

172544

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

L-DOPA VE DOPAMİN'İN BAKTERİYEL BİYOSENTEZİ

UFUK ÖZER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
TEMMUZ 2006

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürilerimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA
(Başkan)



Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ
(Üye)



Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL
(Üye)

Onay

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylanm.

20.10.2006



Prof. Dr. Ali ŞAHİN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

L-DOPA VE DOPAMİN'İN BAKTERİYEL BİYOSENTEZİ

UFUK ÖZER

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

57 + x sayfa

2006

Danışman: Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL

Bazı gram-negatif bakteriler tarafından üretilen L-DOPA başta Parkinson hastalığı olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan önemli bir terapötik ajandır. L-DOPA'dan tek bir enzimatik basamakla yapılan dopamin ise akut dolaşım yetersizliği ve hipotansiyon tedavisinde kardiyostimulant olarak terapötik kullanıma sahip bir katekolamindir. L-DOPA ve dopaminin sentezi kimyasal (sentetik) veya farklı kaynaklardan gelen enzimlerle veya hücre kültürü ile yapılmaktadır. L-DOPA ve dopaminin sentezinden sorumlu enzimler çeşitli fiziksel (ısı, pH, oksijen) ve kimyasal (L-tirozin, monovalent katyonlar) faktörlerle regüle olmaktadır.

İlk kez bu çalışmada bazı Gram-negatif bakterilerde (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia herbicola*) ve Gram-pozitif bir bakteri olan *Streptococcus faecalis*'de farklı kültür koşulları altında L-DOPA ve dopamin sentez oranları karşılaştırılmalı olarak çalışılmıştır. En yüksek L-DOPA ve dopamin seviyeleri tirozin içeren zengin besi ortamında kültürlerin nispeten erken fazlarında (12 saat) kaydedilmiştir. Benzer şekilde, en yüksek tirozin fenol liyaz aktivitesi de bu kültürlerde gözlenmiştir. Ancak, benzer kültür koşulları altında her bakterinin kendine has bir L-DOPA, dopamin ve enzim profiline sahip olduğu belirlenmiştir. En yüksek ve en düşük değerler sırası ile *C. freundii* ve *P. aeruginosa* için kaydedilmiştir. Çarpıcı olarak, L-DOPA üretimi için pek tanınmayan *E. aerogenes* en yaygın kullanılan bir bakteri olan *E. herbicola*'ya göre oldukça yüksek düzeyde L-DOPA üretmiştir. Ayrıca, hem L-DOPA ve hem de dopaminin aynı bakteri tarafından yapılmadığı genel kanısının tersine, *C. freundii* ve *S. faecalis* bakterilerinin her iki bileşiği de sentezlediği saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: L-DOPA; Dopamin; Katekol; Tirozin; Tirozin fenol liyaz; Tirozin dekarboksilaz; Parkinson hastalığı.

ABSTRACT

Master Thesis

BACTERIAL BIOSYNTHESIS OF L-DOPA AND DOPAMINE

UFUK ÖZER

Department of Biology
Institute of Natural Sciences
Inonu University

57 + x pp.

2006

Supervisor: Hikmet GEÇKİL, Associate Professor

L-DOPA, produced by several Gram-negative bacteria, is an important therapeutic agent used for many neurodegenerative diseases, especially Parkinson disease. Another important drug, dopamine, is a catecholamine made from L-DOPA by a single enzymatic step and has therapeutic mode of action in acute circulation disorder and has been applied as a cardio vascular stimulant. Both L-DOPA and dopamine are synthesized either chemically or through the use of bacterial enzymes or bacterial cells themselves. The enzymes for production of L-DOPA and dopamine are regulated with various physical (temperature, oxygen, pH) and chemical (L-tyrosine, monovalent cations) factors.

First time in this study L-DOPA, dopamine and tyrosine phenol lyase (TPL), the enzyme catalyzing the conversion of L-DOPA to dopamine, were studied comparatively in several Gram-negative bacteria (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia herbicola*) and a Gram-positive bacterium (*Streptococcus faecalis*) grown under various culture conditions. The highest L-DOPA and dopamine levels in general were observed in relatively early phase (12 h) of cultivation in nutrient rich medium supplemented with L-tyrosine. Similarly, TPL activity was also highest in the same cultures. However, all bacteria showed distinct L-DOPA, dopamine and the enzyme profiles under similar culture conditions. The highest and lowest rates were determined for *C. freundii* and *P. aeruginosa*, respectively. Noteworthy, *E. aerogenes* which is not a common strain for production of L-DOPA, had substantially higher levels of this compound than *E. herbicola*, the most preferred bacterium in this regard. Furthermore, a bacterium (*C. freundii* and *S. faecalis*) was determined to produce both L-DOPA and dopamine which were generally been known as compounds synthesized in different bacteria.

KEY WORDS: L-DOPA; Dopamine; Catechol; Tyrosine; Tyrosine phenol lyase; Tyrosine decarboxylase; Parkinson disease.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasında yardım, öneri ve desteğinden dolayı danışman hocam Sayın **Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL**'e;

Çalışmalarım esnasında Biyoloji Bölümü ve kendi laboratuvarındaki HPLC cihazını kullanımına sunan sayın **Prof. Dr. Turgay SEÇKİN**'e, bu cihazın kullanımında teknik yardımlarından dolayı **Arş. Grv. Burhan ATEŞ** ve **Arş. Grv. Selim ERDOĞAN**'a, hücre özütlelerinin hazırlanması için Gıda Mühendisliği Laboratuvarlarını bana açan Gıda Mühendisliği Bölümü'ne ve sayın **Arş. Grv. Gökhan DURMAZ**'a ve birçok konuda yardımlarını gördüğüm çok sevgili kendi laboratuvar arkadaşlarım **Salih GENCER** ve **Miraç UÇKUN**'a ve ayrıca Biyoloji Bölümü'ne;

Ayrıca, eğitimim ve tüm hayatım boyunca yardımlarını ve desteklerini hiç esirgemeyen sevgili **AİLEM**'in kendilerine ne kadar minnettar olduklarını bilmelerini isterim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ	1
1.1. L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin).....	2
1.2. Dopamin	3
1.3. L-DOPA ve Dopaminin Bakteriler Tarafından Sentezi.....	5
1.3.1. L-DOPA Sentezi.....	5
1.3.1.1. L-Tirozin.....	6
1.3.1.2. Katekol.....	7
1.3.1.3. Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Enzimi.....	9
1.3.2. L-DOPA'dan Dopamin Sentezi.....	11
1.3.2.1. DOPA Dekarboksilaz (DDC) Enzimi.....	11
1.4. L-DOPA ve Dopaminin Terapötik Önemi.....	12
1.5. Parkinson Hastalığı.....	13
2. ÇALIŞMA İLE İLGİLİ KAYNAK ÖZETLERİ	15
3. MATERYAL VE METOT.....	18
3.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Ayıraçlar.....	18
3.1.1. Nessler Ayıracağı.....	18
3.2. Araştırmada Kullanılan Besiyeri Ortamları.....	18
3.3. Araştırmada Kullanılan Bakteriler.....	19
3.4. Araştırmada Kullanılan Bakterilerin Üretilmesi ve Stok Kültürler.....	20
3.5. L-DOPA ve Dopamin Sentezi İçin Bakteri Kültürleri.....	20
3.6. Kültür Ortamındaki Toplam Biokütle Belirlenmesi.....	20
3.7. Kültür Supernatantlarının Saklanması.....	21
3.8. Hücre Özütlelerinin Hazırlanması.....	21
3.9. Tirozin Fenol Liyaz Enziminin Aktivite Tayini.....	21
3.10. L-DOPA Üretimi İçin <i>in vitro</i> Düzenek.....	22

3.11.	L-DOPA ve Dopaminin HPLC ile Analizi.....	22
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	24
4.1.	HPLC ile L-DOPA ve Dopamin Ölçümü	24
4.2.	Farklı Kültür Koşullarının ve Kültür Fazlarının Tirozin Fenol Liyaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi	30
4.2.1.	Zengin Besi (LB) Ortamında <i>C. freundii</i> 'nin Tirozin Fenol Liyaz Aktivitesi.....	30
4.2.2.	Minimal Besi (M9) Ortamında <i>C. freundii</i> 'nin Tirozin Fenol Liyaz Aktivitesi	31
4.3.	Farklı Kültür Koşullarının ve Fazlarının L-DOPA Üretimi Üzerindeki Etkisi.....	32
4.3.1.	Kültür Fazının <i>C. freundii</i> 'de L-DOPA Üretimi Üzerine Etkisi	33
4.3.2.	Farklı Kültür Fazlarından Gelen <i>C. freundii</i> Özütleri ile <i>in vitro</i> Bir Reaksiyon Düzenğinde L-DOPA Üretimi.....	35
4.4.	Farklı Ortamlarda Kültürü Yapılan <i>C. freundii</i> 'nin L-DOPA Seviyesi.....	36
4.4.1.	Farklı Ortamlarda Kültürü Yapılan <i>C. freundii</i> 'nin Hücre İçi, Hücre Dışı ve Total L-DOPA Seviyeleri.....	36
4.4.2.	Farklı Besiyerlerinden Gelen <i>C. freundii</i> Özütleri ile <i>in vitro</i> Bir Reaksiyon Düzenğinde L-DOPA Üretimi.....	40
4.5.	<i>C. freundii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. herbicola</i> ve <i>S. faecalis</i> Bakterileri Tarafından L-DOPA Üretimi.....	41
4.5.1.	Çeşitli Bakterilerde Hücre İçi, Hücre Dışı ve Total L-DOPA Seviyeleri...41	
4.5.2.	<i>C. freundii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. herbicola</i> ve <i>S. faecalis</i> Bakterilerinden Gelen Hücre Özütleri ile <i>in vitro</i> Bir Reaksiyon Düzenğinde L-DOPA Sentezi.....	45
4.6.	<i>C. freundii</i> ve <i>S. faecalis</i> Bakterilerinde Dopamin Sentezi.....	46
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
6.	KAYNAKLAR.....	54
	ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.1.1	Dopaminin nörotransmitter olarak sinyal iletim mekanizması.....	4
Şekil.1.2	L-DOPA'nın bakteriyel TPL ile katalizlenen sentez şeması.....	6
Şekil.1.3	Hücrede ve çevresinde katekollerin kimyasal reaksiyonları ve moleküler aksiyon modları.....	9
Şekil.1.4	TPL ile L-tirozinden L-DOPA sentezi.....	10
Şekil 1.5	L-DOPA'dan Dopamin Sentezi.....	11
Şekil 1.6	Tirozin dekarboksilaz tarafından katalizlenen L-DOPA→ dopamin reaksiyonu.....	12
Şekil 4.1(a)	L-DOPA ve dopamin karışımını içeren solüsyondan gelen HPLC spektrumu.....	24
Şekil 4.1(b)	a) Saf L-DOPA'nın HPLC spektrumu; b) Dopamin ve L-DOPA karışımı ile saf halde uygulanmış L-DOPA'nın sistem tarafından çakıştırılmış HPLC spektrumu.....	25
Şekil 4.1(c)	<i>C. freundii</i> 'nin 12 saat kültüre edilen LB + % 0.1 tirozin içeren ortamdan gelen L-DOPA düzeyini gösteren HPLC spektrumu.....	26
Şekil 4.2	<i>C. freundii</i> 'nin LB ve LB+%0.1 tirozin ortamlarında farklı kültür fazlarındaki TPL aktivitesi.....	28
Şekil 4.3	<i>C. freundii</i> 'nin M9 ve M9+%0.1 tirozin ortamlarında farklı kültür fazlarındaki TPL aktivitesi.....	29
Şekil 4.4	<i>C. freundii</i> 'nin LB ve LB+%0.1 tirozin ortamlarında farklı kültür zamanlarındaki hücre dışı (a), hücre içi (b) ve total L-DOPA (c) seviyesi.....	31
Şekil 4.5	<i>C. freundii</i> 'nin LB ve LB+%0.1 tirozin ortamlarında farklı kültür fazlarından gelen hücrelere ait TPL içeren in vitro reaksiyon düzeneğindeki L-DOPA üretimi.....	32
Şekil 4.6(a)	Farklı ortamlarda kültürü yapılan <i>C. freundii</i> 'nin hücre dışı L-DOPA seviyesi.....	34
Şekil 4.6(b)	Farklı ortamlarda kültürü yapılan <i>C. freundii</i> 'nin hücre içi L-DOPA seviyesi.....	35
Şekil 4.6(c)	Farklı ortamlarda kültürü yapılan <i>C. freundii</i> 'nin total L-DOPA seviyesi.....	36

Şekil 4.7	Farklı ortamlarda kültürü yapılan <i>C. freundii</i> 'den gelen hücre özütleri ile <i>in vitro</i> bir reaksiyon karışımındaki L-DOPA üretimi.....	37
Şekil 4.8(a)	<i>C. freundii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. herbicola</i> ve <i>S. faecalis</i> hücre dışı L-DOPA düzeyleri.....	39
Şekil 4.8(b)	<i>C. freundii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. herbicola</i> ve <i>S. faecalis</i> hücre içi L-DOPA düzeyleri.....	40
Şekil 4.8(c)	<i>C. freundii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. herbicola</i> ve <i>S. faecalis</i> hücre kültürlerinde total L-DOPA seviyeleri.....	41
Şekil 4.9	<i>C. freundii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. herbicola</i> ve <i>S. faecalis</i> bakterilerinden gelen özütlerden <i>in vitro</i> bir reaksiyon karışımında L-DOPA düzeyleri.....	43
Şekil 4.10	<i>C. freundii</i> ve <i>S. faecalis</i> bakterilerinin LB+tirozin içeren ortamda 12 saat kültürlerinden gelen hücre içi, hücre dışı ve total dopamin düzeyleri.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Luria - Bertani (LB) Besiyerinin İçeriği.....	19
Çizelge 3.2	Medium 9 (M9) Besiyerinin İçeriği	19
Çizelge 3.3	HPLC cihazı analiz parametreleri	23



SİMGELER VE KISALTMALAR

L-DOPA	Dihidroksifenilalanin
TPL	Tirozin fenol liyaz
TDC	Tirozin dekarboksilaz
TH	Tirozin hidroksilaz
DDC	DOPA dekarboksilaz
COMT	Katekol-o-metil transferaz
MAO	Monoamin oksidaz
HVA	Homovalinik asit
PLP	Piridoksal 5'-fosfat
TCA	Trikarboksilik asit
KPi	Potasyum fosfat
Ea	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Eh	<i>Erwinia herbicola</i>
Cf	<i>Citrobacter freundii</i>
Sf	<i>Streptococcus faecalis</i>
LB	Luria Bertani Zengin Besiyeri
M9	Minimal Besiyeri 9

1. GİRİŞ

Bakteriler çoğalmak için yenilenebilir ucuz kaynakları karbon ve enerji kaynakları olarak kullanmaları, belli bir zaman süresi içinde yüksek oranda çoğalma yetenekleri, nispeten basit organizasyonları ile müdahale edilebilir ve değişikliğe uğratılabilir özelliklerinden dolayı ve ucuz maliyet sağladıkları için sağlık endüstrisinden çevre sağlığına kadar birçok alanda yaygın olarak kullanılırlar. Günümüzde bakteriler tarafından herhangi bir genetik manipülasyona gerek duyulmadan endüstriyel boyutlarda üretilen bir çok ürün (amino asit, etanol, bazı enzimler, sitrik asit gibi daha bir çok diğer spesifik kimyasal ve metabolit) bulunduğu gibi, bakterilerin kendileri tarafından yapılamayan ancak çeşitli endüstrilerde yüksek kullanım potansiyeli olan bir çok ürün (özellikle proteinler) rekombinant teknikler kullanılarak bakterilerin genetik manipülasyonu ile başarılmaktadır. Örneğin, insülin böyle bir teknoloji ile insan insülin geninin *Escherichia coli*'ye aktarılması ile ticari amaçlı olarak üretilen ürünlerden sadece biridir. Ancak, bakterilerin bu şekilde kullanım potansiyelleri sadece onlara heterolog bir gen aktarılması ile sınırlı değildir. Bazen, bakterilerde doğal olarak işleyen metabolik bir şema genetik olarak tamamen modifiye edilerek amaca uygun yeni bir üretim şeması ile donatılabilir. Son yıllarda adını sıkça duyduğumuz "Metabolik Mühendislik" böyle çalışmalarını içinde barındıran bir çalışma alanıdır. Metabolik mühendislikte genetik mühendisliğin araçları kullanılarak (yeni gen veya regülatör DNA dizileri bakterinin genomuna aktararak) organizmanın metabolit üretim kapasitesi istenen yönlere ayarlanabileceği gibi, bazen organizmada bu değişiklikler yapılmadan da organizmanın normal koşullar altında çok az ürettiği bir metabolit için uygun kimyasal ve fiziksel ortamlar sağlanarak da o metabolitin yüksek miktarlarda yapımı sağlanabilir. Sağlık endüstrisinde yaygın kullanımı olan birçok ürünün bakteriler ve diğer canlı sistemler (ör., funguslar, bitkiler) kullanılarak üretilmesi nispeten yenidir. Bu tür üretimler geleneksel olarak kimyasal sentez yolu ile yapılmışlardır. Ancak, geçmişin geleneksel fosil yakıt kaynaklarına dayalı bu "hidrokarbon endüstrisi"nin yerini günümüzde "yeşil kimya" olarak da adlandırılan "karbohidrat endüstrisi"nin önemli oranda alacağı düşünülmektedir. Canlı sistemler tarafından üretimleri için yenilenebilir ucuz kaynakların kullanılması ve elde edilen ürünlerin daha stereospesifik (etkin) yapılara sahip olmasından dolayı bu yeni teknolojinin kaynakları sınırlı olan fosil yakıtlarının kullanıldığı eskinin kimyasal teknolojilerine iyi bir alternatif olacağı sanılmaktadır. Bu çeşit üretimler günümüzde %

95 oranında kimyasal endüstriden sağlanmakla beraber bu oranın gelecekte biyosentez lehine önemli değişiklik göstereceği ve önümüzdeki 10 yılda, yenilenebilir enerji kaynaklarından biyosentez oranının % 10-15'i bulacağı tahmin edilmektedir.

Bakteriler birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar için yegâne kaynaklardır. Özellikle genetik mühendislik çalışmalarının hızla gelişmesi ilaç üretimi için yeni çözümleri de beraberinde getirmiştir. Bakteriler ilaç olarak L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) ve dopamin üretiminde de kullanılabilirler. L-DOPA'nın Parkinson Hastalığı'nda temel ilaç olarak ve dopaminin kan basıncı ve kardiyak verimini artırmak amacıyla ilaç olarak kullanılması bu bileşiklere olan ilgiyi arttırmıştır. Her ne kadar L-DOPA ve dopamin üretimine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmış olsa da bakteriyel olarak L-DOPA ve dopamin üretimi hakkında çok az çalışma vardır. Bu çalışmada L-DOPA ve dopamin üretmeleri ile bilinen çeşitli Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin değişik kültür koşulları ve fazlarında bu maddeleri üretme kapasiteleri karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Bu amaçla, bakterilerin hücre içi ve ortama saldıkları L-DOPA ve dopamin miktarlarının belirlenmesinin yanında, gerekli ko-enzim ve substratların sağlandığı *in vitro* bir düzenekle de bu maddelerin yapımları çalışılmıştır. Bu bölümde bakteriyel olarak L-DOPA ve dopamin sentezi, sentezde kullanılan öncül moleküller ve enzimlerin önemleri, L-DOPA ve dopaminin terapötik yönleri ve bu maddelerin analizi için kullanılan HPLC yöntemi hakkında bilgi verilecektir. Bu moleküller ve enzimlerin bakteriyel sentezlerine geçmeden önce özellikle insan sağlığı için önemli moleküller olan L-DOPA ve dopamin hakkında genel bir bilgi verilmesi uygun olacaktır.

1.1. L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin)

L-DOPA dopamin, norepinefrin ve epinefrin gibi katekolaminlerin sentezinde önemli bir ara üründür. L-DOPA vücutta tirozinin *tirozin hidroksilaz* (TH) enzimi tarafından hidroksillenmesi ile doğal olarak sentezlenmektedir [1, 2]. 1913'de *Vicia faba* (bakla) tohumlarında L-DOPA izole edildiği zaman, bu maddenin biyolojik olarak inaktif olduğu ileri sürülmüştü. Ancak 1927 ve 1930'da yayınlanan 2 farmakolojik çalışma L-DOPA'nın glukoz metabolizması ve arteriyal (atardamar) kan basıncı üzerine önemli etkileri olduğunu kanıtladı [3].

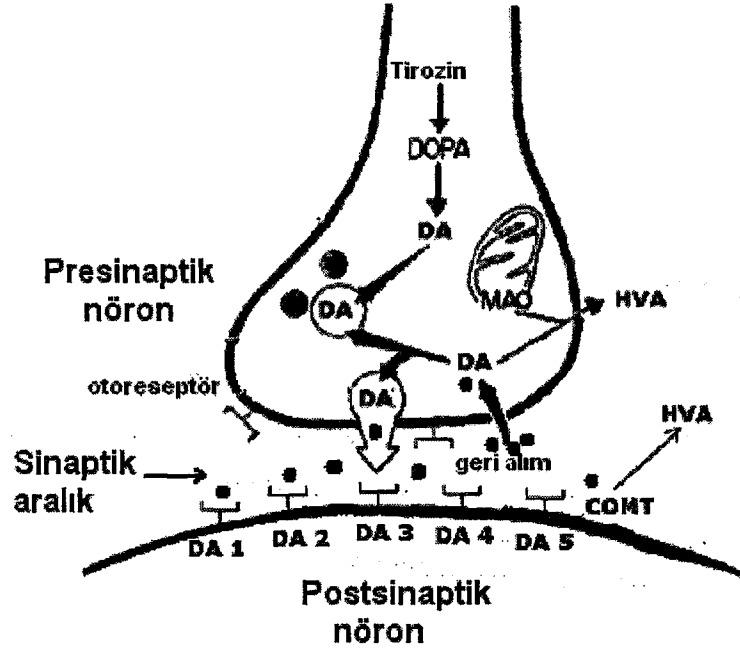
1938'de *L-DOPA dekarboksilaz* enziminin (DDC) keşfi ile L-DOPA'ya olan ilgi tekrar artmıştır. Çünkü bu enzim, insan ve hayvan vücudunda L-DOPA'nın enzimatik

olarak dopamine dönüşümünü katalizlemektedir [4]. 1968'de William Knowless rodyum ile kiral fosfinler kullanarak asimetric hidrojenasyonla L-DOPA sentezini gerçekleştirmiştir. Daha sonra bu çalışma 2001 yılında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür [5]. Dopaminden farklı olarak, L-DOPA'daki bu kirallık onun seçici olarak kan-beyin bariyerini geçerek beyine geçmesini mümkün kılmaktadır. L-DOPA, kısmi olarak beyin mutluluk hormonu olarak bilinen *feniletilamin*'e benzerlik göstermektedir. Sentetik ilaçlar olan *ecstasy* (mutluluk hapi) ve *meskalini*'nin içeriğindeki etkin madde de *feniletilamin*'dir [6].

