T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Vitreoscilla HEMOGLOBİN GENİNİN *Erwinia herbicola*'YA KLONLANMASI VE L-DOPA ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

EMEL AYTAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
TEMMUZ 2009

Tezin Başlığı: *Vitreoscilla* Hemoglobin Geninin *Erwinia herbicola*'ya Klonlanması ve L-DOPA Üretimi Üzerine Etkisi

Tezi Hazırlayan: Emel AYTAN

Sınav Tarihi: 10.07.2009

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA (İnönü Üniv.) _____

Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL (İnönü Üniv.) _____

Doç. Dr. Dilek ASMA (İnönü Üniv.) _____

İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İsmail ÖZDEMİR
Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Yüksek Lisans olarak sunduğum **"*Vitreoscilla* Hemoglobin Geninin *Erwinia herbicola*'ya Klonlanması ve L-DOPA Üretimi Üzerine Etkisi"** başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakça yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunun onurumla doğrularım.

Emel AYTAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Vitreoscilla HEMOGLOBİN GENİNİN *Erwinia herbicola*'YA KLONLANMASI VE L-DOPA ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Emel AYTAN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

83 + ix sayfa
2009
Danışman: Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL

Yabancı organizmadaki faydalı etkisi iyi şekilde belirlenmiş olan *Vitreoscilla* hemoglobinin (VHb) *Erwinia herbicola*'da L-DOPA ve dopamin üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. VHb geni (*vgb*$^+$) taşıyan rekombinantın sitoplazmik L-DOPA seviyesi (97 mg L^{-1}) konakçısından (33.8 mg L^{-1}) ve *vgb*$^-$ kontrol suşundan (35.8 mg L^{-1}) oldukça yüksek kaydedilmiştir. Ayrıca, *E. herbicola vgb*$^+$ rekombinantının dopamin seviyesi konakçısından yaklaşık 100 kat daha fazla bulunmuştur. L-DOPA ve dopaminin en yüksek seviyelerde L- tirozin eklenen zengin kültür ortamının ileri kültür fazda (24 saat) gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, tirozin fenol liyaz aktivitesi de en yüksek seviyede aynı kültür fazında belirlenmiştir. Bu enzimin aktivitesinin sitoplazmik L-DOPA ile ilişkili olduğu saptanmıştır. *E. herbicola vgb*$^+$ suşunun yüksek *tirozin fenol liyaz* aktivitesi ileri kültür fazında görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELER: L-DOPA, Dopamin, Tirozin, Tirozin fenol liyaz, Tirozin Dekarboksilaz, Parkinson hastalığı, Katekolamin.

ABSTRACT

Master Thesis

Cloning of *Vitreoscilla* Hemoglobin in *Erwinia herbicola* and Its Effect on L-DOPA Production

EMEL AYTAN

Inonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Institute of Natural Sciences

83+ ix pp
2009
Supervisor: Hikmet GEÇKİL, Associate Professor

Given the well-established beneficial effects of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) on heterologous organisms, the potential of this protein for the production of L-DOPA and dopamine in *Erwinia herbicola*, was investigated. The constructed recombinant bearing the VHb gene (*vgb*$^+$) had substantially higher levels of cytoplasmic L-DOPA (97 mg L^{-1} for *E. herbicola*) than its respective host (33.8 mg L^{-1}) and the *vgb*$^-$ control strain (35.8 mg L^{-1}). Further, the *vgb*$^+$ recombinants *E. herbicola* had about two orders of magnitude higher dopamine level than its host. The highest L-DOPA and dopamine levels were observed in post-stationary growth phase (24 h) of cultivation in nutrient rich medium supplemented with L-tyrosine. Similarly, TPL activity was also highest in the same cultures. The activity of tyrosine phenol-lyase, the enzyme converting L-tyrosine to L-DOPA, was well-correlated to cytoplasmic L-DOPA levels. As cultures aged, higher tyrosine phenol-lyase activity of the *vgb*$^+$ strains was more apparent.

KEY WORDS: L-DOPA, Dopamine, Tyrosine, Tyrosine phenol lyase, Tyrosine Decarboxylase, Parkinson disease, Catecholamine.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yürütülmesinde bütün bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında yardımını, önerilerini ve desteğini esirgemeden beni yönlendiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL' e;

Yüksek lisansa başladığımdan itibaren her türlü yardımını, desteğini ve anlayışını esirgemeyen sevgili laboratuar arkadaşım Aslı GİRAY KURT'a;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bana maddi ve manevi açıdan destekleyen ve bugüne gelmemi sağlayan canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	ÖZET……..……....	i
	ABSTRACT…….……	ii
	TEŞEKKÜR…….	iii
	İÇİNDEKİLER…….	iv
	ŞEKİLLER DİZİNİ…….	vi
	ÇİZELGELER DİZİNİ……..……..	viii
	SİMGELER VE KISALTMALAR…….	ix
1.	GİRİŞ ……...	1
1.1.	DOPA……	3
1.2.	DOPAMİN……	4
1.3.	L-DOPA ve Dopaminin Bakteriyel Sentezi…….	5
1.3.1.	L-DOPA Sentezi……..	6
1.3.1.1.	Tirozin Fenol Liyaz Enzimi…….	7
1.3.1.1.1.	Tirozin Fenol Liyaz Enziminin Geni……	8
1.3.1.2.	Tirozinaz Enzimi…...…….....	9
1.3.1.3.	Tirozin……...	11
1.3.1.4.	Katekoller.…….	13
1.3.2.	Dopaminin Sentezi……	14
1.3.2.1.	Dopa Dekarboksilaz Enzimi…….	15
1.3.3.	Parkinson Hastalığı……..	15
1.3.4.	Mikroorganizma Hemoglobinleri…….	16
1.4.	Bakteriyel *(Vitreosilla)* Hemoglobin (Vhb)…….	17
1.4.1.	*Vitreoscilla* Hemoglobin Geni (*vgb*)…….	22
1.4.2.	*Vitreocilla* Hemoglobin Genini Klonladığı Organizmaya Etkisi…….	22
1.4.3.	VHb Metabolik Mühendislikteki Uygulamaları…….....	23
2.	KAYNAK ÖZETLERİ……	25
3.	MATERYAL VE YÖNTEM……..	31
3.1.	Araştırmada Kullanılan Kimyasallar Ve Ayıraçlar……..	31
3.1.1.	Nessler Ayıracı…….	31
3.2.	Araştırmada Kullanılan Besiyeri Ortamları…….	31
3.3.	Araştırmada Kullanılan Bakteriler……..	32
3.4.	Bakteri Stoklarının Hazırlanması……..	33
3.5.	Araştırmada Kullanılan *Vgb* Klonları……...	33
3.6.	Uygun Bakteri Suşlarının Eldesi ve Klonlama Çalışmaları…….	34
3.6.1.	Plazmid İzolasyonu İçin Bakterilerin Kültürü……..	34
3.6.2.	Plazmid İzolasyonu (Miniprepler)……	34
3.6.3.	Plazmidlerin Restriksiyon Kesilimi ve Agaroz Jel Elektroforezi……	37
3.6.4.	Bakterilerin Yeni Vektörlerle Transformasyonu……..	39
3.6.4.1.	Kompetan Hücre Oluşturulması……	40
3.6.4.2.	Hücrelerin Transformasyonu……	40
3.6.4.3.	Rekombinant Klonların Seçilimi……..	41
3.7.	L-DOPA ve Dopamin Sentezi İçin Bakteri Kültürleri…….	42
3.8.	Kültür Ortamındaki Toplam Biomas Belirlenmesi……...	42
3.9.	Kültür Supernatantlarının Saklanması……..	42
3.10.	Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması……..	42
3.11.	Tirozin Fenol Liyaz Enziminin Tayini…….	43
3.12.	L-DOPA ve Dopaminin HPLC ile Analizi……...	44
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI……...	45

4.1.	HPLC ile L-DOPA ve Dopamin Ölçümü…….	45
4.2.	Farklı Kültür Koşullarının ve Fazlarının L-DOPA Üretimi Üzerindeki Etkisi.	46
4.2.1.	LB Ortamında Rekombinant Bakterilerin L-DOPA ve Dopamin Üretimi…..	46
4.2.2.	LB-Tirozin Ortamında Rekombinant Bakterilerin L-DOPA ve Dopamin Üretimi……..	48
4.2.3.	*E. herbicola'*nın ve Rekombinantlarının Farklı Kültür Koşularındaki L-DOPA ve Dopamin Üretim Kapasitesi…….	49
4.2.4.	Minimal Besi (M9) Ortamında *Erwinia herbicola* ve Rekombinantlarının L-DOPA ve Dopamin Üretim Kapasitesi…….	54
4.3.	Farklı Kültür Koşullarının ve Kültür Fazlarının Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi……..	55
4.3.1.	LB Ortamında *Erwinia herbicola* 'nin Farklı Fazlardaki Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Aktivitesi……...	56
4.3.2.	LB-Tirozin Ortamında *Erwinia herbicola* 'nin Farklı Fazlardaki Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Aktivitesi……..	57
4.3.3.	Minimal Besi (M9) Ortamında *Erwinia herbicola'*nın Tirozin Fenol Liyaz Aktivitesi……...	58
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ…….	60
6.	KAYNAKLAR…….	68
	ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	L-DOPA ……..	4
Şekil 1.2	Dopamin…….	5
Şekil 1.3	L-tirozinin TPL enzimi ile pirüvat, amonyak ve fenole dönüşümü……..…	6
Şekil 1.4	TPL enzimi ile L-DOPA yapımı……...	7
Şekil 1.5	L-DOPA'dan dopamini oluşumu …..……..……	7
Şekil 1.6	*tpl* promotor regulatör elementler ……..	9
Şekil 1.7	Tirozinazın L-DOPA sentez şeması …….……...	10
Şekil 1.8	Tirozin metabolizması……	12
Şekil 1.9	L-DOPA'dan Dopamin Sentezi……	14
Şekil 1.10	Bakteriyel hemoglobin geni taşıyan yegane bakteri *Vitreoscilla*'nın taksonomik konumu…….	18
Şekil 1.11	VHb'nin 3-boyutlu yapısı……..	19
Şekil 1.12	Düşük oksijen yoğunluğunda *vitreoscilla* hemoglobinin rolü……	19
Şekil 1.13	VHb ve sitokrom *bo* obiquionol oksidazların I.alt ünitesi arasındaki ilişkinin muhtemel mekanizması……...	21
Şekil 1.14	*E. coli* transkripsiyon sistemi tarafından tanınan *vgb* promotoru	22
Şekil 3.1	pUC8 ve pUC8:15 plazmidlerinin fiziki haritası …….	33
Şekil 3.2	HindIII ile kesilmiş λ pUC8 plazmidinin agaroz jeldeki restriksiyon fragmanları……	38
Şekil 3.3	Agaroz jelde sırasıyla HindIII ile kesilmiş λ DNA'sı (1), pMK79 (2-4) , pMK57 (5-7) ve pUC8:15 (8-10) plazmidleri görülmektedir……...	39
Şekil 3.4	Rekombinant bakterilerde piyosiyanin pigmenti……..	41
Şekil 3.5	Rekombinant bakterilerden izole edilen plazmidlerin agaroz jeldeki restriksiyon fragmanları……	41
Şekil 4.1	LB ortamında *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'nın 24 saate hücre dışı (a) ve hücre içi (b) L-DOPA (■) ve dopamin (■) miktarları…….	47
Şekil 4.2	LB + %0.1 tirozin ortamlarında *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 24 saate hücre dışı (a) ve hücre içi (b) L-DOPA (■) ve dopamin (■) miktarları……	49
Şekil 4.3	*Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 24 saate LB (■) ve LB + %0.1 tirozin (■)	

ortamında hücre dışı L-DOPA miktarı. …… 50

Şekil 4.4 *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 24 saate LB (■) ve LB + %0.1 tirozin (■) ortamında hücre dışı (a) ve hücre içi (b) dopamin miktarları……... 51

Şekil 4.5 *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 24 saate M9 (■) ve LB (■) ortamında hücre dışı (a) ve hücre içi (b) L-DOPA miktarları, hücre içi (c) ve hücre dışı (d) dopamin miktarları……..…….. 53

Şekil 4.6 *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 24 saate M9 ortamında L-DOPA (■) ve dopamin (■) miktarları…….. 54

Şekil 4.7 Üretilen L-DOPA tirozinaz enziminin aktivasyonu ile piyomelanine dönüştüğü düşünülmektedir…….. 55

Şekil 4.8 *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 12 saat (■)ve 24 saate (■) LB ortamında TPL aktivitesi. ……. 56

Şekil 4.9 *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 12 saat (■) ve 24 saate (■) LB+ %0.1tirozin ortamındaki TPL aktivitesi…..... 57

Şekil 4.10 *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 12 saate M9 (■) ve M9+ %0.1tirozin (■) ortamındaki TPL aktivitesi…..…….. 58

Şekil 4.11 *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 24 saate M9 (■) ve M9-tirozin (■)ortamındaki TPL aktivitesi…..…….. 59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Luria-Bertani (LB) Besiyerinin İçeriği (g L^{-1})…….. 32

Çizelge 3.2 Medium 9 (M9) Besiyerinin İçeriği (g L^{-1})……..... 32

Çizelge 3.3 HPLC cihazı analiz parametreleri……. 44

SİMGELER VE KISALTMALAR

L-DOPA	3,4- dihidroksi fenil alanin
TPL	Tirozin fenol liyaz
HPLC	Yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromotografisi
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
g	Gram
µl	Mikrolitre
rpm	Dakikada dönme hızı
kPa	Kilopascal
mg	Miligram
Vgb	Bakteriyel hemoglobin sentezleyen gen
vHb	*Vitreosilla* hemoglobin
TOH	Tirozin hidroksilaz
DDC	L-DOPA dekarboksilaz
MAO	Monoamin oksidaz
HVA	Homovalinik asit
kDa	Kilodalton
CRP	cAMP reseptor proteini
TDO	Toluen dioksijenaz
TCGDH	cis-toluen dihidrodioldehidrojenaz
PLP	Piridoksal 5'-fosfat
·OH	Hidroksil radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksitin
TDC	Tirozin dekarboksilaz
CSF	Beyin omurilik sıvısı
COMT	Katekol-o-metil transferaz
RI	Refraktif indeks
DNA	Deoksiribonükleik asit
Mb	Miyoglobinin
LB	Luria-Bertani
M9	Minimal ortam
U	Ünite
SA	Spesifik aktivite

1. GİRİŞ

Doğada milyonlarca canlı türü bulunmasına rağmen, bu çeşitlilik içinde canlılar arasında ortak yapı ve karakterler mevcuttur. Mikroorganizmalar insanların sahip olduğu birçok gene sahip olmalarının yanı sıra bizde olmayan bazı genleri de barındırırlar. "Mikroorganizma" terimi bakteri, fungus, alg ve hatta protozoaları da içeren mikro boyutlardaki geniş yelpazede birçok canlıyı tanımlamak için kullanılmaktadır. Bakteriler bunlar arasında ve hatta tüm canlılar arasında yerküre üzerinde en çok sayı, çeşit ve kütlede bulunan mikroorganizmalardır. Yapılan çalışmalar, dünyamızda 10^7–10^9 kadar farklı bakteri türünün olabileceğini göstermektedir. Bu da onların gen çeşitliliğinde önemli bir artış olduğunun göstergesidir. Ancak, kompleks ekolojik komünitelerde bulunan bu bakterilerin sadece yaklaşık % 0.00001 kadarı laboratuar ortamında kültüre alınabilmektedir. Böyle ortamlardaki tüm mikroorganimalardan topluca izole edilen DNA'nın laboratur ortamında çoğalabilen bakterilere klonlanması ile, böyle kompleks komünitelerdeki mikroorganizmaların ne tür genlere sahip oldukları ve onların gen ürünlerinin muhtemel biyoteknolojik potansiyelleri belirlenebilir. Bu amacı güden ve son yıllarda ortaya çıkmış olan araştırma alanı "metagenomik" olarak adlandırılmaktadır. Metagenomik çalışmalarla belki de insanoğlunun henüz keşfedemediği mikrobiyal genler ve ürünler belirlenebilecek ve bunların endüstri, sağlık ve diğer birçok alandaki potansiyelleri ortaya konacaktır. Son yıllarda bilim adamları, çeşitli mikroorganizmal orijinli protein ve metabolitlerin insanlığın geleceğini etkileyecek gelişimler arasında olabileceklerini ileri sürmüşlerdir. Bu gelişmelerin yaşama geçirilmesiyle insan sağlığından tarıma, kimya mühendisliğinden çevre korumaya, gıda üretiminden enerji sektörüne kadar yaşamın her alanında mikro ölçekli organizmalardan makro ölçekde ürünlerin eldesi mümkün olacaktır. Günümüzde bakteri ve fungus biyoteknolojisi ilaçtan yakıta birçok maddenin büyük ölçeklerde üretilmesine imkân tanısa da, bu yönelimin artarak devam edeceği düşünülmektedir. Aslında endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizma kaynaklıdır. Bunun önemli nedenlerinden biri, bu canlıların (özellikle bakterilerin) nispeten ucuz substratlarla da çoğalabilme özelliğine sahip olmalarıdır. Bakteriler tüm canlılar içerisinde en yüksek üreme oranı ve en düşük jenerasyon sürelerine sahip olmaları ve diğer canlılar gibi logaritmik bir çoğalma göstermelerinden dolayı uygun besi ortamlarında büyük kütlelere ulaşabilirler. Yapılan hesaplamalar *Escherichia coli* gibi laboratuarlarda yaygın kullanılan ve uygun besin ortamında çoğaltılan bir bakterinin her 20 dakika da bir bölünebileceğini ve dolayısı ile

24 saate 72 jenerasyon geçirebileceğini göstermiştir. Eğer bakteri bu hızla 24 saat boyunca çoğalabilseydi, tek hücresi yaklaşık 10^{-12} g olan *E. coli* 1 günde yerkürenin toplam kütlesinden daha büyük bir kütleye ulaşacaktı. Ancak, bulundukları ortamdaki besin kısıtlamasından dolayı hiçbir bakteri bu şekilde çoğalmaya devam edemez ve ortam besini tükendiğinde bakteriler de çoğu zaman ortadan kalkarlar.

Genetik mühendislik alanında yakın zamanda geliştirilen teknikler antibiyotik, hormon, aşı gibi yararlı ürünlerin geniş ölçekte üretilmesini mümkün kılmıştır. Çeşitli endüstrilerde yüksek kullanım potansiyeli olan birçok ürün rekombinant teknikler kullanılarak elde edilmektedir. Bakterilerin bu yöndeki kullanım potansiyelleri onlara sadece heterolog bir gen aktarılması ile sınırlı değildir. Bakterilerde doğal olarak işleyen metabolik şemaya ek olarak bazı durumlarda bakteriler genetik olarak kısmen modifiye edilir ve amaca uygun yeni bir üretim şeması elde edilebilir. Özellikle bakterilerin birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar için temel kaynaklar olması ve genetik mühendislik çalışmalarının hızla gelişmesi etkin ilaç üretimi için yeni çözümleri beraberinde getirmiştir.

Oldukça küçük bir anaerobik bakteri grubu hariç, organizmaların birçoğu için oksijen hayati bir önem taşımaktadır. Oksijen, organizmaların enerjilerinin (ATP) büyük kısmını sağladıkları oksidatif fosforilasyon olayının gerçekleşmesin de kullanılmasının yanı sıra birçok enzim tarafından substrat olarak da kullanılmaktadır. Aromatik halkaya sahip zararlı bileşiklerin yıkılmasından, reaktif oksijen türlerine ve hücredeki diğer birçok doğal metabolik reaksiyona kadar birçok enzim oksijeni kullanarak bu bileşiklerin metabolizmasını gerçekleştirmektedir. Birçok mikroorganizma için ortam oksijen dalgalanmaları üreme ve çoğalma için belirleyici rol oynar. Oksijen konsantrasyonu belli sınırlar altına düştüğü zaman, bütün hücrelerin fizyolojik ve metabolik aktivitelerinde önemli değişimler olurken, çoğu zaman hücre büyümesi durmakta ve hücre parçalanması gerçekleşmektedir.

2000'leri geriye bırakmaya başladığımız yıllarda ortalama insan ömrünün artmasına paralel olarak ileri yaşlara özgü hastalıklar olan "nörodejeneratif" olarak adlandırılan hastalıklar grubunda bir artış gözlenmiştir. Nörodejeneratif hastalıklar, yalnız hastalar ve onlara bakmakla yükümlü yakınlarının yaşam kalitesini düşürmekle kalmamakta, aynı zamanda aile ve ülke ekonomisine giderek artan bir yük oluşturmaktadır.

20. yüzyıl başlarında 60 yaş ve üstü nüfus toplam dünya nüfusunun yüzde 4'ünü oluştururken, yeni yüzyılda 65 yaş üstü nüfusun yüzde 17'leri bulacağı tahmin edilmektedir. Dolayısı ile yaşlanma ile ortaya çıkan hastalıkların erken teşhis ve

tedavisinin önemi ortaya çıkmaktadır. İlerleyen yaşla görülen nörodejeneratif hastalıkların en önemlileri demansın yani bunamanın en sık görülen ve özgün bir çeşidi olan "Alzheimer Hastalığı" ve hareketlerde yavaşlama ve ellerde titremeyle giden "Parkinson Hastalığı"dır.

Son yıllarda bu hastalıklar üzerine yapılan çalışmalar sonunda bu tip hastalıkların yaşlılığın bir kaderi olmadığı, erken tanı ve etkin tedaviyle en azından hastalıkların ilerlemesinin durdurulup, temel hedef olan hasta ve yakınlarının yaşam kalitesinin arttırılabileceği ortaya konmuştur. L-DOPA'nın Parkinson Hastalığı'nda temel ilaç olarak kullanılması ve dopaminin kan basıncını ve kardiyak verimini artırmak amacıyla kullanılması bu bileşiklere olan ilgiyi arttırmıştır.

Vitreoscilla hemoglobini (VHb) bakteriyel orijinli bir hemoglobin olup, prokaryotik hemoglobindir. VHb geni (*vgb*) klonlanmış tüm heterolog (yabancı) organizmalarda bu proteinin organizmalar üzerinde pozitif etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu etkinin özellikle belli oksijen seviyesi gerektiren proseslerde daha gözle görülür olduğu belirlenmiştir. VHb'nin organizma üzerindeki ve ürün üretimindeki etkisi en açık şekilde düşük oksijen konsantrasyonlarında görülmektedir.

Endüstriyel açıdan önemli fermentatif ürünler olan L-DOPA ve dopaminin *vgb*/VHb sistemini içeren rekombinant mikroorganizmalar kullanılarak mikrobial üretimi ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ve onu kültürün ileri fazlarında membran transferazlarına aktararak yaşlı hücrelerin daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma karakteristiği sağlayan VHb/*vgb* sisteminin, bu amaç için önemli avantaj sağladığı kanısındayız. *Erwinia herbicola* (NRRL B–3466)'nın ve vgb^- ve vgb^+ taşıyan vektörleri klonlanarak elde edilmiş rekombinantlarının değişik kültür koşulları ve fazlarında L-DOPA ve dopamin üretiminin nasıl olduğu ve VHb'nin buna etkisi belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamındaki başlıca hedefimiz bakterilerin hücre içine ve ortama saldıkları L-DOPA ve dopamin miktarlarının nasıl ve ne seviyede olduklarının belirlenmesidir.

Bu bölümde bakteriyel olarak L-DOPA ve dopamin sentezi, sentezde kullanılan öncül moleküller ve enzimlerin önemleri, L-DOPA ve dopaminin ilaç olarak kullanımı hakkında bilgi verilmiştir.

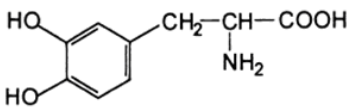
1.1. L-DOPA

L-DOPA (3,4-dihidroksi-L-fenilalanin), 1700 kişiden birinin yakalandığı önemli bir nörodejenaratif hastalık olan Parkinson hastalığının ve miyokardiyumu (kalp kası) izleyen nörojenik yaralanmanın tedavisinde temel ilaç olarak kullanılır (Şekil 1.1). L-DOPA, adrenal medullada ve beyinde *tirozin hidroksilaz*ın (TOH) tirozini hidroksilemesi sonucu oluşmaktadır. Ayrıca L-DOPA nörotransmiter ve hormonlar gibi önemli biyolojik fonksiyonu olan katekolaminlerin (dopamin, norepinefrin ve epinefrin) biyosentezinde önemli bir öncüldür [1, 2].

İlk kez 1911 yılında *Visia faba* (bakla) tohumlarında izole edilen L-DOPA'nın biyolojik olarak inaktif olduğu ileri sürülmüştür. Daha sonra birçok araştırmacı tarafından bu maddenin *Mucana pruriens* tohumlarında doğal olarak sentezlendiği belirlenmiştir [3–5].

1938'de *L-DOPA dekarboksilaz* (DDC) enziminin keşfi ile L-DOPA'ya olan ilgi yeniden artmıştır. Bu enzim, insan ve hayvan vücudunda L-DOPA'nın enzimatik olarak dopamine dönüşümünü katalizlemektedir [6]. 1950'li yıllarda *Arvid Carlsson* Parkinson hastalığına benzer semptomlar gösteren farelerde ilaç olarak L-DOPA'yı kullanmış, bu semptomların azaldığını saptamış ve bu buluşu ile benzer konularda araştırmaları olan *Paul Greengard* ve *Eric Kandel* ile birlikte "sinir sisteminde sinyal iletimi" konusundaki keşif için 2000 Nobel Tıp Ödülü almaya hak kazanmıştır [7]. 1968'de *William Knowless* rodyum ile kiral fosfinler kullanarak asimetrik hidrojenasyonla L-DOPA sentezini gerçekleştirmiştir. Bu çalışma da 2001 yılında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür [8]. Dopaminden farklı olarak, L-DOPA'daki kirallık onun seçici olarak kan-beyin bariyerini geçerek beyne geçmesini mümkün kılmaktadır. Bu yüzden L-DOPA 1961'den itibaren Parkinson hastalarının tedavisinde en etkili ilaç olarak kullanılagelmiştir [9].

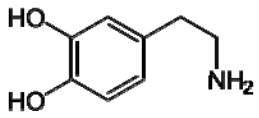
Son yıllarda, dopamin öncülü olmasına ek olarak L-DOPA'nın merkezi sinir sisteminde nöromodulatör veya nörotransmiter olarak da rol aldığı rapor edilmiştir [10, 11].



Şekil 1.1. L-DOPA

1.2. DOPAMİN

Dopamin, memeli merkezi sinir sistemi nörotransmitterleri olan nörepinefrin ve epinefrin hormonlarının öncülüdür [12]. Dopamin, *dopa dekarboksilaz* (DDC; aromatik L-amino asit dekarboksilaz, EC 4.1.1.28) enzimi aracılığı ile L-DOPA'dan sentezlenmektedir. Bu madde akut dolaşım yetersizliği ve hipotansiyon tedavisi için bir kardiyo-stimulant olarak terapötik kullanıma sahiptir [13]. Ayrıca kardiyak verimi ve kan basıncını artırmadaki özelliğinden dolayı nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere çeşitli hastalıklarda terapötik etkisinin olduğu bilinmektedir [14]. Dopamin vücuda enjekte edildiğinde muhtemelen spesifik dopaminerjik reseptörlere bağlanarak renal ve mezenterail vasodilasyon oluşturmaktadır. Dopamin vazokonstriksiyonda rol oynadığı gibi β_1-adrenerjik reseptörler üzerinde etki göstererek kalp üzerinde pozitif bir inotropi oluşturmaktadır. Bu yönü ile dopaminin travmatik ve kardiyojenik şok tedavisinde uygulaması bulunmaktadır [15].



Şekil 1.2. Dopamin.

Nörotransmitterler, beyinde iki nöron arasında veya nöron ile hücre arasında elektriksel sinyallerin iletimi sağlayan kimyasallardır. Sinyal iletiminde görev yapan önemli bir nörotransmitter olan dopamin, beyinde nöron hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Dopamin, nöronla diğer hücrenin oluşturduğu sinaps bölgesinde presinaptik nöron içerisinde sentezlendikten sonra veziküllerde birikmektedir. İyon aksiyon mekanizması ile bu veziküller sinaptik aralığa doğru ilerlemekte ve vezikül ile presinaptik membran birleşince dopamin vezikül içinden sinaptik boşluğa salınmaktadır. Yani, sinaptik boşlukta dopamin postsinaptik membranda (hedef hücre membranında) bulunan dopamin reseptörlerine bağlanarak ve bu hücreye spesifik sinyali iletmektedir. Dopaminin bir kısım sinaptik aralıkta *katekol-o-metil transferaz* (COMT) tarafından homovalinik asite (HVA) yıkılabilir diğer kısımı ise geri alım mekanizması ile presinaptik nörona tekrar alınıp burada bir vezikül içinde stoklanmaktadır. Ayrıca, geriye alınan bu dopaminin bir kısmı *monoamin oksidaz* (MAO) enzimi tarafından yine homovalinik asite (HVA) yıkılmaktadır [15, 16].

