olomisin. A: 14 saat süreli uygulama, B: 28 saat süreli uygulama. *Kontrol değerinden önemli derecede farklı (P<0,025).



Şekil IV.1.2.1.: *Allium cepa* tohumlarının kontrol grubunun kök uçlarından hazırlanan ezme preparatlardan çekilmiş a. interfaz ve b. profazdaki hücreler .



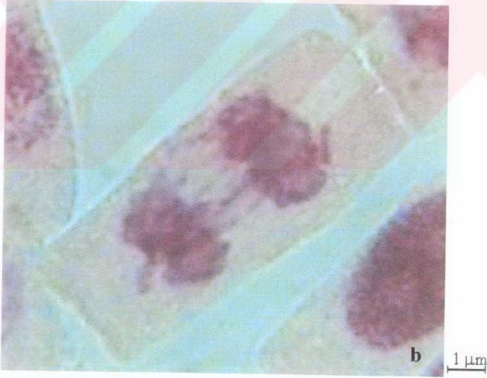
Şekil IV.1.2.2.A: *Allium cepa* tohumlarının 28 saat süreyle, 10 μ M *meta*-topolin uygulanan kök uçlarında. a. 3 nukleuslu hücre ve b. çok nukleuslu hücre .



Şekil IV.1.2.2.B: *Allium cepa* tohumlarının 28 saat süreyle, 10 µM *meta*-topolin uygulanan kök uçlarında. a. ve b. çok nukleuslu hücreler .



Şekil IV.1.2.3: *Allium cepa* tohumlarının 28 saat süreyle, 100 µM olomisin uygulanan kök uçlarında. a. profazda kromozomları tek kutba doğru yönelmiş hücre, b. metafazda tek kutba doğru yönelmiş kromozomlar .



Şekil IV.1.2.4: *Allium cepa* tohumlarının 28 saat süreyle, 100 µM olomisin uygulanan kök uçlarında. a. anafaz, b. anafazda kromozom köprüsü .

BÖLÜM V

TARTIŞMA ve DEĞERLENDİRMELER

Bitki gelişimi meristematik ve farklılaşmış dokulardaki çoğalma aktivitesinin koordinasyonu ile çok sıkı kontrol edilir. Bitki büyümesinin nasıl düzenlendiğini açıklığa kavuşturmak için bitki hücre bölünmesinin düzenlenmesini iyi anlamak gerekir. Hücre devri sırasında DNA replikasyonu genetik materyalin yavru hücrelere dağılmasından sonra meydana gelir ve bu olay hücrenin ilk büyüme evresi olan G₁, DNA replikasyonunun meydana geldiği S, daha sonra G₂ ve M evreleri olmak üzere dört evrede meydana gelir.

Adenin türevi sitokininler hücre bölünmesini teşvik eden bitki hormonlarıdır (Miller ve ark. 1955). Sitokininler bitki büyüme ve gelişmesi ile de ilgilidirler, buna gövde oluşumu ve büyümesi, apikal dominansi, senesens ve fotomorfogenik gelişim dahildir. Sitokininlerin fizyolojik etkilerinin çok iyi belirlenmiş olmasına rağmen moleküler etki mekanizmaları hala açıklık kazanmamıştır (Mok ve Mok 1994, Binns 1994).

Son yıllarda Strnad ve ark. (1992) kavak yapraklarından yeni bir aromatik sitokinin olan *mT* i izole etmişlerdir. Bu aromatik sitokinin doku kültüründe benziladenine alternatif olarak ortaya konmuştur. Holub ve ark. (1991) *mT* in buğday senesensinde ve tütün kallus kültüründe etkin olduğunu saptamışlardır. Werbrouck ve ark. (1996) BA ve *mT* i *in vitro* gövde ve kök üretiminde etkilerini araştırmışlar ve 10 µM *mT* in aynı konsantrasyondaki BA e oranla daha iyi köklenmeye neden olduğunu saptamışlardır.

Soh ve Yang (1993) *A. cepa* kök ucu hücrelerine 12 saat süreyle 100 ppm kinetin uyguladıklarında mitotik indekste azalış olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, Sikka ve Sharma'da (1976) aynı doğrultuda veriler elde etmişlerdir. Polanco ve Ruiz (1997) mercimek bitkisi ile yaptıkları çalışmada, *in vivo* da mercimek filiz ve kök büyümesine benzilamino purin'in (BAP) etkisini araştırmışlardır. BAP'nin filiz ve kök büyümesine ket vurduğunu ve bu inhibisyonunda mitotik indeksteki düşüşten kaynaklandığını bildirmişlerdir. Ayrıca konsantrasyonun artmasıyla, meydana gelen inhibisyonun da arttığını gözlemlemişlerdir. Riou ve Khamlichi ve ark. (1999) *Arabidopsis*'te sitokinlerin hücre bölünmesine etki mekanizmasını incelemişler ve sitokinlerin hücre devrinde G1-S geçişinde CycD3 siklini üretimini artırarak hücre bölünmesini teşvik ettiklerini bulmuşlardır. Son yıllarda Huyluoğlu (2002) arpa kök uçlarında *mT* in 10^{-4} - 10^{-6} M ve BA in 10^{-5} - 10^{-6} M konsantrasyonlarda mitoz bölünme frekansını arttırdığını saptamıştır. Tomaszewska-Sowa ve ark. (2002) çeşitli sitokinlerin *Capsicum annuum* L. de *in vitro* morfogenez ve ploidiye etkisini araştırmışlardır. Elde ettikleri rejeneratlarda zeatin ve tidiazuron uygulamalarının mitotik indeksi ATM hücre hatlarında teşvik ettiğini belirlemişlerdir.

Bu çalışmada ise *mT* in 14 saat uygulamadan sonra mitotik indekste kontrole oranla bir fark meydana getirmediği, 28. saatte ise % 8 oranında bir azalmaya sebep olduğu saptandı. Soh ve Yang (1993) da aynı konsantrasyonda kinetin uygulaması ile aynı doğrultuda veriler elde etmişlerdir.

Binarova ve ark (1998) spesifik sikline bağımlı kinaz inhibitörleri bohemini ve roskovitinin *Vicia faba* kök ucu hücrelerinde 100 veya 200 μ M konsantrasyonlarda G1/S ve G2/M geçişlerini inhibe edici aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Glab ve ark (1994) CDK inhibitörü OLO in *Petunia* protoplastlarında özellikle G1 fazında ve *Arabidopsis* süspansiyon hücre kültürlerinde hücre devrinin geç G1 ve G2 evrelerinde inhibe edici etkisini belirlemişlerdir. Vermeulen ve ark (2002 a, b) insan lösemi hücre hatlarında bitki sitokin analogu OLO in sikline bağımlı kinaz aktivitesine ket vurarak, hücre çoğalmasını inhibe ettiğini ve sitokin analoglarının önemli bir potansiyel anti kanserojen ajan olduklarını ortaya koymuşlardır. Ayrıca Schutte ve ark. (1997) akciğer hücre hatlarında CDK inhibitörü roskovitin, OLO e oranla 10 kat daha düşük konsantrasyonda etkili olduğunu saptamışlardır. OLO in 200 μ M, roskovitin ise 40 μ M konsantrasyonlarının hücre bölünmesini tamamen bloke ettiği de ayrıca gösterilmiştir. Bundan başka, Vesely ve ark. (1994) OLO in *Xenopus* yumurta ekstrelerinde M-fazı teşvik edici faktörünü inhibe ettiğini ve

hücrelerin metafazda tutulu kalmasına sebep olduğunu göstermişlerdir. Yapılan literatür taramaları sonucunda günümüze kadar bitkilerde OLO-mitotik indeks ilişkisine dayalı bir araştırma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada *A. cepa* kök ucu hücrelerinde 14 ve 28 saat OLO uygulamalarında kontrole göre sırası ile % 40 ve 39 oranında inhibisyon belirlendi. Görüldüğü gibi bu bulgular yukarıda belirtilen hayvan hücrelerinde elde edilen verilerle uyumluluk sergilemektedir.