1.2. Dopamin

Dopamin de L-DOPA gibi vücudumuzda doğal olarak sentezlenen bir moleküldür. Dopamin beynimizdeki nöron (sinir) hücreleri tarafından sentezlenir ve sinyal iletiminde görev yapan önemli bir nörotransmitterdir. Nörotransmitterler, beyinde nöron ile diğer hücre (başka bir nöron veya hedef hücre) arasında elektriksel sinyallerin nörotransmisyonunu (sinir impulsu iletimi) sağlayan kimyasallardır. Şekil 1.1.'de şematize edildiği gibi, böyle bir olayda dopamin nöronla diğer hücrenin oluşturduğu sinaps bölgesinde presinaptik nöron içerisinde sentezlendikten sonra veziküllerde toplanmaktadır. İyon aksiyon mekanizması ile bu veziküller sinaptik aralığa doğru ilerler ve vezikül ile presinaptik membran birleşince dopamin vezikül içinden sinaptik aralığa salınır. Burada, yani sinaptik aralıkta dopamin postsinaptik membranda (hedef hücre membranında) bulunan dopamin reseptörlerine bağlanır ve bu hücreye spesifik sinyali iletir. Bu olay sırasında bir kısım dopamin sinaptik aralıkta *katekol-o-metil transferaz* (COMT) tarafından homovalinik asite (HVA) yıkılabilir ve diğer bir kısım dopamin geri alım mekanizması ile presinaptik nörona tekrar alınıp burada bir vezikül içinde yoğunlaştırılabilir. Ayrıca, geri alınan bu dopaminin bir kısmı *monoamin oksidaz* (MAO) enzimi tarafından yine homovalinik asite (HVA) yıkılabilir [1, 7, 9].

Dopaminin diğer bir özelliği onun hipotalamus tarafından salınan bir nörohormon olmasıdır. Hormon olarak dopaminin ana görevi hipofizin ön lobu tarafından salınan ve *prolaktin* adı verilen süt üretimini stimüle eden hormonun salınımını inhibe etmesidir. Prolaktin fazla salınıncaya *adenom* denilen kitleler oluşturur ki bu adenomların çevre dokulara zarar verdiği bilinmektedir [1, 10].



Şekil 1.1. Dopaminin nörotransmitter olarak sinyal iletim mekanizması

Dopamin ayrıca bir katekolamin çeşidi olup yaygın bilinen ve stresle ilişkili diğer iki katekolamin (epinefrin ve norepinefrin) için öncül madde (prekürsör) olarak kullanılmaktadır [7, 8]. Bu madde genellikle nöral olanlar başta olmak üzere çeşitli hastalıklardaki terapötik etkisi ile bilinmektedir. Bu maddenin bu tür hastalıklardaki terapötik fonksiyonu onun kardiyak verimi ve kan basıncını artırmadaki özelliğinden kaynaklanır [11]. Dopamin vücuda enjekte edildiğinde muhtemelen spesifik dopaminerjik reseptörlere bağlanarak renal ve mezenteryal vazodilasyon oluşturmaktadır. Dopamin vazokonstriksiyonda rol oynadığı gibi β_1 -adrenerjik reseptörler üzerinde de aksiyon göstererek kalp üzerinde pozitif bir inotropik etki oluşturmaktadır. Bu yönü ile dopaminin travmatik ve kardiyojenik şok tedavisinde uygulaması bulunmaktadır [1]. Dopaminin beyindeki diğer üç önemli fonksiyonu ise hareket, algı ve motivasyondaki rolüdür. Dopamin, fiziki hareketlerimizin kontrol edilmesi bakımından önemli olup eksikliği (özellikle nigrostriatal yoldaki dopamin nöronlarının ölümünden dolayı) Parkinson hastalığına yol açar. Frontal loblarda dopamin beyinin diğer alanlarından bilgi akışını kontrol eder. Beyinin bu bölgesinde dopamin seviyesinde meydana gelecek bir bozukluk algılama, dikkat ve problem çözme yeteneklerinde azalmaya neden olur. Ayrıca, retinadaki sinapslarda bulunan dopamin kırmızı-yeşil renklerin ayırt edilmesinde rol oynamaktadır. Dopamin aynı zamanda zevk (keyif) ve motivasyonla da ilişkili bir kimyasaldır. Dopamin diğer iki katekolamin

(epinefrin ve norepinefrin) gibi akut ve kronik strese adaptasyonda yardımcı hormonlarla (glukagon, glukokortikoidler, vazopressin v.b.) birlikte önemli rol oynamaktadır [2, 7, 8, 10].

Bu katekolaminler diğer biyojenik aminler gibi omurgalıların sinir sistemindeki rolüne ek olarak Gram-negatif bakterilerin üremesini ve virülans bağımlı faktörlerin üretimini ayarlamada önemli etkiler göstermektedir. Minimal besi ortamına eklendiklerinde her üç yaygın katekolamin çeşidinin (norepinefrin, epinefrin ve dopamin) bakteri büyüme ve çoğalmasında önemli artışa neden oldukları gösterilmiştir [12-16].

1.3. L-DOPA ve Dopaminin Bakteriler Tarafından Sentezi

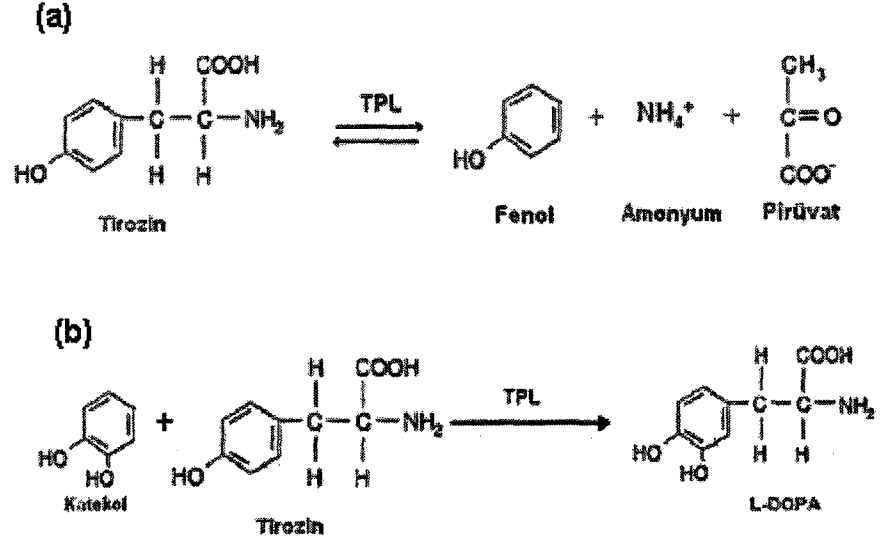
L-DOPA ve dopaminin bakteriler tarafından sentezi iki aşamada gerçekleşmektedir. Birinci basamakta çeşitli substratlardan (tirozin, katekol gibi) L-DOPA sentezlenirken, ikinci basamakta ise L-DOPA'dan dopamin yapılmaktadır.

Ancak, bugüne kadar her iki reaksiyonu içinde barındıran bir bakteri türü üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Çünkü birinci basamağı, yani çeşitli substratlardan L-DOPA oluşumunu katalizleyen *tirozin fenol liyaz* (TPL) ve ikinci basamağı (L-DOPA'dan dopamin oluşumunu) katalizleyen *dopa dekarboksilaz* (DDC) enzimleri farklı bakterilerde çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda L-DOPA sentezi için bir bakteriye ihtiyaç duyulurken, L-DOPA'dan dopamin sentezi için başka bir bakteriye gereksinim duyulmuştur. Araştırmacılar bu 2 aşamayı eş zamanlı olarak başlatıp ardi ardına tepkimeleri gerçekleştirdiklerinde üretkenliğin aşamalar ayrı yapıldığındaki üretkenlikten daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir [17].

Bakteriyel L-DOPA ve dopamin sentezini daha iyi anlayabilmemiz için bu aşamaları ayrı ayrı ele almamız gerekir.

1.3.1. L-DOPA Sentezi

L-DOPA sentezi bakteriyel bir enzim olan TPL tarafından gerçekleştirilir. TPL enzimi L-tirozinden fenol, amonyak ve pirüvat oluşumunu katalizler (Şekil 1.2a). Ortama katekol ilavesinde fenol ile katekol yer değiştirir ve yine TPL enzimi ile katekol, amonyak ve pirüvattan L-DOPA oluşturulur (Şekil 1.2b).



Şekil 1.2. L-DOPA'nın bakteriyel TPL ile katalizlenen sentez şeması.

TPL enziminin aktivasyonu için PLP koenzimi ve K^+ , NH_4^+ gibi kofaktörlere ihtiyaç vardır. Bu koşullar sağlandığında TPL tirozini yıkarak fenol, amonyak ve pirüvat oluşturur. Bu reaksiyon geri dönüşümlüdür. Pirüvat ve amonyağın yeterli miktarlarda bulunması durumunda TPL geri dönüşümlü olarak L-tirozini oluşturabilmektedir [17–19].

L-DOPA'nın biyosentezinde diğer bir anahtar enzim *tirozinaz*'dır. Bu enzim L-DOPA üretimini L-tirozinden fermentasyonla tek bir basamakta gerçekleştirir. Başarılı bir üretim için kültür koşullarının optimize edilmesi gerekir ve bu optimizasyon kullanılan organizmanın türüne göre sistemden sisteme farklılık gösterebilir. Enzim mikrobiyal (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Agaricus* ve *Neurospora* spp.) ve bitki orijinli olabilir (*Vicia* spp.) [20]. L-DOPA oluşumunda kullanılan substratlar tirozin ve katekol ile TPL enzimi hakkında da bilgi sahibi olmak, L-DOPA sentezini anlamayı kolaylaştıracaktır.

1.3.1.1. L-Tirozin

L-tirozin, bilinen 20 adet standart amino asitten biri olup, sentezindeki kompleks reaksiyon serilerinden dolayı esansiyel bir amino asittir. Buna ilaveten, diğer bir esansiyel amino asit olan fenilalanin önemli oranda (2/3) tirozine çevrilir. Bu dönüşümü tersinir olmayan bir şekilde katalizleyen *fenilalanin hidroksilaz* enzimi aktivitesindeki bir düşüş veya enzimdeki fonksiyon kaybı hücrede fenilalanin birikimine sebep olur ki

bu durum en iyi bilinen amino asit metabolizma bozukluklarından biri olan ve kendini mental bozuklukla gösteren *fenolketonürea*'ya sebep olur [1, 7, 9, 21].

Tirozin amino asiti L-DOPA ve daha sonra dopamin için başlangıç materyali olmasının yanında, epinefrin, norepinefrin gibi diğer birçok önemli monoamin grubu molekülün de öncülüdür. Vücutta saç ve deriye rengini veren ve siyah renkli pigment olarak bilinen melanin *tirozin hidroksilaz* (TH) enzimi ile tirozinden oluşur. Işığa duyarlı olması sebebiyle, TH enziminin aktivitesi güneş ışığı ile indüklenmektedir. Dolayısıyla güneş ışığına maruz kalma derecesi ve süresine göre melanin birikmesinden kaynaklanan ten rengi populasyonlar arasında önemli varyasyon göstermektedir. Ayrıca, tirozin tiroid hormonlarının sentezinde de öncül molekül olarak kullanılmaktadır [7, 9, 22–24].

Katekolamin sentezinde oran belirleyici basamak L-tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonudur. Bu basamak TH enzimi tarafından katalizlenir. Ancak, bu reaksiyon basamağındaki bir inhibisyonun daha çok epinefrin ve norepinefrin hormonlarının seviyesini oldukça düşürmesi fakat dopamin seviyelerini önemli oranda etkilememesi, dopaminin sentezinde alternatif mekanizmaların da rol oynadığını düşündürmüştür. Muhtemel alternatif bir mekanizma *tirozinaz* enzimi ile katalizlenen tirozinden dopakinon yapımıdır. Melanin oluşumu ile sonlanan bir seri reaksiyonun ilk safhasında dopakinon'dan L-DOPA üretilir. L-DOPA *tirozinaz* enzimi için alternatif bir substrat olduğundan bu reaksiyon daha da ileri gider. TH enzim eksikliğindeki durumun tersine, *tirozinaz* enzimi eksikliği öldürücü değildir ve daha çok kendini albinizmle belli eder [25].

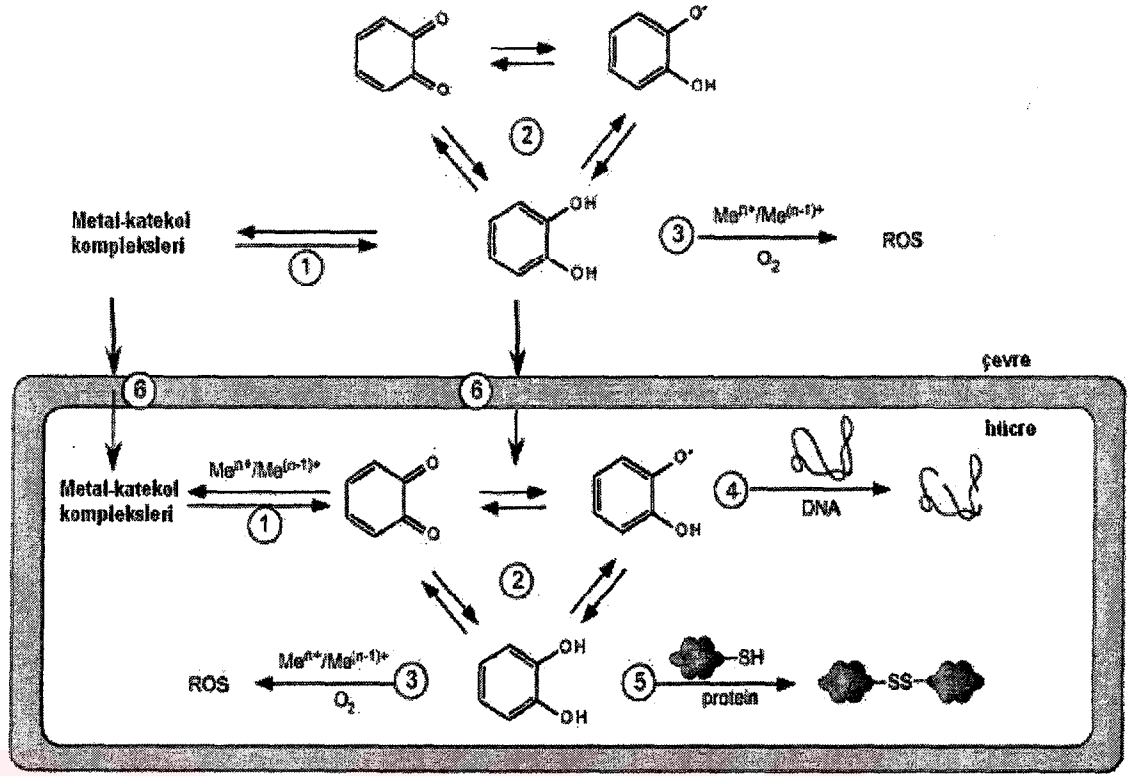
1.3.1.2. Katekol

Katekol (1,2-dihidroksibenzen) fotoğrafçılık, kürk boyama, lastik ve plastik üretimi ve eczacılık endüstrisi gibi alanlarda birçok uygulama alanında kullanılan bir kimyasaldır [26, 27]. Bu kimyasalın mikrobiyal üretimi lignin ve diğer aromatik halkasal bileşikler içeren ham maddelerin yıkımı sonucu olur [28]. İnsan ve birçok hayvanda ise katekoller daha çok hormon (steroid) metabolizmasının metabolitleri olmalarının yanında adrenalin, nöradrenalin, dopamin ve L-DOPA gibi endojen bileşiklerin metabolitleri olarak da bulunabilirler [29]. Ayrıca katekoller sigara dumanı ve besin bileşenleri (katekol, dopamin, kafeik asit, çay kateşini gibi) kaynaklı da olabilirler [30–34].

Hücrelerde katekollerin moleküler aksiyon modları önemlidir. Katekoller hem lipid peroksidasyonunu engelleyen birer antioksidan ve hem de DNA ve proteinler gibi makromoleküllere hasar veren pro-oksidanlar olarak rol oynayabilirler. Katekoller redoks aktiviteleri yüzünden membran fonksiyonunu da bozabilirler. Katekollerin ağır metaller (Cu^{+2} , Fe^{+2}) ile kombine olarak ve moleküler oksijen varlığında DNA zincirine hasar verdiği görülmüştür [35, 36].

Okside katekoller proteinlerin sülfidril grupları ile reaksiyona girer. Böylece katekol ya doğrudan sülfidril gruplarına bağlanarak proteinleri inaktive eder ya da protein radikallerinin oluşmasına neden olur. Bu protein radikalleri yeni çapraz bağlara ve dimer oluşmasına yol açarak proteinlerin ve peptidlerin agregasyonuna dolayısı ile inaktivasyonuna neden olur. Glutatyon hücrelerde önemli bir redükleyici (indirgeyici) ajan olduğu için iki glutatyon molekülünün bu şekilde biri birine bağlanması bu ajan tarafından sağlanan hücrenin redoks statüsünü değiştirebilir ve böylece oksidatif stres oluşabilir [37]. Östrojenler, L-DOPA, dopamin gibi katekol türevi bileşikler de proteinlere çapraz bağlanabilir ve onların yapı ve fonksiyonlarını etkileyebilir. Bu bağlamda, L-DOPA ve dopaminin nörofilamentlere çapraz bağlandığı saptanmıştır [38–41].

Katekollerin membranlar üzerindeki zararlı etkisi onların reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ya da lipid molekülleri ile reaksiyonları sonucu değil, membran potansiyelinde sebep oldukları değişiklik sebebiyledir [42]. Ancak, bütün bu olumsuz etkilerinin yanında katekoller lipid peroksidasyonunu önleme gibi yararlı etkilere de sahiptir. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif modifikasyonu olarak bilinen lipid peroksidasyonu çeşitli okside edici bileşikler tarafından başlatılan bir dizi reaksiyonla olur. Lipid peroksidasyonun büyük oranda membran hasarına yol açtığı ve patolojik süreçte önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Östrojenler, adrenalin, adrenerjik katekol türevleri (dopamin, izoproterenol gibi), kateşinler ve kafeik asit gibi katekol ve katekol türevlerinin lipid peroksidasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir [43].



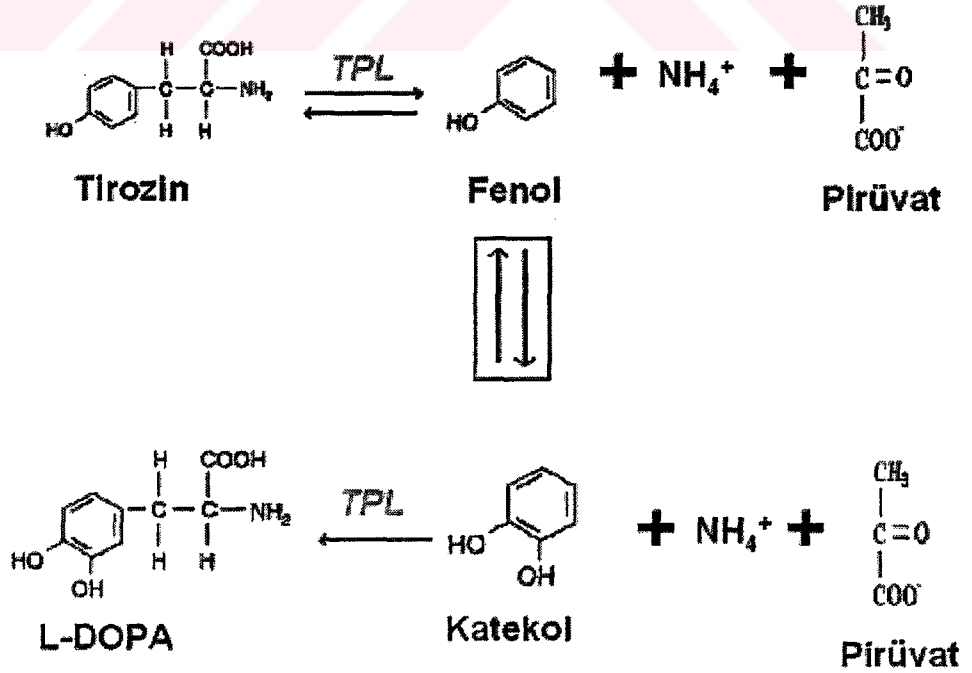
Şekil 1.3. Hücrede ve çevresinde katekollerin kimyasal reaksiyonları ve moleküler aksiyon modları. Katekollerin kimyasal reaksiyon modları ağır metallere kompleks oluşumu (1), redoks döngüsü (2) ve ağır metallere ve oksijenle reaksiyona girerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu (3) şeklinde iken, bu kimyasalların hücrelerdeki moleküler aksiyon modları zincir kırılımına götüren DNA hasarları (4), disülfid grupları ile çapraz bağlanma sonucu protein hasarı (5) ve membran aksiyon potansiyeli üzerinde meydana getirdikleri değişimler (6) olarak sıralanabilir [42].

1.3.1.3. Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Enzimi

Tirozin amino asitinin fenol, amonyak ve pirüvata dönüşümü TPL enzimi (EC 4.1.99.2) ile katalizlenir. Enzimatik katalizleme şeklinden dolayı bu enzim aynı zamanda *β*-tirozinaz olarak da adlandırılır [44, 45]. Reaksiyon geriye dönüşümlü (tersinir) bir reaksiyon olup eğer katekol fenol ile yer değiştirirse L-DOPA oluşur [44]. Günümüzde her yıl yaklaşık 250 ton L-DOPA üretilmekte olup bunun yaklaşık olarak yarısı TPL'nin kullanıldığı enzimatik metotla yapılmaktadır [47, 48]. Geri kalan kısmı ise kimyasal sentezle üretilmektedir. TPL enzimi ayrıca tirozin, serin, S-metilsistein, S-etilsistein, sistein, O-benzoilserin ve β-kloroalanin gibi maddelerden amonyum ve pirüvat oluşumunu da katalizler [49].

Mikroorganizmalar arasında L-tirozini fenol, piruvat ve amonyağa dönüştüren ve TPL tarafından katalizlenen reaksiyon sadece *Enterobacteriaceae* familyasına ait bir özelliktir. TPL enzimi L-tirozin ile indüklenirken katabolit baskılanmaya maruz kalmış hücrelerde inhibe olmaktadır [50]. TPL, aminotransferaz ailesine ait PLP-bağımlı bir enzim (B6 enzimi) olup L-tirozinin β -eliminasyon reaksiyonunu katalizler. Monovalent katyonların (NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) olmadığı ortamlarda enzim aktivitesi görülmezken, Na^+ katyonu enzimi inhibe etmektedir. Birçok PLP-bağımlı enzim normal reaksiyonun yanında yan grup transaminasyon reaksiyonları da gerçekleştirirler. Yani, bu enzimler bir substrattaki amino grubunu ko-enzime bağlayarak piroksidamin fosfat ve bir keto asit oluşumunu sağlarlar [51].

TPL enzimi benzer 4 alt üniteden (homotetramer) yapılmış olup, alt ünitelerin her birinin moleküler kütlesi yaklaşık 50 kDa'dur. Her alt üniteye transaminasyon reaksiyonunda görev yapan bir ko-enzim olan 1 adet piridoksal 5'- fosfat (PLP) bağlıdır. Diğer PLP bağımlı enzimlerin tersine TPL aktivitesi pH 6.0 ve 9.0 arasında önemli bir değişiklik göstermez [45]. Her ne kadar, bu enzimin bazı artropodlarda (eklem bacaklılar) da bulunduğu rapor edilmişse de L-DOPA üretimi için kullanılan enzimin esas kaynağının *Enterobacteriaceae* familyasına ait bazı bakteriler (özellikle, *Citrobacter* ve *Erwinia* türleri) olduğu bilinmektedir [17, 52, 53].