Dopaminin diğer bir özelliği hipotalamus tarafından salınan bir nörohormon olmasıdır. Dopaminin hormon olarak görevi hipofizin ön lobu tarafından salınan ve *prolaktin* adı verilen süt üretici hormonun salınımını inhibe etmesidir. Prolaktin fazla

salınınca *adenom* denilen kitleler oluşmakta ve bu adenomların çevresindeki dokulara zarar verdiği bilinmektedir [15, 16].

1.3. L-DOPA ve Dopaminin Bakteriyel Sentezi

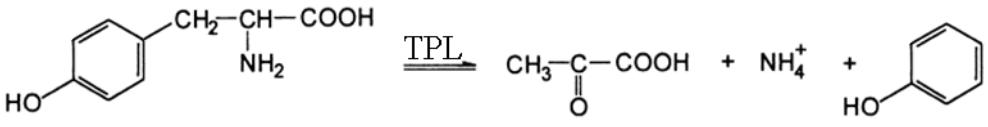
Terapötik açıdan oldukça önemli olan L-DOPA ve dopaminin bakteriyel sentezi iki aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşamada tirozin, katekol gibi substratlardan L-DOPA sentezlenirken, ikinci aşamada ise L-DOPA'dan dopamin sentezlenmektedir.

Birinci basamağında çeşitli substratlardan L-DOPA oluşumunu katalizleyen *tirozin fenol liyaz* (TPL, EC 4.1.99.2) ve ikinci basamağı olan L-DOPA'dan dopamin oluşumunu katalizleyen *dopa dekarboksilaz* (DDC, EC 4.1.1.28) enzimleri farklı bakterilerde çalışıldığı rapor edilmiştir. 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 ardı ardına tepkimeleri gerçekleştirdiklerinde üretkenliğin aşamalar ayrı yapıldığındaki üretkenlikten daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir [17, 18].

L-DOPA ve dopaminin diğer bir oluşum mekanizması ise pentoz fosfat yolunun tirozin amino asiti ile başlayan metabolik sürecinde görülmektedir. *Tirozin hidroksilaz* (TH) enzimi tirozinin aromatik halkasına hidroksil grubu (OH) ekleyerek katekolaminin ilk basamağı olan L-DOPA sentezini başlatmakta ve L-DOPA aromatik *L-amino asit dekarboksilaz* enziminin dekarboksilasyonu ile dopamine dönüşmektedir [19] .

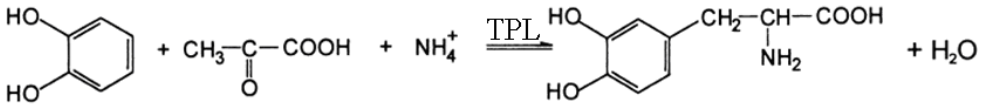
1.3.1. L-DOPA Sentezi

Bakteriyel bir enzim olan *tirozin fenol liyaz* (TPL, EC 4.1.99.2) aracılığı ile L-tirozin L-DOPA'ya dönüştürülür. TPL enzimi normalde L-tirozinden fenol, amonyak ve pirüvat oluşumunu katalizlemektedir (Şekil 1.3).



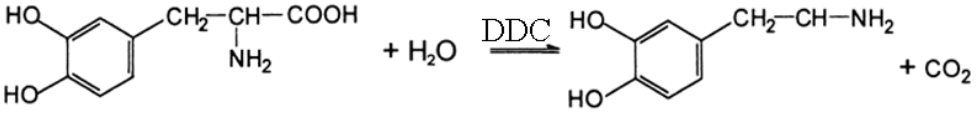
Şekil 1.3. L-tirozinin TPL enzimi ile pirüvat, amonyak ve fenole dönüştürülmesi.

Ortama katekol ilavesi yapıldığında fenol ile katekol yer değiştirerek TPL enzimi aracılığı ile katekol, amonyak ve pirüvattan L-DOPA oluşumunu sağlamaktadır (Şekil 1.4).



Şekil 1. 4. Yukarıdaki reaksiyonda fenol yerine katekol ilavesi ile yine TPL enzimi ile L-DOPA'nın yapımı.

Dopamin ise tek bir enzimatik basmakta (L-DOPA dekarboksilaz enzimi yardımı ile) L-DOPA'dan yapılır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. L-DOPA'dan dopamini oluşumu

1.3.1.1. Tirozin Fenol Liyaz Enzimi

L-DOPA titreme, sertlik, konuşma yavaşlığı ve sonunda akıl hastalığına neden olan dejeneratif bir beyin hastalığı olarak da bilinen Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır [20]. Her yıl yaklaşık 250 ton L-DOPA elde edildiği ve bunun yaklaşık olarak yarısının *tirozin fenol liyazın* katalizlediği enzimatik metotla oluşturulduğu bildirilmektedir [21].

β-tirozinaz olarak bilinen ve tirozin ile indüklenen *tirozin fenol liyaz* (TPL, EC 4.1.99.2) enzimi geri dönüşümlü olarak α,β-yıkım, β-değişim ve rasemik gibi multi fonksiyonel reaksiyonları katalizleyen bir enzimdir [22, 23]. L-aminoasitler ile α,β-eliminasyon, β-değişim fonksiyonu ile girdiği reaksiyonda amino asitlerin β-karbonların bağlı bulunduğu –OH, -SH, fenol gibi fonksiyonel grubların sabit kalmasını sağlamaktadır [20, 24]. Ayrıca TPL enzimi aromatik bir amino asit olan tirozini α,β-eliminasyonu ile pirüvat, amonyak ve fenol oluşturmak için katalizlemektedir. Bunu gerçekleştirebilmek için piridoksal fosfata ihtiyaç duymaktadır. Böylece bakterilere karbon ve nitrojen kaynağı olarak L-tirozinden faydalanma olanağı sağlamaktadır. Bu reaksiyon geri dönüşümlüdür ve katekol fenol ile yer değiştirdiği zaman L-DOPA üretilmektedir [25–27].

Mikroorganizmalar arasında L-tirozini fenol, pirüvat ve amonyağa dönüştüren ve TPL tarafından katalizlenen reaksiyon *Enterobacteriaceae* familyasına ait bir özelliktir [28]. Bununla birlikte, *Symbiobacterium* türlerinde de bu çeşit bir reaksiyona

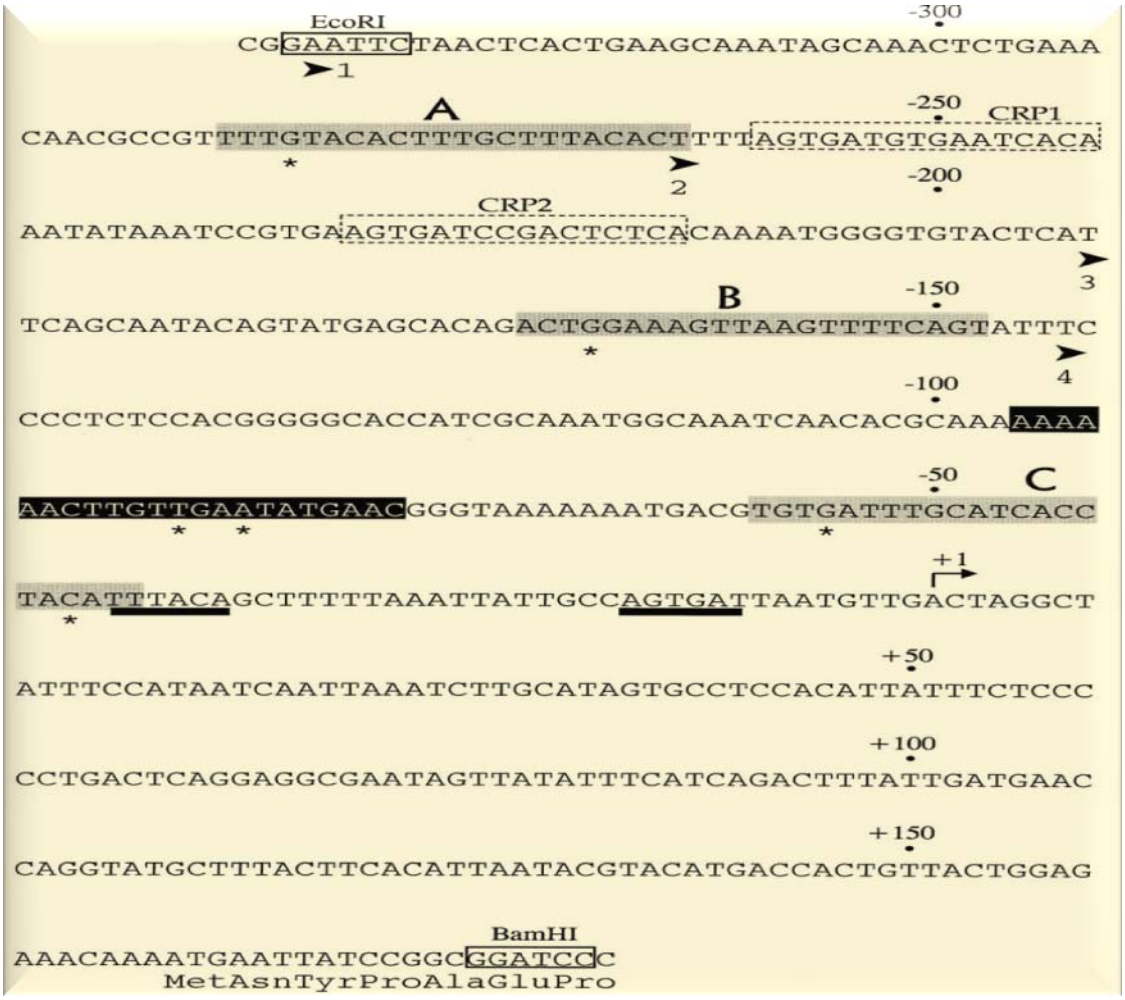
rastlanıldığı belirtilmiştir. *Symbiobacterium* sp. SC–1 bakterisinden izole edilen TPL enziminin yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösteren katekolün varlığında kararlı kaldığı belirlenmiştir. Bu nedenle bu enzimin katekol, pirüvat ve amonyaktan L-DOPA oluşumu için avantaj sağlayacağı bildirilmiştir [29–31].

TPL enzimi L-tirozin ile indüklenirken, katobolit baskılanmaya maruz kalmış hücrelerde inhibe olmaktadır [32]. TPL, *aminotransferaz* ailesine ait PLP-bağımlı bir enzim (B6 enzimi) olup L-tirozinin β-eliminasyon reaksiyonunu katalizlemektedir. Monovalent katyonların (NH_4^+, K^+, Rb^+, Cs^+) olmadığı ortamlarda enzim aktivitesi görülmezken, Na^+ enzimi inhibe etmektedir. Birçok PLP-bağımlı enzim normal reaksiyonun yanında yan grup transaminasyon reaksiyonları da gerçekleştirmektedirler. Yani, bu enzimler bir substrattaki amino grubunu ko-enzime bağlayarak piroksidamin fosfat ve bir keto asit oluşumunu sağlamaktadırlar [33]. TPL enzimi, dört aynı alt üniteden yapılmış olup (homotetramer), 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) bağlı bulunmaktadır. Diğer PLP bağımlı enzimlerin tersine TPL aktivitesi pH 6.0 ve 9.0 arasında önemli bir değişiklik göstermemektedir [34].

1.3.1.1.1. Tirozin Fenol Liyaz Enziminin Geni (*Tpl*)

TPL enziminin sentezinin düzenlenmesi çeşitli biyokimyasal ve genetik çalışmalarda araştırılmıştır. Bu enzim sentezi L-tirozin ile indüklenirken katobolit baskılanmaya maruz kalmış hücrelerde inhibe olmaktadır [32]. *Erwinia herbicola* ile yapılan çalışmalarda tpl promotorunun hem cAMP reseptor proteini (CRP) hemde TyrR proteini tarafından düzenlendiği kanıtlanmıştır [35]. Özellikle *E. coli*'de TyrR'nın aromatik amino asitlerin biyosentezinde ve taşınmasında rol alan proteinlerin genlerini düzenlendiği bilinmektedir [36-38]. *E. coli'*de tpl'-'lac promotor modelinde bu yapısal geninin akış-yukarı (upstream) bölgesinde (Şekil 1.6) TyrR bağlanma bölgesi üç kısımdan oluşmaktadır. Konsensus dizisi $TGTAAAN_6TTTACA$ olup TyrR kutusu olarak adlandırılmaktadır [37]. Tpl geninin transkripsiyonun başlama bölgesine olan uzaklıkları A, B ve C kutuları olup bu uzaklık sırasıyla -313.5, -200.5 ve -85.5 olduğu saptanmıştır. CRP'nin konsensus dizisi AAATGTGATCT/AGATCACATTT olup *TyrR* A ve B kutuları arasında yer almaktadır [38, 39]. *Tpl* promotorunun aktivasyonunda konakçı entegrasyon faktörü (IHF) ile cAMP reseptor proteini (CRP) rol almaktadır. *Tpl* promotoru upstream bölgesinin DNA'ya bağlanan kısmında bu iki protein TyrR

dimerinin oligomerizasyonunu sağlamaktadır. Yüksek miktarlarda TyrR proteini σ^{70} RNA polimerazın *Tpl* promotoruna bağlanmasını kolaylaştırmakta ve böylece bu genin (*tpl*) transkripsiyonunu artırmaktadır [39].



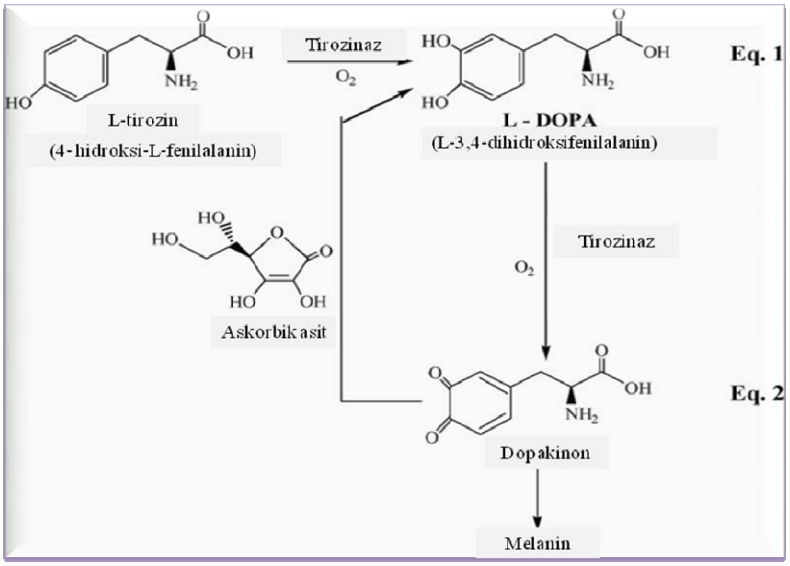
Şekil 1.6. *tpl* promotor regulatör elementler

1.3.1.2. Tirozinaz Enzimi

Tirozinaz (monofenol monooksijenaz, EC 1.14.18.1) hem tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonunu hem de L-DOPA'nın dopakinona oksidasyonunu katalizleyen ve L-DOPA biyosentezinde anahtar bir rol oynayan biyofonksiyonel bir enzimdir [40]. Aynı zamanda tirozinaz melanin ve diğer polifenolik bileşiklerin biyosentezinden sorumlu olan bakır içerikli bir metalloproteindir. Tirozinazın iki enzimatik aktivitesi bulunmaktadır. İlki monofenollerden *o*-difenol hidroksilasyonu, ikincisi *difenolaz* aktivitesiyle *o*-difenolden *o*-quinon oksidasyonudur. Ayrıca *katalaz* oksidasyonu ile

quinondan hem *o*-difenolden hem de *p*-difenol oluşur [41–43]. Çok reaktif molekül olan dopakinon enzimatik olmayan polimerilasyonu ile melanine dönüşmektedir (Şekil 1.7). Dopakinondan L-DOPA'ya dönüşümü ise askorbik asit gibi reduktant maddeleri kullanarak gerçekleşmektedir [43].

Araştırmalar tirozinazın fungus, bakteri, bitki, böcek ve memeli hücrelerinde bulunduğunu göstermiştir. Melanin üretebilen bakteriler *Aeromonas, Azotobacter, Mycobacterium, Micrococcus, Bacillus, Legionella, Streptomyces, Vibrio, Rhizobium, Proteus, Azospirillum and Shewanella* olduğu belirlenmiştir [44, 45]. Tirozinaz enzimi mikrobiyal olarak (*Aspergillus, Rhizopus, Neurospora* vb.) ve *Agaricus* ve *Vicia* vb. gibi bitkiden yüksek oranda saflaştırıldığı saptanmıştır. Başarılı bir üretim için kültür koşullarının optimize edilmesi gerekir ve bu optimizasyon kullanılan organizmanın türüne göre sistemden sisteme farklılık göstermektedir [46]. Bununla birlikte mikroorganizmalarda tirozinaz aktivitesi genellikle çok zayıf olup L-tirozin ile L-DOPA hızlı bir şekilde diğer metabolitlere ayrışmaktadır. Sonuç olarak L-DOPA'nın saf olarak elde edilmesi oldukça zordur [47, 48].



Şekil 1.7. Tirozinazın L-DOPA sentez şeması

Tirozinazların memeliler ve bitkilerde de yaygın bir şekilde bulunduğu saptanmıştır. Bitki tirozinazları bazı meyve ve sebzelerde istenmeyen kararma reaksiyonlarından sorumlu enzimlerdir [49]. Memeli tirozinazları ise spesifik olarak deri, saç ve gözlerde yerleşen yüksek derecede özelleşmiş hücrelerde ve pigment üreten melanositlerde bulunmaktadır. Böylece ultraviyole radyasyon yaralanmasına karşı koruyucu bir etkiye sahip olan melaninin oluşmasında da yer alan anahtar enzimlerdir [50, 51].

1.3.1.3. Tirozin

Aromatik bir molekül olan tirozin çeşitli endüstriyel ve farmokimyasal uygulamalarda önemli bir öncül olarak kullanılmakdır. Alternatif olarak TPL enzimi L-tirozinden fenol, amonyak ve pirüvat oluşumunu da katalizlemektedir [52].

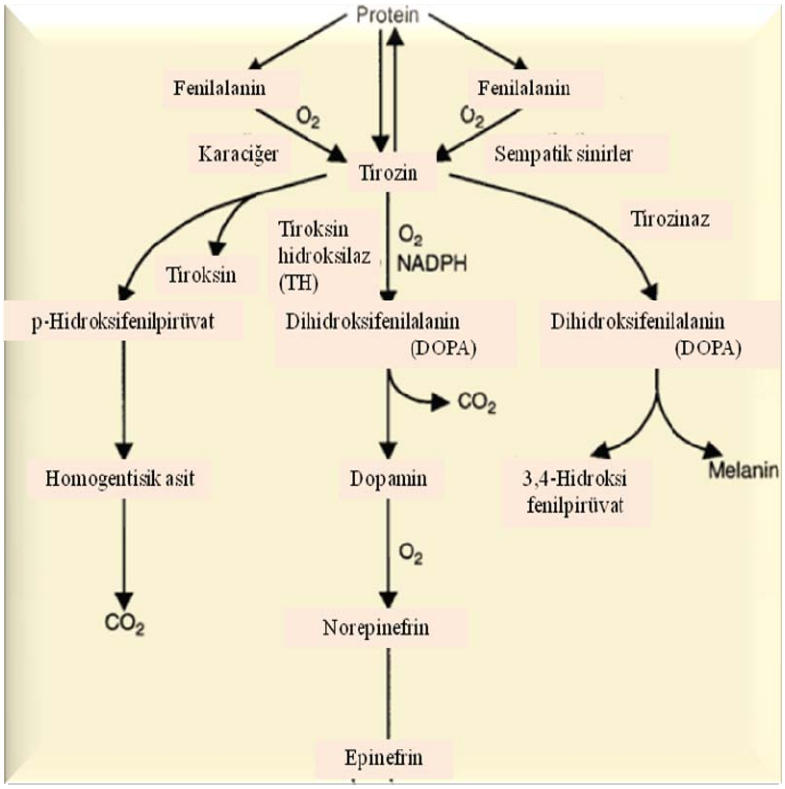
Ayrıca tirozin son yıllarda Parkinson hastalığının tedavisinde en etkili semptomik ilaç olarak kullanılan L-DOPA veya levodopa gibi önemli birçok bileşiğin sentezini başlatan önemli bir öncül amino asit olduğu bilmektedir. Yine çeşitli endüstriyel bileşenlerde de öncülük etmektedir [53–55].

Tirozinin vücutta fenilalaninden sentez edildiği ve bu nedenle esansiyel bir amino asit olmadığı savunulmaktadır [56]. Vücut fenilalanini önemli oranda (2/3) tirozine dönüştürmesine rağmen tirozini fenilalanine dönüştürememektedir. Esansiyel olmayan bir amino asit olarak sınıflandırılmasına karşın tirozinin şartlı olarak esansiyel bir amino asite dönüştüğüne dair bulgular da bulunmaktadır. İnsanlarda esansiyel olmayan amino asitlerin çoğu glukoz ve amonyaktan sentezlenmektedir. Dolayısıyla tirozinin oluşması için de fenilalanine gereksinim vardır. Bu yüzden L-tirozin bilinen 22 adet standart amino asitten biri olup, sentezindeki kompleks reaksiyon serilerinden dolayı esansiyel bir amino asit olarak adlandırılır. Fenilalaninden tirozin dönüşümü tersinir olmayan bir şekilde katalizleyen *fenilalanin hidroksilaz* enzimi aktivitesindeki bir düşüş veya enzimdeki fonksiyon kaybı hücrede fenilalanin birikimine sebep olmaktadır. Bu durum en iyi bilinen amino asit metabolizma bozukluklarından biri olan ve kendini mental bozuklukla gösteren *fenilketonürea*'ya sebep olmaktadır [17, 57–59].

Tirozin, merkezi ve periferal sinir sistemi ile adrenal medulla da dopamin, L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), nörepinefrin ve epinefrin; tiroid bezi tarafından tiroksin ve triiyodotironin gibi katekolaminlerin, hormonların ve nörotransmitterlerin üretimi için gerekli temel bir bileşiktir.

Katekolamin sentezinde oran belirleyici basamak L-tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonudur. Şekil 1.8'de gösterildiği gibi bu basamak *tirozin hidroksilaz* (TOH) enzimi tarafından katalizlenmektedir. Ancak, bu reaksiyon basamağındaki inhibisyon daha çok epinefrin ve norepinefrin hormonlarının seviyesini düşürürken dopamin seviyelerini önemli oranda etkilememesi dopaminin sentezinde alternatif mekanizmaların rol oynadığını düşündürmüştür. Muhtemel alternatif bir mekanizma *tirozinaz* enzimi ile katalizlenen tirozinden dopakinon yapılmasıdır. Melanin oluşumu ile sonlanan bir seri reaksiyonun ilk safhasında dopakinon'dan L-DOPA üretilmektedir. L-DOPA *tirozinaz* enzimi için alternatif bir substrat olduğundan bu reaksiyon daha ileri

gitmektedir. *Tirozin hidroksilaz* (TH) enzimi eksikliğindeki durumun tersine, *tirozinaz* enzimi eksikliği öldürücü değildir daha çok kendini albinizmle belli etmektedir [60].



Şekil 1.8. Tirozin metabolizması

1.3.1.4. Katekoller

Katekol (1,2-dihidroksibenzen) eczacılık, kürk boyama, lastik ve plastik üretimi gibi birçok uygulama alanlarına sahiptir. Katekoller mikroorganizmalar tarafından aromatik maddelerin ve lignin parçalanmasının ara ürünleridir [61].

İnsan ve birçok hayvanda katekoller daha çok hormon (steroid) metabolizmasının metabolitleri olmalarının yanında adrenalin, nöradrenalin, dopamin ve L-DOPA gibi endojen bileşiklerin metabolitleri olarak da bulunabilirler [62].

Katekolaminler diğer biyojenik aminler gibi omurgalıların sinir sistemindeki rolüne ek olarak gram-negatif bakterilerin büyümesini 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 belirlenmiştir [63–65].

Son zamanlarda özellikle *Erwinia herbicola, Citrobacter freundii* bakterileri ticari olarak L-DOPA üretiminde *tirozin fenol liyaz* (TPL) enzimini kullanırlar. Bu reaksiyon geri dönüşümlüdür. Katekol TPL katalizinde başlama materyali olarak kullanılmakla birlikte çok iyi bir otooksidattır. Katekol sentezi arada kesilirse antioksidan etki göstermektedir. Bu yüzden katekol büyük bir engel oluşturken yüksek konsantrasyonda mikroorganizmalarda toksik etki göstermektedir.

TPL ve katekol üreten enzimler alternatif olarak birleşebilirler. Katekol üretimi bittiğinde mikroorganizmalardaki toksisite azalmakta ve otooksidasyonları en aza inmektedir. Katekolün biyolojik üretimi *toluen dioksijenaz* (TDO) ve *cis-toluen dihidrodioldehidrojenaz* (TCGDH) ile iki adımlı reaksiyondan oluşmaktadır [68]. TDO/TCGDH L-DOPA sentezinde TPL ile başarılı bir şekilde birleşirse hem L-DOPA sentez sürecinde ekonomiklik kazandırmakta hem de büyük endüstrinin toksik atıklarından biri olan benzenin tekrar kullanılmasında etkili bir yol oluşturmaktadır [66].

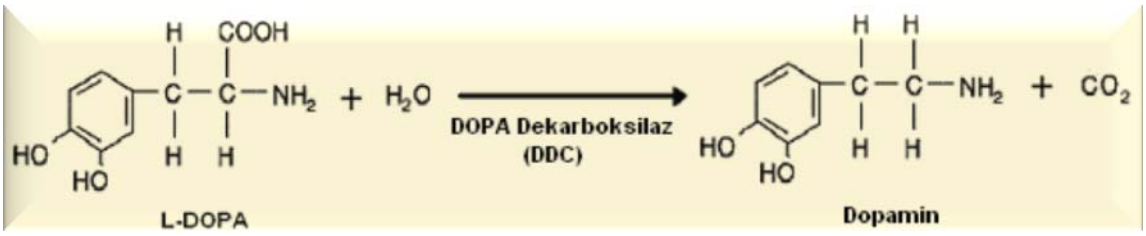
Oksidize katekoller proteinlerin sülfidril grupları ile reaksiyona girmektedirler. Böylece katekol ya doğrudan sülfidril gruplarına bağlanarak proteinleri inaktive etmekte ya da protein radikallerinin (karbon merkezli radikaller) oluşmasına neden olmaktadır. Bu protein radikalleri yeni çapraz bağlara ve dimer oluşmasına yol açarak proteinlerin ve peptidlerin yığılması ve dolayısı ile inaktivasyonuna neden olmaktadır. Glutatyon hücrelerde önemli bir redükleyici (indirgeyici) ajan olduğu için iki glutatyon

molekülünün bu şekilde birbirine bağlanması bu ajan tarafından sağlanan hücrenin redoks statüsünü değiştirmekte ve böylece oksidatif stres oluşmaktadır [67].

Katekollerin membranlar üzerindeki zararlı etkisi onların reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ya da lipid molekülleri ile reaksiyonları sonucu değil, membran potansiyelinde sebep oldukları değişiklikten dolayıdır. Katekollerin kimyasal reaksiyonu ve kimyasal özelliği DNA, protein ve membran gibi biyomoleküllerde onarılamayan zararlar oluşturmaktadır. Proteinlerle reaksiyona girdiğinde enzimlerin ve proteinlerin inaktivasyonuna sebep olduğu belirlenmiştir. Membranla katekollerin etkileşimi sonucu lipid peroksidasyonu oluşmaktadır. Ayrıca katekol ile farklı biyomoleküllerin etkileşimi serbest oksijen radikalerinin oluşumuna sebep olmaktadır [68]. Örneğin, dopamin *monoamin oksidaz* (MAO) enzimi tarafından homovalinik asite (HVA) yıkılmaktadır. Dopaminin bu metabolizması ve otooksidasyonu ile hidroksil radikali ($^{\cdot}OH$) oluşmaktadır. Ayrıca ferro demir (Fe^{+2}) ve ferri demir (Fe^{+3}) serbest kalarak hidrojen peroksitin (H_2O_2) miktarının artmasına sebep olup fenton reaksiyonun oluşumu gözlenmektedir [69].

1.3.2. Dopaminin Sentezi

L-DOPA'dan dopamin oluşumu *L-DOPA dekarboksilaz* (DDC; aromatik L-amino asit dekarboksilaz, EC 4.1.1.28) enzimi tarafından katalizlenmektedir. Dopaminin bakteriyel sentezinde birinci aşamada sentez edilen L-DOPA ikinci aşamada substrat olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. L-DOPA'dan Dopamin Sentezi

Sentez sırasında açığa çıkan CO_2 ortam pH'sının düşmesine yol açmaktadır. Bundan dolayı dopamin verimde bir azalma olmaması için reaksiyon ortamının sürekli kontrol altında olması gerekmektedir [70].