Kinetin ve BA uygulamalarının birçok mitotik anormalliteye neden olduğu Soh ve Yang (1993) tarafından saptanmıştır. Bu mitotik anormallikleri anafaz ve telofaz köprüleri, kromozom davranışlarında bozukluklar, çok kutuplu iğ ipliği oluşumu, C-mitoz ve mikronukleus oluşumu olarak saptamışlardır. Ayrıca, Tomaszewska ve ark. (2002) sitokinlerin yüksek konsantrasyonda *Capsicum praetermissun* ve *C. annuum*'da geç kalmış kromozom ve anafaz köprülerinin oluşumuna sebep olduğunu göstermişlerdir. Huyluoğlu (2002) ise BA (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M) ve *mT* (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M) uygulanan arpa kök uçlarında profazda kromozomların bir yöne yönelmesi, düzgün olmayan metafaz tablası, kromozom köprüleri, kutuplara geç giden kromozomlar, iki nukleuslu hücreler, nukleus birleşmesi ve dev nukleuslu dev hücreler gibi anormallikleri gözlemiştir. Bundan başka aynı çalışmada BA in, *mT* den farklı olarak mikronukleus oluşumuna sebep olduğunu saptamıştır.

Bu çalışmada ise, *mT* nin 14 ve 28 saat süreli uygulamalarında kromozom davranışlarında farklı etki gösterdiği belirlendi. 14 saat *mT* uygulanan *A. cepa* kök ucu hücrelerinde profazda kromozomların tek kutba yöneldiği, aşırı kromozom kontraksiyonu ve iki nukleuslu hücre oluşumu görüldü. 28. saat *mT* uygulanan hücrelerde ise, hücrelerin büyük bir çoğunluğunun çok nukleuslu (2-26) olduğu, ayrıca nukleus hacimlerinde farklılıklar gözlemlendi.

CDK inhibitörleri bohemini ve roskovitinin kromozom davranışına etkileri sadece Binarova ve ark. (1998) tarafından *Vicia faba* kök ucu hücrelerinde incelenmiştir. Uygulama sonrasında, uzun profaz, nukleus zarının kaybolmaması, profazda odaklanmış iğ ipliği oluşumu, tek kutuplu metafaz iğ ipliği, kısa ve yoğun kinetokor mikrotübül fibrillerinin oluşumlarını mitotik anormallikler olarak saptamışlardır.

OLO ve kromozom davranışı ilişkisi ise ilk kez bu çalışmada ele alınmıştır. 14 saat süre ile 100 μ M OLO uygulanan hücrelerde kromozom köprüleri ve iki nukleuslu hücreler saptanan anormalliklerdir. 28 saat uygulananlarda ise bozuklukta

daha fazla çeşitlilik görüldü. Profazda kromozom kollarının bir yöne yönelmesi, metafazda ekvator tablasındaki kromozomların tek kutba doğru sıralanmaları ya da düzensiz dizilmeleri, anafazda kromozomların tüm iç ipliği üzerine yayılmaları, kromozom köprüleri, mikronukleus oluşumu ve iki nukleuslu hücreler saptanan anormalliklerdir. Görüldüğü gibi, literatürde *Vicia faba*'nın kök ucunda yapılan CDK inhibitörü-kromozom davranışı ile ilgili çalışma dışında araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmadaki veriler yukarıda belirtilen araştırmadaki verilerle genelde paralellik göstermektedir, ancak OLO etkisinde *A. cepa* kök ucu hücrelerinde çok daha fazla çeşitte anormallikler tespit edildi.

Diğer taraftan sitokin ve PA lerin pekçok fizyolojik özelliklerden sorumlu olduğu bilinmektedir, örneğin hücre bölünmesinin teşviki, yaprak senesensinin gecikmesi, proteaz aktivitesinin inhibisyonu (Altman 1989, Iliev 1989, Sergiev ve ark. 1994). Bazı araştırmacılar PA lerin, bitkilerin sitokininlere verdiği cevapta bir ikincil haberci olarak rol oynadığını ileri sürmektedirler (Galston 1983). Sitokinlerin kıvrıkcık salata (Cho 1983), salatalık kotiledonları (Suresh ve ark. 1978, Walker ve ark. 1988) ve arpa tohum endospermi (Hemantarangjan ve Garg 1984) gibi birçok farklı bitki sistemlerinde ADC aktivitesini teşvik ettiği saptanmıştır (Suresh ve ark. 1978, Prasad ve Adiga 1985, Mukhopadhyay ve ark. 1983, Chaudhuri ve Ghosh 1982, Palavan ve ark. 1984).

Suresh ve ark. (1978) *Cucumis sativus* kotiledon kültürlerinde BA, benziladenozin ve kinetin ADC aktivitesini sırası ile 4.5, 6 ve 3 kat teşvik ettiğini belirlemişler ve Put düzeyinde de aynı doğrultuda veriler elde etmişlerdir. Palavan ve ark. (1984) ise etiyole bezelye fidelerinde BAP in fitokrom pigmenti ile etkileşimini araştırmışlar ve düşük konsantrasyonlarda tomurcuk büyümesine etki etmediği halde ADC aktivitesini önemli miktarda arttırdığını göstermişlerdir. 100 µM BAP in kırmızı ışık uygulanan fidelerde tomurcukların, sadece ADC aktivitesini kırmızı ışık uygulanan kontrole göre 2,5 kat arttırdığını belirlemişlerdir. Hadrami ve D'Auzac da (1992) *Hevea brasiliensis* kalluslarında 0-40 günleri arasında 9 µM BAP uygulamasının PA düzeyinde erken ve geçici bir artışa sebep olduğunu bulmuşlardır. Sergiev ve ark. (1994) ise yüksek sitokin aktivitesi gösteren kinetin ve N₁-(2-kloro-4-piridil)-N₂-fenilürenin (4-PU-30) etiyole ve yeşil turp kotiledonlarının büyümesini ve serbest PA içeriğini önemli ölçüde arttırdığını tespit etmişlerdir. Sitokinlerin etkisinde özellikle serbest Spd ve Put düzeyleri artmış, fakat Spm düzeyinde aynı doğrultuda veri elde edememişlerdir. Aynı araştırmacılar ayrıca, 4-siklo-pentil-amino-

2-metiltiyopirrololo[2,3-d]pirimidin (CPP) ve N(4-piridil)-O-(4-klorofenil)-karbamat (PC) gibi iki antisitokinik etkiye sahip maddenin de PA içeriğine etkisini incelemişler ve heriki uygulamanın, 4-PU-30 un tetiklediği Spd birikimini inhibe ettiğini saptamışlardır. Bu sistemde PC nin, CPP den daha etkili olduğu da ayrıca tespit edilmiştir. Liu ve ark. (1997) *Glycine max* doku kültürü ortamında naftalen asetik asit ve kinetin kallus büyümesi, indolasetik asit ve PA içeriğine etkisini araştırmışlardır. Bu bitki hormonlarının kültür ortamına eklenmesiyle hem Put , Spd ve Spm miktarında artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca hormon uygulamasıyla en fazla Spm miktarında artış olduğunu da kaydetmişlerdir. Buna ilave olarak Legocka ve Zarnowska (2002) *Ceratodon purpureus* protonemalarında sitokin ve PA ilişkisini incelemişler ve sitokinlerin serbest ve bağlı Put düzeyini ve ADC aktivitesini 2 kat arttırdığını bulmuşlardır.