Şekil 1.4. TPL ile L-tirozinden L-DOPA sentezi

Bazı bakterilerde (*Erwinia herbicola*, *Citrobacter intermedius* ve *Citrobacter freundii*) TPL enziminin tirozin ihtiva eden ortamlarda indüklendiği, alanin amino asiti ile de baskılandığı rapor edilmiştir. Her ne kadar L-alanin TPL için bir substrat değilse de, bu amino asit tirozinin TPL tarafından dönüştürülmesini kompetitif olarak inhibe eder [49-54]. Bu enzim pH 8.5'te optimum aktivite göstermekte ve hücredeki esas lokalizasyonu önemli ölçüde sitoplazmik bölgede olsa da, enzimin periplazmik bölgede de bulunduğu rapor edilmiştir [54].

1.3.2 L-DOPA'dan Dopamin Sentezi

Bakteriyel dopamin sentezinde birinci aşamada sentez edilen L-DOPA ikinci aşamada substrat olarak kullanılır. L-DOPA'dan dopamin oluşumu *L-DOPA dekarboksilaz* (DDC) enzimi tarafından katalizlenir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. L-DOPA'dan Dopamin Sentezi

Dopamin oluşumu sırasında açığa çıkan CO₂ ortam pH'sının düşmesine yol açar. Bundan dolayı yüksek verimde dopamin üretmek için reaksiyon ortamının sürekli kontrolü gerekir [17].

1.3.2.1 L-DOPA Dekarboksilaz (DDC) Enzimi

L-DOPA dekarboksilaz (EC 4.1.1.28) enzimi (DDC) de TPL gibi PLP bağımlı bir enzim olup nöral dokularda dopamin biyosentezinde önemli bir rol oynar [55, 56]. DDC bu enzimin memelilerdeki formu olup L-DOPA, tirozin, fenilalanin ve triptofan gibi aromatik L-amino asitlere geniş bir substrat özgüllüğü gösterir. Örneğin bu enzim aynı zamanda triptofandan mutluluk hormonu olarak bilinen serotonin yapar. Bu enzimin aynı zamanda *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Papaver*

somniferum gibi geniş bir organizma grubunda da bulunduğu rapor edilmiştir [54]. Ancak, L-DOPA'nın dekarboksilasyonu sadece ökaryotik organizmalara özgü bir özellik değildir. L-DOPA'nın dopamine dekarboksilasyonunun çeşitli bakterilerde (*Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Streptococcus*) aynı reaksiyonu katalizleyen başka dekarboksilazlarla olduğu rapor edilmiştir [17, 57-59].

Farklı bakteriyel dekarboksilazlar arasında özellikle *Streptococcus faecalis* tirozin dekarboksilaz (TDC, EC 4.1.1.25) enziminin L-DOPA ve tirozin için yüksek oranda özgünlüğe sahip olması bu enzimin dopamin sentezi için tercih edilmesini sağlamıştır [60, 61].



Şekil 1.6. Tirozin dekarboksilaz tarafından katalizlenen L-DOPA→ dopamin reaksiyonu.

1.4. L-DOPA ve Dopaminin Terapötik Önemi

Bakteriyel olarak sentezlenen L-DOPA ve dopaminin terapötik önemi büyüktür. L-DOPA titreme, sertlik, konuşma yavaşlığı ve sonunda akıl hastalığına neden olan dejeneratif bir beyin hastalığı olarak bilinen ve her 1700 kişiden birinin yakalandığı Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılır. İsveçli bilim adamı *Arvid Carlsson* 1950'lerdeki çalışmalarında Parkinson hastalığı benzeri semptomlar gösteren hayvanlarda L-DOPA uygulanmasının bu semptomların azalmasına katkıda bulunduğunu gösterdi [62, 69]. Çalışmaları ile bu bilim adamı 2000 yılında Nobel Tıp Ödülü'nü kazanmıştır. 1960'da Parkinsonlu hastalarda önemli derecede beyin dopamin eksikliğinin keşfinden hemen bir yıl sonra Parkinsonlu hastalarda L-DOPA'nın güçlü terapötik etkisi gösterildi. Günümüzde her yıl yaklaşık 250 ton L-DOPA üretilmekte olup, bunun yaklaşık olarak yarısı TPL'nin kullanıldığı enzimatik metotla gerçekleştirilmektedir [46, 63, 64]. 1967'den beri yüksek dozlu oral L-DOPA uygulaması klinik olarak uygulanmaya gelmiştir. Her ne kadar başlangıçta Parkinson hastalığında L-DOPA'nın çalışma mekanizması hakkında bazı şüpheler olmuşsa da

bugün Parkinson hastalığında L-DOPA kullanımının bir beyin nörotransmitteri ile yer değişim terapisinin klasik bir örneğini teşkil ettiği bilinmektedir. Böyle bir uygulamadan Parkinson hastalarının çoğunlukla büyük yarar gördükleri kaydedilmiştir.

Ancak, bu tür ciddi bir hastalığın tedavisinde önemli bir ilaç olmasının yanında L-DOPA'nın bazı önemli yan etkileri de mevcuttur. Parkinson hastalığının temelini oluşturan nörodejeneratif süreçte oksidatif stres büyük bir rol oynamaktadır [65]. L-DOPA'nın serbest radikal oluşumu yolu ile nöronal hasara neden olabileceği yönünde bazı araştırmalar olmuştur [66, 67]. Herhangi bir tedavi görmemiş Parkinson hastaları ile L-DOPA ile tedavi görmüş Parkinson hastalarının kan hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, tedavi gören hastaların kan hücrelerinde daha yüksek düzeyde hidroksil radikalinin bulunduğunu göstermiştir [68]. Bütün bunlara rağmen, L-DOPA Parkinson hastalığında potansiyel kullanımı olabilecek diğer kimyasallara (antikolinergikler ve dopamin agonistleri) nazaran daha az yan etkiye sahiptir.

Kan-beyin bariyerini geçemediğinden, dopamin parkinson hastalığı tedavisinde kullanılmaz. Bu nedenle, dopamin öncülü olan L-DOPA kullanılarak bu bariyer aşılar ve nöronlara alınan L-DOPA burada DDC enziminin katalizlediği bir reaksiyonla Parkinson hastalığının esas terapötüğü olan dopamine dönüştürülür. Ancak, dopaminin doğrudan kullanım alanları da vardır. Örneğin, kardiyak verimi ve kan basıncını artırmak için şok halindeki hastalarda bu madde inotropik ilaç olarak kullanılmaktadır [70, 71].

Parkinson hastalığında temel ilaç olması sebebiyle L-DOPA ve onun ürünü olan dopaminin üretimi için son yıllarda alternatif yollar araştırılmış ve bazı bakterilerin bu maddeleri doğal olarak sentezlediklerinin anlaşılması üzerine bu yönde bazı çalışmalar olmuştur [17, 18]. Ancak, böyle basit organizmaların bu tür daha çok yüksek yapılı hayvanlardaki sinir impulsu iletimi ile ilişkili kimyasalları neden sentezledikleri konusunda bilgilerimiz henüz tam değildir.

1.5. Parkinson Hastalığı

İlk kez 1817'de İngiliz Doktor *James Parkinson* tarafından tanımlanmış olan Parkinson hastalığı beyin ile ilişkili bir hastalıktır. Beynin *substantia nigra* denilen kısmındaki sinir hücreleri ölür veya hasar görürse Parkinson hastalığı ortaya çıkar [5]. Normalde bu hücrelerin rolü vücut kaslarının ve hareketinin düzgün ve koordineli bir şekilde fonksiyon göstermesini sağlayan dopamin üretmektir. Dopamin üretici

hücrelerin yaklaşık olarak %80'i hasar görürse Parkinson hastalığı semptomlarının ortaya çıktığı belirlenmiştir [72].

Hastalığın ana semptomları titreme, kaslarda oluşan sertlik, hareketlerdeki yavaşlama (*bradikinezi*) ve denge bozukluğudur. Diğer semptomlar sıkışık ve okunaksız yazı yazma, sert veya sinirli bir yüz ifadesi, ayaklarını sürüyerek yürüme, boğuk bir sesle konuşma ve depresyondur. Sosyal, etnik, ekonomik ya da coğrafik sınırlar tanımayan bu hastalığın kadın ve erkekteki oranı hemen hemen aynıdır. Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl 60,000 hastaya Parkinson teşhisi konulmaktadır. Dünya çapında ise 4 milyon Parkinson hastası olduğu tahmin edilmektedir. Hastalık genellikle 65 yaş üstü bir olgu gibi kabul görmüşse de son yıllarda teşhis konulan hastaların yaklaşık %15'inin 50 yaşın altında olduğu bildirilmiştir [72, 73]. Bununla birlikte insanlar hastalıkla 20-30 yıl yaşayabilmektedirler [76].

20. yüzyıl başlarında 60 yaş ve üstü toplam nüfusun % 4'ünü oluştururken, yeni yüzyılda 65 yaş üstü nüfusun toplam dünya nüfusunun % 17'si olacağı tahmin edilmektedir. Bu durum Parkinson hastalığı insidansının yeni yüzyılda önemli derecede artacağını göstermektedir.

Parkinson hastalığı tedavisi için eksilen dopamini yerine koymak veya dopamin gibi etki gösteren ilaçlar (*pramipexole, ropinirole, pergolide, bromocriptine*) geliştirmek için çalışmalar önemli ölçüde artmıştır. Ancak, bu hastalığın tedavisinde en yaygın uygulama L-DOPA hapları kullanılarak dopamin eksikliğini gidermeye dayalı olanıdır [7, 9, 10]. Ancak L-DOPA'nın kan beyin bariyerine varmadan kanda ve diğer dokularda dopamine dekarboksilasyonu bu maddenin terapötik etki derecesini önemli ölçüde azaltmaktadır [74, 75]. Bu nedenle L-DOPA uygulaması onun dopamine dekarboksilasyonunu önleyecek inhibitörlerle (*cardidopa* ve *benserazide* gibi DDC enzimi inhibitörleri) birlikte yapılmalı ya da onu dolaşım sisteminde kararlı kılabacak bir yöntemle (ör; polietilenglikolle konjuge ederek) verilmelidir.

2. ÇALIŞMA İLE İLGİLİ KAYNAK ÖZETLERİ

Yapılmış olan literatür araştırmasında L-DOPA ve dopaminin bakteriyel sentezi üzerine nispeten az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmaların birinde TPL enzim aktivitesine sahip olan bakteriden ilgili gen bir plazmide aktarılarak konakçı hücreye transformasyonu yapılmış ve enzimin bu hücrelerdeki ekspresyonu araştırılmıştır [18]. Bu çalışmada konakçı hücre olarak *E. coli* ve *P. aeruginosa* tercih edilmiştir. Çalışmada ise L-DOPA'nın ucuz bir materyal olan benzenden biyosentezi araştırılmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada benzenden L-DOPA'yı sağlayacak katekolün oluşumu için *toluen dioksigenaz* (TDO) ve *toluen cis-glikol dehidrogenaz* (TCGDH) enzimlerine gereksinim olduğunu belirtmişlerdir [77, 78]. Dolayısı ile bir katekol türevi olan benzenden doğrudan L-DOPA elde edebilmek için bir plazmide TDO, TCGDH ve *Citrobacter freundii*'den TPL genleri klonlanmış ve biyotransformasyon için konakçı hücreler olarak *E. coli JM105*, *E. coli JM109* ve *P. aeruginosa* kullanılmıştır. TDO enzimi ile benzenden benzen cis-dihidrodiol, bu molekülden de TCGCH enzimi ile L-DOPA'ya prekürsör olan katekol sentezlenmiştir. Ortamda katekole ek olarak amonyum asetat ve pirüvatın bulunması ve TPL enzimi ile kofaktörü olan PLP varlığında L-DOPA oluştuğu bildirilmiştir. *E. coli* kullanılarak yapılan kültürlerde 4. saatte 3 mM L-DOPA üretimi kaydedilirken, *P. aeruginosa*'da aynı kültür koşulları altında bu değer 14 mM olarak belirlenmiştir. Bu farkın nedeni olarak sonraki bakterinin ilk bakteriye göre ortamda bulunan benzenin hücre membranı üzerindeki yıkıcı etkisine karşı daha dirençli olması gösterilmiştir.

Diğer bir çalışmada ise dopamin sentezi çalışılmıştır [17]. Bu çalışmada katekol, pirüvat ve amonyaktan enzimatik bir sistemle dopamin sentezi iki basamakta gerçekleştirilmiştir. İlk basamakta katekol, pirüvat ve amonyak katekolün yüksek konsantrasyonlardaki inhibitör etkisine karşı dirençli olan *Symbiobacterium* sp. SC-1 bakterisinin TPL'si ile L-DOPA'ya dönüştürülmüş ve bu sistemden saflaştırılan L-DOPA sıçan karaciğerinden izole edilen DDC enzimi ile *in vitro* bir düzenekle dopamine dönüştürülmüştür [17]. Bu çalışmada, katekolün TPL üzerindeki inhibe edici etkisine benzer olarak oluşan L-DOPA'nın DDC'yi belli oranlarda inhibe ettiği görülmüştür. Bu nedenle böyle bir dönüşüm (L-DOPA→dopamin) için DDC'ye göre L-DOPA'ya ve diğer katekollere daha dirençli olan ve aynı dönüşümü katalizleyen *Streptococcus faecalis* bakterisinin TDC'si kullanılmıştır. Burada *Symbiobacterium* sp. SC-1 TPL'sini rekombinant *E. coli* JM 105 bakterisine aktarmış ve dopamin üretimi

için de asetonla kurutulmuş *Streptococcus faecalis* hücreleri kullanmışlardır. Geribeslemeli bir fermentör ile devamlı katekol ve pirüvat ekleyerek 15. saatte 65g/l L-DOPA elde edilmiştir. 100 mM L-DOPA ve 0.15mg/ml asetonla kurutulmuş *S. faecalis* hücreleri içeren bir reaksiyon karışımında dopamin üretiminin 1 saate kadar lineer olarak arttığı, fakat aniden maksimum aktivitenin 1/10'i kadar bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Bu azalmanın ortamda piridoksal fosfatın (PLP) eksilmesinden dolayı olduğu ileri sürülmüştür. Ortama 5mg PLP eklendiğinde aktivitenin %70 arttığı gözlemlenmiştir. TDC enzim aktivitesinin 9 saat sonrasında substrat eksikliğinden dolayı azaldığı saptanmıştır. Dopamin üretiminde TPL ve TDC enzimlerinin direkt olarak eş zamanlı olarak reaksiyona girmesi denendiği zaman üretkenliğin, enzimlerin ayrı ayrı reaksiyonları gerçekleştirdiği üretkenliğe göre çok daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Üretilen L-DOPA ve dopamin HPLC yöntemi ile belirlenmiştir [17, 60].

L-DOPA üretimi için bakterilerin üreme ortamına tirozin eklenmesi gerekir. Bu da L-DOPA'nın saf olarak üretilmesini engeller. Araştırmacılar bir mutant transkripsiyonel regülatör (TyrR) taşıyan rekombinant *E. herbicola* hücreleri kullanarak bu problemin üstesinden gelmişlerdir. TPL enzimi tirozinle indüklenen bir enzimdir ve normal olarak tirozinin fenol, amonyak ve pirüvata α ve β -eliminasyonunu katalizler. Bu reaksiyon geri dönüşümlüdür ve katekol fenol ile yer değiştirdiğinde L-DOPA oluşur [46].

Ortamda tirozinin bulunması tıbbi standartlardaki L-DOPA'nın saf halde elde edilmesini oldukça zorlaştırır. Ortama eklenen tirozinin çoğu reaksiyon ürününü kontamine eder. Çünkü eklenen tirozinin çoğu nötral pH'da düşük çözünürlüğe sahip olduğu için çöker, böylece hücrelerle birlikte reaktöre taşınır. Ayrıca, tirozin kültürasyonu sırasında yıkılmasına rağmen L-DOPA üretimi başladığı anda hücreler ve ortamda bulunan serbest haldeki fenol TPL'nin ters reaksiyonu ile yeniden tirozine dönüştürülür.

Araştırmacılar bu dezavantajı önlemek için yüksek ifade sistemleri kullanarak güçlü promotorların önüne *tpl* genini yerleştirmişlerdir [79, 80]. Buna rağmen bu hücreler ile L-DOPA üretimi yabani tip hücrelerden daha az bulunmuştur.

Yapılan araştırmalar *tpl* promotorunun tirozin varlığında TyrR proteini tarafından aktive edildiğini göstermiştir. TyrR'nin aromatik amino asit metabolizması için gerekli olan genlerin regülasyonunda merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda yüksek TPL ifade suşu oluşturmak için hataya meyilli PCR ile *E.*

herbicola bakterisinin *tyrR* geni rastgele mutasyona uğratılmış ve sonra *tpl* promotorunun aktivasyon yeteneğini artırması gözlemlenmiştir. Sonuç olarak 3 amino asit yer değişikliğini (V67A, Y72C, E201G) içeren bir *tyrR5* alleli elde edilmiş ve *tyrR5* alleli taşıyan bir plazmidin transforme edildiği *E. herbicola* hücrelerinin ortama tirozin konulmadan önemli derecede *tpl* ekspresyonu yapabildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar pratik L-DOPA üretimi için rekombinant *E. herbicola* hücrelerinin uygulanmasını göstermiştir. Araştırmacılar bu deneyle yüksek verim ve yüksek saflıkta L-DOPA oluşması için bu hücrelerin oldukça uygun olduğunu göstermiştir [52, 81, 82]. Bu hücreleri kullanmanın avantajları sadece onların yüksek üretimi ve tirozin eklenmesinden kaçınmak değil, aynı zamanda orijinal üretim tesisini değiştirme ya da modifiye etmeye gerek duyulmamasıdır [47].

Yaptığımız çalışmada ilk defa Gram-negatif (*C. freundii*, *E. herbicola*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*) ve Gram-pozitif (*S. faecalis*) bakterilerin kültür ortamlarında ve ayrıca *in vitro* bir düzenekteki L-DOPA ve dopamin üretimi araştırılmıştır. Çalışmada kültür ortamlarında bakterilerin hücre içinde tuttıkları, hücre dışına saldıkları ve total (hücre içi+hücre dışı) L-DOPA ve dopamin seviyeleri saptanmıştır. Ayrıca *in vitro* bir reaksiyon düzenğinde bakterilere ait enzimler (TPL ve TDC) kullanılarak üretilen L-DOPA ve dopamin düzeyleri de rapor edilmiştir. Ayrıca şimdiye kadar çalışılmamış olan *C. freundii* ve *E. herbicola*'ya yakın diğer bakterilerin (*E. aerogenes*, *P. aeruginosa*) L-DOPA ve dopamin üretilip üretilmediği de ilk defa yapılan bu çalışmada araştırılmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Ayıraçlar

Bu çalışmada besiyeri hazırlamasında kullanılan kimyasallar ve trikloroasetik asit, piridoksal fosfat, sodyum sülfid, sodyum dihidrojen fosfat, katekol, amonyum klorid, potasyum fosfat (KPi), fosforik asit, Nessler ayıracı kimyasalları (HgI₂, KI, NaOH), metanol, L-DOPA ve dopamin hidroklorür analitik saflık derecesinde olup Sigma şirketinden; L-tyrosine, pürvik asit Acros şirketinden temin edilmişlerdir.

3.1.1. Nessler Ayıracı

Nessler ayıracı solüsyon A ve solüsyon B adı verilen iki solüsyonun karışımından oluşur [83]. *Solüsyon A*, 35g KI ve 50g HgI₂ içeren 200 mL bir solüsyon iken, *solüsyon B* 50g NaOH içeren 250 mL'lik solüsyondur. Solüsyon A ve B soğutulduktan sonra solüsyon B solüsyon A'ya eklenmiş ve bu karışım (Nessler ayıracı) ışıktan korunacak şekilde koyu renkli şişeler içerisinde karanlıkta muhafaza edilmiştir.

Renk oluşumu ve olabilecek presipitasyon için bu şekildeki bir muhafaza en az bir hafta süre ile yapılmıştır. Bu süreden sonra ayıracın renklenmiş (sarı-turuncu) olan sıvı kısmı (dipte oluşan presipitata dokumulmadan) kullanılmıştır.

3.2. Araştırmada Kullanılan Besiyeri Ortamları

Bu çalışmada zengin bir besi ortamı olan Luria-Bertani (LB) (pH 7.0), besinsel açıdan fakir bir minimal ortam (M9) ve bu her iki ortamın %0.1 tirozin içeren formları kullanılmıştır. Her iki besiyerinin içeriği Çizelge 3. 1. ve Çizelge 3. 2.'de verilmiştir. Besiyerleri 100 mL kapasiteli erlenlerde 20 mL besiyeri olacak şekilde 30 dakika 121°C'de 1 atm basınç altında steril edilmiştir.

Ortamlara eklenen azot ve karbon kaynakları (M9 için) benzer şekilde ancak stok solüsyonlar olarak ayrı steril edilmiş (karamelizasyonu önlemek için) ve oda sıcaklığına gelen besi ortamlarına istenen son konsantrasyonları verecek şekilde ilave edilmiştir.

Çizelge 3.1. Luria-Bertani (LB) Besiyerinin İçeriği (g L⁻¹)

NaCl	10
Pepton	10
Maya özütü	5
%0.1 L-tirozin (otoklav sonrası)	

Çizelge 3.2 Medium 9 (M9) Besiyerinin İçeriği (g L⁻¹)

Na ₂ HPO ₄	6
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0.5
NH ₄ Cl	1
Otoklav Sonrası Eklenen Stok Solusyonların İçeriği (mL L ⁻¹)	
0.01 M MgSO ₄ .7H ₂ O	10mL
0.01M CaCl ₂	10mL
Glukoz (%20)	10mL
%0.1 L-tirozin (NH ₄ Cl yerine)	

3.3. Araştırmada Kullanılan Bakteriler

Bu araştırmada çeşitli Gram-negatif bakteriler (*Enterobacter aerogenes* (NRRL B-427), *Pseudomonas aeruginosa* (NRRL B-771), *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643), *Erwinia herbicola* (NRRL B-3599)) ve Gram-pozitif bir bakteri olan *Streptococcus faecalis* (ATCC 29122) bakterisi kullanılmıştır. Bu bakterilerin bazıları için (*Citrobacter freundii*, *Erwinia herbicola* ve *Streptococcus faecalis*) L-DOPA ve dopamin üretim özellikleri ilgili literatür bilgisi mevcuttur. *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *E. herbicola*, *C. freundii* bakterileri Amerikan Tarım Bakanlığı Kültür Koleksiyonu'ndan (USDA Culture Collection, Peoria, Illinois, USA) bakteri stok kültürlerinden sorumlu küratör Dr. Alejandro Rooney tarafından tarafımıza sağlanmıştır.