1.3.2.1. Dopa Dekarboksilaz Enzimi

L-DOPA dekarboksilaz (DDC, EC 4.1.1.28) nöral dokularda dopamin biyosentezinde önemli bir rol oynayan piridoksal 5'-fosfat (PLP) bağımlı bir enzimdir. Enzim karaciğer ve böbrekler gibi periferal organlarda bulunmaktadır [71, 72]. Memelilerdeki çoğu DDC enzimi L-DOPA, tirozin, fenilalanin ve triptofan gibi aromatik amino asitlere geniş bir substrat özgüllüğü göstermektedir. *Micrococcus* [73, 74], *Bacillus* [75], *Pseudomonas* [76] ve *Streptococcus* [77] gibi çeşitli mikrobiyal türlerde L-DOPA'nın dekarboksilasyonu mevcuttur.

Bakteriyal dekarboksilazlar arasında *Streptococcus faecalis tirozin dekarboksilaz* (TDC, EC 4.1.1.25) enzimi, L-DOPA üzerindeki daha büyük dekarboksilaz aktivitesi olduğundan dopamin sentezinde rol alan geri dönüşümsüz oldukça önemli olduğu bilinen bir enzimdir [78]. *S. faecalis* TDC'si tirozin ve L-DOPA'ya tam bir substrat özgüllüğü göstermektedir ve bu yüzden dopamin sentezi için bu enzim tercih edilmektedir.

1.3.3. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı, İngiliz Doktor *James Parkinson* tarafından ilk kez 1817 yılında tanımlanmış olan beyin ile ilişkili bir hastalıktır. Parkinson hastalığı beyinin *substantia nigra* denilen kısmındaki sinir hücrelerinin ölmesi veya hasar görmesi ile ortaya çıkar [79]. Bu hücrelerin yaklaşık olarak %80'i hasar görürse bu hastalığın semptomlarının ortaya çıktığı belirlenmiştir [80]. Normalde bu hücrelerin rolü vücut kaslarının ve hareketinin düzgün ve koordineli bir şekilde fonksiyon göstermesini sağlayan dopamini üretmektir. Parkinson hastalarının beyin omurilik sıvısında (CSF) tirozin seviyesinde azalışın olması dopamin seviyesinde azalışa sebep olmaktadır. Ayrıca sentezlenen dopaminin bir kısmının *katekol-o-metil transferaz* (COMT) tarafından homovalinik asite (HVA) dönüşmesi bu maddenin miktarı artırırken dopamin miktarında azalışa neden olmaktadır [81].

Hastalığın semptomları titreme, kaslarda oluşan sertlik, hareketlerdeki yavaşlama ve denge bozukluğudur. Diğer semptomlar ise 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 [80].

Parkinson hastalığında titreme, özellikle elleri ve ayakları, bazen dudakları, dili, çeneyi, seyrek olarak da gövdeyi etkilemektedir. El veya ayakta dinlenme halinde ortaya çıkan titreme bir hareket sırasında kaybolmaktadır. Örneğin uzanıp bir cismi tutma hareketi sırasında eldeki titreme kaybolurken dinlenme haline geçince tekrar ortaya çıkmaktadır. Dinlenme sırasında ortaya çıkma özelliği diğer hastalıklarda görülebilen çeşitli titremelerden ayırt edilmesine yardımcı olmaktadır.

L-DOPA'nın kan beyin bariyerine ulaşmadan kanda ve diğer dokularda dopamine dekarboksilasyonu bu maddenin terapötik etki derecesini önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu nedenle L-DOPA uygulamasının onun dopamine dekarboksilasyonunu önleyecek inhibitörlerle (*cardidopa* ve *benserazide* gibi DDC enzimi inhibitörleri) birlikte yapılmasını gerekmektedir. Dopamin kan-beyin bariyerini geçemediğinden Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılmaz. Bu nedenle, dopamin öncülü olan L-DOPA kullanılarak bu bariyer aşılır ve nöronlara alınan L-DOPA burada DDC enziminin katalizlediği bir reaksiyonla Parkinson hastalığının esas terapötiği olan dopamine dönüştürülmektedir. Bunun yanısıra, dopaminin direkt olarak kullanım alanları da bulunmaktadır. Örneğin, kardiyak verimi ve kan basıncını artırmak için şok halindeki hastalarda bu madde inotropik ilaç olarak verilmektedir [82].

Oksidatif stres Parkinson hastalığının temelini oluşturan nörodejeneratif süreçte büyük bir rol oynamaktadır [83]. Çeşitli deneysel çalışmalar L-DOPA'nın serbest radikal oluşumu ile nöronal hasara çelişkili olarak katkıda bulunabileceğini göstermektedir [84, 85]. Hem tedavi görmeyen Parkinson hastaları hem de sağlıklı insanlar ile karşılaştırıldığında L-DOPA ile tedavi gören bu hastalarının kan hücrelerinde hidroksil radikallerinin ($^{\cdot}OH$) oluşumunun arttığı rapor edilmiştir [86].

1.3.4. Mikroorganizma hemoglobinleri

Bakteriyal globinler hemoglobinler (Hbs), Flavohemoglobinler (FlavoHbs), ve Trunkat hemoglobinler (TrHbs) olarak üç sınıfa ayrılmaktadır [87, 88]. Bakteriyal hemoglobine *Vitreosilla* VHb, *Campylobacter jejuni* CHb ve *Clostridium perfringens* CpHb örnek olarak verilebilir [87, 89, 90].

İlk grub flavohemoglobinler kimerik yapıya sahip olup, bir globin domeyni ile aynı zamanda bir FAD-bağımlı oksido-redükto domeynini'ne sahiptirler. Ayrıca FAD-bağımlı *oksido-redüktaz* enzimi yapısal olarak ferrodoksin $NADP^{+}$ *reduktaza* benzemektedir [91]. Flavohemoglobinler bitki Hb'lerine benzeyen diziye de sahiptirler. İkinci grup olan trunkat hemoglobinler ise "kırpılmış tip zincir" hemoglobinler olup

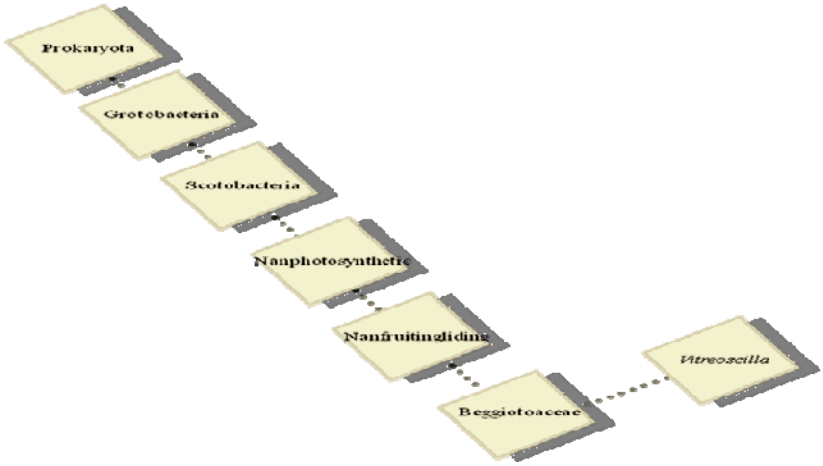
normallerden 20-40 amino asit daha kısadırlar ve oldukça yüksek oksijen affinitesine sahiptirler. Üçüncü grup ise bu proteinlerin bakteriyel orijinli olanları olup en iyi bilineni *Vitreoscilla* hemoglobinidir. Bakteriler genel olarak iki tip hemoglobine sahiptir. İlk bakteriyal tipi Hb'i buradaki çalışmada da ele alınan *Vitreoscilla* Hb'dir (VHb). Spektral karakteristiklerinin ve aminoasit dizisinin ökaryotik hemoglobinine % 25'e varan benzerliğinden dolayı, hemoglobin olarak adlandırılmıştır [92].

Hem grubunun etrafındaki grupların özel dizilimi bu proteinlerin yüksek oksijen affinitelerine katkıda bulunur. FlavoHb'ler ise daha yaygın bulunurlar. VHb'nin tersine FlavoHb'ler bir amino terminal globin domeyni ve FAD^- ve $NADP^+$ bağlanma bölgelerine sahip bir karboksil flavodomeynine sahiptirler. VHb'nin fonksiyonu her ne kadar hala tam olarak bilinmiyorsa da, bu hemoglobinin oksijen taşıma ve depolamada (tamponlamada) rol oynadığı sanılmaktadır. Flavin domeyninde oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarından dolayı FlavoHb'lerin böyle bir fonksiyonunun olmadığı sanılmaktadır. FlavoHb'lerin daha çok *NO deoksigenazlar* olarak davrandıkları ileri sürülmüştür [93].

Son zamanlarda VHb ve diğer bakteriyal Hbs ve FlavoHbs hem bakterilerde hemde tütün de nitrosatif stresine ve NO (nitrik oksit) radikaline karşı koruduğu gözlemlenmiştir [94, 95].

1.4. Bakteriyel (*Vitreoscilla*) Hemoglobin (VHb)

1986 yılında kadar hemoglobinler ökaryotik orijinli proteinler olarak bilinmiştir. Fakat Dr. Webster ve arkadaşları gram-negatif bir bakteri olan *Vitreoscilla stercoraria'nın* doğal olarak hemoglobin (VHb) içerdiğini saptamışlardır [96]. *Vitreoscilla* mor bakterilerin beta-alt grubunda *Beggiatoaceae* familyasında bulunmaktadır [97]. *Vitreoscilla* zorunlu bir aerob gram negatif, kemoorganotrof flamentöz bir bakteridir. Zorunlu aerob olmasına rağmen doğal yaşam alanı oksijeni düşük ortamlardır [98].

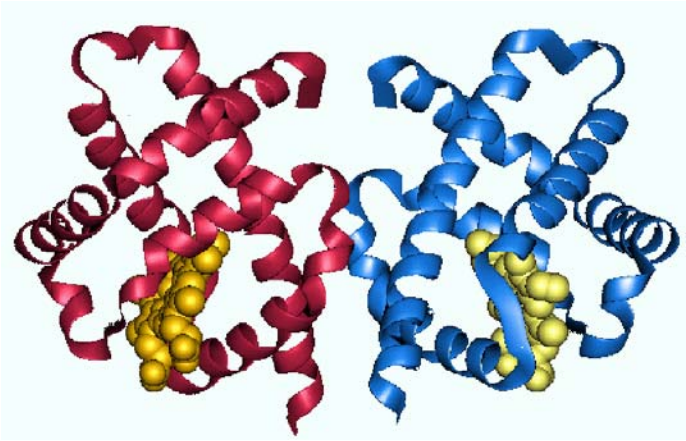


Şekil 1.10. Bakteriyel hemoglobin geni taşıyan yegane bakteri *Vitreoscilla*'nın taksonomik konumu [99].

Vitreoscilla stercoraria bakterisi düşük oksijen şartlarına dayanabilmek için sitoplazmasında eriyebilen hemoglobin sentezi yolunu seçmiştir. Son yıllarda bu hemoglobinin üzerindeki çalışmalar onun çeşitli endüstriyel organizmalarda enerji metabolizmasında uygun bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Bakteriyel hemoglobin, hemoglobine benzeyen proteinlerin büyük ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin en iyi karakterize olan üyesi hemoglobin ve daha çok hayvanlarda miyoglobindir. Ama son zamanlarda hemoglobine benzeyen oksijen transformu yapan bu hemoproteinlerin protozoa, bitki, fungus ve bakterilerde de bulunduğu belirlenmiştir [100–103]. Hemoglobin ile miyoglobinin (Mb) 3 boyutlu yapısı (3D) ve benzer amino asit sırası onların aynı atada evrimleştiğini göstermektedir [104–108]. Diğer hemoglobinlerle kıyaslandığında örneğin kök hemoglobiniyle %24, *B. subtilis* flavo hemoglobiniyle %56 gibi önemli bir benzerlik göstermektedir [96, 109].

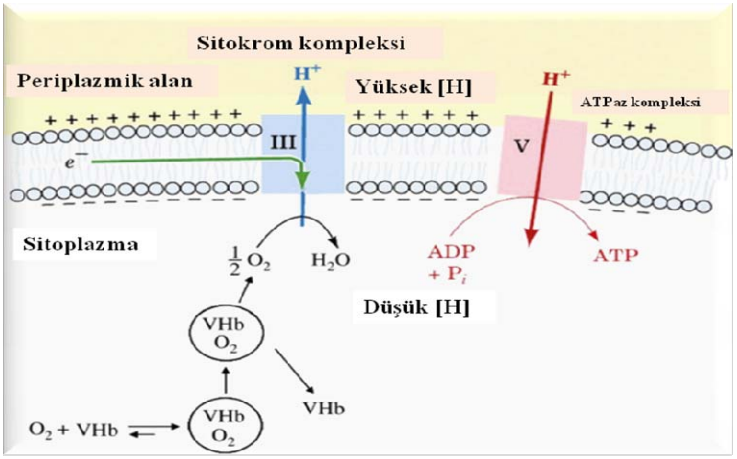
VHb'nin yapısı klasik globin katlanmasına uymakta ve ökaryotik hemoglobinleri ile yüksek bir homoloji göstermekte olup klasik 8-helikse (A-H) sahiptir ve globin katlanması göstermektedir (Şekil 1.11). VHb proteini iki benzer alt üniteden oluşan bir hem proteinidir ortalama molekül ağırlığı 15,775 olan her bir alt ünite protohem IX ve 146 aminoasitten meydana gelen dimerik yapıdan olumaktadır [96].



Şekil 1.11. VHb'nin 3-boyutlu yapısı. Homodimerik yapıda "hem" grubunun lokalize olduğu yer sarı renk ile gösterilmiştir (Protein Data Bank).

Rekombinant *E. coli*'de hem *vitreocilla* hemoglobin hem de proteini sitoplazmik olarak yerleştiği tespit edilmiştir [110]. Ekstrasellüler oksijenin düşük olduğu durumlarda bu proteinin sentezinin arttığı ve bağlandığı oksijenin ökaryotik hücrelerde olduğu gibi serbest bıraktığı rapor edilmiştir [111, 112].

Oksijen kaynağı olarak rol alan *vitreosilla* hemoglobinin, mikroaerobik koşullar altında çözünmüş oksijen konsantrasyonunda intrasellüler etkisi artmakta ve çözünmüş-oksijendeki artış hem sitokrom *o* hem de sitokrom *d* aktivitesini arttırmaktadır. Öte yandan sitokrom *o* spesifik aktivitesi sitokrom *d*'den daha hızlı bir şekilde arttırarak proton pompasında artışa sebep olmaktadır (Şekil 1.12). Böylece sitoplazmadaki ATPaz yoluyla bu proton gradiyenti sayesinde ATP üretilmektedir [113].



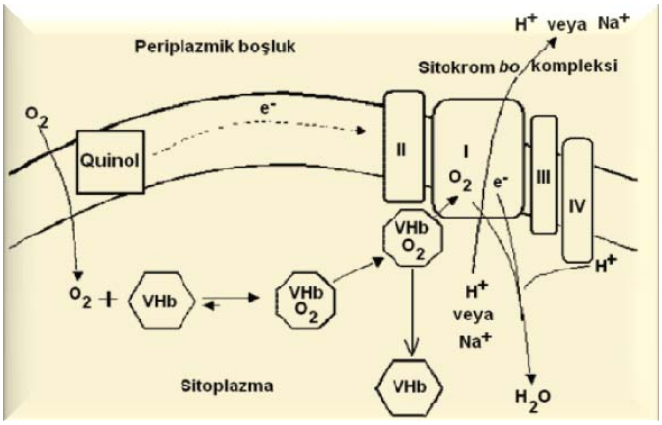
Şekil 1.12. Düşük oksijen yoğunluğunda *Vitreoscilla* hemoglobinin rolü

Bu proteini bulunduran hücrelerin daha oksitlenmiş durumda bulunmaları, VHb'nin hücrelerin karbon metabolizması akış şemalarında önemli yeniden düzenlemelere sebep olması ile ilgilidir. Her ne kadar bunun nasıl sağlandığı kesin olarak ortaya konmamışsa da, NAD^+/NADH ve ADP/ATP oranlarında olan önemli değişimlerin esas teşkil ettiği sanılmaktadır. VHb içeren hücrelerde NADH seviyesinde düşüş ATP miktarında ise artış gözlenmektedir. Dolayısı ile NAD^+/NADH ve ADP/ATP oranlarında meydana gelen önemli değişmeler hücrenin karbon bileşiklerini kullanımı yollarında önemli değişime neden olur. Bu bağlamda VHb ekspresyonu yapan *E. aerogenes'*de gözlenen % 80 artışın bu tür bir metabolik akış şeması değişikliğinden olabileceği bildirilmiştir [114, 115].

Vitreoscilla hemoglobini ise son yıllarda keşfedilen ilk prokaryotik hemoglobin olup, bu proteinin çeşitli endüstriyel proseslerdeki kullanım potansiyeli son yıllarda birçok araştırmanın konusunu oluşturmuştur. Bu bağlamda, özellikle düşük oksijen konsantrasyonlarının negatif etki yarattığı birçok biyoüretim olayında bu proteinin potansiyelinin olabileceği ileri sürülmüştür. Gram negatif bakteri olan *Vitrescilla* atmosferik oksijen konsantransyonundan %90 daha düşük ortamda *E. coli* ile kıyaslandığında 50 kat daha fazla ürün elde ettiği belirlenmiştir [116]. Rekombinant protein üretiminden, çeşitli antibiyotiklerin üretimine ve zararlı aromatiklerin parçalanmasına birçok böyle proseste bu proteinin klonlanmış hücrelere önemli avantaj kazandırdığı saptanmıştır. Dolayısı ile son yıllarda literatüre girmiş olan "metabolik mühendislik" terimi kullanıldığında bu protein ilk sırada bahsedilen ajan olarak karşımıza çıkmıştır. VHb genini (*vgb*) çeşitli bakteri ve fungusa transformasyonu ile büyüme ve üretimlerinde artış olduğu saptanmıştır. Aerobik bakterilerde toksik aromatik bileşiklerin yıkımı biyoremidasyonunu artırarak "VHb teknolojisi" terimini de karşımıza çıkarmıştır [117, 118].

Globin proteinleri bütün canlılarda yapısal ve fonksiyonel olarak farklılık göstermektedir. Hem grubunun yanında 6–8 α-heliks segmenti içeren hemoglobinleri karakteristik olarak dönüşümlü oksijen bağlayabilme yeteneğine sahiptirler [119].

Vitreoscilla'nın *sitokrom bo terminal oksidazı* bir çok yönüyle *E. coli*'ye benzese de, bu kompleks *E. coli*'de H^+ pompalayarak bir membran proton gradiyentine katkıda bulunurken (kemoozmotik hipotez), *Vitreoscilla*'da Na^+ pompalamaktadır (Şekil 1.13). *Sitokrom bo oksidaz* I, II, III ve IV olarak adlandırılan 4 alt üniteden oluşmaktadır. En büyük alt ünitesi alt ünite I olup sodyum pompalamada kullanılır ve aynı zamanda VHb'nin hücredeki etkisi ile ilişkilidir [116].



Şekil 1.13. VHb ve sitokrom *bo* ubiquionol oksidazların I. alt ünitesi arasındaki ilişkinin muhtemel mekanizması

VHb sitokrom bo_3 komplesinin I subünite interaksiyonu ile reaktif nitrojen türlerinin toksik etkisine karşı bo_3'un enerji üreten aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir [120]. Bu gözlemler önceki sonuçları destekleyerek Hbs ve FlavoHbs *nitrik oksit dioksijenaz* (NOD) aktivitesini belirtmektedir [121].

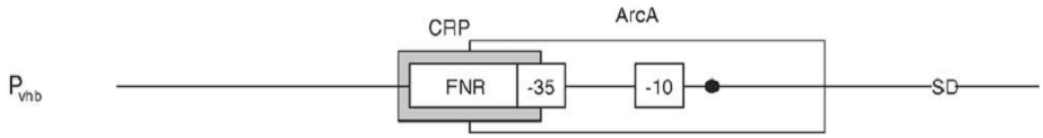
Diğer hemoglobinlere göre VHb, oksijene karşı düşük affiniteye sahiptir. VHb diğer birçok globinin ayrışma sabitesinden daha büyüktür. Böylece oksijenin VHb'den ayrışma sabitesi oldukça yüksek olup bu durumun önemi oksijenin hızlı salıverilmesinin bir gereklilik olduğu hipoksik şartlarda ortaya çıkmaktadır. Bir hipoteze göre VHb'nin bulunduğu hücreler çevrelerine göre daha oksijene formda bulunurlar [122].

Vitreosilla hemoglobin geninin klonlanmış olduğu tüm organizmalarda, regülasyonu oksijenle olan birçok metabolit ve rekombinant proteinin sentezinde önemli artış gözlenmiştir. Özellikle, bakteri ve funguslarda VHb'nin hem solunumu hem de büyümeyi arttırma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı, VHb teknolojisi genel olarak oksijence fakir şartların bulunduğu alanlarda ve oluşumları belli kritik seviyede oksijen gerektiren biyoremidasyondan rekombinant protein üretimine kadar bütün biyoproseslerde uygulama alanı bulmaktadır [123–125]. "VHb teknolojisi"nin kullanılması ile toksik aromatik bileşiklerin mikrobiyal oksidatif yıkımlarının arttığı rapor edilmiştir [126].

Yapılan bazı çalışmalarda VHb'nin *Pseudomonas*'larda biyoremediasyonu arttırmada önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir [126, 127]. Bunun en önemli nedenlerinden birisi de yabanıl türlere oranla VHb aktarılan türlerin daha yüksek oksijen alınımına sebep olmasıdır [123, 129].

1.4.1. *Vitreoscilla* hemoglobin geni (*vgb*)

Vitreoscilla hemoglobin geni (*vgb*) promotor-operatör bölge ve hemoglobini kodlayan bölge ile toplam 648 nükleotidden oluşmaktadır. Genin promotoru oksijene duyarlı bir promotordur ve aynı zamanda katabolit baskılanma gösterir. Promotorun oksijene duyarlı olmasını üzerinde taşıdığı FNR ve ArcAB proteinlerine özgü dizilerden sağlar. Katabolit baskılanmayı ise promotor üzerinde bulunan cAMP-CRP bağlanma bölgesi sağlar [129, 130]. Güçlü bir promotor olan vgb promotoru -35 korunmuş dizisi taşımaz. Ancak pribnov kutusundan 20 nükleotid geride katabolit aktivatör protein bağlanma bölgesine benzer bir bölge vardır (Şekil 1.14) [131, 132].



Şekil 1.14. *E. coli* transkripsiyon sistemi tarafından tanınan *vgb* promotoru. Shine-Dalgarno (SD) bölgesi, transkripsiyon başlama bölgesi (•), -10 ve -35 dizileri, ArcA, CRP ve FNR bağlanma bölgeleri. Yatay çizgi (—) promotorun AUG başlama kodonunundan akış-yukarı 150 nükleotidlik fragmanını göstermektedir [133].

1.4.2. *Vitreocilla* Hemoglobin Geninin Klonlandığı Organizmalara Etkisi

VHb geni (*vgb*) *E. coli* [99], *Enterobacter aerogenes* [92], *Streptomyces* türleri [134] ve tütün bitkisi [135] gibi farklı sistemlere klonlanarak, hemoglobinin bu organizmaların fizyolojik ve metabolik aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. VHb hemen hemen bütün klonlanmış olduğu hücrelere daha iyi bir oksijen alım ve kullanım potansiyeli kazandırırken [92, 136, 137] bu proteinin hücre üreme ve çoğalması üzerine olan etkisi konusunda farklı sonuçlar rapor edilmiştir [138–140].

1.4.3. VHb Metabolik Mühendislikteki Uygulamaları

1991 yılında, Bailey "metabolik mühendislik" olarak adlandırılan yeni bilim ile "Rekombinant DNA teknolojisini, hücresel aktivitesindeki fonksiyonların düzenlenmesi, taşıması ve enzimatik kullanımı" olarak tanımlamıştır [122].

	VHb'nin ETKİSİ	***ÇALIŞMALAR***
Schwanniomyces occidentalis	α-amilaz aktivitesinde artış ve total protein de artış	[141]
Pichia pastoris	Büyümede ve heterolog protein üretiminde artış	[142]
Enterobacter aerogenes	Asetoin ve 2,3-bütandiol üretiminde % 80 artış, hücrelerin böyle bir ortamda daha uzun süre canlı kalmaları	[115]
Acremonium chrysogenum	Sefalosporin C üretiminde 3.2 kat artış	[143]
Bacillus subtilis	% 30 proteaz artışı, α-amilaz aktivitesinde % 7–15 artış ve protein salınımında 1.5 kat artış	[144]
Burkholderia sp.	Biyomasta % 15, DNT parçalanmasında 2 kat artış	[145]
Çin hamster'i ovaryum hücreleri	Doku plazminojen aktivatör proteini üretminde % 40–100 artış	[146]
Escherichia coli	L-laktamaz aktivitesinde % 61 artış	[147]
Escherichia coli	Toplam hücre proteininde % 30, CAT aktivitesinde % 80, L-galaktozidaz aktivitesinde 40% artış	[140]
Corynebacterium glutamicum	L-lizin üretiminde % 24 artış	[148]
Escherichia coli	α-amilaz aktivitesinde 3.3 kat artış	[149]
Escherichia coli	Ferritin üretiminde 1.8 kat artış	[150]
Nicotiana tabacum	% 50 daha hızlı çimlenme, artan büyüme, % 80–100 daha fazla kuru ağırlık, % 30–40 daha fazla klorofil ve % 34 daha fazla nikotin	[151]
Pseudomonas aeruginosa	Canlı hücre sayısında % 11 artış ve 2–5 kat daha fazla oksijen alımı	[136]
Rhizobium etli	Bakla nodüllerinde nitrojenaz aktivitesinde %68 artış ve % 53 daha fazla azot içeriği	[151]
Saccharomyces cerevisiae	Hücre yoğunluğunda 3 kat artış ve etanol üretiminde artış	[152]
Saccharopolyspora erythraea	Eritromaysin üretiminde % 70 artış	[153, 154]
Serratia marcescens	Hücre büyüklüğünde artış	[155]
Streptomyces coelicolor	Aktinorodin üretiminde 10 kat artış	[156]
Streptomyces lividans	Kültür sonu hücre yoğunluğunda % 50 artış	[156]
Serratia marcesce	Oksitetrasiklin üretiminde 2.2 kat artış	[157]
Xantomonas maltophila	Canlı hücre sayısında % 15 artış, benzoik asitin yıkımında artış	[158]

Çevre kirliliğine paralel olarak mikrobiyal habitatlara ağır metal salınımı gitgide artmaktadır. Bununla beraber mikroorganizmaların ağır metal stresi ile baş edebilecekleri sistemlerin geliştirilmesi çalışmalara da önem kazandırmıştır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada *Enterobacter aerogenes* bakterisinin yabanıl tipi ile *vgb* geni klonlanmış Ea[pUC8:16] suşu Cd^{+} içeren besi ortamında üretilmiş ve Cd^{+} alımı, adsorbsiyonu, biyosorbsiyon bakımından karşılaştırıldığında Ea[pUC8:16] suşu daha yüksek biyokütle değeri, daha yüksek Cd^{+} alımı, daha düşük adsorbsiyonu ve daha yüksek biyosorbsiyon değerleri ile dikkat çekmiştir. Çalışma sonucunda bakteriyel hemoglobinin ağır metal detoksifikasyonunun kontrolü için çok uygun bir aday olduğu bildirilmiştir [159].

Yapılan başka bir çalışmada ise *vgb* klonlanmış *Burkholderia sp*.'de dinitrotoluen yıkımında artış sağladığı bildirilmiştir [124]. *vgb* klonlanmış bakterilerde rekombinant protein sentezi artmaktadır. Bu konu ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda *vgb*'nin mayalarda antibiyotik ve etanol üretimini arttırdığı tespit edilmiştir. Diğer bir çalışma ise *vgb'*nin bazı Enterobacteriaceae üyelerinin bütandiol ve asetoin üretimini arttırdığını göstermiştir [153].

Diğer bir çalışmada ise *Enterebacter aerogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa* ve onların *vgb* klonlanmış rekombinant bakterileri kanser tedavisinde kullanılan asparaginaz enzimini farklı karbon katabolitinde üretimleri çalışılmıştır. Enzim üretiminde karbon katabolit baskılanmasından dolayı vgb^{+} taşıyan Ea[pUC8:15] bakterisi vgb^{-} olan Ea[pUC8] kıyaslandığında 20 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir. PajC ise asparaginaz enzimini Pa kıyaslandığında 1.6 kat daha az üretildiği saptanmıştır [160].