Bu araştırmamızda 14 saat süre ile *mT* uygulamasının Put miktarında % 34 lık bir azalmaya neden olduğunu, buna karşın Spd miktarının etkilenmediğini gözlemledik. *mT* in etkisine zıt olarak bu uygulama süresinde OLO nun Put miktarında % 59 oranında bir artışa, Spd miktarında ise % 29 luk bir artışa neden olduğunu tespit ettik. Bu muamele maddeleri 28 saat süre uyguladıklarında ise *mT* nin PA miktarında önemli bir değişime neden olmadığını, ancak OLO uygulamasının hem Put ve hem de Spd miktarında belirgin bir azalmaya neden olduğunu gözlemledik.

Sitokinler genel olarak protein sentezini teşvik ederek senesensi geciktirmektedirler (Nooden and Leopold 1978). Tepfer ve Fosket (1978) sitokinlerin protein sentezini regüle edici rolünü açıklamışlardır. Sitokinler bitki dokularında sadece protein sentezi hızını arttırmaz, aynı zamanda protein spektrumunu da değiştirmektedirler. *mT*, BA, kinetin ve zeatinin yeşillenmekte olan kotiledonlardaki total protein içeriğine etkileri araştırıldığında, *mT* uygulanan örneklerin, diğer sitokinlere göre iki kat daha fazla protein içerdiği belirlenmiştir (Palavan-Ünsal 2003). D'Agustino ve Kieber (1999) de sitokinlerin hücre bölünmesini teşvik etmesini sikline bağımlı kinazlar gibi proteinleri tetiklemesi ile açıklamışlardır. Ayrıca Palavan-Ünsal ve ark. (2002) *mT* in buğday yaprak segmentlerinde senesensi geciktirdiğini, fakat total protein miktarına etki etmediğini göstermişlerdir. Çağ ve Palavan-Ünsal da (2003) turp kotiledonlarında haricen uygulanan *mT* in total protein içeriğine etki etmediğini saptamışlardır. Diğer taraftan

elektroforetik analizlere göre, *mT* total protein miktarını etkilemeksizin *de novo* sentezini teşvik ettiğini tespit etmişlerdir.

Durmuş ve Kadioğlu (1998) ayçiçeği kotiledonunun senesens derecesi arttıkça, POD aktivitesinin de fazlaştığını tespit etmişlerdir. 10-100 µM BA uygulanan kotiledonlarda ise isoperoksidaz sayısının kontrole oranla azaldığını bulmuşlardır. Venkatarayappa ve ark. (1984) de aynı doğrultuda veriler elde etmişlerdir. Buna karşın Gaspar ve Xhaufflaire (1967, 1968) kinetin ve isopentenil adeninin POD aktivitesini kök segmentlerinde arttırdığını saptamışlardır. Hadrami ve D'Auzac da (1992) *Hevea brasiliensis* kalluslarında 0-40 gün arası 9 µM BAP uygulamasının POD aktivitesini arttırdığını ve bu artışın, kallusun embriyonik kapasitesini sınırlayan faktörlerden biri olan kahverengileşme ile pozitif korelasyon gösterdiğini belirlemişlerdir. Palavan-Ünsal ve ark. (2003) yeni aromatik sitokinin *mT* ile diğer çok bilinen kinetin, BA ve zeatin gibi sitokininlerin salatalık kotiledonlarında POD aktivitesine etkisini kıyaslamışlardır. Uygulanan tüm sitokininler POD aktivitesini teşvik etmişler, fakat BA ve kinetin diğer sitokininlerden daha etkili olduklarını bulmuşlardır. Literatür verilerine göre sitokininler organ tipine ve yaşına bağlı olarak zıt etkiler sergileyebilmektedir.

Bu araştırmada 14 saat *mT* uygulamasının POD aktivitesini kontrole oranla % 101 oranında arttırdığı, 28 saat uygulandığında ise kontrole kıyasla % 13 oranında azalmaya neden olduğu tespit edildi.

OLO uygulamasında da POD aktivitesinin arttığı belirlendi. 14 ve 28 saat uygulamalarında sırası ile % 39 ve % 28 oranında artış meydana geldiği saptandı.

Bu araştırmanın amacını teşkil eden aromatik sitokin *mT* ve antisitokin OLO in mitotik aktivite, PA metabolizması ve diğer parametrelerle etkileşimlerine yönelik olarak elde edilen bulgular aşağıda sıralanmaktadır.

- *mT* muamelesi mitotik anormalliklerin artmasına sebep olmaktadır ancak PA miktarında herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır. OLO etkisiyle meydana gelen mitotik anormalliklerin, uygulama süresine bağlı olarak artmasına paralel olarak PA miktarında azalma meydana gelmektedir.
- *mT*, uygulanan doz ve sürelerde mitotik indeks ve PA miktarında herhangi bir değişiklik meydana getirmemiştir. OLO nun kısa süreli etkisine bakıldığında beklenenden zıt bir etkiye bulunmaktadır. Uygulama süresi uzatıldığında mitotik indekse ket vurmaktadır ve bu sonuca uygun olarak PA miktarında da bir azalmaya neden olmaktadır.
- Bulgulara göre *Allium cepa* kök hücrelerinde Spm olmayışı Spm in sentezinden sorumlu Spm sentaz ve SAMDC enzimlerinin aktivitelerinin ya hiç ya da çok düşük olduğunu düşündürmektedir.
- OLO uzun süreli uygulandığında mitotik indekste azalmaya, kromozomal anormalliklerin sayısında artışa, PA içeriğinde ve PA metabolizmasında etkili olan total protein miktarında azalmaya, POD ve DAO aktivitesinde artışa neden olmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Abraham, R.T.; Acquarone, M.; Andersen, A.; Asensi, A.; Bellé, R.; Berger, F.; Bergounioux, C.; Brunn, G.; Buquet-Fagot, C.; Fagot, D.; Glab, N.; Goudeau, H.; Goudeau, M.; Guerrier, P.; Houghton, P.; Hendriks, H.; Kloareg, B.; Lippai, M.; Marie, D.; Maro, B.; Meijer, L.; Mester, J.; Mulner-Lorillon, O.; Poulet, S.A.; Schierenberg, E.; Schutte, B.; Vaultot, D.; Verlhac, M.H.: "Cellular Effects Of Olomoucine, An Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases" *Biol. Cell.* 83 (1995) 105-120.
- [2] Alhonen, L.; Parkkinen, J.J.; Keinänen, T.; Sinervirta, R.; Herzig, K.H.; Jänne, J.: "Activation of Polyamine Catabolism In Transgenic Rats Induces Acute Pancreatitis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(15) (2000) 8290-8295.
- [3] Altman, A.: "Polyamines And Plant Hormones", In: *The Physiology Of Polyamines, II*, (1989) 121-145.
- [4] Antognoni, F.; Pistocchi, R.; Casali, P.; Bagni, B.: "Does Calcium Regulate Polyamine Uptake In Carrot Protoplasts?", *Plant Physiol. Biochem.*, 33 (1995) 701-702.
- [5] Aribaud, M.; Carré, M.; Martin-Tanguy, J.: "Polyamine Metabolism and *In Vitro* Cell Multiplication And Differentiation Of Chrysanthemum Leaf Explants", *Plant Growth Regul.*, 15 (1994) 143-155.
- [6] Bagni, N.; Pistocchi, R.: "Uptake And Transport Polyamines And Inhibitors Of Polyamine Metabolism In Plants", In: *Biochemistry and Physiology Of Polyamines In Plants*, Slocum, R.D.; Flores, H.E.; Eds, CRC Press, Boca Raton, (1991) 105-118.
- [7] Balasundaram, D.; Tabor, C.W.; Tabor, H.: "Oxygen Toxicity In A Polyamine-Depleted Spe2 Delta Mutant of *Saccharomyces Cerevisiae*", *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(10) (1993) 4693-4697.
- [8] Basu, H.S.; Sturkenboom, M.C.; Delcros, J.G.; Csokan, P.P.; Szollosi, J.; Feuerstein, B.G.; Marton, L.J.: "Effect Of Polyamine Depletion on Chromatin Structure In U-87 MG Human Brain Tumour Cells", *Biochem. J.*, 282(Pt 3) (1992) 723-727.