3.4. Araştırmada Kullanılan Bakterilerin Üretilmesi ve Stok Kùltürler

Araştırmada kullanılan bakterilerin uzun süreli stokları % 20 gliserol (v/v) içeren sıvı LB besi ortamı içinde yapılmıştır. Bunun için logaritmik fazdaki kùltürlerden steril Eppendorf tüplerine 1 mL alınıp, 5,000 rpm'de 3 dak santrifüj edilmiş ve supernatan dökülerek bunun yerine 0.8 mL LB ve 0.2 mL gliserol eklenerek -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir. Bu tür bir stoktaki hücrelerin 2 yıl canlılıklarını korudukları (koloni oluşturma) belirlenmektedir. Ancak çalışmada bu stok kùltürler değil, LB agar plaklar (+4 °C'deki 1 ayı geçmeyen sürelerle tutulmuş taze pasajlar) kullanılmıştır. Yani, TPL enzimi sentezi, L-DOPA ve dopamin üretimi çalışmaları için hücre kùltürleri bu pasajlardan yapılmıştır. Pasajlardan bir koloni alınarak 20 mL besiyeri/100 mL erlenlere ekim yapılmış ve 1 gece (~15 saat) 37 °C'de çalkalamalı (200-rpm) etüvde inkübe edilmiştir. Bu kùltürler çalışma sırasında stok olarak kullanılmıştır.

3.5. L-DOPA ve Dopamin Sentezi İçin Bakteri Kùltürleri

Bakterileri plaklarından bir koloniden 1 öze dolusu alınarak 20 mL LB içeren 100 mL kapasiteli erlenlere ekim yapılmış ve gece boyunca çalkalamalı koşullarda (200-rpm) 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu stok kùltürlerden taze besiyerlerine %1 olacak şekilde (Ör; 20 mL LB içeren erlenlere 200 µl gece kùltürü) ekim yapılmış ve inkübasyona (24 saat 200-rpm, 37 °C) bırakılmıştır. TPL enzimi tirozin ile indüklediği için ekim yapılmadan önce besiyerine % 0.1 olacak şekilde tirozin eklenmiştir.

3.6. Kùltür Ortamındaki Toplam Biokùtle Belirlenmesi

Hücre kùltürlerinde çoğalma indikatörü olarak toplam ortam türbiditesinin optik yoğunluğu kullanılmıştır. Bunun için belirlenmiş kùltür fazlarında kùltürün optik yoğunluğu 600 nm dalga boyunda kaydedilmiştir. OD₆₀₀ > 0.5 olduğu zaman kùltürler uygun şekilde (1/5 veya 1/10) dilüsyon yapılarak değerleri kaydedilmiştir. Hücrelerin hepsi durağan fazlardan geldiklerinden bu tür bir biyokùtle belirlemesi canlı hücre sayıları ile ilişkili değildir. Ancak, bu tür bir ölçümü yapmamızdaki amaç hücre

özütlerinin hazırlanmasında eşit OD değerlerini sağlayarak eşit miktarda biyokütle'yi sonifiye etmek içindir.

3.7. Kültür Supernatantlarının Saklanması

Kültürler belli zaman sürelerince inkübe edildikten sonra santrifüj tüplerine transfer edilmiş ve 10,000 xg'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj sonrası elde edilen supernatantlardan 1'er mL alınmış ve alüminyum folyo ile kaplanmış Eppendorf tüplerine konularak hücre dışı L-DOPA ve dopamin tayini için HPLC ile ölçüm yapılana kadar +4 °C saklanmışlardır.

3.8. Hücre Özütlerinin Hazırlanması

İnkübasyon sonrası santrifüj edilen kültürlerin pelletleri bu bölümde hücre içi L-DOPA ve dopamin üretimi, *in vitro* düzenekteki L-DOPA ve dopamin üretimi ve TPL aktiviteleri için kullanılmışlardır. Peletler 0.05 M KPi tamponunda (pH 8.6) iki kez yıkandıktan sonra aynı tamponda $A_{600} = 10$ olacak şekilde tekrar süspansiyon edilmiş ve bu süspansiyonlar bir ultrasonifikatör (Sanyo soniprep 150) ile 40 saniye sonifikasyon, 20 saniye buz üzerinde inkübasyon olacak şekilde toplam 3 dakika sonifiye edilerek ultrasonik hücre özütleri hazırlanmıştır. Hücre özütleri 10,000 xg ve 4 °C'de 5 dakika santrifüj edilerek supernatantlardan 1'er mL alınıp alüminyum folyo ile kaplanmış Eppendorf tüplerine konulmuştur. Hücre içi L-DOPA ve dopamin seviyesi analizinin yapıldığı ve TPL enzim aktivitesinin belirlendiği bu supernatantlar HPLC ile ölçüm yapılana kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.9. Tirozin Fenol Liyaz Enziminin Aktivite Tayini

TPL enzim aktivitesi, enzim tarafından L-tirozinin fenol, pirüvat ve amonyağa yıkılmasından açığa çıkan amonyağın belirlenmesine dayanan ve yaygın olarak kullanılan Nessler reaksiyonu ile belirlenmiştir [84]. Toplam 1 mL olan reaksiyon karışımı, 5 mM L-tirozin ve 0.1 mM piridoksal fosfat (PLP) içeren 800 µl 0.05 M KPi (pH 8.6) ve 200 µl hücre özütünden oluşmaktadır. Her bir örnek için paralel hazırlanmış kör tüplere özüt konulmadan önce 0.1 mL 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) konularak hücre proteinlerinin (dolayısı ile TPL'nin) denatürasyonu sağlanmıştır. Örnekler ve

bunlara karşı gelen körler 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra örnek tüplerine 0.1 mL 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) konularak reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyon karışımı daha sonra 10,000 xg’de 5 dakika santrifüj edilerek, 500 µl süpernatant 1.75 mL distile su içeren tüplere transfer edilmiştir. Bu karışıma 250 µl Nessler ayırıcı eklenerek toplam hacim 2.5 mL yapılmış ve karışım vortekslenerek, 10 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur. Bu süre sonunda oluşan renk yoğunluğu değerleri o renge özgü olan 480 nm dalga boyunda körlerine karşı okunarak kayıt edilmiştir. Bir TPL enzim ünitesi (U), 37°C’de 1 dakikada 1 µmol amonyak açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanırken, spesifik aktivite (SA) miligram toplam hücre proteininde bulunan enzim ünitesi olarak ifade edilmiştir. Örneklerdeki amonyak konsantrasyonu, daha önce amonyum sülfatla hazırlanmış olan standart eğri yardımı ile hesaplanmıştır. Bu metodla amonyak belirleme alt sınırı yaklaşık 10 µM olarak belirlenmiştir. Örneklerdeki total protein miktarı, sığır serum albumininin (BSA) standart olarak kullanıldığı Lowry metoduna göre yapılmıştır [86].

3.10. L-DOPA Üretimi İçin *in vitro* Düzenek

L-DOPA ve dopamin üretimi doğrudan hücre ortamından ve hücrenin kendisi tarafından sağlanan bileşiklerden yapılabileceği gibi *in vitro* bir düzenekle TPL’nin bulunduğu ortamda üretilebilir. Toplam 1.1 mL olan reaksiyon karışımı 900 µl KPi (pH 8.6) içinde 0.05 mM katekol, 0.05 mM pirüvik asit, %0.1 ‘lik sodyum sülfat (w/v), 0.1 mM piridoksal fosfat (PLP), 0.65 M amonyum klorid ve 200 µl hücre özütü içerecek şekilde hazırlanmıştır [17]. Örnekler 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 0.1 mL 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. L-DOPA ışık ve hava teması ile bozulduğu için reaksiyon alüminyum folyo ile sarılı kapalı Eppendorf tüplerde yapılmış ve HPLC ile tayin edilene kadar ışık almayan bir ortamda muhafaza edilmiştir.

3.11. L-DOPA ve Dopaminin HPLC ile Analizi

Hem hücre kültürlerindeki ve hem de bir *in vitro* reaksiyon ortamında elde edilen L-DOPA ve dopamin miktarı Agilent 1100 HPLC cihazı ile ölçülmüştür. Analizler çizelge 3.3.’de verilen cihaz parametrelerine göre gerçekleştirilmiştir. Burada

1000 mg/L (1000 ppm)'lik stok L-DOPA ve dopamin çözeltilerinden, kalibrasyon için ara stok standartlar 10-200 mg/L (10-25-50-100-200) aralığında hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrileri L-DOPA ve dopamin için standartlar kullanılarak elde edilmiştir. Bu kalibrasyon eğrileri için korelasyon katsayıları genel olarak ≥ 0.99 düzeyinde olmuştur. Analizlerde her bir örneğin üç tekrarı hazırlanarak ölçülmüş ve elde edilen verilerin aritmetik ortalamaları alınarak sonuçlar hesaplanmıştır. Her analiz öncesi standart grafikler çizilerek kalibrasyon yenilenmiş ve her bir analizin gerçekleştirilmesi ve peşinden kolonun temizlenmesi için geçen sürenin 10 dakika olduğu saptanmıştır.

Çizelge 3.3. HPLC cihazı analiz parametreleri.

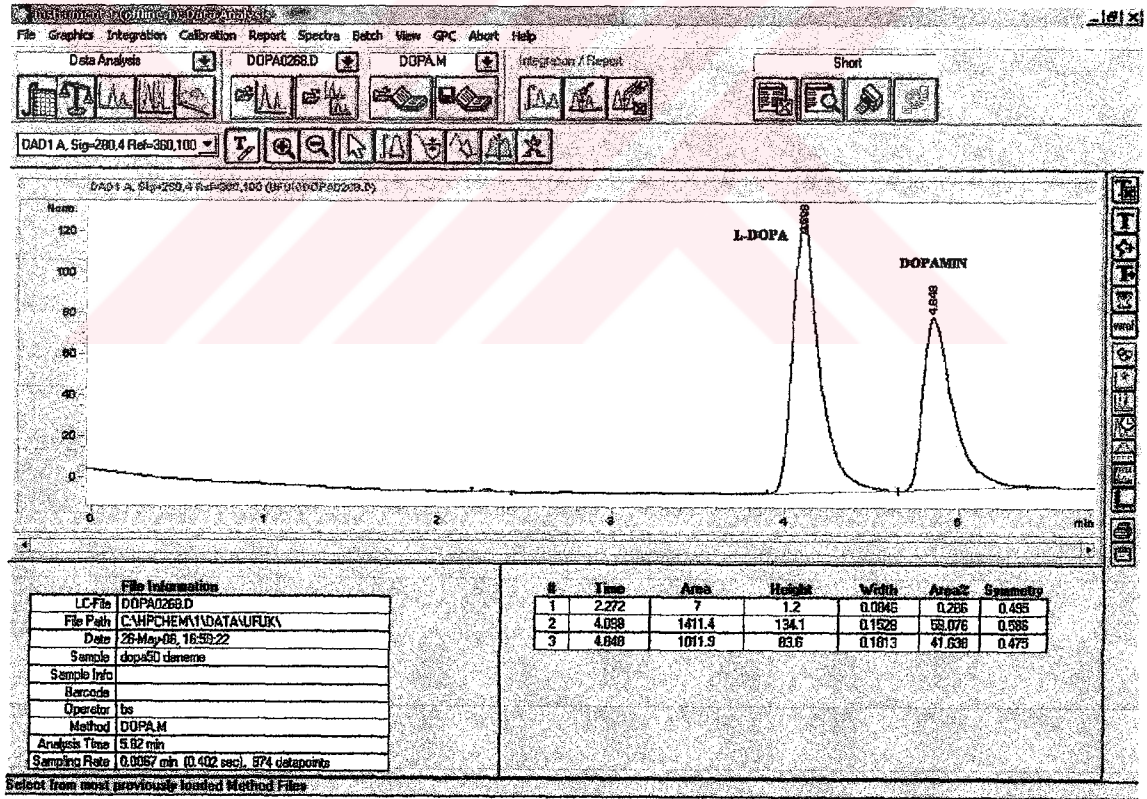
PARAMETRE

Kolon	SGE C ₁₈ (4.6 x 250 mm,5 μ m)
Dedektör	Diyot Array Dedektör (DAD)
Çözgen karışımı (mL)	20 mM Fosfat Tamponu pH: 3.0 / Metanol (97 / 3)
Çözgen akış hızı (mL/dk)	1.0
Kolon sıcaklığı (°C)	25
Tayin yapılan dalga boyu (nm)	280
Hesaplama kriteri	Pik alanı

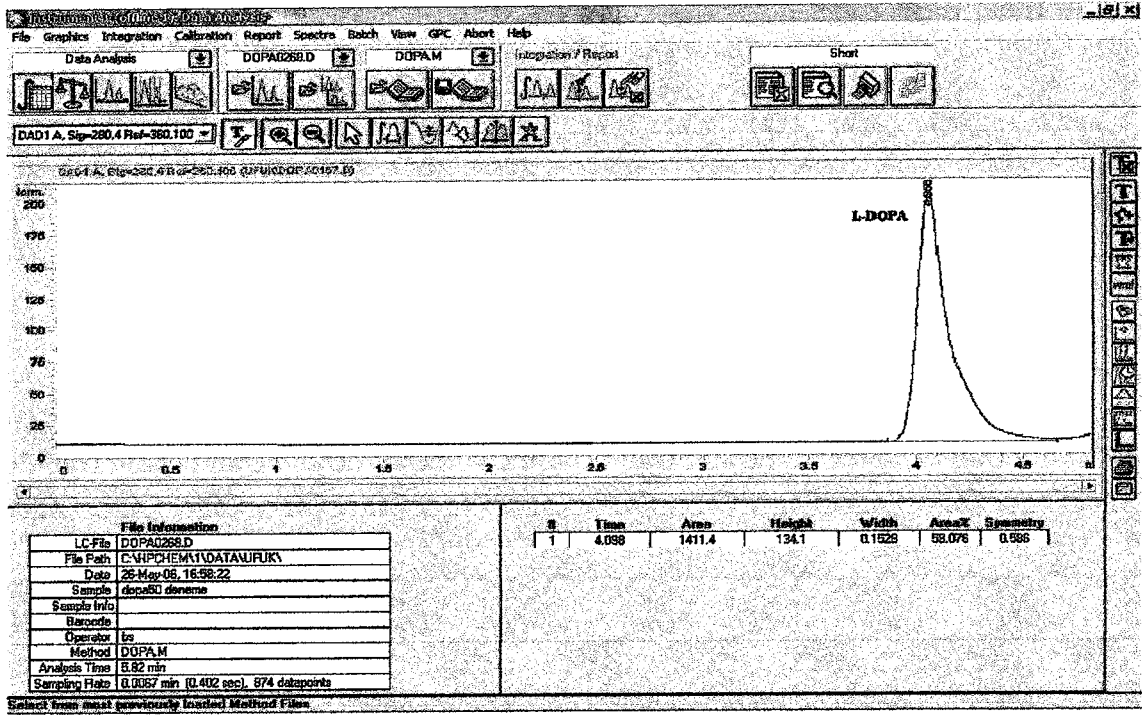
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. HPLC ile L-DOPA ve Dopamin Ölçümü

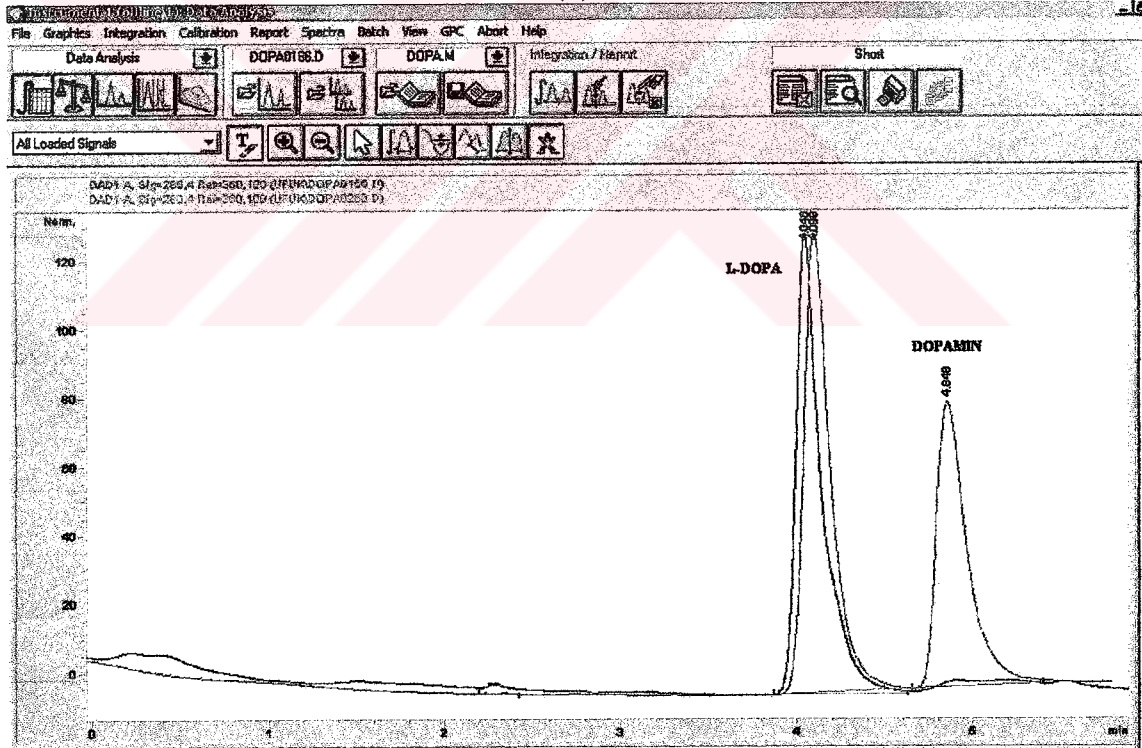
L-DOPA ve dopamin üretimi için analizi yapılacak olan örneklerin HPLC ile ölçümü yapılmadan önce L-DOPA ve dopamin standart grafikleri oluşturulmuştur. Standart grafikler ara çalışma konsantrasyonlarında L-DOPA ve dopaminin ayrı ayrı ve birlikte hazırlanarak cihaza verilmesi ve oluşan spektrumlara göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen spektrumlar hem standart grafikler oluşturulurken hemde örneklerinin analizi yapılırken üst üste çakıştırılarak (Şekil 4.1.(c)) analizin hassasiyeti sürekli kontrol edilmiştir. Örneklerin analizi bu standart spektrumdan oluşturulan kalibrasyon grafiği baz alınarak (Şekil 4.1.) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1 (a). L-DOPA ve dopamin karışımını içeren solüsyondan gelen HPLC spektrumu.

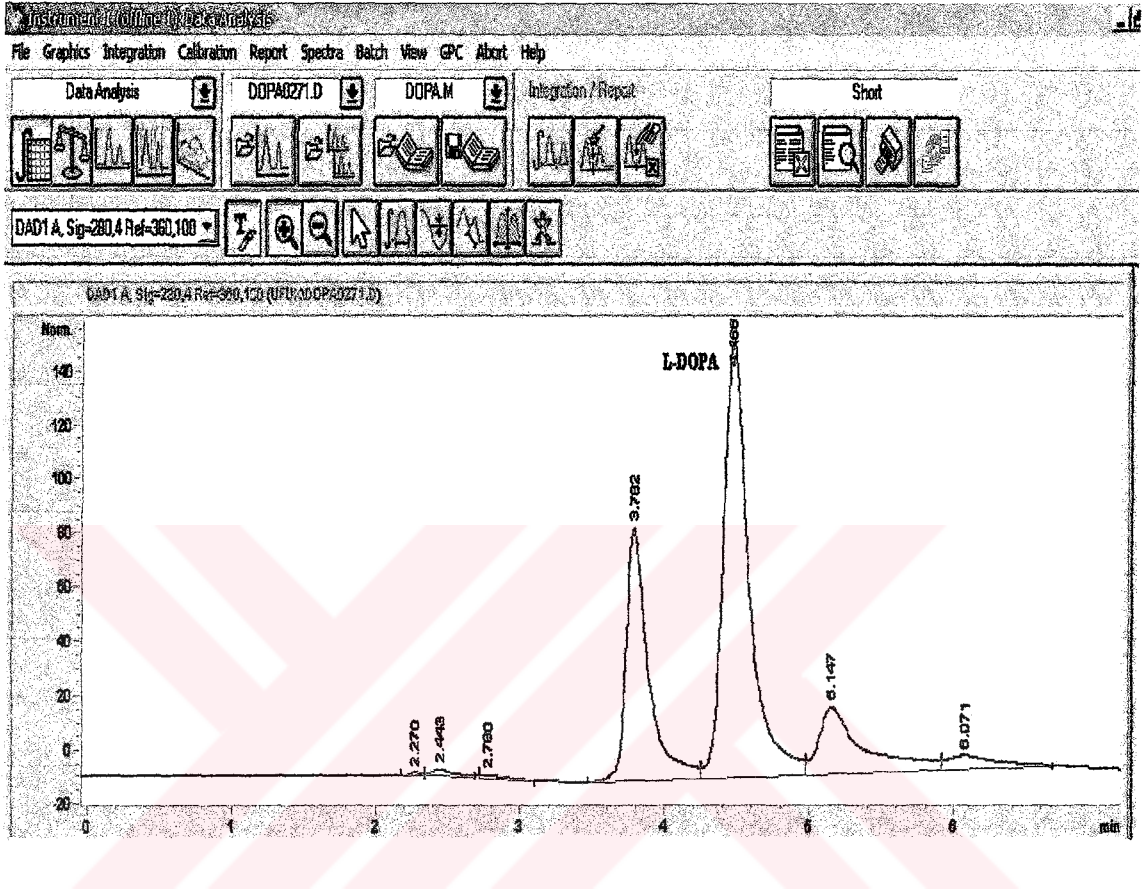


(a)



(b)

Şekil 4.1 (b). a) Saf L-DOPA'nın HPLC spektrumu; b) Dopamin ve L-DOPA karışımı ile saf halde uygulanmış L-DOPA'nın sistem tarafından çakıştırılmış HPLC spektrumu.



Şekil 4.1 (c). *C. freundii*'nin 12 saat kültüre edilen LB + % 0.1 tirozin içeren ortamdan gelen L-DOPA düzeyini gösteren HPLC spektrumu.

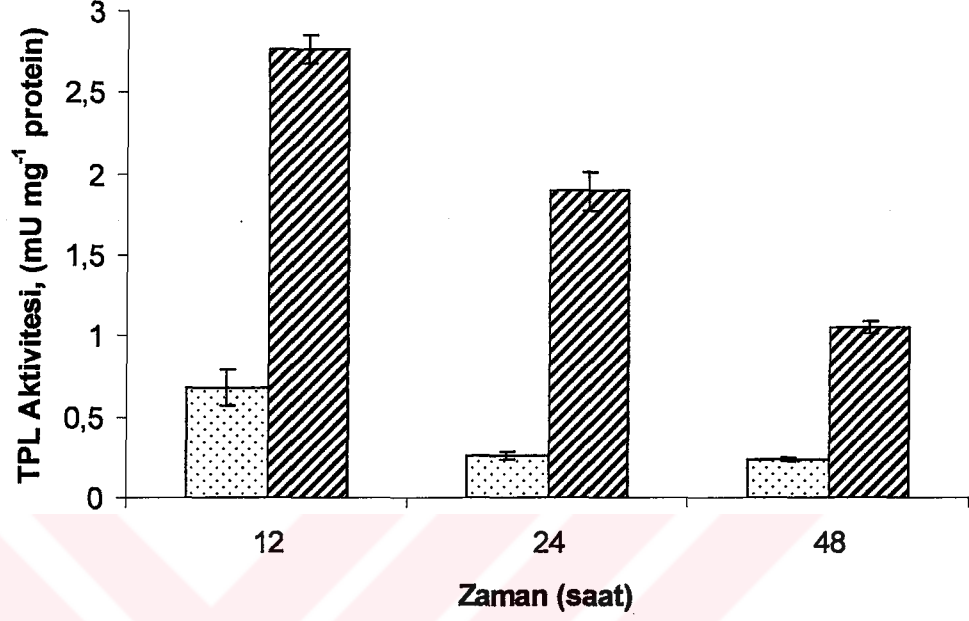
4.2. Farklı Kültür Koşullarının ve Kültür Fazlarının Tirozin Fenol Liyaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çalışmanın bu kısmında *C. freundii*'deki TPL aktivitesinin farklı kültür koşulları altında nasıl değiştiği araştırılmıştır. L-tirozin bu enzimin hem substratı ve hem de indükleyicisi olduğu için, ön çalışmalarımızda değişik konsantrasyonlarda L-tirozin eklenen ortamlarla L-tirozin içermeyen kontrol ortamları karşılaştırılmış ve hem minimal ve hem de zengin besi ortamında L-tirozinin % 0.1 oranında bu enzimin aktivitesini maksimum indüklediği görülmüştür. Bu oranın üzerinde (% 0.4) tirozin kullanılmasının TPL enzim aktivitesinde % 0.1'e göre önemli bir değişiklik yapmadığının belirlenmesinin yanında böyle yüksek oranlardaki tirozinin kültür dinamikleri (hücre çoğalması) üzerinde de önemli negatif etki yaptığı gözlenmiştir. Dolayısı ile çalışma boyunca L-tirozin içeren ortam denilmesi tirozinin % 0.1 oranında eklendiğini ifade etmektedir. Araştırmanın bu kısmında ayrıca farklı kültür fazlarındaki *C. freundii*'nin genç ve yaşlı hücrelerinde TPL aktivitesini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Bu amaç için 12, 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilmiş hücreler kullanılmıştır.