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bakteriler, birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçları üreten küçük fabrikalardır. Özellikle genetik mühendislik çalışmalarının hızla gelişmesi ilaç üretimi için yeni çözümleri de beraberinde getirmiştir. Bakteriler tarafından herhangi bir genetik manipülasyona gerek duyulmadan endüstriyel boyutlarda üretilen birçok ürün bulunduğu gibi, bakterilerin kendileri tarafından yapılamayan ancak çeşitli endüstrilerde yüksek kullanım potansiyeli olan birçok ürün (özellikle proteinler) rekombinant teknikler kullanılarak bakterilerin genetik manipülasyonu ile başarılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak elde edilmesi güç olan veya pahalı olan maddeler bol miktarda elde edilebilmektedir. Örneğin, bu teknikler kullanılarak önemli nörodejeneratif hastalıklardan biri olan Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) ve dopamin üretimi de sağlanmaktadır.

L-DOPA'nın Parkinson Hastalığı'nda temel ilaç olarak kullanılması ve dopaminin kan basıncını 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. Literatürde L-DOPA'nın ucuz bir materyal olan benzenden biyosentezi araştırmacılar tarafından araştırılmıştır [161]. Araştırmacılar bu çalışmada benzenden L-DOPA'yı sağlayacak katekolün oluşumu için *toluen dioksigenaz* (TDO) ve *toluen cis-glikol dehidrogenaz* (TCGDH) enzimlerine gereksinim olduğunu belirtmişlerdir. Dolayısı ile bir katekol türevi olan benzenden direkt olarak 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. Önemli bir toksik bileşik olan benzenden L-DOPA sentezinin başarılması ile hem L-DOPA sentez sürecinde ekonomiklik hemde toksik atıkların tekrar kullanılmasında etkili bir yol oluşur [162, 29].

Oldukça toksik olan benzenden L-DOPA üretmeye çalışan araştırmalar, tirozinin α,β-eliminasyonunu katalizleyerek L-DOPA oluşturan TPL enzimini *Citrobacter freundii'*den *E. coli*'ye klonlamışlardır. *E. coli* hücrelerinin benzenin toksik etkisinden dolayı 3mM gibi düşük miktarda L-DOPA ürettikleri saptanırken benzene oldukça dirençlilik gösteren *Pseudomonas aeruginosa'*nın ise aynı ortamda yaklaşık olarak 14 mM L-DOPA ürettiği belirlenmiştir [163].

Tirozinle indüklenen bir enzim olan TPL normal olarak pirüvat, amonyak ve fenol oluşturmak için tirozinin α,β-eliminasyonunu katalizlemektedir. Böylece bakterilere karbon ve nitrojen kaynağı olarak L-tirozinden faydalanma olanağı sağlanmaktadır. Geri dönüşümlü olan bu reaksiyonda katekol fenol ile yer değiştirdiği zaman L-DOPA üretilmektedir [25].

Besiyeri ortamına L-tirozin eklenmesiyle beraber TPL enziminin de buna bağlı olarak indüklendiği belirlenmiştir. Diğer taraftan bu durum son ürün olan L-DOPA'nın saf halde hazır olarak elde edilmesini ciddi olarak engellemektedir. Bazı araştırmacıların yapmış oldukları çalışmalarda, L-tirozinin yokluğunda tpl promotorunu aktive edebilme yeteneğinde olan mutant transkripsiyonel bir regülatör TyrR proteini taşıyan rekombinant *E. herbicola* hücrelerini kullanılarak bu problemi aşmışlardır [26].

Bakteriyal dekarboksilazlar arasında *Streptococcus faecalis'*in tirozin dekarboksilaz (TDC, EC 4.1.1.25) enziminin göstermiş olduğu yüksek aktiviteye bağlı olarak L-DOPA üretimini arttırdığı ve bu sebepten dolayı dopamin sentezi üzerinde de önemli rol aldığı saptanmıştır [64]. *S. faecalis* TDC'sinin tirozin ve L-DOPA'ya tam bir substrat özgüllüğü gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmacılar TDC ile DDC (*dopa dekarboksilaz*)'nin aktiviteleri karşılaştırdıklarında, DDC 1mM substrat ile %50 aktivite kaybı gösterirken TDC 40 mM substrat varlığında aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Yani TDC enziminin L-DOPA'nın dopamine dönüşümünde DDC'den 40 kat daha iyi aktivite gösterdiği saptanmıştır [78].

Tirozin fenol liyaz (TPL) genin tirozinle indüklenmekte ve buna bağlı olarak da L-DOPA üretimi de artmaktadır [20, 21]. *E. herbicola* bakterisinin *tyrR* geni rastgele mutasyona uğratılmış ve sonra tpl promotorunun aktivasyon yeteneğini arttırdığı belirlenmiştir. 3 amino asit yerdeğişikliği (V67A, Y72C, E201G) içeren bir *tyrR5* alleli elde edilmiştir. Bu alleli taşıyan pAH423 (5,014bp) plazmidi *E. herbicola* hücrelerinin transforme edilip ortama tirozin konulmadan *tpl* ekspresyonunu önemli derecede arttırdığı rapor edilmiştir [26]. Araştırmacılar bu deneyler sonucunda yüksek verim ve yüksek saflıkta L-DOPA sentezinde bu hücrelerin oldukça uygun olduğunu göstermişlerdir [35].

Tirozinaz enzimi bakır-aljinat jel yöntemi ile immobilize edilebilmektedir. İlgili bir çalışmada bu immobilize edilen enzimin konsantrasyonun 9.5 ve 4.5 mg/L ve L-

DOPA konsantrasyonunun ise 1.2 mg/L olduğu belirlenmiştir. Oksijen varlığında L-DOPA üretiminin 6.4 kat arttığı saptanmıştır [163].

Diğer bir çalışmada ise L-DOPA üretiminin oksijen ve ortamdaki L-DOPA konsantrasyonunudan da etkilendiği belirlenmiştir. L-DOPA konsantrasyonun 1mM'dan daha düşük olduğu kinetik modelde kompetatif inhibisyon ile L-DOPA üretiminin de %50 azalış olduğu saptanmıştır. Oksijen basıncının 21 kPa'dan 50 kPa'ya çıkarılması durumunda L-DOPA üretiminde %10 oranında artığı belirlenmiştir [164].

Benzen gibi organik çözüçülere karşı dirençli olduğu bilinen *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 50182 yabanıl suşu ve pHS404 plazmidi taşıyan suşu ile *E. coli*'nin L-DOPA üretimi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* yabanıl suşunda L-DOPA, katekol ve benzene karşı katabolik aktivite bulunamamıştır. Ancak değişik konsantrasyonlarda benzen içeren reaksiyon karışımında üretilen *P. aeruginosa* (pHS404) ile *E. coli* de TPL, TDO/TCGDH in aktivasyon ürünleri ölçülmüştür. *E. coli'nin* benzene olan etkisi ihmal edilerek TPL'nın konsantrasyonunun 10 mM olduğu belirtilmiştir. TDO/TCGDH aktivitesi benzenden olumsuz olarak etkilenmiş, ama inhibisyonunun etkisinin *E. coli*'den daha az olduğu gözlemlenmiştir. *P. aeruginosa* (pHS404) ise katekol üretimi *E. coli'*ye benzer olmasına rağmen L-DOPA oranı %50'si kadardır. Bu da *P. aeruginosa'*daki TPL sentez seviyesinin *E. coli'*den daha düşük olduğunu göstermiştir [165].

Başka bir çalışmada ise *Aspergillus oryzae* mutant suşu (UV 7) ve yabanıl suşunun (GCB–6) L-DOPA biyosentezi çalışılmıştır. UV mutantı ve yabanıl suşu peletleri arasında farklılık bulunmuştur. Ancak diğer taraftan *Aspergillus oryzae* UV–6 suşunda tirozinaz enziminin aktivitesinde ve morfolojisinde benzerlik olduğu belirlenmiştir. Miselyumun intrasellüler enzimi olan tirozinaz ile L-tirozinden L-DOPA'ya biyokimyasal dönüşümünde rol almaktadır. Mutant suşun yabanıl suşa göre 3.72 kat daha fazla L-DOPA ürettiği gösterilmiştir (parental 32.73 mg/mg mutant suşta 95.71 mg/mg) [48].

Oksidatif stres Parkinson hastalığının temelini oluşturan nörodejeneratif süreçte büyük bir rol oynamaktadır [83]. Çeşitli deneysel çalışmalar L-DOPA'nın serbest radikal oluşumunu tetiklediği ve bunun sonucunda da bu radikallerin nöronal hasara sebep olduğu gösterilmiştir [84, 85]. L-DOPA ile tedavi gören hastalar ile hem tedavi

görmeyen Parkinson hastaları hem de sağlıklı insanların kan hücrelerindeki serbest radikal oluşumları karşılaştırıldıklarında hidroksil radikallerinin ($^{\cdot}OH$) oluşumunun L-DOPA ile tedavi gören hastalarda daha çok arttığı rapor edilmiştir [86].

Bazı araştırmacıların dopaminin bakteriyel sentezi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada da katekol, pirüvat ve amonyaktan enzimatik bir sistemle dopamin sentezinin iki basamakta gerçekleştiğini belirtmişlerdir. İlk basamakta katekol, pirüvat ve amonyak katekolün yüksek konsantrasyonlardaki inhibitör etkisine karşı dirençli olan *Symbiobacterium* sp. SC–1 bakterisinin TPL'si aracılığıyla L-DOPA üretilmiş ve ikinci basamakta ise bu sistemden saflaştırılan L-DOPA sıçan karaciğerinden izole edilen DDC enzimi ile *in vitro* bir düzenekle dopamine dönüştürülmüştür [18, 30]. Bu çalışmada, katekolün TPL üzerindeki inhibitör etkisine benzer şekilde oluşan L-DOPA'nın DDC'yi belli oranda inhibe ettiği belirtilmiştir. 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 aktarılmış ve dopamin üretimi için asetonla kurutulmuş *S. faecalis* hücreleri kullanılmıştır. L-DOPA geri-beslemeli bir fermentör ile devamlı katekol ve pirüvat ekleyerek 15 saatte 65 g/L elde edilmiştir. 100 mM L-DOPA ve 0.15 mg/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. Muhtemelen bu azalma ortamda piridoksal fosfatın (PLP) eksilmesinden dolayıdır. Ortama 5 mg PLP eklendiğinde orijinal aktivitenin %70 oranında arttığı gözlemlenmiştir. TDC enzim aktivitesinin 9 saat sonrasında substrat eksikliğinden dolayı azaldığı saptanmıştır. Dopamin üretiminde TPL ve TDC enzimlerinin eş zamanlı olarak reaksiyona girmesi denendiği zaman üretkenliğin, enzimlerin ayrı ayrı reaksiyonları gerçekleştirdiği üretkenliğe göre çok daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca *S. faecalis* hücrelerinin ürettiği L-DOPA ve dopamin HPLC yöntemi ile saptanmıştır [18].

Koyanagi ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada tipik olarak L-DOPA üretiminin tirozin destekli bir besi ortamında kültürü yapılan *E. herbicola* hücrelerinin çöktürülmesi ve hücre peletinin enzim kaynağı olarak substratlarla (pirüvat, amonyak ve katekol) birlikte bir fermentöre transferi gerçekleştirilmiştir. Böyle bir enzimatik metodun kimyasal metoda göre çok daha kolay olduğu ve optik bir ayırmaya gereksinim duyulmadığı rapor edilmiştir. Ancak, L-DOPA'nın tirozinle kontamine

olması nedeniyle enzimatik üretimde bir sorun oluşturduğu bildirilmiştir. Her iki madde de yapısal ve kimyasal olarak benzer olduğundan, böyle bir kontaminasyonun son ürün olan L-DOPA'nın klinik uygulamalarında büyük bir zorluk yarattığı belirtilmiştir. Bu çeşit olumsuzlukların aşılması için *E. herbicola* ve *C. freundii* TPL geninin önüne güçlü promotorlar (ör. *tac* promotoru) eklenerek yüksek eksprasyon vektörlerinin oluşturulduğu ve *E. coli*'ye aktarıldığı rapor edilmiştir. Besi ortamına IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside) eklendiğinde ise her iki bakteriden gelen TPL geninde yüksek bir eksprasyon görülmüş olmasına rağmen, bu hücrelerin L-DOPA üretiminin yabanıl tip *E. herbicola* kadar olmadığı saptanmıştır. Dolayısı ile bu hücrelerin TPL eksprasyon kapasitelerinin sırf gen dozajı ile açıklanabilecek bir olgu olmadığını göstermektedir. Böyle olsaydı, üzerinde TPL geni taşıyan vektörlerle transformasyonu gerçekleştirilmiş *E. coli*'de bu geni kromozomlarında tek kopya halinde taşıyan doğal konakçı hücrelere (*E. herbicola* ve *C. freundii*) göre daha yüksek TPL aktivitesi gözlememiz gerekirdi. Bu da göstermektedir ki, L-DOPA üretimi için kullanılan substratların (L-tirozin, katekol, amonyum ve pirüvat) hücre membranından içeri taşınım oranları enzimin eksprasyon seviyesinde belirleyici bir rol oynamaktadır. *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 dozaj dışında bu tür membran taşınım özelliklerinin rol oynadığını belirtmektedir. Dolayısı ile TPL genini doğal olarak bulunduran *E. herbicola* ile bu geni rekombinant olarak taşıyan *E. coli* hücreleri TPL enziminin substratlarına ve bu enzimi indükleyen ajanlara karşı farklı geçirgenlik potansiyellerine sahip olabilirler. Ayrıca, membran yapısını bozabilen katekollere karşı gösterdikleri direnç bu tür bir aktivite farkından kaynaklanmaktadır. Bu bağlamda, bu hücrelerin değişik katekolamin, katekol ve katekol türevlerine dirençlerinin araştırılması önemli ipuçları verebilir. Ayrıca, TPL eksprasyonu ile ilgili regülator faktörlerin çalışılması, TPL promotoru (P_{TPL}) L-tirozin içeren ortamda TyrR proteini tarafından aktive edildiğini göstermiştir. TyrR proteinin aromatik amino asitlerin metabolizmasındaki rolü uzun zamandan beri bilinmektedir [174].

Rekombinant *E. coli*'de lac raportör sistemlerinin kullanılması ile TPL eksprasyonunda hem TyrR proteini ve hem de cAMP reseptör proteini (CRP) rol oynadığını belirtilmektedir. Bilindiği gibi TyrR proteinin en önemli fonksiyonu aromatik amino asitlerin biyosentezi, transportu ve parçalanmasından sorumlu genlerin regüle etmesidir. 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 TPL genin aktivitesini düzenlerken (daha çok arttırır), amino ucu RNA polimeraza bağlanmakla aktivatör olarak görev yapmaktadır. Tirozin, fenilalanin ve triptofan bu regülatör proteinin ko-faktörleri olup hedef promotorlardan transkripsiyonu TyrR'nin DNA üzerindeki bağlanma konumuna göre pozitif veya negatif olarak etkileyebilmektedir. TPL geninin regülatör bölgesinde (yani promotoru/operatörü üzerinde) üç adet TyrR bağlanma bölgesi mevcut olup ve 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 yaparak üç adet TyrR dimeri bir araya toplanmaktadır [175].

Bizim yaptığımız çalışmada, endüstriyel açıdan önemli fermentatif ürünler olan L-DOPA ve dopamin *vgb*/VHb sistemini içeren rekombinant mikroorganizmalar kullanılarak mikrobial üretimi ilk kez araştırılmıştır. Ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ve onu kültürün ileri fazlarında membran transferazlarına aktararak yaşlı hücrelerin daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma karakteristiği sağlayan VHb/*vgb* sistemi, bu amaç için önemli avantaj sağlamaktadır. *Erwinia herbicola* (NRRL B–3466)'nın ve vgb^- ve vgb^+ taşıyan vektörleri klonlanarak elde edilmiş rekombinantlarının değişik kültür koşulları ve fazlarında L-DOPA ve dopamin üretiminin nasıl olduğu ve VHb'nin buna etkisi belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamındaki başlıca hedefimiz bakterilerin hücre içine ve ortama saldıkları L-DOPA ve dopamin miktarlarının nasıl ve ne seviyede olduklarının belirlenmesidir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Ayıraçlar

Bu çalışmada besiyeri hazırlamasında kullanılan kimyasallar; trikloroasetik asit, piridoksal fosfat, sodyum sülfit, sodyum dihidrojen fosfat, amonyum klorid, potasyum fosfat (KPi), tris-HCl, Nessler ayıracı kimyasalları (HgI_2, KI, NaOH), metanol, L-DOPA ve dopamin hidroklorür analitik saflık derecesinde olup Sigma şirketinden; L-tirozin, pirüvik asit Acros şirketinden temin edilmiştir.

3.1.1. Nessler Ayıracı

Nessler ayıracı solüsyon A ve solüsyon B adı verilen iki solüsyonun karışımından oluşur [166]. *Solüsyon A*, 35 g KI ve 50 g HgI_2 içeren 200 ml bir solüsyon iken, *solüsyon B* 50 g 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 çözeltiye dokunulmadan) kullanılmıştır.

3.2. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

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 20 ml 100 ml erlenlerde olacak şekilde hazırlanmış ve 121°C'de 1 atm basınç altında 20 dakika otoklavize edilmişlerdir.

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

Çizelge 3.1 Luria-Bertani **(**LB) Besiyerinin İçeriği (g L^{-1})

NaCI	10
Pepton	10
Yeast ekstrat	5
%0.1 L-tirozin (otoklav sonrası)	

Çizelge 3.2 Medium 9 (M9) Besiyerinin İçeriği (g L^{-1})

Na_2HPO_4	6
KH_2PO_4	3
NaCl	0,5
NH_4Cl	1
Otoklav Sonrası Eklenen Stok Solusyonların İçeriği (ml L^{-1})	
0,01 M $MgSO_4.7H_2O$	10
0,01M $CaCl_2$	10
Glukoz (%20)	10
%0.1 L-Tirozin	

3.3. Araştırmada Kullanılan Bakteriler

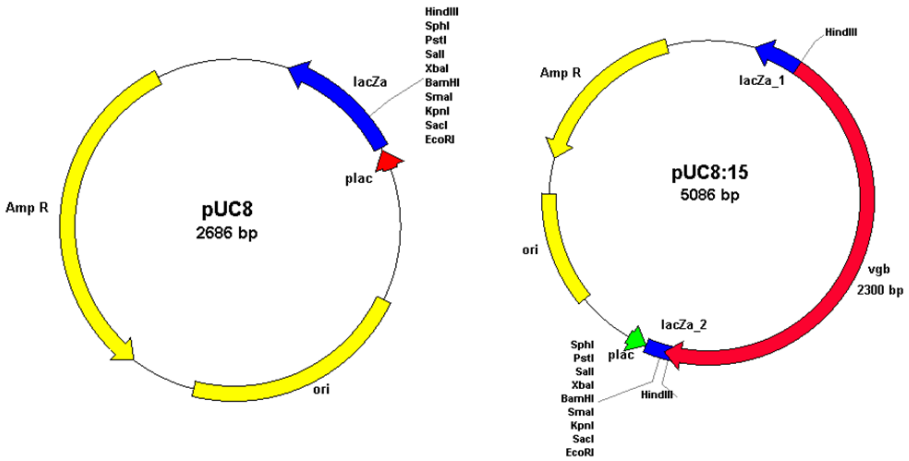
Bu çalışmada ikiside gram-negatif bakteri olan *Enterobacter aerogenes* ve *Erwinia herbicola* (NRRL B–3466) bakterileri kullanılmıştır. *Erwinia herbicola* L-DOPA ve dopamin üretimi ile bilinen bir bakteridir. Bu bakteri Amerikan Tarım Bakanlığı Kültür Koleksiyonundan (USDA Culture Collection, Peoria, Illinois, USA) bakteri stok kültürlerinden sorumlu küratör Dr. Alejandro Rooney tarafından tarafımıza sağlanmıştır. *Enterobacter aerogenes'in* iki rekombinantından pUC8 plazmidini taşıyan Ea[pUC8] olarak, aynı plazmidin *vgb* geni taşıyan formu ise Ea[pUC8:15] olarak adlandırılmaktadır. *E. aerogenes*'in vgb^- ve vgb^+ rekombinant suşlarından plazmidler izole edilmiş, bu vektörlerin L-DOPA veya dopamin üretimleri ile bilinen *Erwinia herbicola* 3466 suşuna transformasyonu yapılıp L-DOPA ve dopamin üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

3.4. Bakteri Stoklarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan bakterilerin uzun süreli stokları aynı zamanda % 20 gliserol (v/v) içeren sıvı Luria-Berteni (LB) besi ortamı içinde yapılmışlardır. Bunun için konakçı bakteri (*E. aerogenes ve E. herbicola*) sıvı LB içinde çoğaltırken, bunun rekombinantları 100 µg/ml amfisilin içeren LB ortamında inkübe edilmişlerdir. Bu şekilde hazırlanmış olan hücre süspansiyonları -20 ^{0}C'de muhafaza edildiler. Bu şekilde hazırlanan stoklarda hücrelerin 2 yıl kadar canlılıklarını korudukları belirlenmiştir. Ancak, her çalışmada kullanılan bakteriler bu stok kültürlerden değil, LB ve rekombinantlar için amfisilin içeren LB agar plakalar üzerine ekilen ve + 4 ^{o}C'de muhafaza edilen hücrelerden taze pasajlar alınarak yapılmıştır. Transformasyon işleminin tamamlanmasından sonra L- DOPA ve dopamin sentezinin çalışılacağı hücre kültürleri de bu pasajlardan alınmıştır. Tüm çalışmalar sıvı besi yerine ekilen veya ayda bir pasajları alınan taze kültürler kullanılarak yapılmıştır.

3.5. Araştırmada Kullanılan *vgb* Klonları

Bu çalışmada kullanılan *E. aerogenes*'in *vgb* rekombinantı bu geni bir pUC plazmidi üzerinde bulunmaktadır (Şekil 3.1). *E. aerogenes'in vgb*$^{+}$ rekombinantı "Ea[pUC8:15]" olarak adlandırılmaktadır. Ea[pUC8:15] suşu 665 baz çiftine sahip pUC8 plazmidinin multi klonlama bölgesindeki Hind III restriksiyon bölgesine yaklaşık 2.3-Kb'lık promotoru ile beraber *vgb* geni taşıyan *Vitreoscilla* genomik fragmanı klonlanması ile oluşturulmuş bir rekombinant bakteri suşudur. [pUC8:15] plazmidinin büyüklüğü yaklaşık 5-Kb'dır [167].



Şekil 3.1. pUC8 ve pUC8:15 plazmidlerinin fiziki haritası.

3.6. Uygun Bakteri Suşlarının Eldesi ve Klonlama Çalışmaları

Çalışmada plazmid izolasyonu, transformasyonu ve restriksiyon haritalaması için standart protokoller kullanılmıştır. Bu çalışmada ikiside gram-negatif bakteri olan *Enterobacter aerogenes* ve *Erwinia herbicola* (NRRL B-3466) bakterileri kullanılmıştır. *Enterobacter aerogenesin* iki rekombinantından pUC8 plazmidini taşıyan Ea[pUC8] olarak, aynı plazmidin *vgb* geni taşıyan formu ise Ea[pUC8:15] olarak adlandırılmıştır.

E. aerogenes'in *vgb* klonlanmış rekombinant suşlarından plazmidler izole edilerek, VHb kaynağı olarak L-DOPA veya dopamin üretimleri ile bilinen *E. herbicola* 3466 suşlarına transformasyonları çalışılmıştır. Plazmidlerin restriksiyon haritalarından bu vektörlerin istenen vektörler olup olmadığı araştırılmıştır. Bazı transformantlardan elde edilen plazmidlerin minipreplerinden onların uygun plazmidi içerdikleri kanıtlanmıştır. Çalışılan plazmidlerin genel özellikleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Bu çalışmada kullanılan *E. aerogenes*'in *vgb* rekombinantı bu geni bir pUC8 plazmidi üzerinde taşımakta ve yeni plazmid pUC8:15 olarak adlandırılmaktadır. Hedeflenen bütün *Erwinia herbicola* rekombinantları elde edildikten sonra, bu rekombinant suşlar ile *vgb* içermeyen (vgb^-) suşların ve yabanıl suşların L-DOPA veya dopamin üretme karakteristikleri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Bu amaçla orijinal suşların ve onların vgb^+ ve vgb^- rekombinantlarının L-DOPA veya dopamin üretim potansiyelleri çeşitli fiziksel (ısı, oksijen) ve kimyasal koşullar (değişik besi ortamları) altında araştırılmıştır. Elde edilen muhtemel transformantlardan tekrar plazmid izolasyonu yapılarak doğruluğu yapılmıştır.

3.6.1. Plazmid izolasyonu için bakterilerin kültürü

Vitreoscilla hemoglobin (VHb) geninin (*vgb*) kaynağı olarak bu geni plazmid vektörler üzerinde taşıyan *E. aerogenes* rekombinantları kullanılmıştır. Negatif kontroller elde etmek için aynı plazmidin vgb^- (yani *vgb* geni taşımayan) formunu taşıyan rekombinantlarından bu plazmidler izole edilmiştir. Bunun için taze bir pasaj üzerindeki bir koloniden alınan örnek 100 μg ml^{-1} amfisilin içeren 20 ml sıvı LB içine ekilerek gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu gece kültürleri santrifüj edilerek, peletler plazmid izolasyonu için kullanılmıştır.

3.6.2. Plazmid izolasyonu (miniprepler)

Yukarıdaki şekilde kültürü yapılan *E. aerogenes*'in vgb^+ ve vgb^- rekombinantlarından plazmid izolasyonu standart alkali-lizis yöntemi kullanılarak yapılmıştır [168]. Bu yöntemle yaklaşık 1 µg plazmid DNA'sı ile 5 x 10^6- 2 x 10^7 transformant elde edilebildiği saptanmıştır. İzlenen standart protokol aşağıdaki gibidir:

1. Gece boyunca inkübasyonu yapılan kültürlerden 1.5 ml bir Eppendorf tüpe aktarılarak 10,000-rpm'de 3 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatan atılarak pelet plazmid izolasyonu için muhafaza edilmiştir.
2. Pelet 100 µl soğuk *Çözelti I* (GTE) ile sulandırılıp 30 sn. vortekslendikten sonra 5 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
3. Taze olarak hazırlanmış 200 µl *Çözelti II* (NaOH/SDS) eklenip tüp alt-üst edildikten sonra 5 dk. buz içinde bekletilmiştir.
4. Karışıma 150 µl oda sıcaklığındaki *Çözelti III* (potasyum asetat) eklenerek tekrar vortekslenmiş ve 5 dk. buzda bekletilmiştir.
5. Karışım 10,000 rpm'de +4 C^0 de 3 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatan temiz bir tüpe aktarılmış ve 0.8 ml %95 etanol eklenerek 2 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3 dk. 10,000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatan atılmıştır.
6. Peletin üzerine 1 ml % 70 etanol eklenerek yıkama işleminden sonra tekrar santrifüj edilmiş ve pelet inkübatörde 37 ^{0}C de yarım saat kurumaya bırakılmıştır.
7. Yukarıdaki pelete 30 µl steril TE tamponu eklenerek çözülmüş ve DNA solüsyonu ileriki çalışmalar için +4 ^{0}C ' de muhafaza edilmiştir.

Buradaki alkali-lizis yöntemi ile plazmid izolasyonu için kullanılan solüsyonların stokları ve hazırlanışları aşağıdaki gibidir:

- 10 ml GTE solüsyonu
- 1.5 ml NaOH/SDS solüsyonu (taze hazırlanmış)
- 100 ml 5 M potasyum asetat solüsyonu
- 10 ml TE tamponu

Bu solüsyonları hazırlanışı aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

GTE solüsyonu (Glukoz/Tris.HCl/EDTA)

50 mM glukoz

25 mM Tris-HCl, pH 8.0

10 mM EDTA

GTE solüsyonu hazırlandıktan sonra otoklav edildi ve 4^0C de muhafaza edilmiştir.

NaOH/SDS solüsyonu

0.2 N NaOH

%1 (w/v) SDS

Bu solüsyonun taze hazırlanması gerekir.

Potasyum asetat solüsyonu (5 M, pH 4.8)

29.5 ml glasiyel asetik asit

KOH peletleri (pH 4.8 oluncaya kadar)

70.5 ml H_2O

TE (Tris/EDTA) Tamponu

10 mM Tris.HCl, pH 8.0

1 mM EDTA, pH 8.0

TE solüsyonu otoklav edildikten sonra 4^0C de muhafaza edilmiştir.