- [9] Bennett, M.D.; Jhonston, S.; Hodnett, G.L.; Price, H.J.: "Allium cepa L. Cultivars from Four Continents Compared by Flow Cytometry Show Nuclear DNA Constancy", *Annals of Botany*, 85 (2000) 351-357.
- [10] Biasi, R.; Bagni, N.; Costa, G.: "Endogenous Polyamines In Apple and Their Relationship to Fruit Set and Fruit Growth", *Physiol. Plant.*, 73 (1988) 201-205.
- [11] Binarova, P.; Dolezel, J.; Draber, P.; Heberle-Bors, E.; Strnad, M.; Bögre, L.: "Treatment of Root Tip Cells with Specific Inhibitors to Cyclin-dependent Kinases Leads to Abnormal Spindle Formation", *The Plant Journal*, 16 (1998) 697-707.
- [12] Binns, A.N.: "Cytokinin Accumulation and Action: Biochemical, Genetic and Molecular Approaches", *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45 (1994) 173-196.
- [13] Borrell, A.; Besford, R.T.; Altabella, T.; Masgrau, C.; Tiburcio, A.F.: "Regulation of Arginine Decarboxylase by Spermine in Osmotically-Stressed Oat Leaves", *Physiol. Plant.*, 98 (1996) 105-110.
- [14] Borrell, A.; Culianez-Macia, F.A.; Altabella, T.; Besford, R.T.; Flores, D.; Tiburcio, A.F.: "Arginine Decarboxylase is Localized in Chloroplasts", *Plant Physiol.*, 109 (1995) 771-776.
- [15] Bradford, M.M.: "A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Proteins Utilising the Principle of Protein-Dye Binding", *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [16] Brunton, V.G.; Grant, M.H.; Wallace, H.M.: "Mechanisms of Spermine Toxicity in Babyhamster Kidney (BHK) Cells. The Role of Amine Oxidases and Oxidative Stress", *Biochem. J.*, 280(Pt1) (1991) 193-198.
- [17] Palavan-Ünsal, N.; Çağ, S.; Büyüktuncer, D.: "Comparison of Effect of Different Cytokinins on Chlorophyll, Protein Contents and Peroxidase Activity", *Israeli plant physiology*, (Baskıda)
- [18] Çağ, S.; Palavan-Ünsal, N.: "The Effect Of Meta-Topolin on Protein Profile in Radish Cotyledons", *J. Cell And Mol. Biol.*, 2 (2003) 31-34.
- [19] Casero, R.A. Jr.; Pegg, A.E.: "Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase--The Turning Point In Polyamine Metabolism" *Faseb. J.*, 7(8) (1993) 653-661.
- [20] Chaudhuri, M.; Ghosh, B.: "Purification and Partial Characterization of Arginine Decarboxylase from Rice Embryos (*Oryza sativa* L.)", *Agric. Biol. Chem.*, 46 (1982) 739-743.

- [21] Cho, S.: "Effect of Cytokinins and Several Inorganic Cations on The Polyamine Content of Lettuce Cotyledons", *Plant Cell Physiol.*, 46 (1983) 382-388.
- [22] Costa, G.; Bagni, N.: "Effects of Polyamines on Fruit-Set of Apple", *Hort. Science.*, 18 (1983) 59-61.
- [23] Coulombe, B.: "DNA Wrapping In Transcription Initiation By RNA Polymerase II", *Biochem. Cell Biol.*, 77 (1999) 257-264.
- [24] D'Agostino, I.B.; Kieber, J.J.: "Molecular Mechanism of Cytokinin Action", *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2 (1999) 359-364.
- [25] Das Neves, H.J.C.; Pais, M.S.S.: "A New Cytokinin From Fruits Of *Zantedeschia Aethiopica*", *Tetrahedron Lett.*, 21 (1980) 4387-4390.
- [26] Deng, H.; Bloomfield, V.A.; Benevides, J.M.; Thomas, G.J. Jr.; "Structural Basis of Polyamine-DNA Recognition: Spermidine and Spermine Interactions With Genomic B-DNAs of Different GC Content Probed by Raman Spectroscopy", *Nucleic Acids Res.*, 28(17) (2000) 3379-3385.
- [27] Desiderio, M.A.; Dansi, P.; Tacchini, L.; Bernelli-Zazzera, A.: "Influence of Polyamines on DNA Binding of Heat Shock and Activator Protein 1 Transcription Factors Induced by Heat Shock", *FEBS Lett.*, 455(1-2) (1999) 149-153.
- [28] Dewitte, W.; Chiapetta, A.; Azmi, A.; Witters, E.; Strnad, M.; Rembur, J.; Noin, M.; Chirqui, D.: "Dynamics of Cytokinins in Apical Shoot Meristems of a Day-Neutral Tobacco during Floral Transition and Flower Formation", *Plant Physiol.*, 119 (1999) 111-122.
- [29] Durmuş, N.; Kadioğlu, A.: "Effect of Benzyadenine on Peroxidase Activity During Senescence of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Cotyledons" *Phyton (Horn, Austria)*, 37 (1998) 253-261.
- [30] Evans, P.T.; Malmberg, R.L.: "Do Polyamines Have Roles in Plant Development?", *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40 (1989) 235-269.
- [31] Federico, R.; Angelini, R.: "Polyamine Catabolism", In: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plant*, Slocum, R.D.; Flores, H.E.; Eds, CRC Press, Boca Raton, (1991) Pp. 41-56.
- [32] Feirer, R.; Mignon, G.; Litvay, J.: "Arginine Decarboxylase and Polyamines Required for Embryogenesis in The Wild Carrot", *Science*, 223 (1984) 1433-1435.
- [33] Feuerstein, B.G.; Pattabiraman, N.; Marton, L.J.: "Spermine-DNA Interactions: A Theoretical Study", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83 (1986) 5948-5952.

- [34] Feuerstein, B.G.; Williams, L.D.; Basu, H.S.; Marton, L.J.: "Implications and Concepts of Polyamine-Nucleic Acid Interactions", *J Cell Biochem*, 46(1) (1991) 37-47.
- [35] Frank, M.; Schmülling, T.: "Cytokinin Cycles Cells", *Trends Plant Sci.*, 4 (1999) 243-244.
- [36] Fredlund, J.O.; Oredsson, S.M.: "Normal G1/S Transition and Prolonged S Phase Within One Cell Cycle After Seeding Cells in The Presence of an Ornithine Decarboxylase Inhibitor", *Cell Prolif.*, 29(8) (1996b) 457-466.
- [37] Fredlund, J.O.; Oredsson, S.M.: "Impairment of DNA Replication Within One Cell Cycle After Seeding of Cells In The Presence of a Polyamine-Biosynthesis Inhibitor", *Eur. J. Biochem.*, 237(3) (1996a) 539-544.
- [38] Gahl, W.A.; Pitot, H.C.: "Putrescine-Oxidase Activity In Adult Bovine Seum And Fetal Bovine Serum", *In Vitro*, 15 (1979) 252-257.
- [39] Galston, A.: "Polyamines As Modulators Of Plant Development", *Bioscience*, 33 (1983) 382-388.
- [40] Galston, A.W.; Kaur-Sawhney, R.: "Polyamines as Endogenous Growth Regulators", In: *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry And Molecular Biology*, 2nd Ed, Davies, P.J.; Eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1995) Pp. 158-178.
- [41] Gaspar, T.; Xhaufflaire, A.: "Action Comparee de la 6-furfurylaminopurine et de la 6-(γ , γ -dimethylallylamino)purine sur la croissance, L'activite peroxydasique, la teneur en chlorophylles et en carotenoides" *Physiol. Plant.*, 21 (1968) 792-799.
- [42] Gaspar, T.; Xhaufflaire, A.: "Effect of Kinetin on Growth, Auxin Cathabolism, Peroxidase and Catalase Activities", *Planta*, 72 (1967) 252-257.
- [43] Gilad, G.M.; Gilad, V.H.; Rabey, J.M.: "Arginine and Ornithine Decarboxylation In Rodent Brain-Coincidental Changes During Development and After Ischemia", *Neurosci. Lett.*, 216 (1996) 33-36.
- [44] Glab, N.; Labidi, B.; Qin, L.X.; Trehin, C.; Bergounioux, C.; Meijer, L.: "Olomoucine, an Inhibitor of The Cdc2/Cdk Kinases Activity, Blocks Plant Cells at The G1 To S and The G2 to M Cell Cycle Transitions", *FEBS Lett.*, 533 (1994) 207-211.
- [45] Gosule, L.C.; Schellman, J.A.: "Compact Form of DNA Induced by Spermidine", *Nature*, 259 (1976). 333-335.