4.2.1 Zengin Besi (LB) Ortamında *C. freundii*'nin Tirozin Fenol Liyaz Aktivitesi

Zengin besi ortamında kültürü yapılan *C. freundii* hücrelerinin TPL aktivitesi Şekil 4.2. de gösterilmiştir. Bu ortama L-tirozinin eklenmesi enzim seviyesinde önemli artışa sebep olmuştur. Bu artış oranının farklı kültür fazlarında 4-7 kat arasında olduğu belirlenmiştir. *C. freundii*'nin genç hücrelerinde (12 saat) TPL enzim aktivitesi en yüksek düzeyde iken daha ileri kültür basamaklarında enzim aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu tür bir enzim profili hem LB ve hem de L-tirozinle desteklenen LB ortamında belirlenmiştir. Tirozin ilave edilmiş kültürlerde 12. saatte 24. ve 48. saatteki kültürlerle göre sırası ile 1.5 ve 2.63 kat daha fazla TPL enzim aktivitesi bulunurken, tirozin içermeyen LB ortamında da bu genç hücreler için 24. ve 48. saatteki hücrelere göre benzer bir eğilim gözlenmiş ve sırası ile 2.65 kat ve 2.90 kat daha fazla TPL aktivitesi gözlenmiştir. Diğer bir deyişle her iki ortamda da enzim aktivitesi zamana bağlı olarak önemli ölçüde düşüş göstermiştir. L-tirozinin TPL enzimini indükleyici etkisi oldukça barizdir. Tirozin ilavesi yapılan ortamda 12 saat kültürasyondan gelen hücreler bu amino asiti içermeyen LB ortamının aynı fazındaki hücrelerine göre 4.1 kat

daha fazla TPL aktivitesi gösterirken, 24 saat ve 48 saat kültürlerinde bu oran 7.1 ve 4.5 kat olarak belirlenmiştir.

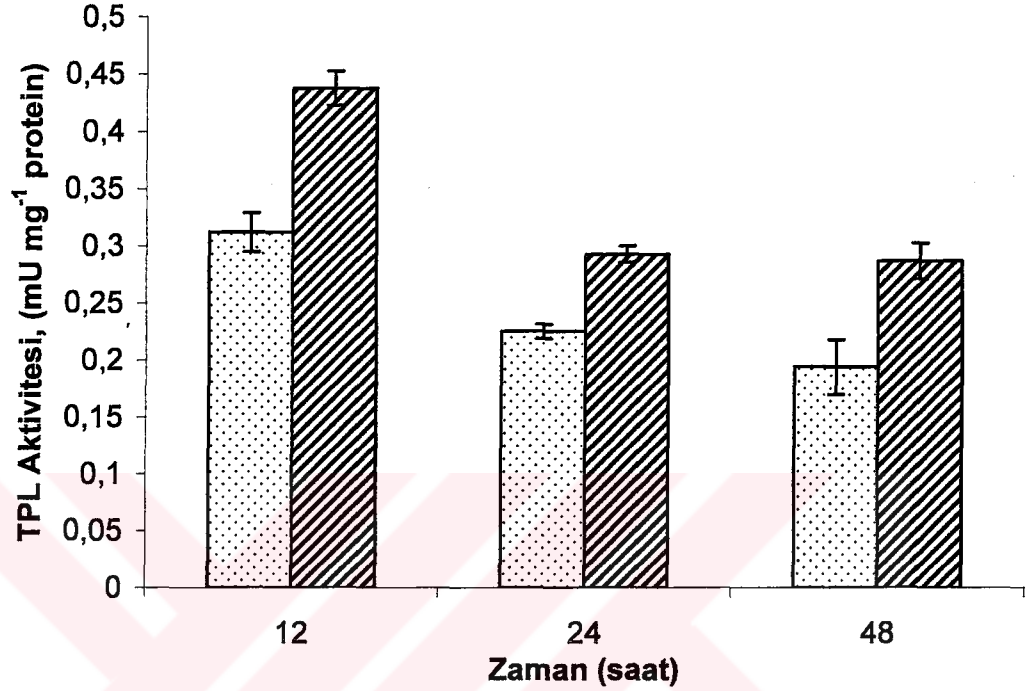


Şekil 4.2. *C. freundii*'nin LB (□) ve LB+%0.1 tirozin (▨) ortamlarında farklı kültür fazlarındaki TPL aktivitesi. Her veri noktası en az üç bağımsız deneyin ortalamasından gelmektedir. Dikey hata çubukları \pm standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.

4.2.2. Minimal Besi (M9) Ortamında *C. freundii*'nin Tirozin Fenol Liyaz Aktivitesi

Minimal besi (M9) ortamında kültürü yapılan *C. freundii* hücrelerinin TPL aktivitesi Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. Bu ortamda da L-tirozin ilavesinin TPL aktivitesi üzerinde indükleyici bir etki yaptığı görülmektedir. Ancak, bu ortamda TPL'nin tirozinle indüklenme oranı LB ortamına göre çok daha düşük kalmıştır. Ayrıca, bu ortamda kültüre edilen hücreler LB ortamında kültüre edilen hücrelere göre oldukça düşük enzim aktivitesi göstermişlerdir. Bu ortamda kültürü yapılan hücrelerin 12. saatte LB ortamındaki aynı fazdaki kültüre göre 2.2 kat daha düşük bir TPL aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir. Ancak bu fark ileri kültür fazlarında daha düşük olmuştur (24 ve 48 saat kültürler için sırası ile % 14 ve % 21). İki kültür ortamı (LB ve M9) arasında TPL aktivitesindeki fark bu ortamların %0.1 tirozin içermesi halinde daha çarpıcı olmuştur. LB + tirozin ortamında 12 saat kültüre edilen hücreler aynı fazdaki M9 + tirozin ortamındaki hücrelere göre 6.3 kat daha fazla bir TPL aktivitesi gösterirken, 24.

ve 48. saat kültürleri için bu oran sırası ile 6.5 ve 3.7 kat olarak belirlenmiştir. Diğer bir deyişle, minimal ortamda tirozinin TPL'yi indükleyici etkisi LB ortamındaki indükleyici etkinse göre çok daha düşük kalmıştır.



Şekil 4.3. *C. freundii*'nin M9 (□) ve M9+%0.1 tirozin (▨) ortamlarında farklı kültür fazlarındaki TPL aktivitesi. Her veri noktası en az üç bağımsız deneyin ortalamasından gelmekte olup ince dikey hata çubukları \pm standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.

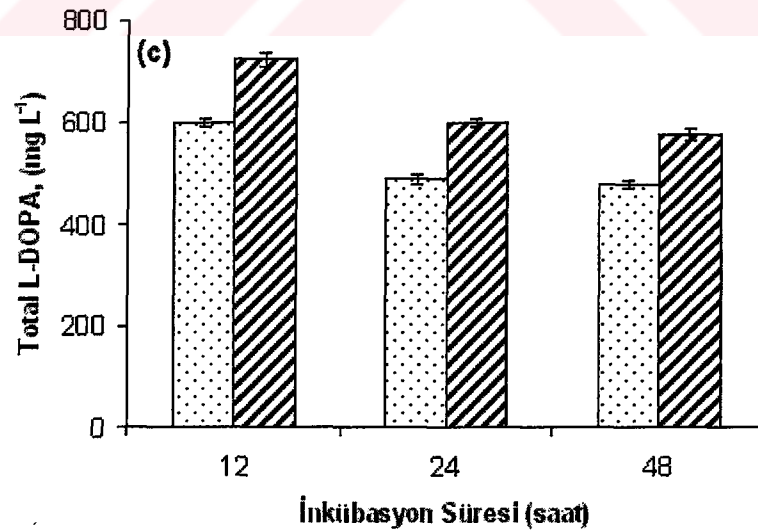
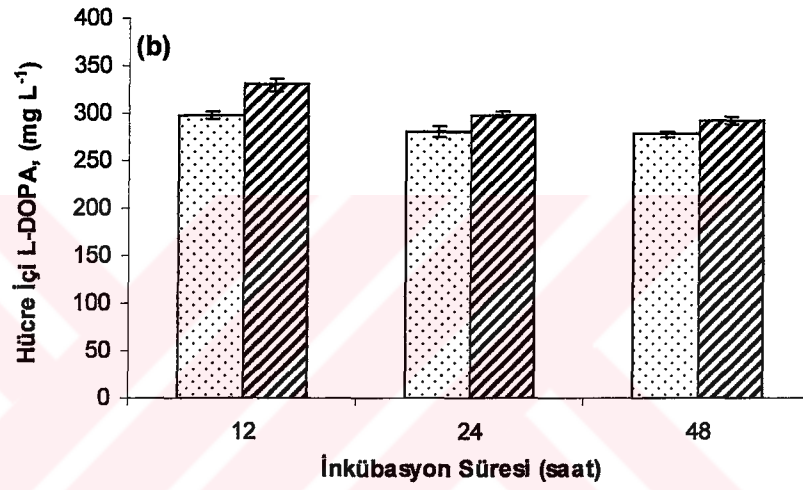
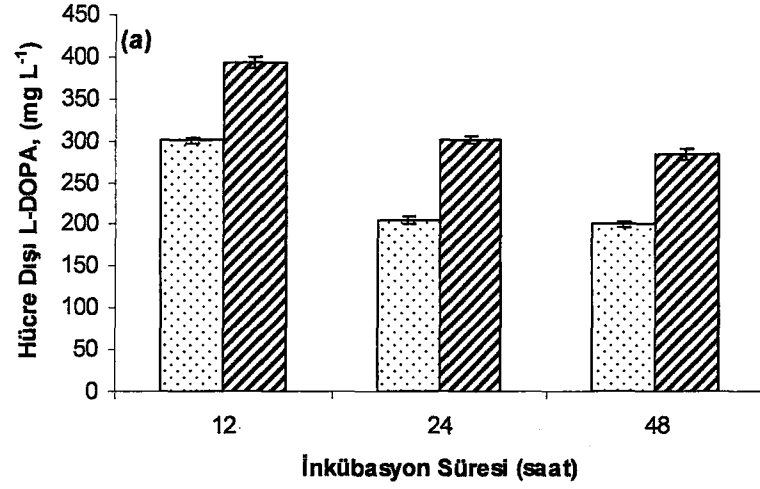
4.3. Farklı Kültür Koşullarının ve Fazlarının L-DOPA Üretimi Üzerindeki Etkisi

Bu kısımda farklı inkübasyon zamanlarından ve farklı ortamlardan gelen *C. freundii* hücrelerinin L-DOPA üretim özellikleri araştırılmıştır. Yukarıda farklı kültür ortamları ve fazları için belirlenmiş olan TPL aktivitesinin bu bakteri tarafından L-DOPA üretimine nasıl yansıdığını anlamak ancak bu şekilde mümkün olacaktır. Benzer şekilde, hücreler tirozin içeren ve içermeyen LB ve M9 ortamlarında üç farklı kültür fazında (12, 24 ve 48 saat) inkübe edilmiş, hücre içi ve hücre dışı (besi ortamına salınan) L-DOPA miktarları belirlenmiştir.

4.3.1. Kültür Fazının *C. freundii*'de L-DOPA Üretimi Üzerine Etkisi

Zor koşullar altında enerjetik sebepler ve diğer nedenlerden dolayı (karbon kaynağı ve azot eksikliği) hücreler ürettikleri L-DOPA'nın bir kısmını hücre içinde tutarlar. Ancak, L-DOPA birincil derecede hücre dışına (besi ortamına) salınan bir metabolittir [17, 18, 20]. Bu nedenle L-DOPA üretimi ayrı ayrı olarak hücre içi ve hücre dışı olarak iki kısımda gösterilebileceği gibi total (hücre içi + hücre dışı) L-DOPA üretimi olarak da belirlenebilir. Şekil 4.4.'de farklı zamanlara kadar inkübe edilmiş olan *C. freundii* hücrelerinin LB ve LB+tirozin ortamlarında ürettikleri hücre içi, hücre dışı ve total L-DOPA miktarları verilmiştir.

TPL aktivitesindeki kadar belirgin olmasa da, L-DOPA üretiminin de L-tirozin ile indüklendiği görülmüştür. L-DOPA üretiminin 12. saat kültürlerinde 24. ve 48. saat kültürlerine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. İleri kültür fazlarında (24 ve 48 saat) hücre içi L-DOPA seviyesi düşerek benzer miktarlarda sabitlenmiştir. Aynı durum hücre dışı (kültür ortamına salınan) L-DOPA için de gözlenmiştir. Dolayısıyla bundan sonra yapılan çalışmalarda L-DOPA üretimi için inkübasyon zamanı 12 saat olarak seçilmiştir. LB içinde bu fazdaki kültürlerin 24. ve 48. saatlerdeki kültürlerle göre yaklaşık % 50 daha fazla hücre içi ve yaklaşık % 8 kadar daha fazla hücre dışı L-DOPA içerdikleri belirlenmiştir. L-tirozinin L-DOPA üretimini indükleyici etkisi hücre içi ve hücre dışı L-DOPA için farklı olmuştur. L-tirozin içeren LB kültürlerde bu amino asiti içermeyen LB kültürlerine göre hücre dışı L-DOPA üretimi 12, 24 ve 48. saat kültürlerinde sırası ile % 31, 46 ve 45 oranında daha fazla olduğu saptanırken, bu oranlar hücre içi L-DOPA için % 10, 6 ve 5 seviyesinde olmuştur.



Şekil 4.4. *C. freundii*'nin LB (□) ve LB+%0.1 tirozin (▨) ortamlarında farklı kültür zamanlarındaki hücre dışı (a), hücre içi (b) ve total L-DOPA (c) seviyesi. Her veri noktası en az 3 bağımsız deneyin ortalaması olup, ince dikey hata çubukları \pm standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.

4.3.2. Farklı Kültür Fazlarından Gelen *C. freundii* Özütleri ile *in vitro* Bir Reaksiyon Düzeneginde L-DOPA Üretimi

Şekil 4.5.'te farklı zamanlara kadar kültürü yapılan *C. freundii*'nin LB ve LB+tirozin ortamlarından gelen hücre özütlerinin *in vitro* bir reaksiyon düzenegindeki L-DOPA üretimi gösterilmiştir. Farklı kültür fazlarından gelen *C. freundii* hücrelerine ait TPL içeren özütler reaksiyon karışımında L-DOPA üretiminin tirozin içeren LB ortamında kontrolüne göre 3-4 kat arttığı gözlenmiştir. 12 saat inkübe edilen hücrelerin 24 ve 48 saat inkübe edilen hücrelere göre daha fazla L-DOPA ürettiği saptanmıştır. 12 saat tirozin içeren LB ortamında inkübe edilen hücreler, LB ortamında inkübe edilenlere göre 4 kattan fazla L-DOPA üretmiştir. 24 saat süre ile tirozin içeren LB ortamında inkübe edilen hücreler, LB ortamında inkübe edilenlere göre yaklaşık olarak 4 kat L-DOPA üretirken, tirozin içeren LB ortamında 48 saat inkübe edilen hücrelerin, LB ortamında aynı süre kültürü yapılan hücrelere göre yaklaşık olarak 3 kat daha fazla L-DOPA ürettikleri saptanmıştır.



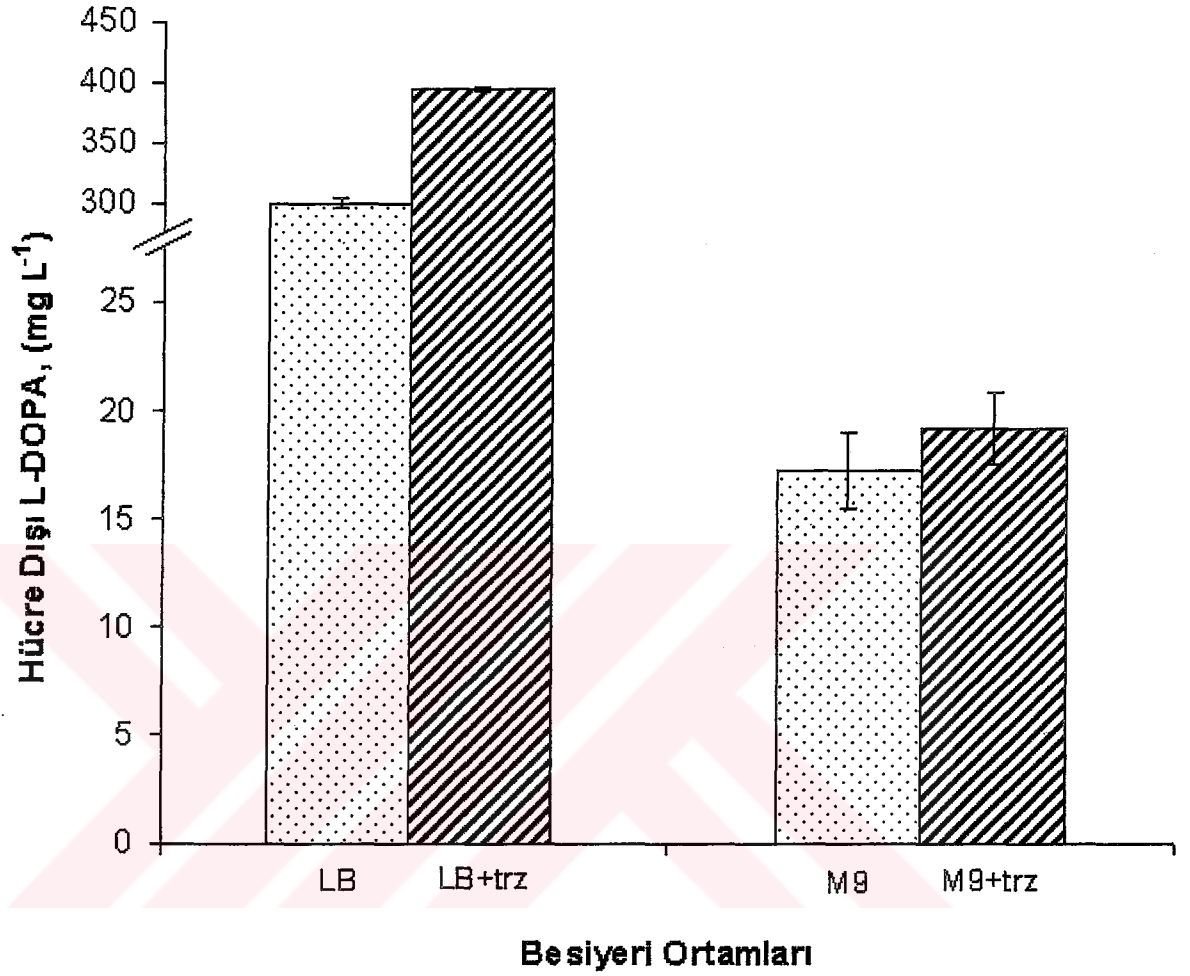
Şekil 4.5. *C. freundii*'nin LB (□) ve LB+%0.1 tirozin (▨) ortamlarında farklı kültür fazlarından gelen hücrelere ait TPL içeren *in vitro* reaksiyon düzenegindeki L-DOPA üretimi. Her veri noktası 3 bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları \pm standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.

4.4. Farklı Ortamlarda Kültürü Yapılan *C. freundii*'nin L-DOPA Seviyesi

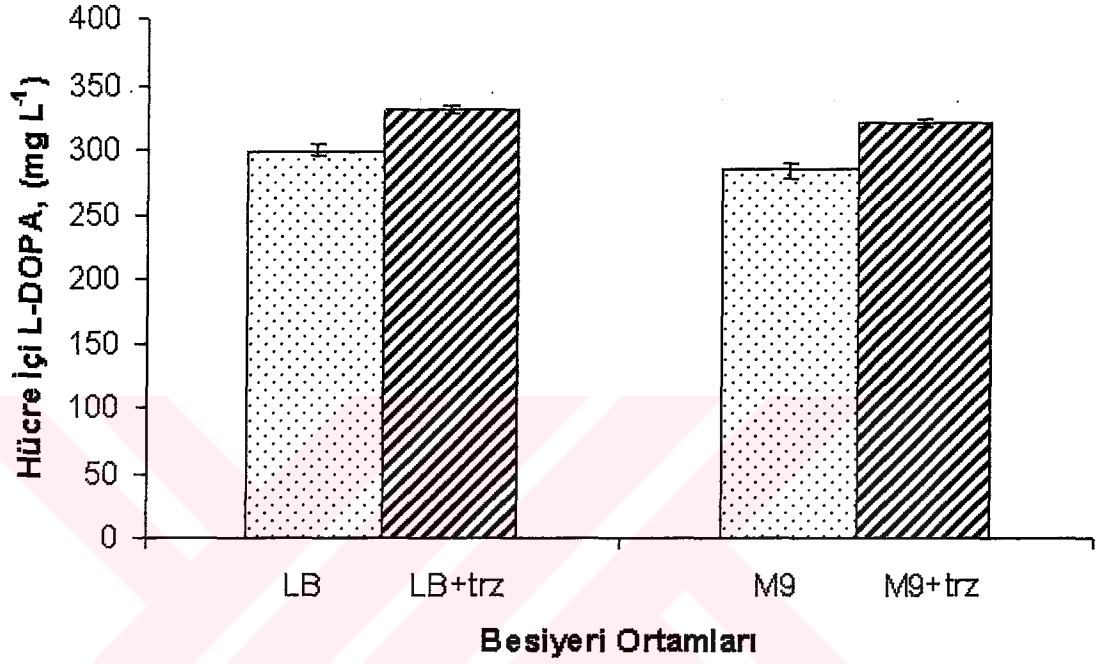
Çalışmanın bu kısmında *C. freundii*'nin farklı ortamlarda kültürünün yapılmasının L-DOPA üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. TPL enzimi 12. saatte daha fazla aktivite gösterdiği için L-DOPA üretiminde inkübasyon süresi 12 saat olarak seçilmiştir.