3.6.3. Plazmidlerin restriksiyon kesilimi ve agaroz jel elektroforezi

Uygun restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek kesilen yukarıdaki plazmidlerin restriksiyon haritaları agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Jellerin hazırlanmasında ve yürütülmesinde 50X stok TAE tamponu kullanılmıştır. Bu tamponun litredeki içeriği aşağıdaki gibidir (L^{-1}):

- 242 g Tris baz (pH 8.5)
- 57.1 g glasiyel asetik asit
- 37.2 g EDTA (pH 8.0)

Jeller ve yürütme tamponu bu stokun 1X' seyreltilmiş solüsyonu ile hazırlanmışlardır. Jellerin hazırlanması ve yürütülmesi genel olarak aşağıdaki protokole göre yapılmıştır [168].

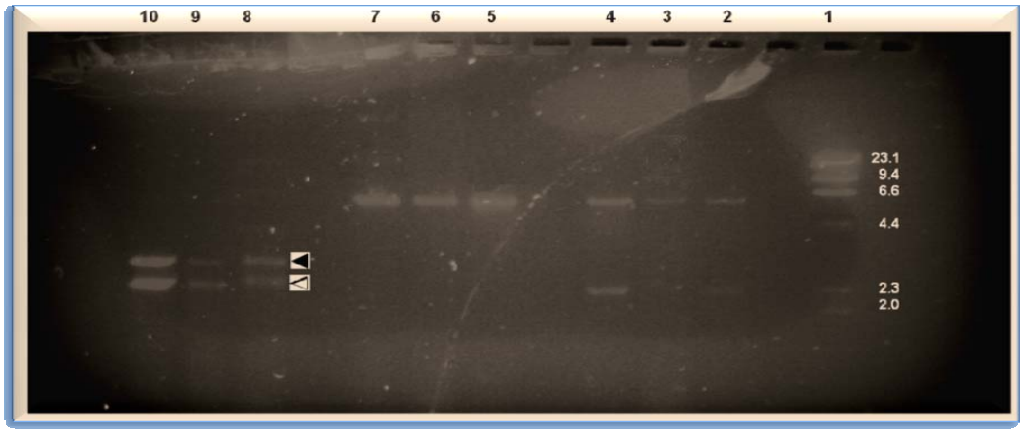
1. Minijeller toplam 100 ml jel solüsyonu ile yapılmışlardır. Bunun için 98 ml dH_2O'ya 2 ml 50X TAE tamponu eklenmiş ve agarozun jeldeki konsantrasyonu %1.25 (w/v) olarak hazırlanmıştır. Bu karışım mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyip solüsyon berraklaşıncaya kadar kaynatılmış ve solüsyonun ısısı yaklaşık 60–70 ^{0}C'ye düşünce etidyum bromidin stok (10 mg/ml) solüsyonundan 10 µl eklenerek hava kabarcığı veya köpürme olmayacak şekilde hafifçe karışması sağlanmıştır.
2. Yukarıdaki jel solüsyonu temiz ve kuru bir jel döküm kalıbına (15 x 15 cm, Biorad) tarak dişlerini kapatacak kalınlıkta dökülerek yaklaşık 30 dk. beklenmiştir.
3. Jel, döküm kalıbı ile beraber jel yürütme tankı içine alınarak taraklar çıkarılmış ve jeli yaklaşık 0.5 cm kapatacak miktarda jel yürütme tamponu tanka doldurulmuştur.
4. Bu esnada plazmidlerin restriksiyon muameleleri yapılmıştır. 100 µl TE tamponu içerisindeki eritilmiş plazmid örneklerinden 10 µl alınıp steril eppendorflara konulmuş ve üzerine 2 µl HindIII tamponu ve 2 µl HindIII enzimi eklenmiştir.
5. Karışım 37 ^{0}C de 2 saat su banyosunda bekletildikten sonra içinde izleme boyası olarak brom fenol blue bulunan yükleme tamponundan 5 µl eklenmiştir.

6. Restriksiyon enzimi ile muamele görmüş plazmid DNA'sı ve yine uygun restriksiyon enzimleri ile önceden kesilmiş ve standart markır olarak kullanılan lambda (λ) DNA'sı uygun kuyucuklara eklenerek jel elektroforezi sabit voltaj (50–70 Volt) ve akımda (20–25 mA) gerçekleştirilmiştir.
7. Minijellerin yürütülmesi bu şartlar altında genel olarak 4–5 saat zaman almış ve bu sürenin sonunda izleme boyasının iki bileşeninden hafif olanının jelin sonuna kadar yürümesinin beklenmesinden sonra elektroforez işlemine son verilmiştir.
8. Jeldeki DNA bantlaşma motifi UV ışık altında floresan ışık yayan etidyum bromür ile belirlenmiş ve elektroforetogramları yapılmıştır.
9. Boyama işleminden sonra jel yüzeyi çok koyu boyandığı takdirde, bantların net olarak görülebilmesi için jeller ek bir yıkamadan geçirilmişlerdir [173].
10. Plazmidlerin restiksiyon bantlaşmasından istediğimiz DNA fragmanlarının bulunup bulunmadığı λ DNA'sının bilinen fragmanları ile oluşturulan standart eğriler yardımı ile bulunmuşlardır.

Yukarıdaki şekilde hazırlanan jelin fotoğrafları çekilerek, jel üzerindeki plazmid DNA fragmanları (bantları)nın büyüklükleri (baz çifti sayısı veya kilobaz olarak), restriksiyon fragman büyüklüğü bilinen λ DNA'sı standardının logaritmik eğrisinden bulunmuşlardır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. HindIII ile kesilmiş λ pUC8 plazmidinin agaroz jeldeki restriksiyon fragmanları.



Şekil 3.3. HindIII ile kesilmiş λ (1), pMK79 plazmidi (2-4) ve pMK57 (5-7) ve pUC8:15 plazmidinin (8-10) agaroz jeldeki restriksiyon fragmanları. İçi dolu üçgenle (◀) gösterilen bant 2.7-kb büyüklügündeki pUC8 plazmidine ait iken, içi boş üçgenle (◁) gösterilen bant 2.3-kb büyüklüğündeki parça *vgb* genine aittir (λ DNA'sı fargmanlarını gösteren rakamlar kb olarak verilmiştir).

3.6.4. Bakterilerin yeni vektörlerle transformasyonu

E. aerogenes'in *vgb*$^-$ (Ea[pUC8]), *vgb*$^+$ (Ea[pUC8:15]) rekombinantlarından izole edilmiş olan plazmid vektörlerin, L-DOPA ve dopamin üretmeleri ile bilinen *Erwinia herbicola* 'ye transformasyonları standart $CaCl_2$-ısı şoku metodu ile yapılmıştır [169].

Bakteri kültürleri taze pasajlardan alınan kolonilerden yapılmıştır. Bunun için, pasajlardan bir koloninin bir kısmı öze ile alınarak 20 ml LB içeren 125 ml kapasiteli erlenlere ekim yapılmış ve gece boyunca çalkalamalı koşullarda (200-rpm) 37 ^{0}C'de inkübe edilmiştir. Bu gece kültürlerinden yeni LB besi ortamına 1/100 inokulum (ör; 20 ml LB içeren erlenlere 200 µl gece kültürü) transfer edilerek OD_{600} değeri yaklaşık 0.5 olana kadar aynı koşullarda inkübe edilmişlerdir. Plazmidlerin transformasyonu için bu logaritmik faz kültürleri kullanılmıştır. Bu hücrelerin eksojen kaynaklı DNA moleküllerini (yani yukarıda izole edilen plazmidleri) içine almaları için öncelikle kompetan duruma getirilmeleri gerekir. Bu çalışmada bunun için aşağıdaki $CaCl_2$ yöntemi kullanılmıştır.

3.6.4.1.Kompetan hücre oluşturulması

Kompetan hücre oluşturulması (hücrenin eksojen kaynaklı bir DNA molekülünü içine alması için yapılan işlem) standart $CaCl_2$ yöntemi [169] ile aşağıdaki protokol çerçevesinde gerçekleştirildi.

1. Gece boyunca (15–18 saat) 37 ^oC 200 rpm'de kültürü yapılan hücrelerden 100 µl örnek (inokulum) alınarak 20 ml LB içeren erlenlere ekim yapıldı ve bu kültürler yine çalkalamalı şartlarda (160 rpm) ve 37 ^oC'de A_{600} değeri yaklaşık 0.5 olana kadar inkübe edildi.
2. Yukarıdaki optik yoğunluğa ulaşan erlenler bir buz kabına gömülerek 10 dk. bekletildikten sonra, eppendorf tüplerine kültürler pipetlendi ve soğutmalı (4 ^oC) santrifüjde 5,000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatan atıldı.
3. Bu işlem 2 defa tekrarlandı.
4. Soğuk 10 mM NaCl'den 1 ml peletlerin üzerine pipetlendi ve peletler çözdürüldü.
5. 5 dk. 5,000 rpm'de 4 ^oC'de santrifüj edildi.
6. Toplanan pelete 0.5 ml soğuk 0.1 M $CaCl_2$ eklenerek 20 dk. buz üstünde tutulduktan sonra 4 ^oC 5.000 rpm'de yine 5 dk. santrifüj edildi ve yine pelet muhafaza edildi.
7. Toplanan pelet 150 µl soğuk 0.1 M $CaCl_2$ içinde süspanse edilerek transformasyon için hemen kullanıldı.

3.6.4.2. Hücrelerin transformasyonu

Yukarıdaki şekilde elde edilen kompetan hücrelere vgb^- ve vgb^+ genlerini taşıyan plazmidinin aktarımı (transformasyonu) literatürdeki standart "ısı şoku" protokolüne göre aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Süspansiyonun üzerine 0,1–1 µg DNA içeren 2 µl DNA solüsyonu eklendi ve buzda 1 saat bekletildi.
2. Tüpler 42 ^oC'deki bir su banyosuna alınarak 2 dk. tutulduktan sonra tekrar buza gömülerek 10 dk. bekletildi.
3. Tüpler 1 ml LB eklenerek hafifçe çalkalandıktan sonra 37 ^oC'de yaklaşık 1 saat inkübe edildiler.
4. Hücreler amfisilin (100 µg/ml) içeren agar petri kaplarına 200 µl olarak transfer edilerek cam çubukla yayıldıktan sonra inkübatöre kaldırılarak en az 18 saat süre ile inkübe edildiler.

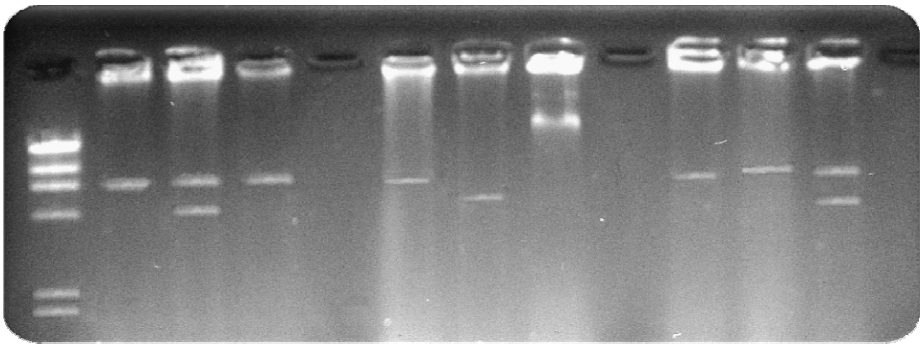
3.6.4.3. Rekombinant klonların seçilimi

Elde edilen rekombinant kolonilerin gözle görülebilir bir büyüklüğe ulaşmalarının en az 18 saatlik bir inkübasyonu gerektirdiği belirlenmiştir. Rekombinant kolonilerden iğne öze ile alınarak 20 ml LB-amp (100 μg/ml amfisilin içeren LB ortamı) ortamına ekim yapıldıktan sonra çalkalamalı koşullarda (200-rpm) 37 ^{0}C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı ve sadece rekombinant bakterilerde mavi-yeşil renkli pigment olan piyosiyanin üretikleri gözlemlendi (Şekil 3.4).

Antibiyotiğe (amfisilin) direnç sağlayan gen sayesinde transformantlar ilgili antibiyotiği içeren ortamlarda oluşturdukları "satellit" koloni morfolojilerinden seçilerek bunların gerçek transformant olup olmadıklarını anlamak için restriksiyon haritalaması yapılmış ve vektörlerin başarılı bir şekilde transform edildiklerini kanıtlanmıştır. Bunun için standart alkali-lizis yöntemi kullanılarak yapılmıştır [172]. Uygun restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek kesilen plazmidlerin restriksiyon haritaları agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir (Şekil3.6).



Şekil 3.4. Rekombinant bakterilerde piyosiyanin pigmenti



Şekil 3.5. Rekombinant bakterilerden izole edilen plazmidlerin agaroz jeldeki restriksiyon fragmanları.

3.7. L-DOPA ve Dopamin Sentezi İçin Bakteri Kültürleri

Bakterilerin pasaj yapıldığı plakalardan bir koloninin bir kısmı alınarak 20 ml LB içeren 100 ml kapasiteli erlenlere ekim yapılmış ve gece boyunca çalkalamalı koşullarda (200-rpm) 37 ^{o}C'de inkübe edilmişlerdir. Bu gece kültürlerinden yeni besi ortamlarına %1 inokulum (Ör; 20 ml LB içeren erlenlere 200 µl gece kültürü) transfer edilerek inkübasyona (24 saat 200-rpm, 37 ^{o}C) bırakılmışlardır. TPL enzimi tirozin ile indüklendiği için bazı çalışmalarda bakterileri inoküle etmeden önce besiyerine %0.1 konsantrasyonda tirozin solüsyonu eklenmiştir.

3.8. Kültür Ortamındaki Toplam Biomas Belirlenmesi

Hücre kültürlerinde çoğalma indikatörü olarak toplam ortam türbiditesinin optik densitesi kullanılmıştır. Bunun için belirlenmiş kültür fazlarında kültürün optik densitesi 600 nm dalga boyunda kaydedilmiştir. OD_{600} > 0.5 olduğu zaman kültürler uygun şekilde (1/5 veya 1/10) dilüsyon yapılarak değerleri kaydedilmiştir. Hücrelerin hepsi durağan fazlardan geldiklerinden bu tür bir biyokütle belirlemesi canlı hücre sayıları ile ilişkili değildir. Ancak, bu tür bir ölçümü yapmamızdaki amaç hücre ektraktlarının hazırlanmasında eşit OD değerlerini sağlayarak eşit miktarda biyokütle'yi sonifiye etmek içindir.

3.9. Kültür Supernatantlarının Saklanması

Kültürler belli zaman sürelerince inkübe edildikten sonra santrifüj tüplerine transfer edilmiş ve 10,000 x*g*'de +4 ^{o}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 ^{o}C saklanmışlardır.

3.10. Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması

Yukarıdaki santrifüj edilen kültürlerin pelletleri bu bölümde hücre içi 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 yapılmıştır. Bu süspansiyonlar bir ultrasonifikatör (Soniks vibra cell) ile 40 saniye sonifikasyon, 20 saniye buz üzerinde inkübasyon olacak şekilde toplam 3 dakika sonifiye edilerek ultrasonik hücre ekstraktları hazırlanmıştır. Hücre ekstraktları 10,000 x*g* ve 4 ^{o}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 süpernatanlar HPLC ile ölçüm yapılana kadar +4 ^{o}C'de muhafaza edilmişlerdir.

3.11. Tirozin Fenol Liyaz Enziminin Tayini

TPL enzim aktivitesi, bu enzim tarafından L-tirozinin fenol, pirüvat ve amonyağa yıkılmasından açığa çıkan amonyağın belirlenmesine dayanan ve yaygın olarak kullanılan Nessler reaksiyonu ile belirlendi [170].

1. 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 ekstraktından oluşmaktadır.
2. Her bir örnek için paralel hazırlanmış körlere ekstrakt konulmadan önce 0.1 ml 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) konularak hücre proteinlerinin (dolayısı ile TPL'nin) denatürasyonu sağlanmıştır.
3. Örnekler ve bunlara karşı gelen körleri 37 ^{o}C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldıktan sonra örnek tüplerine 0.1 ml 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) konularak reaksiyon durdurulmuştur.
4. Reaksiyon karışımı daha sonra 10,000 x*g*'de 5 dk. santrifüj edilerek 500 µl süpernatant 1.75 ml distile su içeren tüplere transfer edilmiştir. Bu karışıma 250 µl Nessler ayıracı eklenerek toplam hacim 2.5 ml yapılmış ve karışım vortekslenerek, 20 dk. oda sıcaklığında tutulmuştur.
5. 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^{o}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 bradford metoduna göre yapılmıştır [171].

3.12. L-DOPA ve Dopaminin HPLC ile Analizi

Hem hücre içi hem hücre dışı 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 çözeltileri, kalibrasyon için ara stok standartlar 10–200 mg/L (10–25–50–100–200) aralığında hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrileri hem L-DOPA ve dopamin için dış standart kullanılarak elde edilmişlerdir. 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 20 dakikalık bir süreyi aldığı saptanmıştır.

Çizelge 3.3 HPLC cihazı analiz parametreleri.

Parametre	
Kolon	SGE C_{18} (4,6 x 250 mm,5μm)
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

Dopamin, bilgileri bir hücreden diğerine iletmede görev yapan önemli bir nörotransmitterdir. Beyinde dopamin hücrelerinin niçin hasara uğradığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Yeterli miktarda dopamin sentezlenmediği taktirde hareket ve denge işlevleri olumsuz etkilenerek Parkinson hastalığının semptomları ortaya çıkmaktadır. Ayrıca hastalığın ortaya çıkmasında yaşlanma süreci zemininde olası kalıtsal ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı bilinmektedir.

Dopamin sentezinin oksijenle önemli ölçüde regüle olduğu konusunda yeterince literatür bilgisi bulunmaktadır. Diğer yandan, önemli bir bakteriyel hemoglobin olan *Vitreoscilla* hemoglobin de oksijenle regüle olan ve karbon katabolit baskılanmaya maruz kalan bir genle (*vgb*) ifade edilmektedir.

Bu çalışma boyunca L-DOPA ve dopamin üretmesi ile bilinen *Erwinia herbicola* (NRRL B–3466)'nın ve onun pUC8 plazmidini taşıyan rekombinantı ile aynı plazmidin *vgb* taşıyan vektörleri klonlanarak elde edilmiş rekombinantlarının değişik kültür koşulları ve fazlarında *tirozin fenol liyaz* (TPL) aktivitesi, L-DOPA ve dopamin üretme kapasiteleri karşılaştırmalı olarak çalışılması esas alınmıştır.

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 hem de örneklerinin analizi yapılırken üst üste çakıştırılarak analizin hassasiyeti sürekli kontrol edilmiştir. Örneklerin analizi bu standart spektrumdan oluşturulan kalibrasyon grafiği baz alınarak gerçekleştirilmiştir.

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

Bakteriler zor koşullar altında enerjitik sebepler ve diğer nedenlerden dolayı (karbon kaynağı ve azot eksikliği) ürettikleri L-DOPA'nın bir kısmını hücre içinde tutarlar. Ancak, L-DOPA birincil derecede hücre dışına (besi ortamına) atılan bir metabolittir. Bu nedenle L-DOPA üretimi ayrı ayrı olarak hücre içi ve hücre dışı olarak belirlenebilir.

Bu kısımda farklı inkübasyon zamanlarından ve farklı ortamlardan gelen bütün *E. herbicola* 3466 yabanıl suşu ve onun vgb^+ rekombinant suşu ile *vgb* içermeyen (vgb^-) suşların L-DOPA ve dopamin üretim karakteristikleri araştırılmıştır. Kültür ortamları ve fazları için belirlenmiş olan TPL aktivitesinin bu bakteri tarafından L-DOPA ve dopamin üretimlerine nasıl yansıdığını anlamak ancak bu şekilde mümkün olmuştur. Benzer şekilde, hücreler tirozin içeren ve içermeyen LB ile tirozin içeren ve içermeyen M9 ortamlarında üç farklı kültür fazına kadar inkübe edilmiş, hücre içi ve hücre dışı (besi ortamına salınan) L-DOPA ve dopamin miktarları belirlenmiştir.

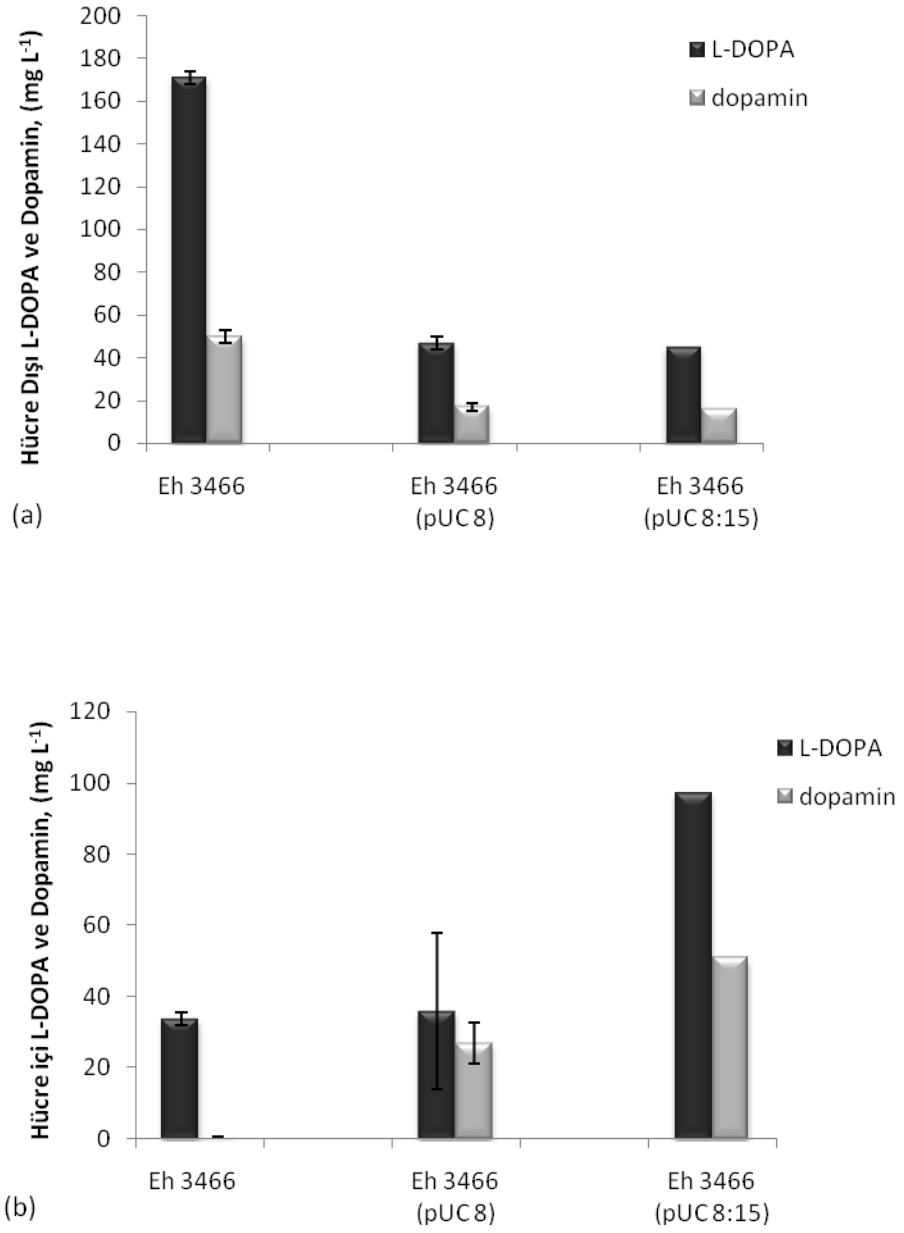
4.2.1. LB Ortamında Rekombinant Bakterilerin L-DOPA ve Dopamin Üretimi

Zengin bir besi ortamı olan LB'de kültürü yapılan *E. herbicola* bakterisinin yabanıl suşları ile bu bakterinin pUC8 plazmidini taşıyan rekombinantı ve aynı plazmidin *vgb* geni taşıyan formu olan pUC8:15 plazmidini taşıyan rekombinant hücrelerinin L-DOPA ve dopamin miktarları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Hücre içi ve hücre dışı (kültür ortamına salınan) L-DOPA üretimi 24. saat kültürlerinde 12. ve 48. saat kültürlerine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla bundan sonraki yaptığımız çalışmalarda L-DOPA üretimi için inkübasyon zamanı 24 saat olarak seçilmiştir. LB ortamında hem *E. herbicola*'ya *vgb* geni klonlanmış (vgb^+) rekombinant suşu ile *vgb* geni içermeyen (vgb^-) suşu yabanıl tipi ile kıyaslandığında hücre içi L-DOPA ve dopamin miktarında önemli bir artış olduğu saptanmıştır.

Aynı ortamın *vgb* geni taşıyan *E. herbicola* [pUC8:15] rekombinatının hücre içi L-DOPA ve dopamin miktarları yabanıl konakçısı ile karşılaştırıldığında sırası ile 2.8 kat ve 101.6 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Yani vgb geni taşıyan rekombinantının

hücre içi L-DOPA ve dopamin miktarı yabanıl suşuna göre önemli ölçüde artış göstermiştir (Şekil 4.1 (b)).



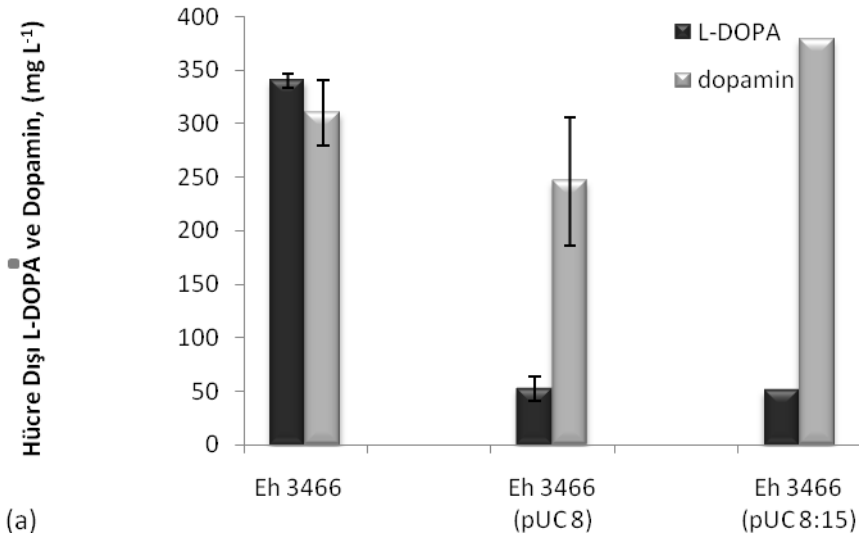
Şekil 4.1. LB ortamında *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'nın 24 saate hücre dışı (a) ve hücre içi (b) L-DOPA (■) ve dopamin (■) miktarları.

4.2.2. LB-Tirozin Ortamında Rekombinant Bakterilerin L-DOPA ve Dopamin Üretimi

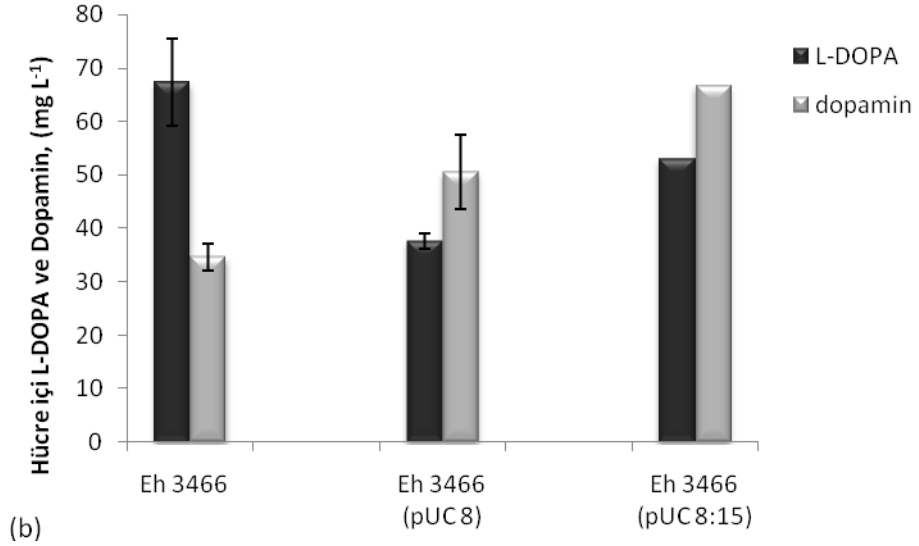
Zengin bir besi ortamı olan LB'ye L-tirozinin %0.1 oranında eklenmesi L-DOPA ve dopamin üretiminde önemli bir artışa sebep olmuştur. Bu ortamda kültürü yapılan yapılan *E. herbicola* bakterisinin yabanıl suşu ile bu bakterinin pUC8 ve pUC8:15 plazmidini taşıyan rekombinant hücrelerinin L-DOPA ve dopamin miktarları Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

LB ortamına %0.1 L-tirozin ilave edilmesi neticesinde *E. herbicola* 3466 hem *E. herbicola* 3466 [pUC8] hem de *E. herbicola* 3466 [pUC8:15] ile kıyaslandığında L-DOPA ve dopamin miktarında önemli bir artış olduğu saptanmıştır. Bu bakterinin *vgb* geni klonlanmış (vgb^+) rekombinantı yabanıl suşuna göre hücre içi dopamin miktarının 2 kat daha fazla olduğu saptanmıştır.