- [46] Hadrami, I.E.; D'Auzac, J.: "Effects of Growth Regulators on Polyamine Content and Peroxidase Activity in *Hevea brasiliensis* Callus", *Annals of Botany*, 69 (1992) 323-325.
- [47] Hare, P.D; Van Staden, J.: "The Molecular Basis of Cytokinin Action", *Plant Growth Reg.*, 23 (1997) 41-78.
- [48] Hasan, R.; Alam, M.K.; Ali, R.: "Polyamine Induced Z-Conformation of Native Calf Thymus DNA", *FEBS Lett.*, 368(1) (1995) 27-30.
- [49] Hayashi, S.: "Antizyme-Dependent Degradation of Ornithine Decarboxylase", *Essays Biochem.*, 30 (1995) 37-47.
- [50] Hayashi, S.; Murakami, Y.: "Rapid and Regulated Degradation of Ornithine Decarboxylase", *Biochem. J.*, 306 (1995) 221-230.
- [51] Heimer, Y.; Mizrahi, Y.: "Characterization of Ornithine Decarboxylase of Tobacco Cells and Tomato Ovaries", *Biochem. J.*; 201 (1982) 373-376.
- [52] Hemantangjan, A.; Garg, O.: "Effect Of Cytokinin And Several Inorganic Cations on The Polyamine Content of Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Endosperm", *Indian J. Exp. Biol.*, 22 (1984) 379-382.
- [53] Hemerly, A.S.; Ferreira, P.; De Almeida Engler, J.; Van Montagu, M.; Engler, G.; Inze, D.: "Cdc2a Expression in *Arabidopsis* is Linked with Competence for Cell Division.", *Plant Cell*, 5 (1993) 1711-1723.
- [54] Herbert, A.; Rich, A.: "Left-Handed Z-DNA: Structure and Function", *Genetica*, 106 (1999) 37-47.
- [55] Herby, O.; Persson, L.: "Molecular Genetics of Polyamine Synthesis in Eukaryotic Cells", *Trends. Biochem. Sci.*, 15 (1990) 153-158.
- [56] Hibi, N.; Higashiguchi, S.; Hashimoto, T.; Yamada, Y.: "Gene Expression in Tobacco Low-Nicotine Mutants", *Plant Cell.*, 6 (1994) 723-735.
- [57] Hölttä, E.; Hovi, T.: "Polyamine Depletion Results in Impairment of Polyribosome Formation and Protein Synthesis Before Onset of DNA Synthesis in Mitogen-Activated Human Lymphocytes", *Eur. J. Biochem.*, 152(1) (1985) 229-237.
- [58] Holub, J.; Hanus, J.; Vanik, T.; Strnad, M.: "Cytokinin Activities of Some 9-Substituted *Ortho*-And *Meta*- Hydroxybenzyladenines", Abstract 14th IPGSA Conf., Agricultural Univ. Wageningen, Amsterdam, (1991) 70.
- [59] Horgan, R.; Hewett, E.W.; Horgan, J.; Purse, J.G.; Wareing, P.F.: "A New Cytokinin from *Populus x Robusta*", *Phytochemistry*, 14 (1975) 1005-1008.

- [60] Hougaard, D.M.; Fujiwara, K.; Larsson, L.I.: "Immunocytochemical Localization of Polyamines in Normal and Neoplastic Cells. Comparisons to The Formaldehyde-Fluorescamine and O-Phthalaldehyde Methods", *Histochem J.*, 19(12) (1987) 643-650.
- [61] Huyluoğlu, Z.: "Çeşitli Sitokininlerin Arpada Tohum Çimlenmesi Kök Uzaması ve Mitoz Bölünmeye Etkisi", Marmaar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, (2002).
- [62] Igarashi, K.; Kashiwagi, K.: "Polyamines: Mysterious Modulators of Cellular Functions", *Biochem Biophys Res Commun*, 271(3) (2000) 559-564.
- [63] Igarashi, K.; Kashiwagi, K.: "Polyamines: Mysterious Modulators of Cellular Functions", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271(3) (2000) 559-564.
- [64] Iliev, L.: "Cytokinin Active Plant Growth Regulators. Doktora Tezi, Sofia, (1989) 296.
- [65] Jain, S.; Zon, G.; Sundaralingam, M.; "Base Only Binding of Spermine in The Deep Groove of The A-DNA Octamer D(GTGTACAC)", *Biochemistry*, 28 (1989) 2360-2364.
- [66] Kaur-Shawney, R.; Shih, L.M.; Cegielska, T.; Galston A.W.: "Inhibition of Protease Activity by Polyamines, Relevance for Control of Leaf Senescence", *FEBS Lett.*, 145 (1982) 345-349.
- [67] Kaur-Shawney, R.; Tiburcio, A.F.; Galston, A.W.: "Spermidine and Flower-Bud Differentiation in Thin-Layer Explants of Tobacco", *Planta*, 173 (1988) 282-284.
- [68] Koza, R.A.; Herbst, E.J.: "Deficiencies In DNA Replication and Cell-Cycle Progression in Polyamine-Depleted HeLa Cells", *Biochem J.*, 281(Pt 1) (1992) 87-93.
- [69] Laitinen, J.; Stenius, K.; Eloranta, T.O.; Hölttä, E.: "Polyamines May Regulate S-Phase Progression but not The Dynamic Changes of Chromatin During The Cell Cycle", *J. Cell Biochem.*, 68(2) (1998) 200-212.
- [70] Legocka, J.; Zarnowska, A.: "Role of Polyamines in Cytokinin-Dependent Physiological Processes. III. Changes in Polyamine Levels during Cytokinin-Induced Formation of Gametophore Buds in *Ceratodon purpureus*" *Acta Physiol. Plantarum (APP)*, 3 (2002).
- [71] Leopold, A.C.; Kawase, M.: "Benzyladenine Effects on Bean Leaf Growth and Senescence", *Am. J. Bot.*, 51 (1964) 294-298.