4.4.1. Farklı Ortamlarda Kültürü Yapılan *C. freundii*'nin Hücre İçi, Hücre Dışı ve Total L-DOPA Seviyeleri

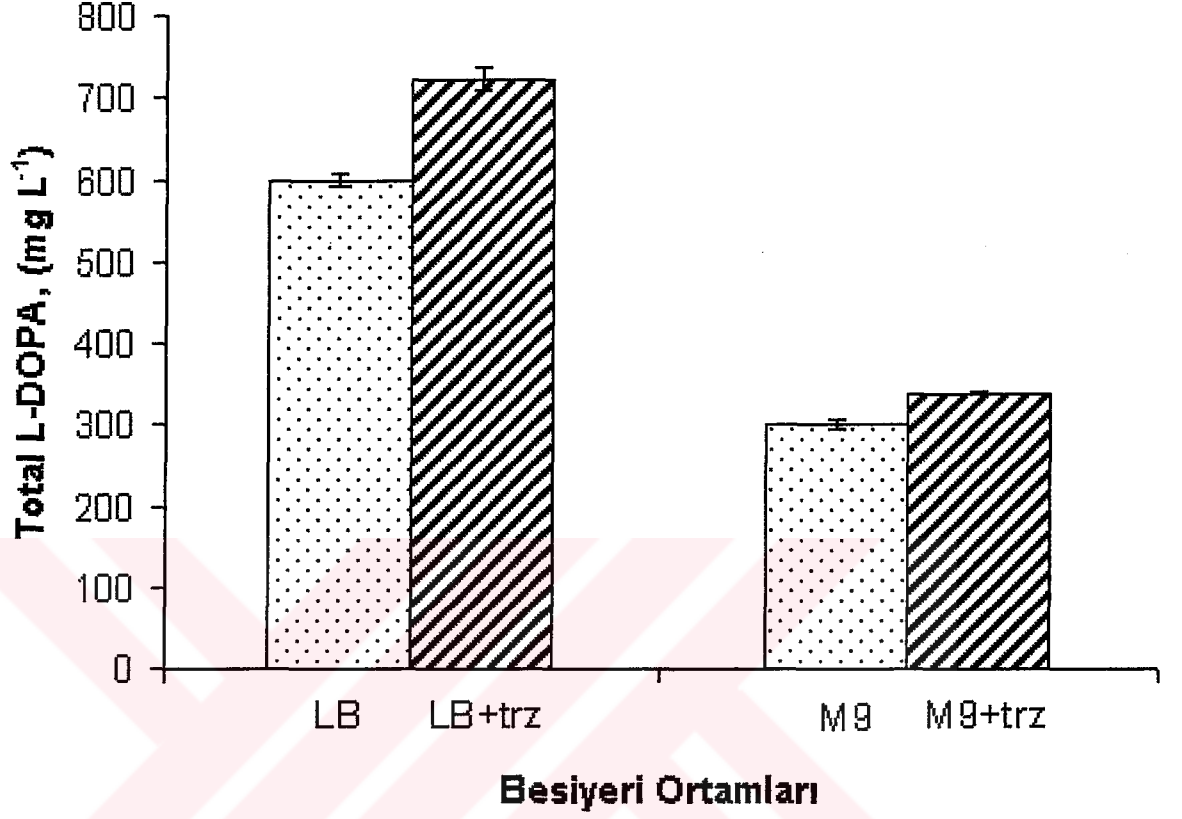
Farklı ortamlarda kültürü yapılan *C. freundii*'nin hücre içi, hücre dışı ve total L-DOPA üretimi Şekil 4.6.'da gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan her iki besiyerine (LB ve M9) tirozin eklendiğinde L-DOPA üretiminde artış gözlenmiştir. Ancak, LB ortamı L-DOPA için en uygun ortam olmasının yanında, bu ortamla verilen L-tirozin M9 ortamındakine göre daha yüksek düzeyde bir L-DOPA üretimini sağlamıştır. LB ortamında üretilen total L-DOPA miktarı M9 ortamında üretilenin 2 katı bulunmuştur. Benzer şekilde bu oran tirozin eklenmiş olan LB ortamında tirozin içeren M9 ortamına göre 2 katın üzerinde olmuştur. Burada dikkat çeken bir özellik her iki ortamda da hücre içi L-DOPA miktarının biri birine çok yakın çıkmış olmasıdır. Dolayısı ile iki ortam arasında toplam L-DOPA miktarı arasındaki 2 kat fark tamamı ile hücre dışı L-DOPA'dan gelmektedir. LB ortamında hücre dışı L-DOPA düzeyi 301 mg/L iken, bu değer M9 ortamı için sadece 17.2 mg/L olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, tirozin içeren LB ortamında hücre dışı L-DOPA 394 mg/L iken, tirozin içeren M9 ortamında sadece 19.1 mg/L L-DOPA belirlenmiştir. Bütün bunlar göstermektedir ki, üretilen L-DOPA'nın belirli bir kısmı hücre içinde tutulurken fazla üretilen L-DOPA hücre dışına salınmaktadır. LB ortamında *C. freundii* hücre dışına hücre içinde ürettiği kadar L-DOPA salmıştır. LB ortamına tirozin eklendiğinde üretim arttığından hücre dışına salınan L-DOPA miktarı da artmıştır. M9 ortamında ise hücre dışına salınan L-DOPA miktarı çok azdır. Burada bakterinin ürettiği L-DOPA az olduğu için hücre gereksinim duyduğu miktardaki L-DOPA'yı hücre içinde tutmuş, bu gereksinimi dışındaki az miktardaki L-DOPA'yı ise hücre dışına salındığı düşünülmektedir.



Şekil 4.6 (a). Farklı ortamlarda kültürü yapılan *C. freundii*'nin hücre dışı L-DOPA seviyesi. Hücreler LB, M9 (▨) ve bunların %0.1 tirozinle desteklenmiş ortamlarında (▩) 12 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Her veri noktası en az 3 bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları \pm standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.



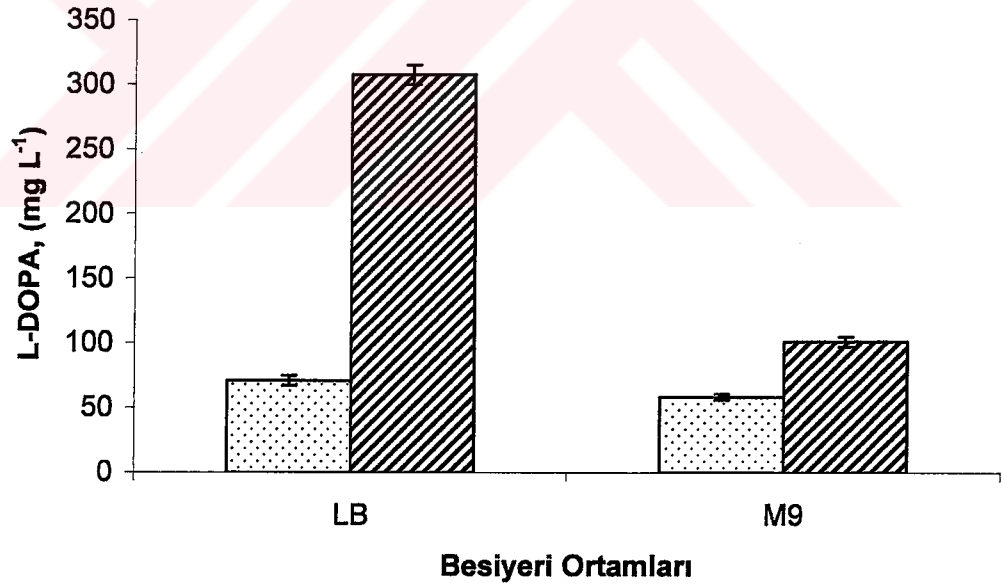
Şekil 4.6 (b). Farklı ortamlarda kültürü yapılan *C. freundii*'nin hücre içi L-DOPA seviyesi. Hücreler LB, M9 (□) ve bunların %0.1 tirozinle desteklenmiş ortamlarında (▨) 12 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Her veri noktası en az 3 bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları \pm standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.



Şekil 4.6 (c). Farklı ortamlarda kültürü yapılan *C. freundii*'nin total L-DOPA seviyesi. Hücreler LB, M9 (□) ve bunların %0.1 tirozinle desteklenmiş ortamlarında (▨) 12 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Buradaki değerler Şekil 4.6(a) ve (b) deki değerlerin toplamını göstermektedir. Her veri noktası en az 3 bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları \pm standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.

4.4.2. Farklı Besiyerlerinden Gelen *C. freundii* Özütleri ile *in vitro* Bir Reaksiyon Düzeneginde L-DOPA Üretimi

LB ve M9 ortamlarında kültürü yapılan *C. freundii* hücre özütlerinin reaksiyon karışımındaki L-DOPA sentez seviyeleri Şekil 4.7. de gösterilmiştir. Bu *in vitro* düzenekte, TPL kaynağı olarak hücre özütü ve L-DOPA yapımı için gerekli kimyasallar (ko-enzimler, substrat, iyonik ortamı sağlayan diğer bileşenler) kullanılmıştır. Bu çalışmada, zengin LB ortamından gelen hücre özütlerinin, sınırlı bir besinsel değeri olan minimal (M9) ortamdan gelen hücre özütlerine göre % 20'nin üzerinde daha fazla L-DOPA üretim kapasitelerinin bulunduğu belirlenmiştir. Her iki ortamın tirozin içeren formlarından gelen hücre özütleri ile L-DOPA üretimi önemli artış göstermiştir. Bu tür bir indüklenme LB ortamında 4.3 kat kadar iken, M9 ortamında ise 1.7 kat olarak gözlenmiştir. Diğer bir deyimle, tirozin içeren LB ortamından gelen hücre özütleri, yine tirozin içeren M9 ortamından gelen hücre özütlerine göre 3 katın üzerinde bir L-DOPA oluşturma kapasitesi göstermişlerdir.



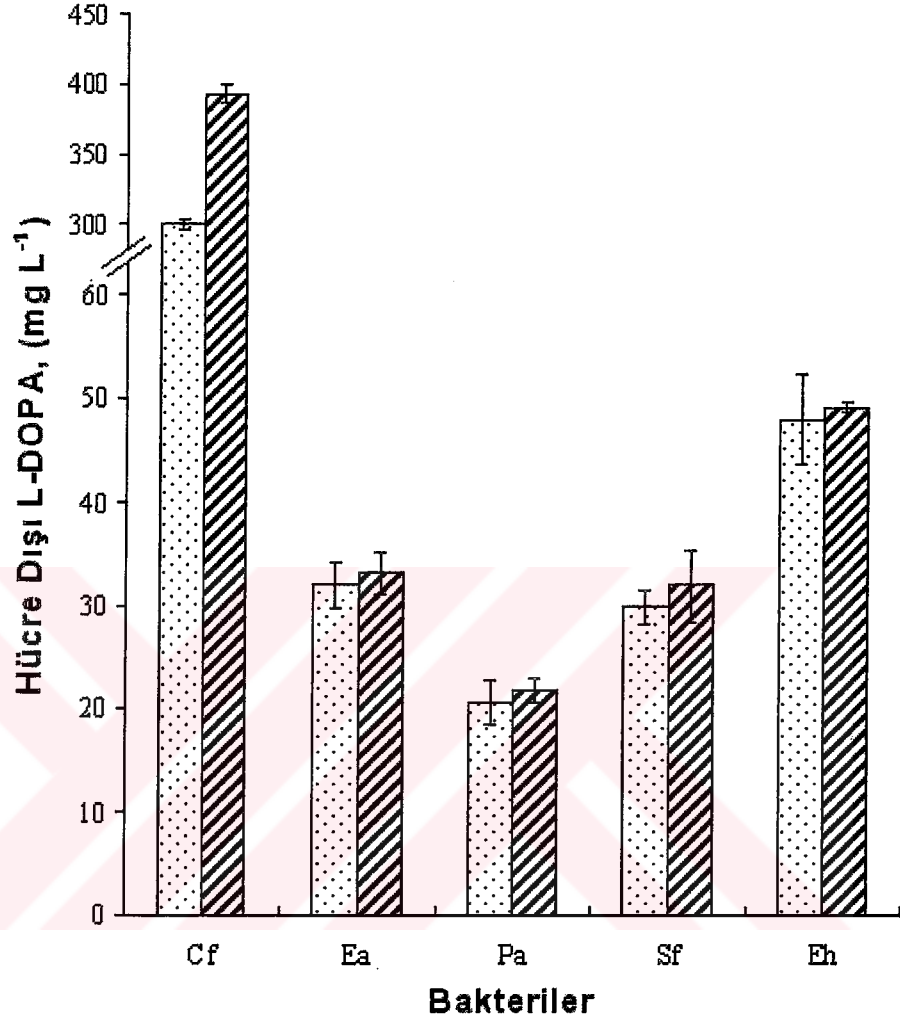
Şekil 4.7. Farklı ortamlarda kültürü yapılan *C. freundii*'den gelen hücre özütleri ile *in vitro* bir reaksiyon karışımındaki L-DOPA sentezi. Hücreler LB, M9 (□) ve bu ortamların %0.1 tirozinle desteklenmiş ortamlarında (▨) 12 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Her veri noktası en az 3 bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları ± standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.

4.5. *C. freundii*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *E. herbicola* ve *S. faecalis* Bakterileri Tarafından L-DOPA Üretimi

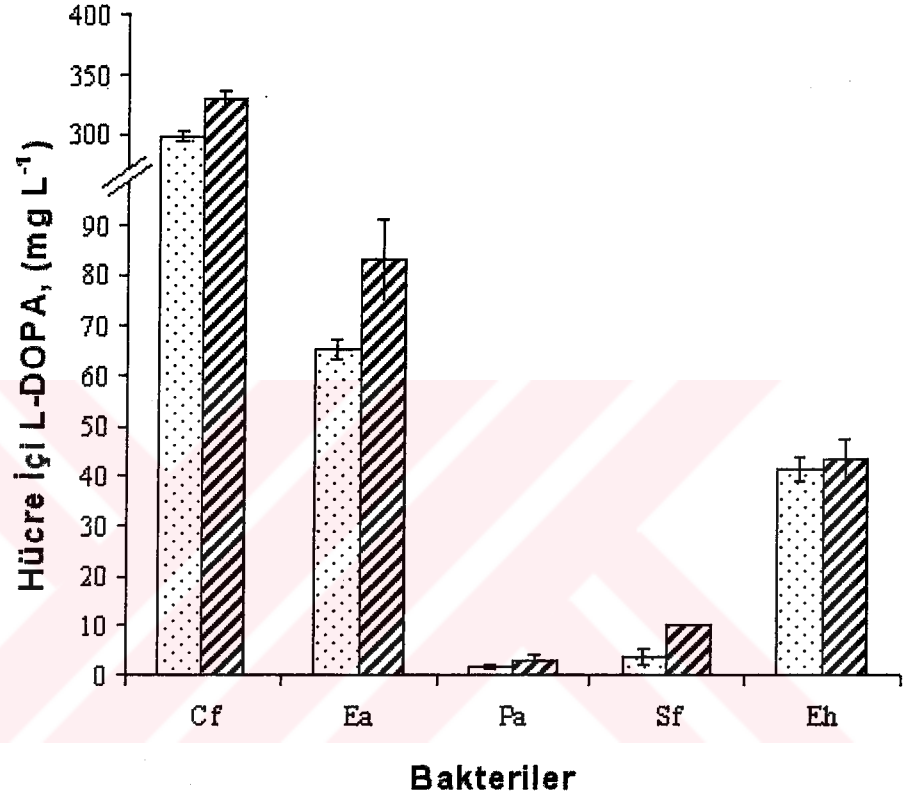
L-DOPA üretiminde LB ortamı daha yüksek düzeyde olduğu için çalışılan bakterilerin hepsi LB ortamında kültüre edilmişlerdir. En yüksek L-DOPA seviyesi nispeten genç hücrelerde olması sebebiyle 12 saat inkübasyona bırakılmış hücreler kullanılmıştır. Ayrıca, LB ortamına tirozin eklenerek bakterilerin tirozinli ortamdaki L-DOPA seviyeleri karşılaştırılmıştır.

4.5.1. Çeşitli Bakterilerde Hücre İçi, Hücre Dışı ve Total L-DOPA Seviyeleri

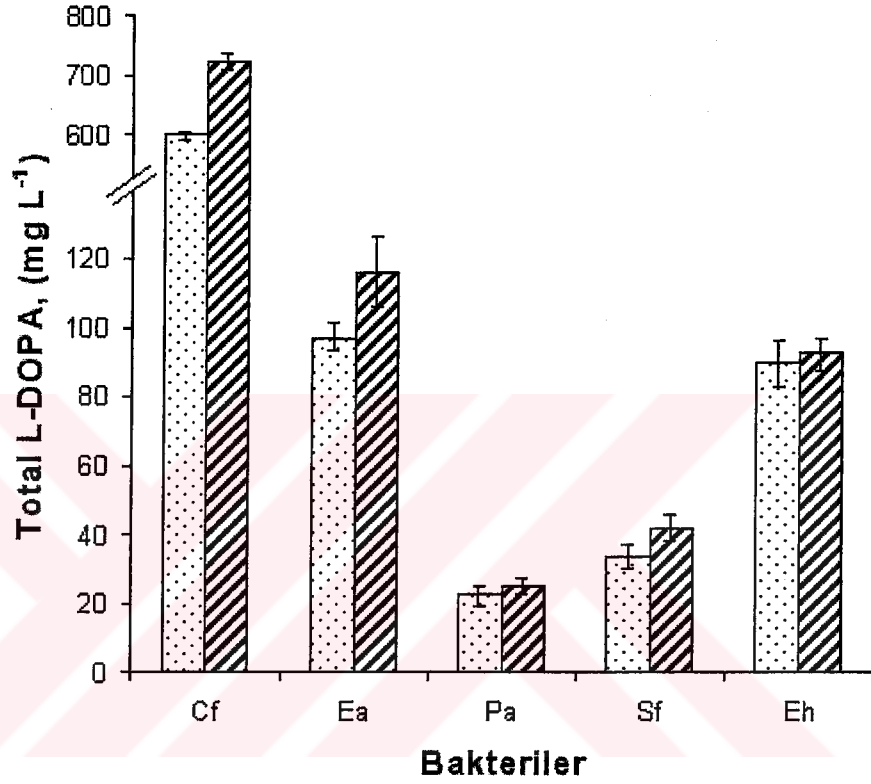
Çalışmanın bu bölümünde çeşitli bakterilerin hücre içi ve hücre dışı L-DOPA düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bunun için, L-DOPA üretimleri ile bilinen bazı Gram-negatif bakteri (*C. freundii*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *E. herbicola*) ve bir adet Gram-pozitif (*S. faecalis*) kullanılmıştır. LB ve tirozin içeren LB ortamlarında kültürü yapılan bu hücrelerin hücre içi, hücre dışı ve total L-DOPA düzeyleri Şekil 4.8. de gösterilmiştir. Çalışılan bütün bakterilerde hem hücre içi ve hem de hücre dışı L-DOPA üretiminin tirozin bulunan LB ortamında kontrolüne göre bütün bakterilerde artış gösterdiği gözlenmiştir. Bakteriler arasında her iki ortam için de en yüksek düzeyde L-DOPA üretimi *C. freundii*'de kaydedilirken, en düşük üretim *P. aeruginosa* bakterisinde olmuştur. Bu bağlamda, *C. freundii*'nin *P. aeruginosa*'ya göre 18 kata varan hücre dışı, 180 kata varan hücre içi yüksek L-DOPA seviyelerine sahip olduğu belirlenmiştir. *C. freundii*'nin *P. aeruginosa* dışındaki diğer bakterilere nazaran 7-12 kat daha fazla hücre dışı L-DOPA ve 4-78 kat daha fazla hücre içi L-DOPA seviyesine sahip olduğu gözlenmiştir. Dikkat çekici başka önemli bir nokta ise *E. aerogenes*'de total L-DOPA üretiminin, bu madde için yaygın kullanımı ile bilinen *E. herbicola*'ya göre daha yüksek çıkmış olmasıdır. *C. freundii* ve *E. herbicola* ürettikleri L-DOPA'nın yaklaşık olarak yarısını hücre içinde tutarken, *P. aeruginosa* ürettiği L-DOPA'nın %10'unu, *S. faecalis* %10-30'unu ve *E. aerogenes* ise %65-75'ini hücre içinde tutmuştur. Bakterilerin ürettikleri L-DOPA'nın bu oranları aşan miktarlarının ise hücre dışına saldıkları belirlenmiştir. Diğer bir deyimle, *C. freundii* ve *E. herbicola* ürettikleri L-DOPA'nın yarısından fazlasını hücre dışına salarken, *P. aeruginosa* %90'ını, *S. faecalis* %70-90'ını *E. aerogenes* ise %25-35'ini hücre dışına salmışlardır.



Şekil 4.8 (a). *C. freundii*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *E. herbicola* ve *S. faecalis* hücre dışı L-DOPA düzeyleri. Hücreler LB (□) ve LB+ %0.1 tirozinle desteklenmiş (▨) ortamlarda 12 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Her veri noktası en az üç bağımsız deneyden olup, hata çubukları \pm standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.



Şekil 4.8 (b). *C. freundii*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *E. herbicola* ve *S. faecalis* hücre içi L-DOPA düzeyleri. Hücreler LB (□) ve LB+ %0.1 tirozinle desteklenmiş (▨) ortamlarda 12 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Her veri noktası en az üç bağımsız deneyden olup, hata çubukları \pm standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.



Şekil 4.8 (c). *C. freundii*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *E. herbicola* ve *S. faecalis* hücre kültürlerinde total L-DOPA seviyeleri. Hücreler LB (□) ve LB+ %0.1 tirozinle desteklenmiş (▨) ortamlarda 12 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Buradaki değerler Şekil 4.8(a) ve (b)'deki değerlerin toplamını göstermektedir. Hata çubukları \pm standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.