E. herbicola'nın hem yabanıl suşu hem de rekombinantlarının üretikleri L-DOPA'nın belirli bir kısmı hücre içinde tutulurken fazla üretilen L-DOPA hücre dışına salınmaktadır. LB ortamında kültivasyondan gelen rekombinant bakteriler hücre dışına hücre içindeki kadar L-DOPA saldıkları belirlenmiştir. LB ortamına %0.1 tirozin eklendiğinde üretim arttığından hücre dışına salınan L-DOPA ve dopamin miktarında da artış gözlenmektedir (Şekil 4.2).



(a)

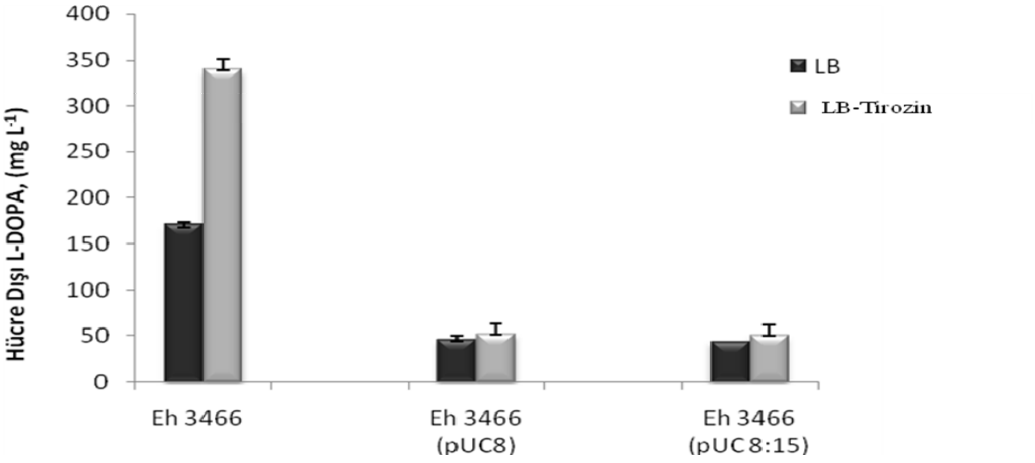


Şekil 4.2. LB + %0.1 tirozin ortamlarında *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 24 saate hücre dışı (a) ve hücre içi (b) L-DOPA (■) ve dopamin (■) miktarları.

4.2.3. *E. herbicola'*nın ve Rekombinantlarının Farklı Kültür Koşullarındaki L-DOPA ve Dopamin Üretim Kapasitesi

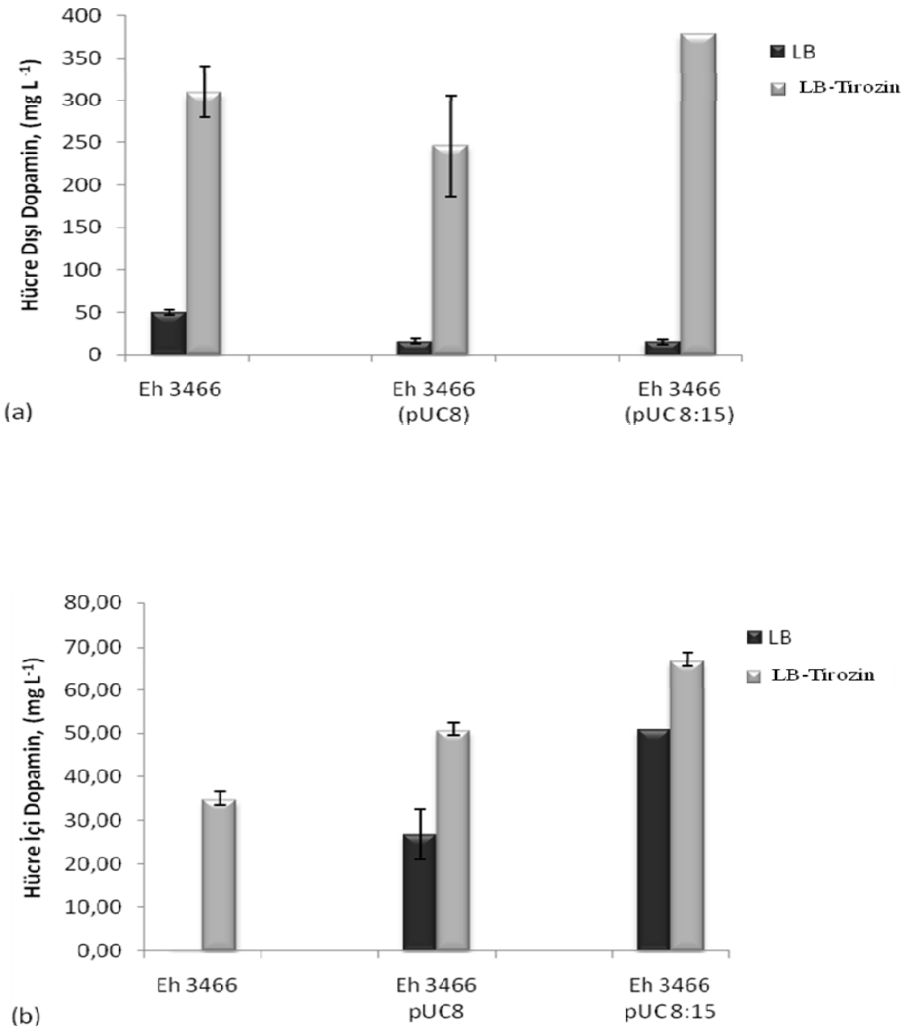
Zengin bir besi ortamı olan LB ortamına L-tirozinin % 0.1 oranında eklenmesi enzim seviyesinde önemli artışa sebep olmuştur. LB + % 0.1 tirozin ortamında hem *E. herbicola*'nın pUC8 plazmidini taşıyan ve aynı plazmidin *vgb* geni taşıyan rekombinantları LB ortamındakilerle kıyaslandığında L-DOPA ve dopamin miktarlarında önemli bir artış olduğu saptanmıştır. Şekil 4.3'de *E. herbicola* ve rekombinant hücrelerinin LB ve LB + %0.1 tirozin ortamlarında ürettikleri hücre içi ve hücre dışı L-DOPA ve dopamin miktarları verilmiştir.

L-tirozinin L-DOPA üretimini indükleyici etkisi hücre içi ve hücre dışı L-DOPA için farklı olmuştur. *E. herbicola*'nın *vgb* geni klonlanmış (vgb^+) rekombinant bakterisinde L-tirozin içeren LB kültürlerde bu amino asiti içermeyen LB kültürlerine göre hücre dışı L-DOPA üretiminin 1.13 daha fazla olduğu saptanmıştır. Yine *E. herbicola*'nın *vgb* geni içermeyen (vgb^-) rekombinant bakterisinde L-tirozin içeren LB kültürlerde bu amino asiti içermeyen LB kültürlerine göre hücre dışı L-DOPA üretiminin ise 1.12 daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 24 saate LB (■) ve LB + %0.1 tirozin (■) ortamında hücre dışı L-DOPA miktarı.

Şekil 4.4'da gösterildiği gibi L-tirozinin dopamin üretimini indükleyici etkisi hücre içi ve hücre dışı dopamin miktarların da farklılık gösterir. *E. herbicola* 3466'nın L-tirozin içeren LB kültürlerinin bu amino asiti içermeyen LB kültürlerine göre hücre dışı dopamin miktarı kıyaslandığında 6.24 kat artış saptanırken, *E. herbicola* 3466[pUC8:15]'ın L-tirozin içeren LB kültürlerinin bu amino asiti içermeyen LB kültürlerine göre hücre dışı dopamin miktarı 23.75 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. *E. herbicola* 3466[pUC8] L-tirozin içeren LB kültürlerinin bu amino asiti içermeyen LB kültürlerine göre hücre dışı dopamin miktarı ise 14.4 kat daha fazla belirlenmiştir. *vgb* geni klonlanmış (vgb^+) rekombinant bakterisinin hücre içi dopamin miktarının ise %31 kadarı olduğu belirlenmiştir.

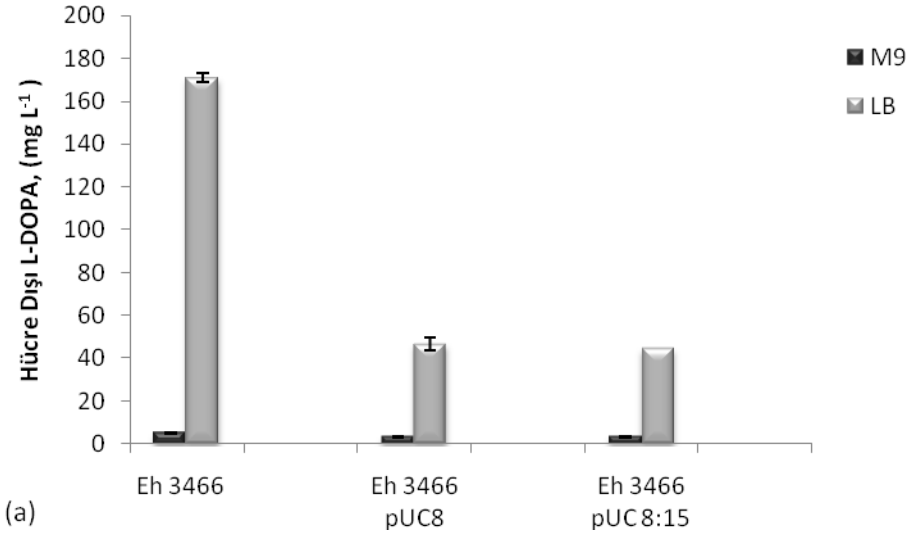


Şekil 4.4. *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 24 saate LB (■) ve LB + %0.1 tirozin (■) ortamında hücre dışı (a) ve hücre içi (b) dopamin miktarları.

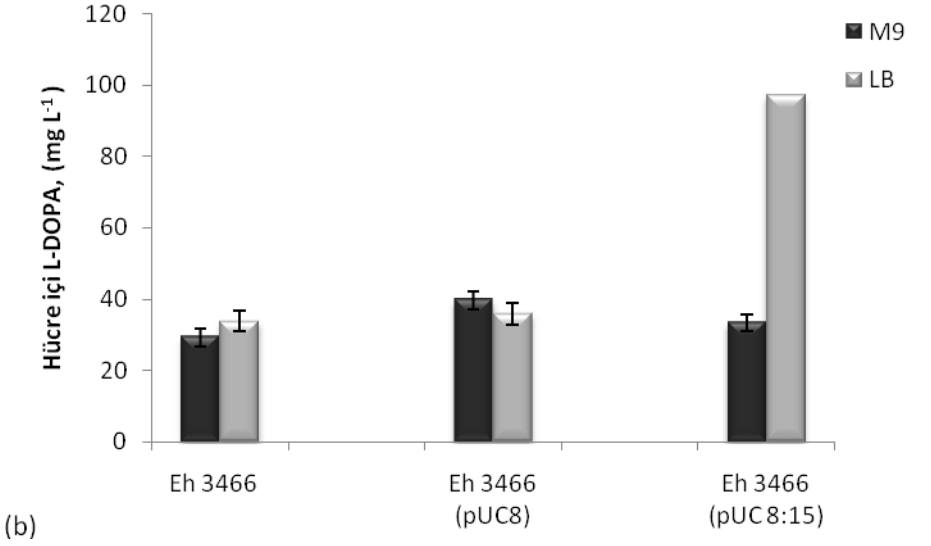
Zengin bir besiyeri olan LB ve fakir bir besiyeri olan minimal besi (M9) ortamı ile bunların tirozin içeren besiyeri ortamları gibi farklı kültür koşullarındaki *Erwinia herbicola* 3466 ile *E. herbicola* 3466[pUC8] ve *E. herbicola* 3466[pUC8:15]'in hücre içi ve hücre dışı L-DOPA ve dopamin üretimi Şekil 4.5' de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan LB besiyerine tirozin eklendiğinde L-DOPA ve dopamin üretiminde artış gözlenmiştir. Bu artışın L-tirozin ilave edilmiş M9 ortamı ile kıyaslanınca, LB + % 0.1 tirozinin ortamında daha yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir.

E. herbicola'nın yabanıl suşunun LB ortamında ürettiği hücre dışı L-DOPA ve dopamin miktarı M9 ortamındaki ile kıyaslandığında sırasıyla 34.27 ve 13.03 kat olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5 (a,d)). *E. herbicola* 3466[pUC8:15] ise bu oran hücre dışı

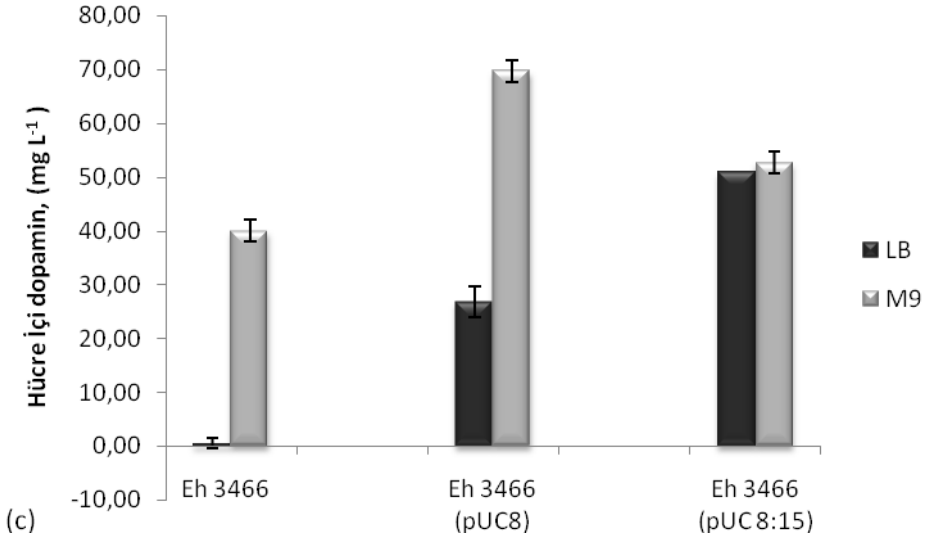
L-DOPA'da 13.95 kat iken hücre dışı dopaminde 3.92 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde bu oran *E. herbicola* 3466[pUC8] hücre dışı L-DOPA 14.65 kat daha fazlayken hücre dışı dopamindeki bu oran 3.88 kat olarak saptanmıştır. Burada dikkat çeken bir özellik her iki ortamda da hücre içi L-DOPA miktarının hücre dışı miktarının aksine birbirine yakın çıkmış olmasıdır. Dolayısı ile iki ortam arasında toplam L-DOPA miktarı arasındaki fark tamamı ile hücre dışı L-DOPA'dan gelmektedir. Bütün bunlar göstermektedir ki, üretilen L-DOPA'nın belirli bir kısmı hücre içinde tutulurken fazla üretilen L-DOPA hücre dışına salınmaktadır. LB ortamına %0.1 tirozin eklendiğinde üretim arttığından hücre dışına salınan L-DOPA miktarı da buna paralel olarak 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 gereksinim dışındaki az miktardaki L-DOPA'yı ise hücre dışına salmıştır.



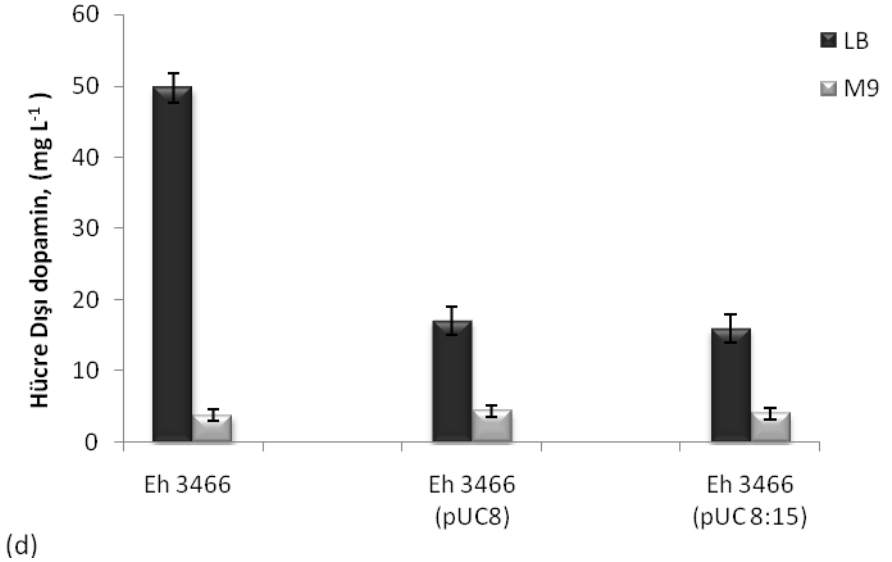
(a)


120
100
80
60
40
20
0
Hücre içi L-DOPA, (mg L-1)
M9
LB
Eh 3466
Eh 3466 (pUC8)
Eh 3466 (pUC 8:15)

(b)


80,00
70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
-10,00
Hücre İçi dopamin, (mg L-1)
LB
M9
Eh 3466
Eh 3466 (pUC8)
Eh 3466 (pUC 8:15)

(c)


60
50
40
30
20
10
0
Hücre Dışı dopamin, (mg L-1)
LB
M9
Eh 3466
Eh 3466 (pUC8)
Eh 3466 (pUC 8:15)

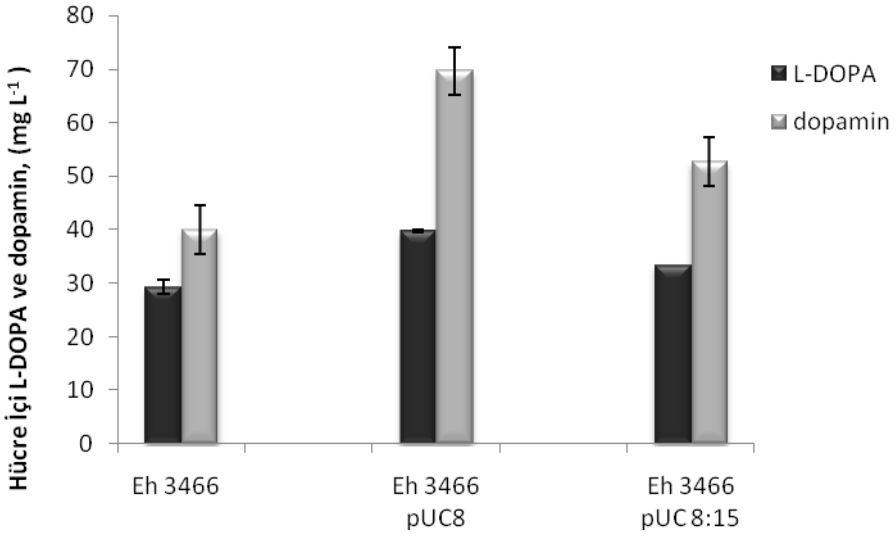
(d)

Şekil 4.5. *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 24 saate M9 (■) ve LB (■) ortamında hücre dışı (a) ve hücre içi (b) L-DOPA miktarları, hücre içi (c) ve hücre dışı (d) dopamin miktarları.

4.2.4. Minimal Besi (M9) Ortamında *Erwinia herbicola* ve Rekombinantlarının L-DOPA ve Dopamin Üretim Kapasitesi

Minimal besi (M9) ortamında kültürü yapılan *E. herbicola* 3466 ile *E. herbicola* 3466[pUC8] ve *E. herbicola* 3466[pUC8:15]'ın L-DOPA ve dopamin miktarları Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

M9 ortamında hücre içi L-DOPA miktarındaki artış oranının *E. herbicola* [pUC8] rekombinatı ile *vgb* geni taşıyan rekombinantı yabanıl suşuyla kıyaslandığında sırasıyla %35 ve %13.8 olduğu belirlenmiştir. Minimal besi (M9) ortamında hücre içi dopamin miktarındaki artış ise yine yabanıl suşuna göre *E. herbicola* [pUC8] rekombinatında 1.7 kat, *vgb* geni taşıyan *E. herbicola* [pUC8:15] rekombinantında ise bu artışın 1.3 olduğu saptanmıştır (Şekil4.6).



Şekil 4.6. *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 24 saate M9 ortamında L-DOPA (■) ve dopamin (■) miktarları.

Minimal besi (M9) ortamına L-tirozinin %0.1 oranında eklenmesi ile *E. herbicola* bakterisinin yabanıl suşunda hücre dışı L-DOPA ve dopamin miktarı sırasıyla 3.22 mg L^{-1} ve 4.78 mg L^{-1} olarak belirlenirken hücre içi miktarları L-DOPA'nın 22.31 mg L^{-1},

dopaminin 35.66 mg L^{-1} olarak saptanmıştır. Ayrıca M9 ortamına L-tirozinin %0.1 oranında eklenmesi *E. herbicola* 3466[pUC8] ile *E. herbicola* 3466[pUC8:15] suşlarında kiremit kırmızısı pigment olan piyomelanin üretimine neden olmuştur. Burada bakterinin ürettiği L-DOPA'yı hücre gereksinim duyduğu miktarda hücre içinde tutmuş, bu gereksinimin dışındaki L-DOPA'yı ise tirozinaz enzimi piyomelanine dönüştürmüştür.



Şekil 4.7. Üretilen L-DOPA tirozinaz enziminin aktivasyonu ile piyomelanine dönüştüğü düşünülmektedir.

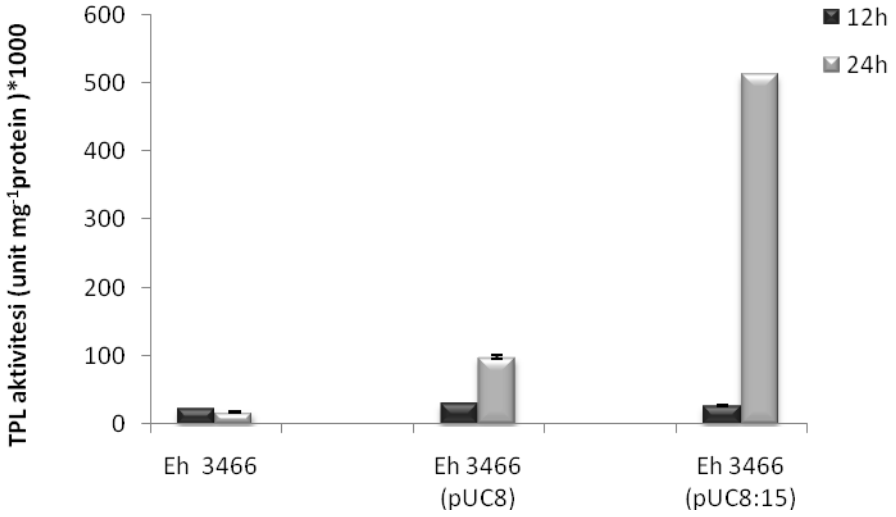
4.3. Farklı Kültür Koşullarının ve Kültür Fazlarının Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çalışmanın bu kısmında hem *Erwinia herbicola* 3466 hem de *E. herbicola* 3466[pUC8]ile *E. herbicola* 3466[pUC8:15]'ın farklı kültür koşulları altında TPL aktivitesinin nasıl değiştiği araştırılmıştır. Çalışmalarımızda L-tirozin eklenen ortamlarla L-tirozin içermeyen kontrol ortamları karşılaştırılmış ve hem minimal hem de zengin besi ortamında bu enzimin aktivitesi belirlenmiştir. Araştırmanın bu kısımda ayrıca farklı kültür fazlarındaki *E. herbicola* ve rekombinantlarının 12. ve 24. saatlerdeki hücrelerin TPL aktivitesinin nasıl değiştiği de araştırılmıştır.

4.3.1. LB Ortamında *Erwinia herbicola* 'nin Farklı Fazlardaki Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Aktivitesi

Zengin bir besi ortamı olan LB'de kültürü yapılan *E. herbicola* 3466 ile *E. herbicola* 3466[pUC8]ve *E. herbicola* 3466[pUC8:15]'ın farklı fazlardaki TPL aktivitesi Şekil 4.8' de gösterilmiştir.

LB ortamında hem *E. herbicola*'nın pUC8 plazmidini taşıyan ve *E. herbicola* 3466[pUC8:15] yabanıl suşu ile kıyaslandığında TPL aktivitesinde önemli bir artış olduğu saptanmıştır. Bu artış oranı *E. herbicola* [pUC8:15] rekombinatının genç hücrelerinde (12 saat) yabanıl konakçıya göre (*E. herbicola*) 1.3 kat artış olduğu belirlenmiştir. Aynı ortamın *vgb* geni taşıyan *E. herbicola* [pUC8:15] rekombinantlarının yaşlı hücrelerinde de (24 saat) benzer bir eğilim gözlenmiş ve 30 kat daha fazla TPL aktivitesi gözlenmiştir. Diğer bir deyimle *vgb* geni taşıyan rekombinantının enzim aktivitesi zamana bağlı olarak önemli ölçüde artış göstermiştir. Bu bakterinin *vgb* geni taşıyan rekombinantın en yüksek enzim aktivitesi 24 saatteki hücrelerde olduğu belirlenmiştir.

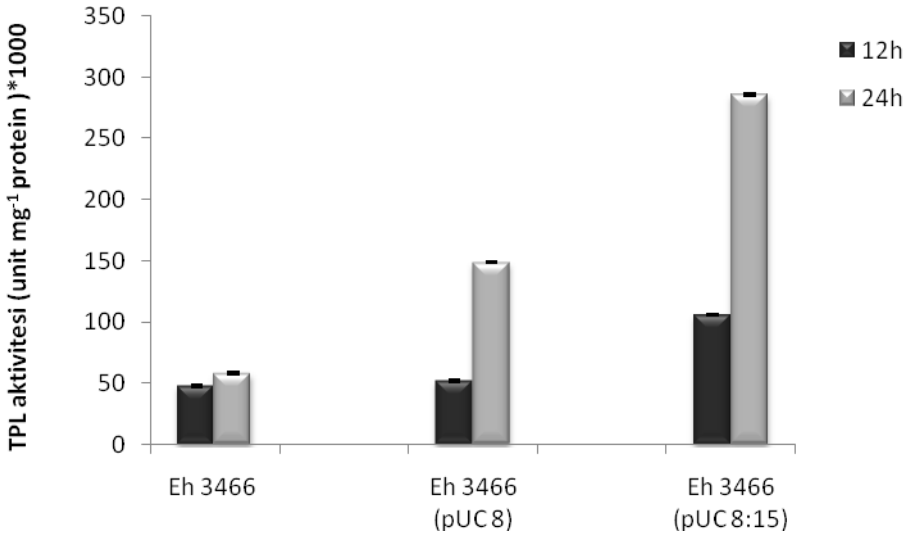


Şekil 4.8. *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 12 saat (■)ve 24 saate (■) LB ortamında TPL aktivitesi.

4.3.2. LB-Tirozin Ortamında *Erwinia herbicola* 'nin Farklı Fazlardaki Tirozin Fenol Liyaz (TPL) Aktivitesi

Zengin bir besi ortamı olan LB ortamına L-tirozinin %0.1 oranında eklenmesi enzim seviyesinde önemli artışa sebep olmuştur. LB-tirozin ortamında hem *E. herbicola*[pUC8] hem de *E. herbicola* 3466[pUC8:15] yabanıl suşları ile kıyaslandığında TPL aktivitesinde önemli bir artış olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9). Bu artış oranını *E. herbicola* 3466[pUC8:15] rekombinantlarının yaşlı hücrelerde (24 saat) yabanıl suşa göre 5 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu da bize *vgb* geni taşıyan rekombinantın enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak önemli ölçüde artış kazandırdığını göstermiştir. Bu şekilde bakterinin *vgb* geni taşıyan rekombinantın en yüksek enzim aktivitesi 24 saatteki hücrelerde olduğu belirlenmiştir.

L-tirozinin TPL enzimini indükleyici etkisi oldukça barizdir. Tirozin ilavesi yapılan ortamda *E. herbicola* [pUC8:15] rekombinatının 12 saatte kültivasyondan gelen hücreleri ile bu amino asiti içermeyen LB ortamının aynı fazındaki hücreler kıyaslandığında 2.2 kat daha fazla aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu ortamdaki artış oranını *E. herbicola* [pUC8:15] rekombinantlarının yaşlı hücrelerde (24 saat) yabanıl suşa göre 5 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. (Şekil 4.9).