- [72] Li, G.; Regunathan, S.; Barrow, C.J.; Eshraghi, J.; Cooper, R.; Reiss, D.J.: "Agmatine-an Endogenous Clonidine-Displacing Substance in The Brain", *Science*, 263 (1994) 966–969.
- [73] Liu, Z.H.; Wang, W.C.; Yan, S.Y.: "Effect of Hormone Treatment on Callus Formation and Endogenous Indole-acetic Acid and Polyamine Contents of Soybean Hypocotyl Cultivated *in vitro*", *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 38 (1997) 171-176.
- [74] Malmberg, R.L.; Cellino, M.L.: "Arginine Decarboxylase of Oat Is Activated By Enzymatic Cleavage into Two Polypeptides", *J. Biol. Chem.*, 28 (1994) 2703–2706.
- [75] Martin-Tanguy, J.: "Conjugated Polyamines and Reproductive Development: Biochemical, Molecular and Physiological Approaches", *Physiol. Plant.*, 100 (1997) 675–688.
- [76] Martin-Tanguy, J.: "Metabolism and Function of Polyamines in Plants: Recent Development (New Approaches)", *Plant Growth Regulation*, 34 (2001) 135-148.
- [77] Marton, L.J.; Pegg, A.E.: "Polyamines as Targets for Therapeutic Intervention". *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 35, (1995) 55-91.
- [78] Meijer, L.: "Chemical Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases", *Trends in Cell Biology*, 6 (1996) 393-397.
- [79] Miller, C.O.; Skoog, F.S.; Okomura, M.H.; Von Saltza, H.; Strong, F.M.: "Kinetin, A Cell Division Factor from Deoxyribonucleic Acid", *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 1392-1393.
- [80] Mitchell, J.L.; Diveley, R.R. Jr.; Bareyal-Leyser, A.: "Abnormal Accumulation And Toxicity of Polyamines in a Difluoromethylornithine-Resistant HTC Cell Variant", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1136 (1992) 136-142.
- [81] Mok, M.C.: In *Cytokinins: Chemistry, Activity And Function.*, Mok, D.W.S.; Mok, M.C. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, (1994) 155-166.
- [82] Montague, M.; Koppenbrink, J.; Jaworski, E.: "Polyamine Metabolism in Embryogenic Cells of *Daucus carota* L. Changes in Intracellular Content and Rates of Synthesis", *Plant Physiol.*, 62 (1978) 430-433.
- [83] Morgan M.L.D.: *Methods in Molecular Biology: Polyamine Protocols*. Humana Press, Vol: 79, (1998).
- [84] Morgan, D.M.L.: "Polyamines and Cellular Regulation: Perspectives", *Biochem Soc Trans.*, 18 (1990).1080-1084.

- [85] Mukhopadhyay, A., Chaudhuri, M.; Sen, K.; Gosh, B.: “Changes in Polyamines and Related Enzymes with Loss of Viability in rice seeds”, *Phytochemistry*, 22 (1983) 1547-1551.
- [86] Neant, I.; Guerrier, P.: “6-Dimethylaminopurine Blocks Starfish Oocyte Maturation by Inhibiting a Relevant Protein Kinase Activity”, *Exp. Cell. Res.*, 176 (1988) 68-79.
- [87] Nooden, L.D.; Leopold, A.C.: “Phytohormones and Related Compounds”, Letham, D.S., Goodwin, T.W., Higgins, T.J.; Eds, Biomedical Press, Amsterdam.
- [88] Palavan, N.; Goren, R.; Galston, A.: “Effect of some Growth Regulators on Polyamine Biosynthetic Enzymes in Etiolated Pea Seedlings”, *Plant Cell Physiol.*, 25 (1984) 541-546.
- [89] Palavan-Ünsal, N.: “Polyamine Metabolism in The Roots of *Phaseolus vulgaris*-Interaction of The Inhibitors of Polyamine Biosynthesis with Putrescine in Growth and Polyamine Biosynthesis”, *Plant Cell Physiol.*, 28 (1987) 565-572.
- [90] Palavan-Ünsal, N.: “Stimulation of Diamine Oxidase and Peroxidase Activities in Potassium Deficiency Conditions in Chick Pea Stems. *Plant Peroxidase Newsletter.*, 11: (1997).
- [91] Palavan-Ünsal, N.; Çağ, S.; Çetin, E.; Büyüktuncer, D.: “Retardation of Senescence by *Meta*-Topolin in Wheat Leaves”, *J. Cell and Mol. Biol.*, 1 (2002) 101-108.
- [92] Papazisis, K.T.; Geromichalos, G.D.; Kouretas, D.; Dimitriadis, K.A.; Kortsaris, A.H.: “CDK-Inhibitor Olomucine Inhibits Cell Death After Exposure of Cell Lines to Cytosine-Arabinoside”, *Cancer Lett.*, 138 (1999) 221-226.
- [93] Parchment, R.E.; Pierce, G.B.: “Polyamine Oxidation, Programmed Cell Death, and Regulation of Melanoma in The Murine Embryonic Limb”, *Cancer Res.*, 49(23) (1989) 6680-6686.
- [94] Pelta, J.; Livolant, F.; Sikorav, J.L.:” DNA Aggregation Induced by Polyamines and Cobalthexamine”, *J. Biol. Chem.*, 271 (1995) 5656-5662.
- [95] Pfeffer, L.M.; Yang, C.H.; Pfeffer, S.R.; Murti, A.; McCormack, S.A.; Johnson, L.R.: “Inhibition of Ornithine Decarboxylase Induces STAT3 Tyrosine Phosphorylation and DNA Binding in IEC-6 Cells”, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278(2) (2000) C331-335.
- [96] Philipps, G.C.; Kuehn, G.D.: “Uncommon Polyamines Plants and Other Organisms”, In: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, Slocum, R.D.; Flores, H.; Eds: CRC Press, Boca Raton, (1991) Pp. 121-133.

- [97] Pistocchi, R.; Antognoni, F.; Bagni, N.; Zannoni, D.: "Spermidine Uptake by Mitochondria of *Hehanthus tuberosus*", *Plant Physiol.*, 92 (1990) 690–695.
- [98] Pistocchi, R.; Bagni, N.: "Effect of Calcium on Spermine Uptake in Carrot Cell Cultures and Protoplasts", *J. Plant Physiol.*, 136 (1990) 728–733.
- [99] Planchais, S.; Glab, N.; Inze, D.; Bergounioux, G.: "Chemical Inhibitors: A Tool for Plant Cell Cycle Studies", *FEBS Letters*, 476 (2000) 78-83.
- [100] Pohjanpelto, P.; Hölttä, E.: "Phosphorylation of Okazaki-Like DNA Fragments In Mammalian Cells and Role of Polyamines in The Processing of This DNA", *Embo J.*, 15 (1996) 1193-1200.
- [101] Polanco, M.C.; Ruiz, M.L.: "Effect of Benzylaminopurine on *in vitro* and *in vivo* Root Development in Lentil, *Lens culinaris* Medik", *Plant Cell Reports*, 17 (1997) 22-26.
- [102] Poulin, R.; Coward, J.K.; Lakanen, J.R.; Pegg, A.E.: "Enhancement of The Spermidine Uptake System and Lethal Effects of Spermidine Over Accumulation in Ornithine Decarboxylase over Producing L1210 Cells Under Hyposmotic Stress", *J. Biol. Chem.*, 268(7) (1993) 4690-4698.
- [103] Prakash, L.; John, P.; Nair, G.M.; Prathapasenan, G.: "Effect of Spermidine and Methylglyoxal-bis(Guanyldrazone) (MGBG) on In-Vitro Pollen Germination and Tube Growth in *Catharanthus roseus*", *Ann. Bot.*, 61 (1988) 373-375.
- [104] Prasad, G.; Adiga, P.: "Modulation of Arginine Decarboxylase Activity in Cucumber (*Cucumis Sativus*) Cotyledons in Short-Term Organ Culture", *J. Plant Growth Regul.*, 4 (1985) 49-61.
- [105] Redmond, J.W.; Tseng, A.: "High Pressure Liquid Chromatographic Determinations of Putrescine, Cadaverine, Spermidine and Spermine", *J. Chromatogr.*, 170 (1979) 479-481
- [106] Riou-Khamlichi, C.; Huntly, R.; Jacquard, A.; Murray, J.A.H.: "Cytokinin Activation of *Arabidopsis* Cell Division through a D-Type Cyclin", *Science*, 283 (1999) 1541-1544.
- [107] Ross, C.W.; Rayle, D.L.: "Evaluation of H⁺ Secretion Relative to Zeatin-Induced Growth of Detached Cucumber Cotyledons", *Plant. Physiol.*, 70 (1982) 1470-1474.
- [108] Rouzina, I.; Bloomfield, V.A.: "DNA Bending by Small, Mobile Multivalent Cations", *Biophys. J.* 74 (1998) 3152-3164.
- [109] Sauve, D.M.; Anderson, H.J.; Ray, J.M.; James, W.M.; Roberge, M.: "Phosphorylation-Induced Rearrangement of The Histone H3 NH₂-Terminal