4.5.2. *C. freundii*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *E. herbicola* ve *S. faecalis*

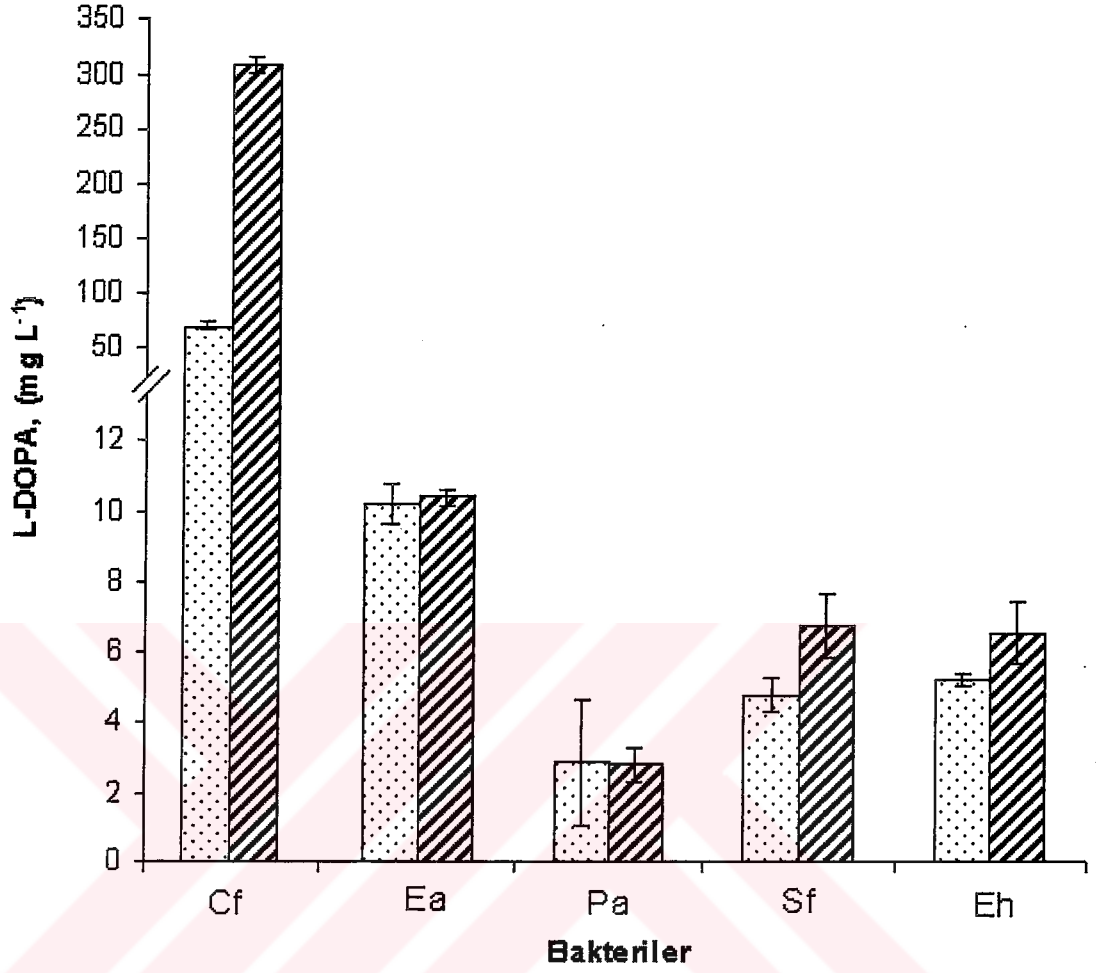
Bakterilerinden Gelen Hücre Özütleri ile *in vitro* Bir Reaksiyon Düzenğinde L-DOPA Sentezi

LB ve tirozinle desteklenmiş LB ortamlarında kültürü yapılan bakterilerden gelen hücre özütlerinin *in vitro* bir reaksiyon ortamındaki L-DOPA sentez düzeyleri Şekil 4.9' da gösterilmiştir. L-DOPA'nın en fazla *C. freundii* özütlerinin bulunduğu reaksiyon ortamında üretildiği şekilde gözlenmektedir. Bu bakterinin LB ortamından gelen hücre özütleri diğer bakterilerin aynı ortamdan gelen özütlerine göre 7-25 kat daha fazla L-DOPA oluşturmuştur. Tirozin içeren LB ortamında bu fark daha da belirgin olmuştur. LB ortamında üretilen *C. freundii* için 71 mg/L L-DOPA üretilirken, tirozinle desteklenmiş olanda 308 mg/L'ye çıkmıştır. Bu değer (308 g/L), diğer bakterilerin aynı ortamdan gelen özütlerinin 30-110 katı kadar olmuştur.

C. freundii'nin L-DOPA üretimi tirozin ilavesi ile önemli derecede indüklenirken, diğer bakterilerin hem LB ve hem de LB+tirozin özütlerinin L-DOPA üretim seviyesi birbirine yakın olarak saptanmıştır.

En düşük L-DOPA üretim seviyesi *P. aeruginosa*'da gözlenmiştir. Bu bakterinin LB ortamı özütleri ile 2.87 mg/L ve LB+tirozin özütleri ile de 2.79 mg/L L-DOPA üretilmiştir.

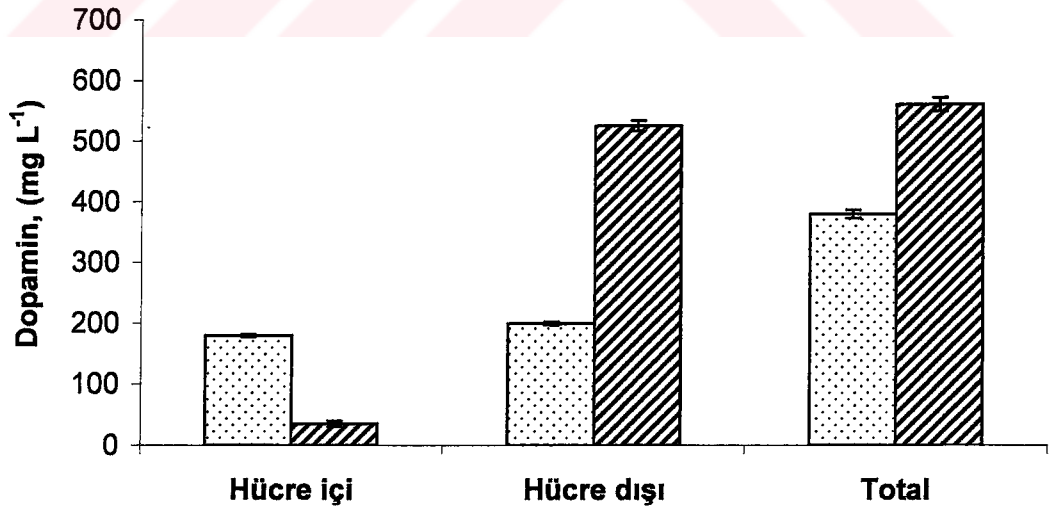
Çalışmada ikinci yüksek derecede L-DOPA üreten bakteri *E. aerogenes* olmuştur. Bu bakterinin LB ve LB+tirozin ortamı özütleri *in vitro* düzenekte sırası ile 10.2 ve 10.4 mg/L L-DOPA üretmiştir. *E. aerogenes* ile elde edilen bu değerler L-DOPA üretiminde yaygın kullanımları ile bilinen *S. faecalis* ve *E. herbicola*'nın L-DOPA düzeylerinden yaklaşık 2 kat daha fazladır.



Şekil 4.9. *C. freundii*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *E. herbicola* ve *S. faecalis* bakterilerinden gelen özütlerden *in vitro* bir reaksiyon karışımında L-DOPA sentezi. Hücreler LB (□) ve LB+ %0.1 tirozinle desteklenmiş (▨) ortamlarda 12 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Her veri noktası en az üç bağımsız deneyden olup, hata çubukları \pm standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.

4.6. *C. freundii* ve *S. faecalis* Bakterilerinde Dopamin Sentezi

Çalışmanın bu kısmında en fazla L-DOPA üreten bakteri olarak belirlediğimiz *C. freundii* ve L-DOPA'dan dopamin yapımını katalizleyen bir enzim olan TDC enzimi ile karakterize *S. faecalis* bakterileri kullanılmıştır. Bu sistemin (*C. freundii* ve *S. faecalis*) kullanılmasının nedeni dopaminin doğrudan L-tirozinden değil ancak L-DOPA üzerinden oluşmasıdır. Her iki madde için de L-DOPA üretiminin en fazla belirlenmiş olduğu tirozin içeren LB ortamı kullanılmıştır. En yüksek düzeyde L-DOPA genel olarak 12 saat kültürlerinde olduğundan, buradaki sistemde de hücreler bu kültür fazına kadar inkübe edilmişler ve hücre içi, hücre dışı ve total dopamin seviyeleri belirlenmiştir (Şekil 4.10). *S. faecalis*, *C. freundii* ile karşılaştırıldığında 18-20 kat daha az L-DOPA üretmesine karşın total dopamin üretimi bakımından yaklaşık olarak 1.5 kat daha fazla dopamin üretmiştir. Üretilen dopamin aslında o bakterinin dopamine dönüştürdüğü L-DOPA miktarını vermektedir. Bu açıdan *C. freundii* total L-DOPA + dopamin miktarı olarak karşılaştırıldığında *S. faecalis* den 2 kat daha fazla L-DOPA üretmiştir. *C. freundii* ürettiği L-DOPA'nın %30'unu dopamine çevirirken *S. faecalis* ürettiği L-DOPA'nın %90'ını dopamine çevirmiştir. *S. faecalis* ürettiği dopaminin yaklaşık olarak %95'ini hücre dışına salarken *C. freundii* ürettiği dopaminin yarısını hücre dışına salmıştır.



Şekil 4.10. *C. freundii* (□) ve *S. faecalis* (▨)' in LB+tirozin içeren 12 saatlik kültürlerinden gelen hücre içi, hücre dışı ve total dopamin düzeyleri. Her veri noktası en az 3 bağımsız deneyin ortlaması olup, hata çubukları \pm standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Birçok nörodejeneratif hastalık için L-DOPA ve dopaminin yarım yüz yıla varan başarılı klinik uygulamaları ve her geçen gün bu maddelere ihtiyaç duyan vakaların artması ile bu iki maddeye olan ihtiyaç da önemli ölçüde artmıştır. Her iki madde de kimyasal sentezle elde edilebildikleri gibi, son yıllarda bu maddelerin yenilenebilir kaynaklardan bakteriler veya ilgili enzimleri kullanılarak sentezleri önemli ilgi odağını oluşturmuştur. Yıllık yaklaşık 250 ton olan L-DOPA üretiminin yarısının TPL enziminin veya bu enzimi taşıyan bakterilerin kullanıldığı biyosentetik metotla yapılması bu ilginin sonucu olmuştur [47, 8].

Bu çalışmada L-DOPA ve/veya dopamin üretme yetenekleri ile bilinen çeşitli Gram-neгатif bakteriler (*C. freundii*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes* ve *E. herbicola*) ve bir Gram-pozitif bakteri olan *S. faecalis*'in farklı kültür koşullarında L-DOPA ve dopamin sentezi yeteneklerindeki değişim araştırılmıştır. Kültür ortamı olarak zengin bir besi yeri olan LB ve minimal bir ortam olan M9 besiyerleri kullanılmış ve ayrıca, hem bu maddelerin oluşumunda öncül olması ve hem de TPL enziminin ifadesini indüklemesi sebebiyle L-tirozin içeren besiyerleri de kullanılmıştır [22, 47, 48, 52, 53]. L-tirozinin indükleyici etkisinin amino asitin %0.1 konsantrasyonda kullanıldığı durumda belirgin olarak ortaya çıktığı saptanmıştır. Bu konsantrasyonun altındaki değerlerde TPL aktivitesinde önemli artış gözlenmezken, üstü değerlerde ise hücre çoğalmasının negatif etkilendiği saptanmıştır. Bu durum, bu amino asitin membran bütünlüğü üzerindeki negatif etkisinden kaynaklanmış olabilir [42]. L-tirozin, katekol, katekolamin ve türevleri hidrofobik yapıları nedeniyle membran bütünlüğünün ve böylece membran elektrik potansiyelinin bozulmasına neden olmaktadır [14, 15, 42]. Tüm besiyerlerinde en yüksek L-DOPA üretiminin 12 saatlik kültürlerde olduğu belirlenmiştir. Bu da bu maddenin genç hücreler tarafından uygun substratlardan (katekol, katekol türevleri, L-tirozin) yapıldığını ve ileri kültür fazlarında ise bu substratların ve muhtemelen işlenmiş oldukları ürünlerin (L-DOPA ve dopamin) besin ve enerji kaynağı olarak kullanılacaklarını düşündürmektedir. Bakteri kültür ortamlarına sonradan eklenen bu maddelerin bakteriler tarafından kolayca metabolize edilerek onların üremesine katkıda buldukları bildirilmiştir [42]. Bizim çalışmamızda da görülmüştür ki, böyle zor şartlar altında özellikle besinsel değeri az olan ortama eklenen L-tirozinin önemli kısmı hücre üremesinde farklı metabolik yollarda kullanılmış, bunun sonucu olarak da bu ortamda çok daha düşük L-DOPA ve dopamin

düzeyleri kaydedilmiş olabilir. Bu tür bir kullanımdan dolayı, L-tirozinin böyle bir ortamda TPL aktivitesi üzerinde indükleyici etkisi de oldukça az olmuş olabilir. Buna karşın, tirozinin LB ortamına eklenmesi durumunda en azından erken kültür fazında (12 saat) hem daha yüksek bir L-DOPA ve/veya dopamin üretimi ve hem de daha yüksek düzeyde TPL stimülasyonu gözlenmiştir. Ancak, ileri kültür fazlarında (24 ve 48 saat) TPL aktivitesi ve buna bağlı olarak L-DOPA ve dopamin seviyeleri de dereceli olarak düşmüştür. Bu durum, bu enzimi içeren bakterilerin ileri kültür fazlarında L-tirozini L-DOPA ve diğer ilgili bileşiklere çevirmeyip onu karbon, azot ve enerji kaynağı olarak kullandıklarını düşündürmektedir ve bu yönde çalışmalar mevcuttur [17, 53].

Tipik olarak L-DOPA üretimi tirozin destekli bir besiyerinde kültürü yapılan *Erwinia herbicola* hücrelerinin santrifüj edilmesi ve hücre peletinin enzim kaynağı olarak substratlarla (piruvat, amonyak ve katekol) birlikte bir fermentöre transferi ile gerçekleştirilir [79]. Böyle bir enzimatik metot kimyasal metoda göre çok daha basit olup optik bir ayırmaya gereksinim duyulmaz. Ancak, enzimatik üretimdeki bir sorun bazen L-DOPA'nın tirozinle kontamine olmasıdır. Her iki madde yapısal ve kimyasal olarak benzer olduğundan, böyle bir kontaminasyon son ürünün (L-DOPA) klinik uygulamaların istediği standartlarda saflaştırılmasını oldukça güçleştirmektedir. Bu çeşit olumsuzlukları aşmak için *E. herbicola* ve *C. freundii* *tpl* geninin önüne güçlü propmotorlar (ör. *tac* propmotoru) eklenerek yüksek ifade vektörleri oluşturulmuş ve *E. coli*'ye aktarılmıştır. Besi ortamına IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside) eklendiğinde her iki bakteriden gelen TPL geni için de yüksek bir ifade görülmüş olmasına rağmen, bu hücrelerin L-DOPA üretimi yabancı tip *E. herbicola* kadar olmamıştır. Dolayısı ile hücrelerin TPL ifade kapasiteleri sırf gen dozajı ile açıklanabilecek bir olgu değildir. Böyle olsaydı, üzerinde *tpl* geni taşıyan vektörlerle transform edilmiş *E. coli*'de bu geni kromozomlarında tek kopya halinde taşıyan doğal konakçı hücrelere (*E. herbicola* ve *C. freundii*) göre daha yüksek TPL aktivitesi gözlemlenmesi gerekirdi. Bu L-DOPA üretimi için kullanılan substratların (L-tirozin, katekol, amonyum ve pirüvat) hücre membranından içeri taşınım oranları enzimin ifadesi seviyesinde belirleyici rol oynayabileceğini göstermektedir. *E. herbicola* kromozomu üzerinde sadece bir kopya *tpl* geni bulundurmasına rağmen bugüne kadar L-DOPA üretimini en yüksek düzeyde yapan bakteri olarak belirlenmiş olması gen dozajı dışında bu tür membran taşınım özelliklerinin rol oynadığını akla getirmektedir. Dolayısı ile TPL genini doğal olarak bulunduran *E. herbicola* ile bu geni rekombinant olarak taşıyan *E. coli* hücreleri TPL enziminin substraartlarına ve bu enzimi indükleyen

ajanlara karşı farklı geçirgenlik potansiyellerine sahip olabilirler. Ayrıca, membran yapısını bozma özellikleri olan katekollere karşı direnç farkı da bu tür bir aktivite farkına katkıda bulunabilir. Bu bağlamda, bu hücrelerin değişik katekolamin, katekol ve katekol türevlerine dirençlerinin araştırılması önemli ipuçları verebilir. Ayrıca, TPL ifadesi ile ilgili regülatör faktörlerin çalışılması TPL promotorunun (P_{TPL}) L-tirozin içeren ortamda TyrR proteini tarafından aktive edildiğini göstermektedir. Bu proteinin (TyrR) aromatik amino asitlerin metabolizmasındaki merkezi rolü uzun zamandan beri bilinmektedir [47, 48, 50, 86].

Lac raportör sistemlerin kullanılması göstermiştir ki, *E. coli*'de rekombinant TPL ifadesinde hem TyrR proteini ve hem de cAMP reseptör proteininin (CRP) rol oynadığını göstermektedir. Bilindiği gibi TyrR proteinin en önemli fonksiyonu aromatik amino asitlerin biyosentezi, transportu ve parçalanmasından sorumlu genlerin regüle edilmesidir [47, 48, 86, 87]. Bu regülatör protein, karboksil ucuna yakın bir pozisyonda DNA'ya bağlanan heliks-dönüş-heliks motifi taşır. TyrR'nin orta bölgesi ise σ^{70} -bağımlı promotora özgü bir dizi olup P_{TPL} 'ye bağlanarak önündeki genin (TPL) aktivitesini düzenlerken (daha çok artırır), amino ucu RNA polimeraza bağlanmakla (bir aktivatör olarak) ilişkilidir. Tirozin, fenilalanin ve triptofan bu regülatör proteinin ko-efektörleri olup hedef promotorlardan transkripsiyonu TyrP'nin DNA üzerindeki bağlanma konumuna göre pozitif veya negatif olarak etkileyebilirler. TPL geninin regülatör bölgesinde (yani promotörü/operatörü üzerinde) üç adet TyrR bağlanma bölgesi mevcut olup, iki uçtaki bu bağlanma bölgeleri ile ortadaki arasında iki adet CRP bağlanma bölgesi mevcuttur. Dolayısı ile CRP'nin iki TyrR arasında bağlanması DNA heliksinde yapısal bir katlanma yapar ki üç adet TyrR dimeri bir araya toplanır [87].

TPL enziminin sentezinin tirozinle indüklenmesi L-DOPA üretimi için avantaj sağlanmaktadır. Ortamdaki tirozin miktarı % 0.1 olarak belirlenmiştir. Çünkü tirozinin çözündüğü pH değeri ya çok düşük ya da çok yüksektir. Nötral pH da tirozin hemen hemen çözünmemektedir. Bakteri büyüme ortamının pH değeri nötral veya baziğe yakın olmalıdır. Bu durum ortama konulacak tirozin miktarını sınırlamaktadır. Dolayısıyla çalışmada kullanılan tirozin miktarı bakteri kültürizasyonu için gerekli olan optimum koşulları değiştirmeyecek düzeydedir.

L-DOPA vücutta hayati önem taşıyan nörotransmisyon olayını gerçekleştiren nörotransmitter grubuna dahil olan katekolaminlerin (dopamin, norepinefrin ve epinefrin) sentezinde öncül moleküldür. L-DOPA'nın Parkinson hastalığında temel ilaç olarak kullanılması ve her yıl 250 tondan fazla L-DOPA'ya ihtiyaç duyulması bu

molekülün sentezinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca hastalık insidansının artması ve hastalığın görüldüğü yaş grubunun 50-60 yaş grubundan 30-40 yaş grubuna düşmesi daha fazla L-DOPA'ya ve mevcut sentez mekanizmalarının yanında alternatif mekanizmalara ihtiyaç duyulacağını göstermektedir.

Son yıllarda bakterilerde L-DOPA ve dopamin üretimi üzerine az sayıda da olsa çalışmalar yapılmıştır [17, 18, 48]. L-DOPA sentezinden sorumlu olan TPL'nin üretimi bakterilerin büyüme ortamında tirozin amino asitinin bulunması ile indüklenmektedir. Yapılan bir çalışmada tirozin varlığında *tpl* promotorunun TyrR proteini ile aktive edildiği anlaşılmıştır. TyrR'nin aromatik amino asit metabolizması için gerekli olan genlerin regülasyonunda merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir. Araştırmalar TyrR geninin mutasyona uğratıldığında ortama tirozin konulmadan bakterilerin önemli derecede *tpl* ekspresyonu yapabildiğini göstermiştir. Yüksek verim ve yüksek saflıkta L-DOPA oluşması için bu rekombinant hücrelerin oldukça uygun olduğu düşünülmektedir [87]. Başka bir çalışmada L-DOPA sentezinden sorumlu enzimler saflaştırılmış ve sentetik bir ortamda L-DOPA üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu tip üretimde devamlı pH kontrolü gerekmekte ve ayrıca substrat, kofaktör ve koenzim miktarlarının devamlı ayarlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır [47, 48, 50, 87].

Benzenden L-DOPA üretimi yapılan bir çalışmada hibrit bir yol izlenmiş ve benzenden katekol üretildikten sonra katekolden L-DOPA üretimi yapılmıştır. Benzenden katekol üretimi için gerekli iki enzim TDO ve TCGDH dır. Katekolden L-DOPA üretimi için ise TPL enzimine ihtiyaç vardır. Bu üç enzimin genleri bir plazmide aktarılarak *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerine transforme edilmiştir. Ancak belirli bir seviyenin üzerindeki katekol ve benzenden bu rekombinant bakteriler etkilenmekte ve bu şartlar altında sonuçta etkili bir L-DOPA üretimi gerçekleşmemektedir [18].

Bakterilerle şu ana kadar L-DOPA ve dopamin üretimi mutant veya rekombinant hücreler oluşturularak ya da saf enzimler kullanarak yapılmıştır. Oluşturulan sentetik ortamlarda verimli ürün eldesi olmuştur. Fakat böyle bir ortamın devamlı olarak kontrolü ve optimum koşulların sağlanması her zaman mümkün değildir [17, 18].

L-DOPA ve dopaminin bakteriyel olarak sentezlenmesi üzerine yaptığımız çalışmada bakterilerin doğal büyüme ortamlarında L-DOPA ve dopamini ürettikleri saptanmıştır. Üreme ortamlarına eklenen tirozin ile de L-DOPA üretiminin arttığı belirlenmiştir [53]. Ayrıca sentetik bir reaksiyon karışımı hazırlanarak üretim için gerekli moleküller (substratlar, kofaktörler ve koenzimler) bakterilere hazır olarak verildiğinde L-DOPA ve dopamin üretiminin nasıl olduğu araştırılmıştır.

Çalışılan bakteriler arasında en fazla L-DOPA'nın *C. freundii* tarafından üretildiği saptanmıştır. L-DOPA üretiminin fazla olması için TPL enzim aktivitesi ve L-DOPA üretimi üzerinde zaman ve besi ortamı optimizasyonu bu bakteri kullanılarak yapılmıştır. *C. freundii*'nin 12, 24 ve 48 saat olmak üzere üç farklı kültürü kullanılmıştır. Bu sayede genç ve yaşlı hücrelerdeki L-DOPA üretiminin nasıl olduğu araştırılmıştır. Ayrıca *C. freundii* zengin (LB) ve fakir (M9) besiyerlerinde kültürü yapılarak L-DOPA üretiminin hangi besiyerlerinde daha iyi olduğu çalışılmıştır. Araştırmalar sonucunda LB ortamında L-DOPA üretiminin 12 saatten 48 saate doğru gittikçe azaldığı görülmüştür. Hem LB hem de M9 ortamlarında hücre içinde yaklaşık olarak aynı miktarda L-DOPA saptanırken, hücre dışına salınan L-DOPA LB ortamında M9 ortamına nazaran 30-40 kat fazla bulunmuştur. Total L-DOPA üretimi LB ortamında daha yüksek gözlenmiştir.

Farklı kültür fazlarından (12, 24 ve 48 saat) elde edilen özütler ile yapılan çalışmada en yüksek L-DOPA üretimi 12 saatlik kültürlerde saptanmıştır. Sonuç olarak yapılan çalışma neticesinde L-DOPA üretimi için en uygun zamanın 12 saat iken, uygun besi ortamının LB besiyeri olduğu rapor edilmiştir. TPL enziminin aktivitesinin de LB ortamında üretilen 12 saatlik hücrelerde yüksek olduğu gözlenmiştir.