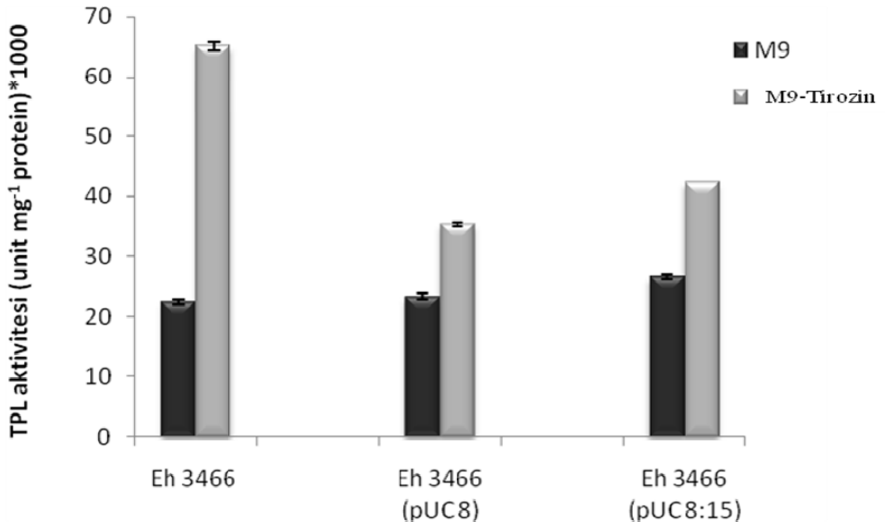


Şekil 4.9. *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 12 saat (■) ve 24 saate (■) LB+ %0.1tirozin ortamındaki TPL aktivitesi.

4.3.3. Minimal Besi (M9) Ortamında *Erwinia herbicola*'nın Tirozin Fenol Liyaz Aktivitesi

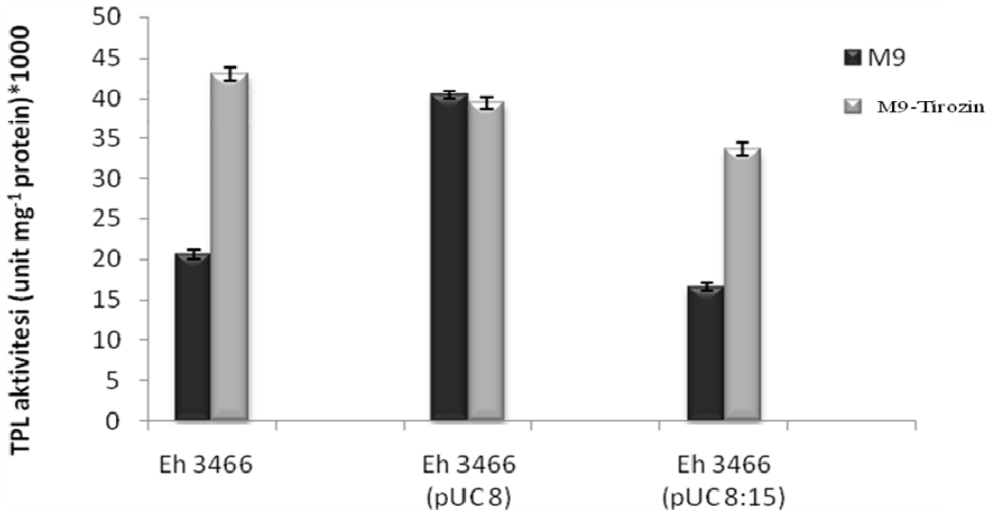
Minimal besi (M9) ortamında kültürü yapılan *E. herbicola* 3466 ile *E. herbicola* 3466[pUC8] ve *E. herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın TPL aktivitesi Şekil 4.10' da gösterilmiştir. Bu ortama L-tirozinin % 0.1 oranında eklenmesi TPL eksprasyonu üzerinde indükleyici bir etki yaptığı görülmektedir. Ancak, bu 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.

Enzim aktivitesi hem minimal (M9) ortamda ve hem de L-tirozinle desteklenen M9 ortamında belirlenmiştir. 12. saatte tirozin ilave edilmiş kültürlerde TPL enzim aktivitesinde artış oranı minimal ortamla kıyaslandığında *E. herbicola* [pUC8] rekombinatın 1.52 kat ve *vgb* geni taşıyan rekombinantında ise 1.59 kat olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 12 saate M9 (■) ve M9+ %0.1tirozin (■) ortamındaki TPL aktivitesi.

Aynı ortamın yaşlı hücrelerinde de (24 saat) benzer bir eğilim gözlenmiştir. *E. herbicola* yabanıl suşunda 2.1 kat artarken, *E. herbicola* [pUC8:15]'de ise 2.02 kat artış olduğu belirlenmiştir. Diğer bir deyimle *vgb* geni taşıyan rekombinantında enzim aktivitesi genç hücrelerde tirozine bağlı olarak önemli ölçüde artış göstermiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *Erwinia herbicola* 3466, *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8] ve *Erwinia herbicola* 3466 [pUC8:15]'ın 24 saate M9 (■) ve M9-tirozin (■)ortamındaki TPL aktivitesi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaşadığımız yüzyılın en önemli teknolojik devrimlerinden biri olarak kabul edilen genetik mühendisliği, insanlığın geleceğini etkileyecek olgular arasında sayılmaktadır. Moleküler biyoloji ve gen teknolojisindeki baş döndürücü gelişmelerin kısa sürede yaşama geçirilmesiyle insan sağlığından tarıma, kimya mühendisliğinden çevre korumaya, gıda üretiminden enerji sektörüne kadar yaşamın hemen hemen her alanında etkisini hissettirmektedir.

Endüstriyel açıdan önemli fermentatif ürünler olan L-DOPA ve dopaminin VHb/ *vgb* sistemini içeren rekombinant mikroorganizmalar kullanılarak mikrobial üretimi bu çalışmada ilk kez araştırılmıştır. *Erwinia herbicola'*nın yabanıl suşu ile bu bakterinin pUC8 plazmidini taşıyan rekombinantı ve aynı plazmidin *vgb* geni taşıyan formu olan pUC8:15 plazmidini taşıyan rekombinant hücrelerinin L-DOPA ve dopamin üretim yeteneği ile *tirozin fenol liyaz* (TPL) enzim değişimi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. VHb/*vgb* sisteminin, ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ve kültürün ileri fazlarında membran transferazlarına aktarılarak yaşlı hücrelere daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma yeteneği sağlaması önemli avantajdır.

Kültür ortamı olarak zengin bir besi yeri olan LB ve minimal bir ortam olan M9 besi ortamları kullanılmıştır. Ayrıca, L-tirozinin L-DOPA ve dopaminin oluşumunda öncül olmasının yanı sıra *tirozin fenol liyaz* (TPL) enziminin ifadesini indüklemesi sebebiyle besiyerlerinde L-tirozin de eklenmiştir. L-tirozinin %0.1'lik konsantrasyonda etkili olduğu saptanmıştır. Bu konsantrasyonun altında TPL aktivitesinde önemli artış gözlenmezken, üstünde hücre çoğalmasının negatif etkilendiği saptanmıştır. Bu durum, bu amino asitin membran üzerine olası negatif etkisinden kaynaklanmış olabilir. Lyte ve ark. (1992–1993) çalışmalarında, L-tirozin ve ondan gelen katekol, katekolamin ve türevlerinin hidrofobik yapıları nedeniyle membran bütünlüğünün ve böylece membran elektrik potansiyelinin bozulmasına neden olduğunu belirtmişlerdir [65, 172].

Yapılan çalışmada tüm besi yerlerinde en yüksek L-DOPA üretiminin 24 saatlik kültürlerle elde edilebileceği belirlenmiştir. Bu madde gibi substratlardan (katekol, katekol türevleri, L-tirozin) oluşan maddeler, ileri kültür fazlarında işlenmektedir ve ayrıca L-DOPA ve dopamin oluşan bu ürünler besin ve enerji kaynağı olarak da kullanılabileceklerini belirtilmektedir. Schweigert ve ark. bakteri kültür ortamlarına eklenen bu maddelerin bakteriler tarafından kolayca metabolize edilerek onların

çoğalmasına katkıda bulunduğunu belirlemişlerdir [173]. Buna bağlı olarak, çalışmada L-tirozin 12 saatlik hücrelere 6. saate, 24 saatlik hücrelere ise 12. saate eklenmiştir.

TPL enzim sentezinin tirozinle indüklenmesi L-DOPA üretimi için avantaj sağlamaktadır. Tirozinin çözündüğü pH değeri ya çok düşük ya da çok yüksektir. Nötral pHda tirozin hemen hemen çözünmemektedir. *E. herbicola*'nın üreme ortamının pH değeri ise nötral veya bazik değerlere yakın olmalıdır. Bu durum ortama konulacak tirozin miktarını sınırlamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada kullanılan tirozin miktarı (%0.1) bakteri kültürizasyonu için gerekli olan optimum koşulları değiştirmeyecek düzeyde hazırlanmıştır.

L-DOPA vücutta hayati önem taşıyan nörotransmisyon olayını gerçekleştiren nörotransmitter grubuna dahil olan katekolaminlerin (dopamin, nörepinefrin 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 septomlarının artması ve hastalığın görüldüğü yaş grubunun 50–60 yaş grubundan 30–40 yaş grubuna düşmesi daha fazla L-DOPA'ya ve ayrıca mevcut sentez mekanizmalarının yanında alternatif mekanizmalara da ihtiyaç duyulacağını göstermektedir [21]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, özellikle rekombinant bakterilerde L-DOPA lehine önemi bir artış olduğunu göstermektedir.

L-DOPA sentezinden sorumlu olan TPL enzimi bakterilerin üreme ortamında tirozinin bulunmasıyla indüklenmektedir. Dolayısıyla L-DOPA sentezinde tirozin önemli bir yere sahiptir. Katayama ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada tirozin varlığında *tpl* promotorunun TyrR proteini ile aktive edildiğini saptamışlardır. TyrR'nin aromatik amino asit metabolizması için gerekli olan genlerin regülasyonunda merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir. Araştırmacılar TyrR genini mutasyona uğrattıklarında ortama tirozin konulmadan bakterilerin önemli derecede *tpl* ekspresyonu yapabildiği göstermişlerdir. Yüksek verim ve yüksek saflıkta L-DOPA oluşması için bu rekombinant hücrelerin oldukça uygun olduğu düşünülmektedir. Ayrıca L-DOPA sentezinden sorumlu enzimler saflaştırılarak sentetik bir ortamda L-DOPA üretimi gerçekleştirilmiştir. Sentetik ortamda yapılan üretimde devamlı pH kontrolü yapılmalı ayrıca substrat, kofaktör ve koenzim miktarlarının devamlı ayarlanması gerekmektedir [175].

Diğer bir çalışmada ise ucuz bir fabrika atığı olan benzenden L-DOPA üretimi yapılmıştır. Bu çalışmada hibrit bir yol izlenmiştir. Bu hibrit yol benzenden katekol üretildikten sonra katekolden L-DOPA üretimini içermektedir. Benzenden katekol

üretimi için iki enzim gerekmektedir. Bunlar *toluen dioksigenaz* (TDO) ve *toluen cis-glikol dehidrogenaz* (TCGDH) enzimleridir. Katekolden L-DOPA üretimi için ise TPL enzimine ihtiyaç vardır. Bu üç enzimin genleri bir plazmide aktarılarak *E. coli* ve *P. aeruginosa'*ya transforme edilmiştir. Ancak belirli bir seviyenin üzerinde oluşan katekol ve benzen bu rekombinant bakteriler etkilenmektedirler. Bu nedenle etkili bir L-DOPA üretimi yapılamamıştır [162].

Bakterilerde şu ana kadar L-DOPA ve dopamin üretimi mutant veya rekombinant hücreler oluşturarak ya da saf enzimler kullanarak yapılmıştır. Oluşturulan sentetik ortamlarda etkili ürün elde edilebilmiştir. Fakat böyle bir ortamda devamlı olarak kontrolün ve optimum koşulların sağlanması her zaman mümkün olmayabilir.

Yapılan bu çalışmada L-DOPA ve dopaminin VHb/*vgb* sistemini içeren rekombinant mikroorganizmalar kullanılarak üretimi sağlanmıştır. *Erwinia herbicola* 3466 ile *E. herbicola* 3466[pUC8] ve *E. herbicola* 3466[pUC8:15]'ın L-DOPA ve dopamin miktarları ile *tirozin fenol liyaz* (TPL) enziminin aktivitesi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda *Vitreosilla* hemoglobin genin ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ile kültürün ileri fazlarında membran transferazlarına oksijeni aktararak yaşlı hücrelere daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma karakteristiği sağlayarak önemli bir avantaj sağladığı belirlenmiştir.

E. coli'de 200'den fazla genin ortam oksijen seviyesi ile direk ilişkili olarak regüle oldukları sanılmaktadır. Bu çalışmanın konusunu oluşturan *vgb* geni de benzer şekilde oksijenle regüle olan bir gendir. Bu genin promotorunun optimal aktivasyonu için FNR ile CRP'nin koordineli olarak promotor bölgedeki kendine özel DNA bölgelerine bağlanmaları gerekmektedir. Bu gen anaerobik şartlar altında maksimum düzeyde indüklenmekle beraber, aerobik ortamlarda bu genin ekspresyonu baskılanmaktadır.

Vitreosilla hemoglobin geninin klonlanmış olduğu tüm organizmalarda, regülasyonu oksijenle olan birçok metabolit ve rekombinant proteinin sentezinde önemli artış gözlenmiştir. Özellikle, bakteri ve funguslarda VHb'nin hem solunumu hem de büyümeyi arttırma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı, VHb teknolojisi genel olarak oksijence fakir şartların bulunduğu alanlarda ve oluşumları belli kritik seviyede oksijen gerektiren biyoremediasyondan rekombinant protein üretimine kadar bütün biyoproseslerde uygulama alanı bulabilmektedir [26–28]. Ayrıca "VHb teknolojisi"nin kullanılması ile toksik aromatik bileşiklerin mikrobiyal oksidatif yıkımlarının arttığı rapor edilmiştir [29].

Yapılan bazı çalışmalarda VHb'nin *Pseudomonas*'larda biyoremediasyonu arttırmada önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir [126, 127]. Bunun en önemli nedenlerinden birisi de yabanıl türlere oranla VHb aktarılan türlerin daha yüksek oksijen alınımına sebep olmasıdır [123, 128]. *Vitreosilla* hemoglobin ile ilgili olarak yapılan diğer çalışmalar değerlendirildiğinde elde edilen bulgularla bu çalışmadaki bulgular paralellik göstermiştir.

Bu çalışmada doğal büyüme ortamında L-DOPA ve dopamin üretmesi ile bilinen *Erwinia herbicola* (NRRL B–3466)'ya vgb^+ genini ihtiva eden plazmid transformasyonu yapılmış ve bunun yaşlı hücrelerde daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma karakteristiği sağlayarak L-DOPA ve dopamin üretiminde önemli artışa neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca *E. herbicola*'ya vgb^- olan Ea[pUC8] plazmidinin de transformasyonu yapılarak L-DOPA ve dopamindeki artışın aktarılan plazmiden mi yoksa *vitreosilla* hemoglobin geninden mi olduğu da araştırılmıştır. Üreme ortamlarına eklenen tirozin ile L-DOPA ve dopamin miktarında ile *tirozin fenol liyaz* (TPL) enziminin aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir.

E. herbicola ve rekombinantlarının 12 ve 24 saat olmak üzere üç farklı zamanda kültürü yapılmıştır. Bu sayede genç ve yaşlı hücrelerdeki L-DOPA üretiminin nasıl olduğu araştırılmıştır. Ayrıca bakteriler zengin besi ortamı olan LB ve fakir besi ortamı olan M9'da üretilerek L-DOPA ve dopamin üretiminin hangi besi ortamında daha iyi olduğu çalışılmıştır. Araştırmalar sonucunda LB ortamında L-DOPA ve dopamin üretiminin 24 saatte maksimum olduğu belirlenmiştir. vgb^+ genini taşıyan Eh[pUC8:15] bakterisinde hem L-DOPA hem de dopamin miktarı arttığı saptanmıştır. L-DOPA ve dopamin miktarlarının yabanıla göre sırası ile 2.8 ve 101.6 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1 (b)). Buda vgb^+ geni taşıyan rekombinant bakterinin hücre içi L-DOPA ve dopamin miktarında önemli oranda artış olduğunu göstermektedir. Ayrıca LB ortamında üretilen rekombinant bakterilerde (vgb^+ ve vgb^-) hücre içi L-DOPA ve dopamin miktarı hücre dışında (LB ortamına salınan) daha fazladır. Bu bakterilerin ürettiği L-DOPA ve dopamini muhtemelen ileri kültür fazlarında besin ve enerji kaynağı olarak kullanmak üzere depolanmıştır. Rekombinant bakterilere fazladan bir yük olan plazmide gerekli proteinleri sentezlemek için bu maddeler daha fazla hücre içinde tutulmuş olabilir.

Tirozin Parkinson hastalığının tedavisinde en etkili semptomik ilaç olarak kullanılan L-DOPA veya levodopa gibi önemli birçok bileşiğin sentezini başlatan öncül bir amino asittir [53-55]. LB'ye %0.1 L-tirozin ilave edilen ortamda *E. herbicola* 3466, *E. herbicola* 3466[pUC8:15] ile *E. herbicola* 3466[pUC8] suşları ile kıyaslandığında L-

DOPA ve dopamin miktarında önemli bir artış olduğu saptanmıştır. *E. herbicola* 3466[pUC8:15] yabanıl suşa göre hücre içi dopamin miktarının 2 kat daha fazla artış göstermesi yukarıdaki çalışmalarla bütünleştirildiğinde anlamlı bir sonuç teşkil etmektedir (Şekil 4.2).

E. herbicola'nın hem yabanıl suşu hem de rekombinantlarının üretikleri L-DOPA'nın belirli bir kısmı hücre içinde tutulurken fazla üretilen L-DOPA hücre dışına salınmaktadır. LB ortamında kültivasyondan gelen bu bakteriler hücre dışına hücre içinde ürettiği kadar L-DOPA saldıkları belirlenmiştir. LB ortamına %0.1 tirozin eklendiğinde üretim arttığından hücre dışına salınan L-DOPA miktarında da artış gözlenmiştir (Şekil 4.3).

Tirozin fenol liyaz (TPL) genin ifadesi tirozinle indüklenmekte ve buna bağlı olarak da L-DOPA üretimi de artmaktadır [20, 21]. Yaptığımız çalışmadaki sonuçlarda bu çalışmalardaki bulgularla örtüşmektedir. *E. herbicola* ve rekombinant hücrelerinin L-DOPA ve dopamin üretiminin L-tirozin ile indüklendiği belirlenmiştir. LB ve LB + %0.1 tirozin ortamlarında ürettikleri hücre içi ve hücre dışı L-DOPA ve dopamin miktarları kıyaslandığında L-tirozinin L-DOPA üretimini indükleyici etkisi hücre içi ve hücre dışı L-DOPA için farklı olmuştur. *E. herbicola* 3466[pUC8:15] L-tirozin içeren LB kültürlerde bu amino asiti içermeyen LB kültürlerine göre hücre dışı L-DOPA üretiminin 1.13 daha fazla olduğu saptanmıştır. *E. herbicola* 3466[pUC8] L-tirozin içeren LB kültürlerde bu amino asiti içermeyen LB kültürlerine göre hücre dışı L-DOPA üretiminin ise 1.12 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil4.3).

L-tirozinin dopamin üretimini indükleyici etkisi de L-DOPA gibi hücre içi ve hücre dışı dopamin miktarlarında farklılık göstermiştir. *E. herbicola* 3466 L-tirozin içeren LB kültürlerde bu amino asiti içermeyen LB kültürlerine göre hücre dışı dopamin miktarı kıyaslandığında 6.24 kat artış saptanırken, *E. herbicola* 3466[pUC8:15] L-tirozin içeren LB kültürlerde bu amino asiti içermeyen LB kültürlerine göre hücre dışı dopamin miktarı 23.76 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. *E. herbicola* 3466[pUC8:15] L-tirozin içeren LB kültürlerde bu amino asiti içermeyen LB kültürlerine göre hücre dışı dopamin miktarı ise 14.4 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4 (a)).

LB ortamı L-DOPA ve dopamin için en uygun ortam olmasının yanında, bu ortamla verilen L-tirozin M9 ortamına göre daha yüksek düzeyde bir L-DOPA üretimini sağladığı belirlenmiştir. *E. herbicola*'nın yabanıl suşu LB ortamında ürettiği hücre dışı L-DOPA ve dopamin miktarı M9 ortamında üretilenin sırasıyla 34.27 ve 13.03 kat olduğu saptanmıştır. *E. herbicola*'nın *vgb* geni klonlanmış (*vgb*$^{+}$) rekombinant bakterisinde ise bu oran hücre dışı L-DOPA'da 13.95 kat iken hücre dışı dopaminde

3.92 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde bu oran *E. herbicola*'nın *vgb* geni içermeyen (*vgb*$^-$) rekombinant bakterisinde hücre dışı L-DOPA 14.65 kat daha fazlayken hücre dışı dopamindeki bu oran 3.88 kat olarak saptanmıştır (Şekil 4.5 (a,d)). 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 bu fark tamamı ile hücre dışı L-DOPA'dan gelmektedir. Bütün bunlar göstermektedir ki, üretilen L-DOPA'nın belirli bir kısmı hücre içinde tutulurken fazla üretilen L-DOPA hücre dışına salınmaktadır. LB ortamına %0.1 tirozin eklendiğinde üretim arttığından hücre dışına salınan L-DOPA miktarı da artmıştır. M9 ortamında ise hücre dışına salınan L-DOPA miktarı çok az olduğu belirlenmiştir. 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 saldığını bize göstermiştir.

Bakterilerin büyüme ve çoğalmasında sınırlayıcı bir rol oynayan minimal ortam (M9) ortamında hücre dışı L-DOPA ve dopamin miktarları birbirine yakın çıkmıştır. Fakat bu ortamında hücre içi L-DOPA ve dopamin miktarındaki artış gözlenmiştir. L-DOPA'da bu artış oranı *E. herbicola* [pUC8] rekombinatı yabanıl suşuyla kıyaslandığında %35 kat ve *vgb*$^+$ geni taşıyan rekombinantında ise %13.8 kat olduğu belirlenmiştir. Minimal besi (M9) ortamında hücre içi dopamin miktarındaki artış ise yine yabanıl suşuna göre *E. herbicola* [pUC8] rekombinatında 1.7 kat iken, *vgb*$^+$ geni taşıyan pUC8:15 plazmidini bulunduran rekombinant hücrelerininde bu artışın 1.30 olduğu saptanmıştır. Buda VHb klonlanmış olduğu hücrelerde daha iyi bir oksijen alım ve kullanım potansiyeli kazandırırken [92, 136, 137] bu proteinin hücre üreme ve çoğalması üzerine etkisinin olduğunu göstermektedir [138–140]. Bu çalışmadaki sonuçlar da *vgb* geninin büyüme ve çoğalmalarında sınırlayıcı etki gösteren minimal ortamda dahi daha iyi oksijen alım ve kullanım potansiyeli olduğunu göstermiştir.

Ayrıca çalışmamızda *vgb*$^+$ genini ihtiva eden plazmid transformasyonu yaptığımız *Erwinia herbicola*'ya ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ve onu kültürün ileri fazlarında membran transferazlarına aktararak yaşlı hücrelerin daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma karakteristiği sağlayan VHb/*vgb* sisteminin, TPL aktivitesi için de önemli bir avantaj sağladığı belirlenmiştir. LB ortamında hem *E. herbicola*'nın *vgb* geni taşıyan rekombinantları yabanıl suşu ile kıyaslandığında TPL aktivitesinde önemli bir artış olduğu saptanmıştır. Bu artış oranı *E. herbicola* [pUC8:15] rekombinatının genç hücrelerinde (12 saat) yabanıl konakçıya göre (*E. herbicola*) 1.3 kat artış olduğu belirlenmiştir. Aynı ortamın *vgb* geni taşıyan *E. herbicola* [pUC8:15]

rekombinantlarının yaşlı hücrelerinde de (24 saat) benzer bir eğilim gözlenmiş ve 30 kat daha fazla TPL aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 4.8). Diğer bir deyimle vgb geni taşıyan rekombinantının enzim aktivitesi zamana bağlı olarak önemli ölçüde artış göstermiştir. Bu bakterinin *vgb* geni taşıyan rekombinantın en yüksek enzim aktivitesi 24 saatteki hücrelerde olduğu belirlenmiştir. LB ortamına L-tirozinin %0.1 oranında eklenmesi enzim seviyesinde önemli artışa sebep olmuştur. Bu ortamdaki artış oranını *E. herbicola* [pUC8:15] rekombinantlarının yaşlı hücrelerde (24 saat) yabanıl suşa göre 5 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9).

L-tirozinin %0.1 oranında eklenmesi TPL eksprasyonu 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.

Bununla beraber enzim aktivitesi hem Minimal (M9) ortamda ve hem de L-tirozinle desteklenen M9 ortamında belirlenmiştir. 12. saatte tirozin ilave edilmiş kültürlerde TPL enzim aktivitesinde artış oranı minimal ortamla kıyaslandığında *E. herbicola* yabanıl suşunda 2.9 kat, *E. herbicola* [pUC8] rekombinatın da 1.5 kat ve *vgb* geni taşıyan rekombinantında ise 1.6 kat olduğu belirlenmiştir (Şekil4.11).

Sonuç olarak L-DOPA ve dopaminin bakteriyel sentezinde VHb/*vgb* sistemini içeren rekombinant mikroorganizmalar kullanılarak *vitreosilla* hemoglobin genin ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ve kültürün ileri fazlarında membran transferazlarına aktararak yaşlı hücrelerin daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma karakteristiği sağlayarak önemli bir avantaj sağlamıştır. Bu çalışma şu ana kadar yapılan L-DOPA ve dopamin sentez mekanizmalarından farklıdır. Çalışmada ilk kez tarafımızdan oluşturulan rekombinant bakterilerin doğal olarak L-DOPA ve dopamin sentezi araştırılmıştır. Metabolit üretimi açısından etkili bir tekniğin kullanıldığı bu çalışma, bu tekniklerle L-DOPA ve dopamin sentezlenin aktarılarabileceğini göstermektedir. Eh[pUC8:15] hücreleri L-DOPA ve dopamin üretiminde etkili bir şekilde kullanılabilir.

6. KAYNAKLAR

[1] T. Nagatsu, M. Levitt, S. Udenfriend, *Tyrosine hydroxylase: the initial step innorepinephrine biosynthesis.* **J. Biol. Chem.,** 239 (1964) 2910-17.

[2] B.G.H. Raju, C. Ayyanna, *Bioconversion of L-tyrosine to L-DOPA Nusing Aspergillus oryzae.* **CBS Publishers.**, (1993) 106–110.

[3] G. Flıng, and J. Paul, *Radiation induced production of L–3,4 dihydroxy phenylalanine by Aspergillus oryzae.* **Journal of Analytical Chemistry.,** 67(2001) 185–187.

[4] I. Haq, F. Iqbal, and M.A. Qadeer, *Production of L-DOPA from L-tyrosine by Aspergillus oryzae.* **Biologia.,** 44 (1998) 31–39.

[5] C.J. Sıh, P. Foss, J. Rosazza, and M. Lembagar, *Microbial synthesis of L–3,4-dihydroxy phenylalanine.* **Journal of Amniotic and Chemistry Society.,** 91 (1969) 62–64.

[6] R. Katzenschlager, A. J. Lees, *Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice* **J. Neurol.,** 249 (2002) 1119–1124.

[7] O. Hornykiewicz, *L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent*, **Biomedical and Life Sciences.,** 23 (2002) 65-70.

[8] http://www.nobelprize.org/chemistry/laureates

[9] Montgomer EB. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa Neurology (1992) 42–17.

[10] Y. Misu, Y. Goshima, **Trends Pharmacol.,** Sci. 14 (1993) 119–123.

[11] Y. Misu, Y. Goshima, T. Miyamae, **Trends Pharmacol.,** Sci. 23 (2002) 262–268.

[12] Z. L. Kruk, C. J. Pycock, *Dopamine. In: Neurotransmitters and drugs*, 3rd ed. Suffolk, UK: St. **Edmundsbury Press.,** (1991) 87–115.

[13] B. B. Hoffman, R. J. Lefkowitz, *Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists.* In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, editors. **The pharmacological basis of therapeutics.**, (1996) 199–248.

[14] A. Lisbon, *Dopexamine, dobutamine and dopamine increase splanchnic blood flow: What is the evidence?* **Chest.,** 123 (2003) 460–463.

[15] W. F. Ganong, Review of Medical Physiology. 17th edition, **Appleton & Lange.,** (1995) 89–93, 248, 327, 331, 390–391.

[16] A. Noyan, **Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji**, 11. baskı (1999) 243–245, 295, 301- 303, 446, 798, 1008–1010, 1079, 1085, 1142.