- Domain during Mitotic Chromosome Condensation". *J. Cell Biol.*, 145 (1999) 225-235.
- [110] Schipper, R.G.; Penning, L.C.; Verhofstad, A.A.: "Involvement of Polyamines in Apoptosis. Facts and Controversies: Effectors or Protectors?", *Semin. Cancer Biol.*, 10(1) (2000) 55-68.
- [111] Schröder, G.; Schröder, J.: "cDNAs from *Catharanthus roseus* Heterologous Expression, Identification of The Proenzyme processing Site, Evidence for The Presence of both Subunits The Active Enzyme, and a Conserved Region in The 5-mRNA Leader", *Eur. J. Biochem.*, 228 (1995) 74-78.
- [112] Schutte, B.; Nieland, L.; Van Engeland, M.; Henfling, M.E.R.; Meijer, L.; Ramaekers, F.C.S.: "The Effect of The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Olomoucine on Cell Cycle Kinetics", *Experimental Cell Research*. 236 (1997) 4-15.
- [113] Seiler, N.: "Oxidation of Polyamines and Brain Injury", *Neurochem. Res.*, 25 (2000) 471-490.
- [114] Sen, D.; Crothers, D.M.: "Condensation of Chromatin: Role of Multivalent Cations", *Biochemistry*, 25 (1986) 1495-1503.
- [115] Sergiev, I.G.; Alexieva, V.S.; Karanov, E.N.: "Cytokinin and Anticytokinin Effects on Growth and Free Polyamine Content in Etiolated and Green Radish Cotyledons", *J. Plant Physiol.*, (1994) 1-5.
- [116] Slocum, R.D.: "Tissue and Subcellular Localisation of Polyamines and Enzymes of Polyamine Metabolism", In: *Biochemistry and Physiology of Polyamines In Plants*, Slocum, R.D.; Flores, H.E.; Eds, CRC Press, Boca Raton, (1991) Pp. 93-105.
- [117] Snyder, R.D.: "Polyamine Depletion is Associated with Altered Chromatin Structure in Hela Cells", *Biochem. J.*, 260(3) (1989) 697-704.
- [118] Soh, W.Y.; Yang, W.Y.: "Effect of Plant Growth Regulators on Mitotic Chromosomes in *Allium cepa* L.", *The Nucleus*, 36 (1993) 109-113.
- [119] Solomon, M.J.: "Activation of Various Cyclin/Cdc2 Protein Kinases", *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5 (1993) 180-186.
- [120] Strnad, M.: "Discovery of a New Cytokinin Family", *Biol. Plant.* 34 (1992) 585-586.
- [121] Strnad, M.; Hanus, J.; Peters, W.; Beck, E.: "*Ortho*-Topolin-9-Glucoside, a New Aromatic Cytokinin from *Populus x canadensis* cv. *Robusta* Leaves", *Phytochemistry*, 37 (1994) 1059-1062.

- [122] Strnad, M.; Hanus, J.; Vaněk, T.; Kaminek, M.; Ballantine, J.A.; Fussell, B.; Hanke, D.E.: “*Meta*-Topolin, a Highly Active Aromatic Cytokinin from Poplar Leaves (*Populus x canadensis* Moench., cv. *Robusta*)”, *Phytochemistry*, 45 (1997) 213-218.
- [123] Suresh, M.; Ramakrishna, S.; Adiga, P.: “Regulation of Arginine Decarboxylase and Putrescine Levels in *Cucumis sativus* cotyledons”, *Phytochemistry*, 17 (1978) 57-63.
- [124] Takemoto, T.; Nagamatsu, Y.; Oka, T.: “The Study of Spermidine-Stimulated Polypeptide Synthesis in Cell-Free Translation of mRNA from Lactating Mouse Mammary Gland”, *Biochem. Biophys. Acta*, 740 (1983) 73-79.
- [125] Tepfer, D.A.; Fosket, D.E.: “Hormone-mediated Translational Control of Protein Synthesis in Cultured Cells of *Glycine max*”, *Dev. Biol.*, 62 (1978) 486-497.
- [126] Thomas, T.; Thomas, T.J.: “Structural Specificity of Polyamines in Modulating The Binding of Estrogen Receptor To Potential Z-DNA Forming Sequences”, *J. Recept. Res.*, 13 (1993) 1115-1133.
- [127] Thomas, T.; Ve Thomas, T.J.: “Polyamines in Cell Growth and Cell Death: Molecular Mechanisms and Therapeutic Applications”, *Cell Mol Life Sci.*, 58 (2001) 244-258.
- [128] Thomas, T.J.; Bloomfield, V.A.: “Ionic And Structural Effects on The Thermal Helix-Coil Transition of DNA Complexed with Natural and Synthetic Polyamines”. *Biopolymers*, 23 (1984). 1295-1306.
- [129] Thomas, T.J.; Gunnia, U.B.; Thomas, T.: “Polyamine-Induced B-DNA to Z-DNA Conformational Transition of a Plasmid DNA with (Dg-Dc)N Insert”, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 6137-6141.
- [130] Tiburcio, A.F.; Altabella, T.; Borrel, A.; Masgrau, C.: “Polyamine Metabolism and Its Regulation”, *Physiol. Plant.*, 100 (1997) 664-674.
- [131] Tiburcio, A.F.; Kaur-Sawhney, R.; Galston, A.W.: “Polyamine Metabolism”, In: *The Biochemistry of Plants, Intermediary Nitrogen Fixation*, Mifli, N.B.J.; Lea, P.J.; Eds: Academic Press, New York, (1990) 283–325.
- [132] Tippin, D.B.; Sundaralingam, M.: “Nine Polymorphic Crystal Structures of D(CCGGGCCCCGG), D(Ccgggccm5cgg), D(Cm5CGGGCCm5CGG) and D(CCGGGCC(Br)5CGG) in Three Different Conformations: Effects of Spermine Binding and Methylation on The Bending and Condensation of A-DNA”, *J. Mol Biol.*, 267 (1997).1171-1185.
- [133] Tobias, K.E.; Kahana, C.: “Exposure To Ornithine Results in Excessive Accumulation of Putrescine and Apoptotic Cell Death in Ornithine