C. freundii ve diğer bakterilerin L-DOPA üretimi hücre içi, hücre dışı ve total olarak ele alınmış ve bütün bakteriler için LB ve tirozin içeren LB ortamları denenmiştir. Bakterilerin tirozin bulunan ortamda daha fazla L-DOPA ürettiği bulunmuştur. *C. freundii* ürettiği L-DOPA'yı hücre içinde tutma ve hücre dışına salma oranı açısından bakteriler arasında en yüksek kapasiteye sahiptir. Dolayısıyla da total olarak en etkili üretim bu bakteride olmuştur. *P. aeruginosa* ve *S. faecalis* hücre içinde L-DOPA tutma ve hücre dışına salma açısından en düşük kapasiteye sahiptir.

C. freundii ve *E. herbicola* hücre içinde L-DOPA tutma ve hücre dışına L-DOPA salma oranı hemen hemen eşittir. Tirozinli ortamda *C. freundii* hücre dışına hücre içindeki miktara göre biraz daha fazla L-DOPA salmıştır. *E. aerogenes* de hücre içinde tutulan L-DOPA hücre dışındakinden fazladır. *P. aeruginosa* ve *S. faecalis* de ise hücre dışına salınan L-DOPA miktarı hücre içinde tutulandan fazladır.

Sonuçta etkin bir L-DOPA üretimi için kullanılacak bakteri *C. freundii* olarak belirlenmiştir. L-DOPA dopamin sentezinde öncül madde olduğu için bakteriyel olarak dopamin sentezinde L-DOPA üretimi en fazla olan bu bakteri seçilmiştir. Ayrıca L-DOPA'dan dopamin sentezini gerçekleştiren karakteristik TDC enzime sahip olması sebebiyle *S. faecalis*'in dopamin sentezi için uygun olduğunu düşünüyoruz.

Bakteriyel olarak dopamin sentezinde *C. freundii* ve *S. faecalis* bakterileri test edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda her 2 bakterinin de doğal olarak dopamin sentezlediği gözlenmiştir. *S. faecalis* *C. freundii*'e göre yaklaşık olarak 1.5 kat daha fazla dopamin sentezlediği belirlenmiştir. Bu sonuca göre *S. faecalis* aslında yüksek L-DOPA üretmesi gerekir. Ancak, iki bakteri arasındaki bu fark onların L-DOPA'yı dopamine çevirme özellikleri ile ilgilidir. *S. faecalis* tarafından üretilen L-DOPA'nın %90 kadarı TDC ile dopamine dekarboksile edilirken, *C. freundii* tarafından üretilen L-DOPA'nın %30 kadarı dopamine dekarboksile olmuştur.

Yapmış olduğumuz çalışma şu ana kadar yapılan L-DOPA ve dopamin sentez mekanizmalarından farklıdır. Yaptığımız çalışmada ilk defa Gram-negatif (*C. freundii*, *E. herbicola*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*) ve Gram-pozitif (*S. faecalis*) bakterilerin kültür ortamlarında ve ayrıca *in vitro* bir düzenekteki L-DOPA ve dopamin üretimi araştırılmıştır. Çalışmada kültür ortamlarında bakterilerin hücre içinde tuttıkları, hücre dışına saldıkları ve total (hücre içi+hücre dışı) L-DOPA ve dopamin seviyeleri saptanmıştır. Ayrıca *in vitro* bir reaksiyon düzeneğinde bakterilere ait enzimler (TPL ve TDC) kullanılarak üretilen L-DOPA ve dopamin düzeyleri de rapor edilmiştir. Ayrıca şimdiye kadar çalışılmamış olan *C. freundii* ve *E. herbicola*'ya yakın diğer bakterilerin (*E. aerogenes*, *P. aeruginosa*) L-DOPA ve dopamin üretip üretmedikleri de ilk defa yapılan bu çalışmada araştırılmıştır.

Bu çalışma göstermiştir ki, L-DOPA ve dopaminin sentezinde uygun bakterilerin (*C. freundii* ve *S. faecalis*) ve besiyerinin (LB+L-tirozin) kullanılması önemli ölçüde avantaj sağlayabilir. Bu çalışmaya ek olarak yapılabilecek deneyler ile etkin bir şekilde ve maliyeti düşük olarak L-DOPA ve dopamin sentezlenebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Ganong W. F. (1995) Review of Medical Physiology. 17th edition, **Appleton & Lange** 89-93, 248, 327, 331, 390-391.
- [2] Kiseleva, Z. M., Parfenova, E. V., Erina, E. V, Shkhvatsabaia I. K. (1979) Administration of the catecholamine precursor, L-DOPA, for evaluating their in vivo biosynthesis in hypertension. **Kardiologiya** 19(10): 55-60.
- [3] Hornykiewicz, O. (2002) L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent historical review article. **Amino Acids** 23,(1-3): 65-70
- [4] Katzenschlager, R. , Lees, A. J. (2002) Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice **J. Neurol.** 249(2): 1119-1124.
- [5] <http://www.nobelprize.org/chemistry/laureates>
- [6] <http://www.kimyasanal.net>
- [7] Noyan, A. (1999) **Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji**, 11. baskı 243-245, 295, 301-303, 446, 798, 1008-1010, 1079, 1085, 1142.
- [8] Orten, J. M. , Neuhaus, O. W. (1982) Human Biochemistry. **The C. V. Mosby Company.** 353-355, 423, 629,630.
- [9] Murray, R. K. , Mayes, P. A. , Granner, D. K. , Rodwell, V. W. (1991) Harper's Biochemistry. **Appleton & Lange**, 22nd Edition, Chapter 33, 50.
- [10] Patton H. D., Fuchs A. F., Hille B., Scher A. M., Steiner R. (1989) Textbook of physiology. circulation, respiration, body fluids, metabolism and endocrinology. 21st edition, **W. B. Saunders International Edition**, volume 2: 1209.
- [11] Lisbon A. (2003) Dopexamine, dobutamine and dopamine increase splanchnic blood flow: What is the evidence? **Chest** 123: 460-463.
- [12] Tesfaye, B. , Gerald. , S. (2002) Differential effects of catecholamines on in vitro growth of pathogenic bacteria **Life Sciences** 71: 447-456.
- [13] Tesfaye, B. , Hernan, A. , Monique, V. , Kimberly, F. , Gerald, S. , Lenard, J. , vanDeroef, R. (1995) A novel bacteriostatic action of bovine and porcine serum that is reversed by norepinephrine. **Life Sciences** 57: 443-447.
- [14] Lyte, M. , Ernst, S., (1992) Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. **Life Sciences** 50: 203-213.
- [15] Lyte, M. (1993) The role of microbial endocrinology in infectious disease. **J. Endocrinol.** 137: 343-345.
- [16] Lyte, M. (1997) Induction of Gram-negative bacterial growth by neurochemical containing banana (*Musa x paradisiaca*) extracts **FEMS Microbiol. Letters** 154: 245-250.
- [17] Lee, S. , Hong, S. , Sung, M. (1999) Development of an enzymatic system for the production of dopamine from catechol, pyruvate, and ammonia. **Enzyme and Microb. Technol.** 25: 298-302.
- [18] Park, H. , Lee, J. , Kim, H. (1997) Production of L-DOPA (3,4-Dihydroxyphenyl-L-alanine) from benzene by using a hybrid pathway. **Biotech. and Bioeng.** 58: 339-343.
- [19] Kumagai, H. , Yamada, H. , Matsui, H. , Ohkishi, H. , Ogata, K. (1970) Tyrosine phenol lyase: I. purification, crystallization and properties. **J. Biol. Chem.** 245: 1767-1772.
- [20] Ali, S. , Qadeer, M. A. (2002) Biosynthesis of L-DOPA by *Aspergillus oryzae*. **Biores. Tech.** 85: 25-29.
- [21] Lehninger, A. L. , Nelson, D. L. , Cox, M. M. (1993) Principles of Biochemistry, **Worth Publishers, Inc.** 713-714.

- [22] Haneda, K., Watanabe, S., Takeda, I. (1971) Synthesis of L-3, 4-dihydroxyphenylalanine from L-tyrosine by microorganisms. **Appl. Microbio.** 22(4): 721-722.
- [23] Stryer, L. (1988) *Biochemistry*, 3rd edition, **W. H. Freeman and Company**. USA, 514
- [24] Patton H. D. , Fuchs A. F. , Hille B. , Scher A. M. , Steiner R. (1989) *Textbook of physiology. circulation, respiration, body fluids, metabolism and endocrinology*. 21st edition, **W. B. Saunders International Edition**, volume 2: 1146-1147.
- [25] Eisenhofer, G. , Tian, H. , Holmes, C. (2003) Tyrosinase: a developmentally specific major determinant of peripheral dopamine. **FASEB J.** 17: 1248-1255
- [26] Merck (1989) *The Merck Index*, 11th edn. Rahway, N. J.: Merck. van der Meer, J.R., de Vos, W. M., Harayama, S., and Zehnder, A. J. B., (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. **Microbiol. Rev.** 56: 677-694.
- [27] Milligan, P. W., and Haggblom, M. M., (1998) Biodegradation of resorcinol and catechol by denitrifying enrichment cultures. **Environ. Toxicol. Chem.** 17: 1456-1461.
- [28] van der Meer, J.R., de Vos, W. M., Harayama, S., and Zehnder, A. J. B., (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. **Microbiol. Rev.** 56: 677-694.
- [29] Porteous, J. W., and Williams, R. T., (1948) Studies in detoxication 20. The metabolism of benzene. II. The isolation of phenol, catechol, quinol and hydroxyquinol from the ethereal sulfate fraction of the urine of rabbits receiving benzene orally. **Biochem. J.** 44: 56-61.
- [30] Stone, K., Bermudez, E. , Zang, L. Y. , Carter, K. M. , Queenan, K. E. , and Pryor, W. A. (1995) The ESR properties, DNA nicking and DNA association of aged solutions of catechol versus aqueous extracts of tar from cigarette smoke. **Arch Biochem. Biophys.** 319: 196-203.
- [31] Pryor, W. A. , Stone, K. , Zang, L. Y. , and Bermudez, E., (1998) Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. **Chem. Res. Toxicol.** 11: 441-448.
- [32] Tressl, R., Grünwald, K. G., Köppler, H., and Silwar, R. (1978) Flüchtige Phenole in Röstkaffees verschiedener Sorten. I. **Z. Lebensm Unters Forsch** 167: 108-110.
- [33] Hayakawa, F. , Kimura, T. , Maeda, T. , Fujita, M. , Sohmiya, H. , Fujii, M. , and Ando, T. (1997) DNA cleavage reaction and linoleic acid peroxidation induced by tea catechins in the presence of cupric ion. **Biochem. Biophys. Acta.** 1336: 123-131.
- [34] Moran, J. F. , Klucas, R. V. , Grayer, R. J. , Abian, J. , and Becana, M. (1997) Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. **Free Radic. Biol. Med.** 22: 861-870.
- [35] Li, Y., and Trush, M. A. (1994) Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. **Cancer Res.** 54: 1895-1898
- [36] Schweigert, N. , Belkin, S. , Leong-Morgenthaler, P. , Zehnder, A. J. B. , and Eggen, R. I. L. (1999) Combinations of chlorocatechols and heavy metals cause DNA degradation in vitro but must not result in increased mutation rates in vivo. **Environ. and Molec. Mutagen.** 33: 202-210.

- [37] Stoyanovsky, D. A. , Goldman, R. , Claycamp, H. G. , and Kagan, V. E. (1995) Phenoxyl radical-induced thiol-dependent generation of reactive oxygen species: Implications for benzene toxicity. **Arch. Biochem. Biophys.** 317: 315-323.
- [38] Bolt, H. M. , and Kappus, H. (1974) Irreversible binding of ethynylestradiol metabolites to protein and nucleic acids as catalyzed by rat liver microsomes and mushroom tyrosinase. **J. Steroid. Biochem.** 5: 179-184.
- [39] Gottlieb, A. J. , and Wurzel, H. A. (1974) Protein±quinone interaction: in vitro induction of indirect antiglobulin reactions with methyl dopa. **Blood** 43: 85-97.
- [40] Scheulen, M. , Wollenberg, P. , Bolt, H. M. , Kappus, H. , and Remmer, H. (1975) Irreversible binding of DOPA and dopamine metabolites to protein by rat liver microsomes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 66: 1396-1400.
- [41] Freyberger, A. , and Degen, G. H. (1989) Covalent binding to proteins of reactive intermediates resulting from prostaglandin H synthase-catalyzed oxidation of stilbene and steroid estrogens. **J. Biochem. Toxicol.** 4: 95-103.
- [42] Schweigert, N. , Zehnder, A. , Eggen, R. , (2001) Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. **Environ. Microb.** 3(2): 81-91
- [43] Dix, T. A. , and Aikens, J. (1993) Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. **Chem. Res. Toxicol.** 6: 2-18.
- [44] Kumagai, H. , Yamada, H. , Matsui, H. , Ohkishi, H. , Ogata, K. (1970) Tyrosine Phenol Lyase I. purification, crystallization and properties. **J. Biol. Chem.** 245: 1767-1772.
- [45] Kumagai, H. , Yamada, H. , Matsui, H. , Ohkishi, H. , Ogata, K. (1970) Tyrosine phenol lyase. II. Cofactor requirements. **J. Biol. Chem.** 245: 1773-1777.
- [46] Yamada, H., Kumagai, H., Kashirna, N., Torii, H., Enei, H., Okumura, S. (1972) Synthesis of L-tyrosine from pyruvate, ammonia and phenol by crystalline tyrosine phenol lyase **Biochem Biophys Res Commun** 46: 370-374.
- [47] Koyanagi, T. , Katayama, T. , Suzuki, H. , Nakazawa, H. , Yokozeki, K. , Kumagai, H. (2005) Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-l-alanine (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR. **J. of Biotech.** 115: 303-306.
- [48] Katayama, T. , Suzuki, H. , Yamamoto, K. , Kumagai, H. , (1999) Transcriptional regulation of tyrosine phenol-lyase gene mediated through TyrR and cAMP receptor protein. **Biosci. Biotech. Biochem.** 63(10): 1823-1827.
- [49] Carman, G. M. , Levin, R. E. (1977) Partial purification and some properties of tyrosine phenol-lyase from *Aeromonas phenologenes* ATCC 29063¹. **App. Environ. Microb.** 33: 192-198.
- [50] Smith, H. Q. , Somerville, R. L. (1997) The tpl Promoter of *Citrobacter freundii* is activated by the TyrR Protein† **J. Bacter.** 179 (18): 5914-5921.
- [51] Demidkina, T. V. , Myagkikh, I. V. , Azhayev, A. V. (1987) Transamination catalysed by tyrosine phenol-lyase from *Citrobacter intermedius*. **Eur. J. Biochem.** 170: 311 -316.
- [52] Suzuki, H. , Katayama, T. , Yamamoto, K. , Kumagai, H. (1995) Transcriptional regulation of tyrosine phenol-lyase gene of *Erwinia herbicola* AJ2985. **Biosci. Biotech. Biochem.** 59: 2339-2341.
- [53] Para, G. M. , Baratti, J. C. (1984) Effect of culture conditions on the production of tyrosine phenol-lyase by *Erwinia herbicola*. **App. Environ. Micro.** 48: 1256-1258
- [54] <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
- [55] Lancaster, G. A. , Sourkes, T. L. (1972) Purification and properties of hog-kidney 3,4 dihydroxyphenylalanine decarboxylase. **Can. J. Biochem.** 50: 791-7.

- [56] Ando-Yamamoto, M. , Hayashi, H. , Sugiyama, T. , Fukui, H. , Watanabe, T. , Wada, H. (1987) Purification of L-DOPA Decarboxylase from rat liver and production of polyclonal and monoclonal antibodies against it. **J. Biochem.** 101: 405–14.
- [57] Nakazawa, H. , Kumagai, H. , Yamada, H. (1981) Constitutive aromatic L-amino acid decarboxylase from *Micrococcus percitreus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 61: 75– 82.
- [58] Perley, J. E. , Stowe, B. B. (1966) The production of tryptamine from tryptophan by *Bacillus cereus* (KVT). **Biochem. J.** 100: 169 –74.
- [59] Bellamy, W. D. , Gunsalus, I. C. (1944) Tyrosine decarboxylation by *Streptococci*: growth requirements for active cell production. **J. Bacteriol.** 48:191–9.
- [60] Anderson, W. A. , Moo–Young, M. , Legge, R.L. (1992) Development of a multienzyme reactor for dopamine synthesis: I enzymology and kinetics. **Biotech. Bioeng.** 39: 781–9.
- [61] McGilvery, R. W. , Cohen, P. P. (1948) The decarboxylation of L-phenylalanine by *Streptococcus faecalis* R. **J. Biol. Chem.** 174: 813-816.
- [62] <http://www.nobelprize.org/medicine/laureates>
- [63] Dougan, D. , Wade, D. , Mearrick, P. (1975) Effects of L-DOPA metabolites at a dopamine receptor suggest a basis for “on-off” effect in Parkinson’s disease. **Nature** 254: 70.
- [64] Antson, A. A. , Demidkina, T. V. , Gollnick, P. , Dauter, Z. , von Tersch, R. L. , Long, J. , Berezhnoy, S. N. , Phillips, R. S., Harutyunyan, E. H., Wilson, K. S. , (1993) Three-dimensional structure of tyrosine phenol-lyase. **Biochem.** 32 (16): 4195–4206.
- [65] Jenner, P. , Olanow, C. W. (1996) Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson’s disease. **Neurology** 47: 161–70.
- [66] Smith, S. T. , Parker, W. D. , Bennet, J. P. (1994) L-DOPA increases nigral production of hydroxyl radicals in vivo: potential L-DOPA toxicity? **Neuroreport** 5: 1009–11.
- [67] Basma, A. N. , Morris, E. J. , Nicklas, W. J. , Geller, H. M. (1995) L-DOPA cytotoxicity to PC12 cells in culture is via auto-oxidation. **J. Neurochem.** 64: 825–32.
- [68] Martignoni, E. , Blandini, F. , Godi, L. , Desideri, S. , Pacchetti, C. , Mancini, F. , Nappi, G. (1999) Peripheral markers of oxidative stress in Parkinson’s disease. The role of L-DOPA. **Free Radic. Biol. Med.** 27: 428–37.
- [69] <http://www.en.wikipedia.org/wiki/L-DOPA>
- [70] Patton, H. D. , Fuchs, A. F. , Hille, B. , Scher, A. M. , Steiner, R. (1989) Textbook of physiology. Excitable cells and neurophysiology. 21st edition, **W. B. Saunders International Edition**, volume 1: 659.
- [71] <http://www.en.wikipedia.org/wiki/dopamine>
- [72] Imke, S. , Hutton, T. , Loftus, S. (2003) Parkinson disease: caring and coping. **The National Parkinson Foundation, Inc.** 1-64.
- [73] <http://www.parkinson.org>
- [74] Marjama-Lyons, J., Okun, M. S. (2003) Parkinson disease: guide to deep brain stimulation therapy, 1st edition 1-60.
- [75] http://www.en.wikipedia.org/wiki/Parkinson's_disease
- [76] Masliah, E. , Rockenstein, E. , Veinbergs, I. (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. **Science** 287 (5456): 1265–1269.
- [77] Zylstra, G. J. , Gibson, D. T. (1989) Toluene degradation by *Pseudomonas putida*

- F1. **J. Biol. Chem.** 264: 14940–14946.
- [78] Lee, S-G. , Hong, S-P. , Choi, Y-H. , Chung, Y-J. , Sung, M-H. (1997) Thermostable tyrosine phenol-lyase of *Symbiobacterium* sp. SC-1: gene cloning, sequence determination, and overproduction in *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.** 11: 263–70.
- [79] Foor, F. , Morin, N. , Bostian, K. A. (1993) Production of dihydroxyphenylalanine in *Escherichia coli* with the tyrosine phenol-lyase gene cloned from *Erwinia herbicola*. **Appl. Environ. Micro.** 59(9): 3070–3075.
- [80] Iwamori, S. , Oikawa, T. , Ishiwata, K. , Makiguchi, N. (1992) Cloning and expression of the *Erwinia herbicola* tyrosine phenol-lyase gene in *Escherichia coli*. **Biotech. Appl. Biochem.** 16 (1): 77–85.
- [81] Bai, Q. , Somerville, R. L. (1998) Integration host factor and cyclic AMP receptor protein are required for TyrR-mediated activation of *tpl* in *Citrobacter freundii*. **J. Bacteriol** 180 (23): 6173–6186.
- [82] Katayama, T. , Suzuki, H. , Yamamoto, K. , Kumagai, H. (1999) Transcriptional regulation of tyrosine phenol-lyase gene mediated through TyrR and cAMP receptor protein. **Biosci. Biotech. Biochem.** 63(10): 1823–1827.
- [83] Chung, J. W. , Webster, D. A. , Pagilla, K. R. , Stark, B. C. (2001) Chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Burkholderia* and *Pseudomonas* for the purpose of producing stable engineered strains with enhanced bioremediating ability. **J. Ind. Microb. Biotech.** 27: 27-33.
- [84] Wriston Jr, J. C. (1970) Asparaginase. **Method. Enzymol.** 17: 732-742
- [85] Lowry, O. H. , Rosebrough, N. J. , Farr, A. L, Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- [86] Koyanagi, T. , Katayama, T. , Suzuki, H. , Kumagai, H. (2005) Construction of an effective protein expression system using the *tpl* promoter in *Escherichia coli*. **Biotech. Let.** 27: 1267–1271.
- [87] Katayama, T. , Suzuki, H. , Koyanagi, T. , Kumagai, H. (2000) Cloning and random mutagenesis of the *Erwinia herbicola* *tyrR* gene for high-level expression of tyrosine phenol-lyase. **App. and Environ. Micro.** 66(11): 4764–4771.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : **Ufuk ÖZER**
Doğum Yeri ve Tarihi : Malatya - 23.10.1983
Mesleği ve Ünvanı : Biyolog

EĞİTİM DURUMU

İlkokul : Hidayet İlköğretim Okulu (Malatya, 1989-1994)
Ortaokul : Hamidiye İlköğretim Okulu (Malatya, 1994-1997)
Lise : Yunus Emre Endüstri Meslek Lisesi (Malatya, 1997-2000)
Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, (Malatya 2000-2004)
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, (Malatya 2004-2006)

YAYINLANMIŞ ESERLER

1. Geckil H, Gencer S, Ates B, **Ozer U**, Uckun M, and Yilmaz I (2006), Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin on production of a chemotherapeutic enzyme, L-asparaginase, by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnology Journal** 1: 203-208.
2. Ates B, Gencer S, Erenler S. O. , Uckun M, **Ozer U**, Yilmaz I ve Geckil H (2006), Production of L-asparaginase, chemotherapeutic enzyme, in bacteria expressing *Vitreoscilla* hemoglobin; **31.FEBS Congress, Molecules in Health & Disease**, Istanbul/Turkey.

BİLİMSEL FALİYETLER

- 1- XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Bazı Gram-negatif Bakterilerde L-asparaginaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi, 30 Eylül-4 Ekim 2005, Kuşadası (poster).

- 2- XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi (görevli öğrenci olarak), 3-7 Eylül 2002, Malatya
- 3- Önemli Bir İnsan Nörotransmitteri Olan Dopaminin Bakteriyel Sentezi (seminer)