- Decarboxylase Overproducing Mouse Myeloma Cells”, *Cell Growth Differ.*, 6(10) (1995) 1279-1285.
- [134] Tomaszewska-Sowa, M.; Drozdowska, L.; Szota, M.: “Effect of Cytokinin on *in vitro* Morphogenesis and Ploidy of Pepper *Capsicum annuum* L.”, *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 5 (2002).
- [135] Tome, M.E.; Fiser, S.M.; Gerner, E.W.: “Consequences of Aberrant Ornithine Decarboxylase Regulation in Rat Hepatoma Cells”, *J. Cell Physiol.*, 158 (1994) 237-244.
- [136] Trehin, C.; Planchais, S.; Glab, N.; Perennes, C.; Tregear, J.: “Cell Cycle Regulation by Plant Growth Regulators: Involvement of Auxin and Cytokinin in The Re-Entry of *Petunia* Protoplast into Cell Cycle”, *Planta*, 206 (1998) 215-224.
- [137] Ünäl, M.; Palavan-Ünsal, N.; Tüfekçi, M.A.: “Role of Putrescine and its Biosynthetic Inhibitor on Seed Germination, Root Elongation and Mitosis in *Hordeum vulgare* L.”, *Bulletin of Pure And Applied Sciences*, 21 (2002) 33-38.
- [138] Venkatarayappa, T.; Fletcher, R.A.; Thompson, J.E.: “Retardation and Reversal of Senescence in Bean Leaves by Benzyadenine and Decapitation”, *Plant Cell Physiol.*, 137 (1984) 407-418.
- [139] Vermeulen, K.; Strnad, M.; Havlicek, L.; Van Onckelen, H.; Lenjou, M.; Nijs, G.; Van Bockstaele, D.R.; Berneman, Z.N.: “Plant Cytokinin Analogues with Inhibitory Activity on Cyclin-Dependent Kinases Exert Their Antiproliferative Effect Through Induction of Apoptosis Initiated by the Mitochondrial pathway: Determination by a Multiparametric Flow Cytometric Analysis”, *Experimental Hematology*, 30 (2002b) 1107-1114.
- [140] Vermeulen, K.; Strnad, M.; Kryštof, V.; Havlicek, L.; Van Der Aa, A.; Lenjou, M.; Nijs, G.; Rodrigus, I.; Stockman, B.; Van Onckelen, H.; Van Bockstaele, D.R.; Berneman, Z.N.: “Antiproliferative Effect of Plant Cytokinin Analogues With an Inhibitory Activity on Cyclin-Dependent Kinases” *Leukemia*. 16 (2002a) 299-305.
- [141] Vesely, J.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Blow, J.J.; Donella-Deana, A.; Pinna, L.; Letham, D.S.; Kato, J.; Detivaud, L.; Leclerc, S.; Meijer, L.: “Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues”, *European Journal of Biochemistry*. 224 (1994) 771-786.
- [142] Walker, M.; Roberts, D.; Dumbroff, E.: “Effect Of Cytokinin And Light On Polyamines during The Greening Response of Cucumber Cotyledons”, *Plant Cell Physiol.*, 29 (1988) 201-205.
- [143] Wang, J.Y.; McCormack, S.A.; Viar, M.J.; Wang, H.; Tzen, C.Y.; Scott, R.E.; Johnson, L.R.: “Decreased Expression of Protooncogenes *c-fos*, *c-myc*, and *c-jun*

Following Polyamine Depletion In IEC-6 Cells”, *Am. J. Physiol.*, 265 (1993), 331-338.

- [144] Watanabe, S.; Kusama-Eguchi, K.; Kobayashi, H.; Igarashi, K.:” Estimation of Polyamine Binding to Macromolecules and ATP in Bovine Lymphocytes and Rat Liver”, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 20803-20809.
- [145] Watson, M.; Malmberg, R.L.: “Regulation of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Arginine Decarboxylase by Potassium Deficiency Stress”. *Plant Physiol.*, 111 (1996) 1077–1083.
- [146] Werbrouck, S.P.O.; Strnad, M.; Van Onckelen, H.A.; Deberg, P.C.: “Metatopolin, An Alternative to Benzyladenine in Tissue Culture?”, *Physiol. Plant.*, 98 (1996) 291-297.
- [147] Werbrouck, S.P.O.; Van Der Jeugt, B.; Dewitte, W.; Prinsen, E.; Van Onckelen, H.A.; Debergh, P.C.: “ The Methabolism of Benzyladenine in *S. Floribundum* Schott Petite in Relation to Acclimatization Problems”, *Plant Cell Rep.*, 14 (1995) 662-665.
- [148] Xie, X.; Tome, M.E.; Gerner, E.W.: “Loss of Intracellular Putrescine Pool-Size Regulation Induces Apoptosis”, *Exp. Cell Res.*, 230(2) (1997) 386-392.
- [149] Yoshida, M.; Meksuriyen, D.; Kashiwagi, K.; Kawai, G.; Igarashi, K.: “Polyamine Stimulation of The Synthesis of Oligopeptide-Binding Protein (Oppa). Involvement of a Structural Change of The Shine-Dalgarno Sequence and The Initiation Codon AUG in Oppa mRNA”, *J. Biol. Chem.*, 274(32) (1999) 22723-22728.
- [150] Zhang, K.; Letham, D.S.; Jhon, P.C.: “Cytokinin Control is The Cell Cycle at Mitosis by Stimulating The Tyrosine Dephosphorilation and Activation of p34cdc2-Like H1 Histone Kinase”, *Planta*, 200 (1996) 2-12.

ÖZGEÇMİŞ

1980'de İstanbul'da doğdum. İlk, Orta ve Lise Eğitimimi İstanbul'da tamamladım. Lisans eğitimimi 2001 yılında Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım. Aynı yıl Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans eğitimine başladım. Halen Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarımı sürdürmekteyim.

YAYINLAR

- Ünal, M.; Palavan-Ünsal, N.; Tüfekçi, M.A.: "Role of Putrescine and its Biosynthetic Inhibitor on Seed Germination, Root Elongation and Mitosis in *Hordeum vulgare* L.", *Bulletin of Pure And Applied Sciences*, 21 (2002) 33-38.

SÖZLÜ BİLDİRİLER VE POSTERLER

- Özalpan, A.; Palavan-Ünsal, N.; Aloğlu, M.; Büyüktuncer, E.D.; Tüfekçi, M.A.; Altun, S.; Djamgoz, M.; Özdilli, K.: "Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Olomisinin Teröpatik Öneminin Poliamin Biyomarkırları ile Gösterilmesi", XV. Ulusal Kanser Kongresi, 23-27 Nisan 2003, Kemer, Antalya/Türkiye.
- Ünal, M.; Palavan-Ünsal, N.; Tüfekçi, M.A.: "Poliamin ve Poliamin Biyosentezi İnhibitörlerinin *Allium cepa* L. Kök Uçlarındaki Mitotik Etkileri", XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, 4-7 Eylül 2002, Malatya/Türkiye.
- Ünal, M.; Palavan-Ünsal, N.; Tüfekçi, M.A.: "Role of putrescine and its biosynthetic inhibitor on seed germination, root elongation and mitosis in *Hordeum vulgare* L." XX. SPPS (Scandinavian Society for Plant Physiology) Congress June 18-20 2001, Roros/Norway
- Kaya, M.; Kucuk, M.; Bulut, R.B.; Gurses, C.; Kozanoğlu, O.; Tüfekçi, M.A.; Cevik, A.: "Magnesium Sulfate Attenuates increased blood-brain barrier permeability during insulin-induced hypoglycemia and hypothermia", Forum of European Neuroscience 2000, 24th- 28th June, 2000, BRIGHTON, UK.

- Kalaycı, R.B.; Kaya, M.; Kucuk, M.; Gurses, C.; Elmas, İ.; Kozanoglu, O.; Tüfekçi, M.A.; Cevik, A.: "Magnesium Sulfate Attenuates increased blood-brain barrier permeability during insulin-induced hypoglycemia in rats", 26th CONGRESS OF THE TURKISH PHYSIOLOGICAL SOCIETY , 4th-8th September, 2000, Eskisehir/TURKEY
- Kalaycı, R.B.; Kaya, M.; Kucuk, M.; Elmas, İ.; Kudat, H.; Kozanoglu, O.; Tüfekçi, M.A.; Cevik, A.: "The influence of Selenium on the blood-brain barrier break down in pentylenetetrazole-induced epileptic seizures in acute hyperglycaemic rats.", 26th CONGRESS OF THE TURKISH PHYSIOLOGICAL SOCIETY , 4th-8th September, 2000, Eskisehir/TURKEY
- Kalaycı, R.B.; Kaya, M.; Kucuk, M.; Elmas, İ.; Kozanoglu, O.; Tüfekçi, M.A.; Cevik, A.: "Selenium supplementation reduces blood-brain barrier permeability induced by epileptic seizures in acute hyperglycemic rats", Botanical Garden, Park Sanssouci Postdam/ Germany, September 22nd - 24th, 2000.

PROJELER VE DESTEKLER

- 1999 yılında TÜBİTAK Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı bünyesinde "Antioksidanların Kan-Beyin Bariyerine Etkileri" konulu proje çalışmamı yaparak bitirdim.