[17] H.D. Patton, A. F. Fuchs, B. Hille, A.M. Scher, R. Steiner, *Textbook of Physiology. Circulation, Respiration, Body Fluids, Metabolism and Endocrinology.* 21st edition, **W. B. Saunders İnternational Edition.,** (1989) 2:1209.

[18] S. Lee, S. Hong, M. Sung, *Development of an enzymatic system for the production of dopamine from catechol, pyruvate, and ammonia*. **Enzyme and Micro. Techno.,** 25 (1999) 298–302.

[19] J.D. Elsworth, R.H Roth, *Dopamine synthesis, uptake metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease*. **Exp Neurol.,** 144 (1997) 4–9.

[20] H. Kumagai, H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi, K. Ogata, *Tyrosine phenol-lyase. I. Purification, crystallization, and properties.* **J. Biol. Chem.,** 245 (1970) 1767–1772.

[21] A.A. Antson, T.V. Demidkina, P. Gollnick, Z. Dauter, R.L. Von Tersch, J. Long, S.N. Berezhnoy, R.S. Phillips, E.H. Harutyunyan, K.S. Wilson, *Three-dimensional structure of tyrosine phenol-lyase.* **Biochemistry.,** 32 (1993) 4195–4206.

[22] J.H. Kim, J.J. Song, B.G. Kim, M.H. Sung, S.G. Lee, *Enhanced stability of tyrosine phenol lyase from Symbiobacterium toebii by DNA shuffing*. **J.Microbial Biotechnol.,** 14 (2004) 153-157.

[23] T. Lükte-Eversloh, C.N.S. Santos, G. Stephanopoulos, *Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its application.* **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** 77 (2007) 751–762.

[24] H. Kumagai, H. Matsui, H. Ohkishi, K. Ogata, H. Yamada, T. Ueno, and H. Fukami, *Synthesis of 3,4-dihydrokxyphenyl-L-alanine froml-tyrosine and pyrocatecholby crystalline β-tyrosinase*. **Biochem. Biophys. Res**. **Commun.,** 34 (1969) 266–270.

[25] H. Yamada, H. Kumagai, N. Kashima, H. Torii, H. Enei, S. Okumura, *Synthesis of l-tyrosine from pyruvate, ammonia, and phenol by crystalline tyrosine phenol-lyase.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** 46 (1972) 370–374.

[26] T. Koyanagi, T. Katayama, H. Suzuki, H. Nakazawa, K. Yokozeki, H. Kumagai, *Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-l-alanine (L-DOPA) with Erwinia herbicola cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR.* **J. of Biotech.,** 115 (2005) 303–306.

[27] H. Enei, H. Matsui, K. Yamashita, S. Okumura, H. Yamada, *Distribution of tyrosine phenol lyase in microorganisms.* **Agric Biol Chem.,** 36 (1972) 1861–1868.

[28] H. Yamada, H. Kumagai, *Synthesis of L-tyrosine-related amino acids by beta-tyrosinase*. **Adv Appl Microbiol.,** 19 (1975) 249–88.

[29] S.G. Lee, S.P. Hong, Y.H. Choi, Y.J. Chung, M.H. Sung, *Thermostable tyrosine phenol-lyase of Symbiobacterium sp. SC–1: gene cloning, sequence determination, and overproduction in Escherichia coli.* **Protein Expr Purif.,** 11 (1997) 263–70.

[30] S.G. Lee, H.S. Ro, S.P. Hong, E.H. Kim, M.H. Sung, *Production of L-DOPA by thermostable tyrosine phenol-lyase of a thermophilic Symbiobacterium species overexpressed in recombinant Eschericia coli.* **J Microbiol Biotechnol.,** 6 (1996) 98 –102.

[31] S.G. Lee, S.P. Hong, M.H. Sung, *Development of an enzymatic system for the production of dopamine from catechol, pyruvate, and ammonia*, **Enzyme and Microbial Technology.,** 25 (1999) 298–302.

[32] H.Q. Smith, R.L. Somerwille, *The tpl Promoter of Citrobacter freundii Is Activated by the TyrR Protein†* **J. Bacter.,** 179 (1997) 5914–5921.

[33] T.V. Demidkina, I.V. Myagkikh, A.V. Azhayev, *Transamination catalysed by tyrosine phenol-lyase from Citrobacter intermedius.* **Eur. J. Biochem.,** 170 (1987) 311-316.

[34] H. Kumagai, H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi, K. Ogata, *Tyrosine phenol lyase. II. Cofactor requirements.* **J. Biol. Chem.,** 245 (1970) 1773–1777.

[35] H. Suzuki, T. Katayama, K. Yamamoto, and H. Kumagai, *Transcriptional regulation of tyrosine phenol-lyase gene of Erwinia herbicola AJ2985*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.,** 59 (1995) 2339–2341.

[36] A.J.Pittard, B.E. Dvidson*, TyrR protein of Escherichia coli and its role repressor and activator.* **Mol. Microbiol.,** 5 (1991) 1585-1592.

[37] H.Q. Smith, R.L. Somerville, *The tpl promoter of Citrobacter freundii is activated by the TyrR protein.* **J. Bacteriol.,** 179 (1997) 5914-5921.

[38] Q.G.Berg, P.H. Von Hippel, *Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. II The binding specificity of cAMP receptor protein to recognition sites*. **J. Mol. Biol.,** 200 (1988) 709–723.

[39] B. Qıng, L. Ronald, Somervılle, *integration Host Factor and Cyclic AMP Receptor Protein are Required for TyrR-Mediated Activation of tpl in Citrobacter freundii.* **Journal of Bacteriology.,** 180 (1998) 6173-6186.

[40] K.C. Rosazza, G.M. Paul, S. Wolf, *The microbial synthesis of L-DOPA*. **Biotechnology Letters.**, 16 (1995) 210–215.

[41] J.R. Ros, J.N. Rodriquez-Lopaz, G.F. Conovas. *Effect of l-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase.* **J. Biol. Chem.,** 295 (1993) 309–12

[42] D.A. Robb, Tyrosinase. In: Lontie, R. (Ed.), *Copper Proteins and Copper Enzymes,* **CRC Press.**, 2 (1984) 207–241.

[43] L. Vamos- Vigyazo, *Polyphenol oxidase and peroxidase in fruit and vegetables*. **Crit Rew Food Sci.,** 15 (1981) 49-127.

[44] Z. Peng, *Studies on tyrosinase production in Pseudomonas*. **J. Amino Acid.,** 1 (1990) 7–9.

[45] V.E. Coyne, L. Al-Harthi, *Induction of melanin biosynthesis in Vibrio cholerae*. **Appl. Environ. Microbiol.,** 58 (1992) 2861-2865.

[46] S. Ali, M. A. Qadeer, *Biosynthesis of L-DOPA* by *Aspergillus oryzae*. **Biores. Tech.,** 85 (2002) 25–29.

[47] L.S. Kumagaı, M. Flıng, A.N. Sarın, *Mushroom tyrosinases.* **Journal of Biological Chemistry.,** 68 (1969) 178-185.

[48] P. James, G. Flıng, *Tyrosinase activity of different fungal strains*. **Biochemistry and Biophysics.,** 112 (2001) 98–103.

[49] A.M. Mayer, *Polyphenol oxidases in plants recent progress*. **Phytochemistry.,** 26 (1987) 11–20.

[50] G. Prota, R.H. Thomson, *Melanin pigmentation in mammals*. **Endeavour.,** 35 (1976) 32–38.

[51] V.J. Hearing, M. Jimenez, *Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level.* **Pigment Cell Res.,** 2 (1989) 75–85.

[52] L.E. Tina, C. N. Santos, G. Stephanopoulos, *Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications,* **Appl Microbiol Biotechnol.,** 77 (2007) 751–762.

[53] A.A. Bell, M.H. Wheeler, *Biosynthesis and functions of fungal melanins*. **Annu Rev Phytopathol.,** 24 (1986) 411–451.

[54] G. Della-Cioppa, S.J. Garger, G.G. Sverlow, T.H. Turpen, L.K. Grill, *Melanin production in Escherichia coli from a cloned tyrosinasegene.* **Biotechnology.,** 8 (1990) 634–638.

[55] N. Cabrera-Valladares, A. Martínez, S. Pinero, V.H. Lagunas-Muñoz, R. Tinoco, R. de Anda, R. Vazquez-Duhalt, F. Bolívar, G. Gosset, *Expression of the melA gene from Rhizobium etli CFN42 in Escherichia coli and characterization of the encoded tyrosinase*. **Enzyme Microb Technol.,** 38 (2006) 772–779.

[56] Food and Nutrition Board, National Research Council. Recommended Dietary Allowances, 10th edition. Washington, DC: National Academy Press, 1989.

[57] W.F. Ganong, Review of Medical Physiology. 17th edition, **Appleton & Lange** (1995) 89–93, 248, 327, 331, 390–391.

[58] R. K. Murray, P. A. Mayes, D. K. Granner, V.W. Rodwell, *Harper's Biochemistry*. **Appleton & Lange.,** 22nd Edition, Chapter (1991) 33, 50.

[59] A. L. Lehninger, D. L.Nelson, M. M. Cox, *Principles of Biochemistry*, **Worth Publishers, Inc.,** (1993) 713–714.

[60] G. Eisenhofer, H. Tian, C. Holmes, *Tyrosinase: a developmentally specific major determinant of peripheral dopamine.* **FASEB J.,** 17 (2003) 1248–1255.

[61] N.J. Rahway, J.R. Merck. van der Meer, W.M de Vos, S. Harayama, A.J.B. Zehnder, *Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds.* **Microbiol Rev.,** 56(1992) 677–694.

[62] J.W. Porteous, R.T. Williams, *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 (1948) 56–61.

[63] B. Tesfaye, S. Gerald, *Differential effects of catecholamines on in vitro growth of pathogenic bacteria* **Life Sciences.,** 71 (2002) 447–456.

[64] B. Tesfaye, A. Hernan, V. Monique, F. Kimberly, S. Gerald, J. Lenard, R. vanDeroef*, A novel bacteristatic action of bovine and porcine serum that is reversed by norepinephrine*. **Life Sciences.,** 57 (1995) 443–447.

[65] M. Lyte, S. Ernst, *Catecholamine induced growth of gram negative bacteria.* **Life Sciences.,** 50 (1992) 203–213.

[66] V. Renganathan and J. B. Johnston, *Production of substitutedcatechols from substituted benzenes by Pseudomonas sp*. **Enzyme Microb Technol.,** 9 (1987) 706-708.

[67] D. A. Stoyanovsky, R. Goldman, H.G. Claycamp, V.E. Kagan, *Phenoxyl radical-induced thiol-dependent generation of reactive oxygen species: Implications for benzene toxicity.* **Arch. Biochem. Biophys.,** 317 (1995) 315–323.

[68] N. Schweigert, A. Zehnder, R. Eggen, *Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals.* **Environ. Micro.,** 3 (2001) 81–91.

[69] H.A. Álvaro, M.Á. Estefan´ıa, S.I Sof´ıa, S.S. Carolina, S.O. Ramón, *Autoxidation and MAO- mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stres: role of ferrous and ferric ions,* **Neurochemistry International.,** 45 (2004) 103–116.

[70] S. Lee, S. Hong, M. Sung, *Development of an enzymatic system for the production of dopamine from catechol, pyruvate, and ammonia.* **Enzyme and Micro. Techno.,** 25 (1999) 298–302.

[71] G.A. Lancaster, T.L. Sourkes, *Purification and properties of hog-kidney 3,4 dihydroxyphenylalanine decarboxylase.* **Can J Biochem.,** 50 (1972) 791–7.

[72] M. Ando-Yamamoto, H. Hayashi, T. Sugiyama, H. Fukui, T. Watanabe, H. Wada, *Purification of L-DOPA Decarboxylase from rat liver and production of polyclonal and monoclonal antibodies against it.* **J Biochem.,** 101 (1987) 405–14.

[73] H. Nakazawa, K. Sano, H. Kumagai, H. Yamada, *Distribution and formation of aromatic L-amino acid decarboxylase in bacteria*. **Agric Biol Chem.,** 41 (1977) 2241–7.

[74] H. Nakazawa, H. Kumagai, H.Yamada, *Constitutive aromatic L-amino acid decarboxylase from Micrococcus percitreus.* **Biochem Biophys Res Commun.,** 61 (1981) 75– 82.

[75] J.E. Perley, B.B. Stowe, *The production of tryptamine from tryptophan by Bacillus cereus* (KVT). **J Biochemical.,** 100 (1966) 169 –74.

[76] M. Agarwal, U. Roy, P.K. Roy, O.P. Shukla, *DOPA decarboxylase activity and dopamine synthesis by Pseudomonas sp., immobilized in different matrices*. **J Microb Biotechnol**., 6 (1991) 28 –34.

[77] W.D. Bellamy, I.C. Gunsalus, *Tyrosine decarboxylation by Streptococci: growth requirements for active cell production*. **J Bacteriol.,** 48 (1944) 191–9.

[78] W.A. Anderson, M. Moo–Young, R.L. Legge, *Development of a multienzyme reactor for dopamine synthesis: I enzymology and kinetics.* **Biotechnol Bioeng**., 39 (1992) 781–9.

[79] http://www.nobelprize.org/chemistry/laureates

[80] J.H. Growdon, E. Melamed, M. Logue, *Effects of oral L-tyrosine administration on CSF tyrosine and homovanillic acid levels in patients with Parkinson' s disease*. **Life Sci.,** 30 (1982) 827–32.

[81] S. Imke, T. Hutton, S. Loftus, *Parkinson Disease: Caring and Coping*. **The National Parkinson Foundation, Inc.,** (2003) 1-64.

[82] H.D. Patton, A.F. Fuchs, B. Hille, A.M. Scher, R. Steiner, *Textbook of Physiology. Excitable Cells and Neurophysiology.* 21st edition, **W. B. Saunders International Edition.,** 1 (1989) 659.

[83] P. Jenner, C.W. Olanow, *Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease.* **Neurology**., 47 (1996) 161–70.

[84] T. Spencer Smith, W.D. Parker, J.P. Bennet, *L-DOPA increases nigral production of hydroxyl radicals in vivo: potential L-DOPA toxicity*? **Neuroreport**., 5 (1994) 1009–11.

[85] A.N. Basma, E.J. Morris, W.J. Nicklas, H.M. Geller, *L-DOPA cytotoxicity to PC12 cells in culture is via auto-oxidation.* **J Neurochem.,** 64 (1995) 825–32.

[86] E. Martignoni, F. Blandini, L. Godi, S. Desideri, C. Pacchetti, F. Mancini, G. Nappi, *Peripheral markers of oxidative stress in Parkinson's disease. The role of L-DOPA*. **Free Radic Biol Med.,** 27 (1999) 428–37.

[87] A.D. Frey, P.T. Kallio, *Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology*. **FEMS Microbiol Rev**., 27 (2003) 525–45.

[88] A.D. Frey, P.T. Kallio, *Nitric oxide detoxification a new era for bacterial globins in biotechnology?* **Trends Biotechnol**., 23 (2005) 69–73.

[89] K.T. Elvers, G.H. Wu, N.J. Gilberthorpe, R.K. Poole, S.F. Park, *Role of an inducible single-domain hemoglobin in mediating resistance to nitric oxide and nitrosative stress in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli.* **J Bacteriol.,** 186 (2004) 5332–41.

[90] J. Farr´es, M.P. Rechsteiner, S. Herold, A.D. Frey, P.T. Kallio, *Ligand binding properties of bacterial hemoglobins and flavohemoglobins.* **Biochemistry**., 44 (2005) 4125–34.

[91] C.M. Bruns, P.A. Karplus, *Refined crystal structure of spinach ferredoxin reductase at 1.7 Å resolution: oxidized, reduced and 2¢-phospho-5¢-AMP bound states.* **J. Mol. Biol,**. 247 (1995) 125–145.

[92] K.L. Dikshit, D. Spaulding, A. Braun and D.A. Webster, *Oxygen inhibition of globin gene transcription and bacterial hemoglobin synthesis in Vitreoscilla*. **J. Gen. Microbiol.,** 135 (1989) 2601-2610.

[93] E.J.H. Ross "Plant nonsymbiotic hemoglobins: hexacoordinated hemoglobins involved in hormonally-regulated cell differentiation". PhD thesis, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska. (2002).

[94] M.F. Perutz, *Structure and function of hemoglobin.* **Harvey Lect.,** 63 (1969) 213–61.

[95] A.D. Frey, J. Farr´es, C.J.T. Bollinger, P.T. Kallio, *Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol.,** 68 (2002) 4835–40.

[96] S. Wakabayashi, H. Matsubara and D.A. Webster, *Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from Vitreoscilla,* **Nature.,** 322(1986) 481-483.

[97] C.R. Woesse, W.G. Weisburg, B.J. Paster, C.M. Hahn, R.S. Tanner, N.R. Kreig, H.P. Koops, H. Harms and E. Stackebrandt, *The phylogeny of purple bacteria: the beta sub division.* **System. Appl. Microbiol.,** 5 (1984). 327–336.

[98] A.D. Frey and P.T. Kallio, *Bacterial hemoglobins and Flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology*, **FEMS Microbiology Reviews.,** 789 (2003).

[99] C. Khosla and J. E. Bailey, *Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant Escherichia coli*, **Nature.,** 331(1988) 633–635.

[100] M.F. Perutz, *Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide*. **Annu. Rev. Physiol.,** 52 (1990) 1–25.

[101] J.B. Wittenberg, B.A. Wittenberg, *Mechanisms of cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function.* **Annu. Rev. Biophys.Chem.,** 19 (1990) 217–241.

[102] T. Takagi, *Hemoglobins from single-celled organisms.* **Curr. Opin. Struct. Biol.,** 3 (1993) 413–418.

[103] C.R. Andersson, E.O. Ostergaard, D.J. Llewellyn, E.S. Dennis, W.J Peacock, *A new hemoglobin gene from soybean: a role forhemoglobin in all plants.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA .,**93 (1996) 5682–5687.

[104] J. Farr´es, M.P. Rechsteiner, S. Herold, A.D. Frey, P.T. Kallio, *Ligand binding properties of bacterial hemoglobins and flavohemoglobins.* **Biochemistry.,** 44 (2005) 4125–34.

[105] S. Vinogradov, C.N.A. Trotman, *Adventitious variability? The amino acid sequences of nonvertebrate globins.* **Comp. Biochem. Physiol.,** 106 (1993) 1–26.

[106] O.H. Kapp, L. Moens, J.R. Vanfletern, C.N.A.Trotman, T. Suzuki, S. Vinogradov, *Alignment of 700 globin sequences: extent ofamino acid substitution and its correlation with variation*. **Protein Sci.,** 4 (1995) 2179–2190.

[107] R.C. Hardison, *A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** 93 (1996) 5675–5679.

[108] L. Moens, S. Vinogradov, *Globins in nonvertebrate species: dispersal horizontal gene transfer and evolution of thestructure-function relationship*. **Mol. Biol. Evol.,** 13 (1996) 324–333.

[109] S.G. Vasudevan, W.L.F. Armarego, D.C. Snaw, P.E. Lilley, R.K. Poole, *Isolation and nucleotide sequence of the hmp gene that encodes haemmoglobin-like protein in Escherichia coli* K-12. **Mol. Gen. Genet.,** 226 (1991) 49-58.

[110] K.W. Ramandeep, Hwarg, M. Raje, K.J. Kim, B.C. Strak, K.L. Dikshit, D.A. Webster, *Vitreocilla hemoglobin: İntracellular Localization and binding to membranes.* **J Biol Chem.,** (2001).

[111] S.J. Boerman, D.A. Webster, *control of heme content in vitreoscilla by oxygen.* **J.Gen. Appl. Microbiol.,** 28 (1982) 35-43.

[112] R.P. Dikshit, K.L. Dikshit, Y. Liu, and D.A. Webster, *the bacterial hemoglobin from vitreoscilla can support the aerobic growth of Escherichia coli lacking terminal oxidase.* **Arch. Biochem. Biophys.,** 293 (1992) 241-245.

[113] P.T. Kallio, D.J. Kim, P.S. Tsai, J.E. Bailey, *Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin alters Escherichia coli energy metabolism under oxygen-limited conditions.* **Eur J Biochem**., 219 (1994) 201–8.

[114] V. Roos, C.I.J. Andersson and L. Bülow, *Gene expression profiling of Escherichia coli expressing double Vitreoscilla hemoglobin,***J. Biotechnol.**,114(2004)107–120.

[115] H. Geckil, Z. Barak, D.M. Chipman, S.O. Erenler, D.A. Webster and B.C. Stark, *Enhanced production of acetoin and butanediol in recombinant Enterobacter aerogenes carrying Vitreoscilla hemoglobin gene,* **Biopro. Biosys. Engineering,**, 26 (2004)325-330.

[116] K.W. Park, K.J. Kim, A.J. Howard, B.C. Stark and D.A. Webster, *Vitreoscilla Hemoglobin Binds to Subunit I of Cytochrome bo Ubiquinol Oxidases,* **J. Bıol. Chem.,** 277 (2002) 33334-33337.

[117] S.C. Liu, D.A. Webster, M.L. Wei and B.C. Stark, *Genetic engineering to contain the Vitreoscilla hemoglobin gene enhances degradation of benzoic acid by Xanthomonas maltophilia*. **Biotechnol Bioeng.,** 49 (1996) 101–105.

[118] S.M. Patel, B.C. Stark, K.W. Hwang, K.L. Dikshit and D.A. Webster, *Cloning and expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene in Burkholderia sp. strain DNT for enhancement of 2,4 –dinitrotoluene degradation.* **Biotechnol Prog.,** 16 (2000) 26–30.

[119] P.R. Gardner, *Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin and myoglobin and their associated reductases*. **J Inorg Biochem.,** 99 (2005) 247–66.

[120] A.D. Frey, B.T. Oberle, J. Farr´es, P.T. Kallio, *Expression of Vitreoscilla haemoglobin in tobacco cell cultures relieves nitrosative stress in vivo and protects from NO in vitro.* **Plant Biotechnol J.,** 2 (2004) 221–31.

[121] K.W. Park, K.J. Kim, A.J. Howard, B.C. Stark, D.A. Webster, *Vitreoscilla hemoglobin binds to subunit I of cytochrome bo ubiquinol oxidases*. **J Biol Chem.,** 277 (2002) 33334–7.

[122] L. Bülow, N. Holmberg, G. Lilius and J.E. Bailey, *The metabolic effects of native and transgenic hemoglobins on plants.* **Trends Biotechnol.**, 17(1999)21-24.

[123] P. A. Fish, D. A. Webster, and B. C. Stark, *Vitreoscilla hemoglobin enhances the first step in 2,4- dinitrotoluene degradation in vitro and at low aeration in vivo*. **J. Mol. Cat.B: Enz**., 9 (2000) 75-82.

[124] S.M. Patel, B.C. Stark, K. Hwang, K.L. Dikshit and D.A. Webster, *Cloning and expression of Vitreoscilla hemoglobin gene in Burkholderi sp. strain DNT for enhancement of 2, 4-dinitrotoluene degradation.* **Biotechnol. Prog**. 16 (2000) 26–30.

[125] M.A. Nasr, K. Hwang, M. Akbas, D. A. Webster and B.C. Stark, *Effects of culture on enhancement of 2, 4- dinitrotoluene degredation by Burkholderia engineered with the Vitreoscilla hemoglobin gene*. **Biotechnol. Prog**., 17 (2001) 359-361.

[126] J.W. Chung, D. A. Webster, K. R. Pagilla, B.C. Stark, *Chromosomal integration of the Vitreoscilla hemoglobin gene in Burkholderia and Pseudomonas for the purpose of producingstable engineered strains with enhanced bioremediating ability*. **J. Indust. Microbiol. Biotechnol.**, 27 (2001) 27–33.

[127] C. C. Somerville, S. F. Nishino, J. C. Spain, *Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. **J. Bacteriol.**, 177 (1995) 3837-3842.

[128] H. Geckil, S. Gencer, H. Kahraman, S.O. Erenler, *Genetic engineering of Enterobacter aerogenes with Vitreoscilla hemoglobin gene: Cell growth, survival,*

and antioxidant enzyme status under oxidative stress. **Res. Microbiol**., 154 (2003) 425-431.

[129] R.L Boerman and D.A. Webster, *Control of heme content in Vitreoscilla by oxygen,* **J. G. Appl. Microbiol.,** 28(1982) 35-43.

[130] C.D. Georgiou and D.A. Webster, *Identification of b,c, and d cytochromes in the membrane of Vitreoscilla,* **Arch. Microbiology**., 148 (1987) 328–333.

[131] C. Khosla and J.E. Bailey, *Evidence for partial export of Vitreoscilla hemoglobin into the periplasmic space in E. coli,* **J. Mol. Biology.**, 210 (1989) 79-89.

[132] K.L. Dikshit, D. Spaulding, A. Braun and D.A. Webster, *Oxygen inhibition of globin gene transcription and bacterial hemoglobin synthesis in Vitreoscilla*. **J. Gen. Microbiol.,** 135 (1989) 2601-2610.

[133] T. Koskenkorva, A.D. Frey and P.T. Kallio, *Characterization of heterologous hemoglobin and flavohemoglobin promoter regulation in Escherichia coli,* **J. Biotechnol.**,122 (2006) 161–175.

[134] S.K. Magnolo, D.L. Leenutaphong, J.A. De Modena, J.E. Curtis, J.E. Bailey, J.L. Galazzo and D.E. Hughes, *Actinorhodin production by Streptomyces coelicolor and growth of Streptomyces lividans are improved by the expression of a bacterial hemoglobin,* **Biotechnology (NY).,** 5(1991) 473–476.

[135] J. Farres and P.T. Kallio, *Improved cell growth in tobacco suspension cultures expressing Vitreoscilla hemoglobindagger*. **Biotechnol. Prog.,** 2 (2002) 229-233.

[136] H. Geckil, B.C. Stark and D.A. Webster, *Cell growth and oxygen uptake of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa are differently effected by the genetically engineered Vitreoscilla hemoglobin gene,* **J. Biotechnol**., 85(2001) 57-66.

[137] M. Joshi and K.L. Dikshit, *Oxygen dependent regulation of Vitreoscilla globin gene: evidence for positive regulation by FNR,* **Biochem. Biophys. Res. Commun**., 202 (1994) 535-542.

[138] M.L. Wei , D.A. Webster and B.C. Stark*, Genetic engineering of Serratia marcescens with bacterial hemoglobin gene: effects on growth, oxygen utilization, and cell size,* **Biotechnol Bioeng**., 57(1998) 477-483.

[139] S.C. Liu, D.A. Webster and B.C. Stark*, Cloning and expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene in pseudomonads: Effects on cell growth,* **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** 44(1995) 419-424.

[140] R. Hardison, *Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different of patterns of gene expression,* **J.Exp. Biol.,** 201(1998) 1099-1117.

[141] D.H. Suthar, B.B. Chattoo, *Expression of Vitreoscilla hemoglobin enhances growth and levels of alpha-amylase in Schwanniomyces occidentalis.* **Appl Microbiol Biotechnol.,** 72 (2006) 94–102.

[142] L.J. Chien, C.K. Lee, *Expression of bacterial hemoglobin in the yeast, Pichia pastoris, with a low O2-induced promoter*. **Biotechnol Lett.,** 27 (2005) 1491–7.

[143] J.A. De Modena, S. Gutierrez, J.Velasco, F.J. Fernandez, R.A. Fachini, J.L. Galazzo, D.E. Hughes and J.F. Martin, *The production of cephalosporin C by Acremonium chrysogenum is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin.* **Bio-Technology.,** 11(1993) 926–929.

[144] P.T. Kallio and J.E. Bailey, *Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin (VHb) enhances total protein secretion and improves the production of K-amylase and neutral protease in Bacillus subtilis.* **Biotechnol. Prog**., 12(1996) 31-39.

[145] M.A. Nasr, K.W. Hwang, M. Akbas, D.A Webster. and B.C. Stark, *Effects of culture conditions on enhancement of 2,4- dinitrotoluene degradation by Burkholderia engineered with the Vitreoscilla hemoglobin gene.* **Biotechnol. Prog.,** 17(2001) 359-361.

[146] G.J. Pendse and J.E. Bailey, *Effect of Vitreoscilla hemoglobin expression on growth and specific tissue plasminogen activator productivity in recombinant Chinese hamster ovary cell,* **Biotechnol. Bioeng.,** 44 (1994) 1367-1370.

[147] M. Nilsson, P.T. Kallio, J.E. Bailey, L.Bülow and K.G. Wahlund, *Expression of Vitreoscilla hemoglobin in Escherichia coli enhances ribosome and tRNA levels : A flow feld-flow fractionation study.* **Biotechnol. Prog.,** 15(1999) 158-163.

[148] F.C. Sander, R.A. Fachini, D.E. Hughes, J.L. Galazzo and J.E. Bailey, *Expression of Vitreoscilla hemoglobin in Corynebacterium glutamicum increases final concentration and yield of lysine.* **Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology.,** (1994) 607–610.

[149] M. Khosravi, D.A. Webster and B.C. Stark, *Presence of the bacterial hemoglobin gene improves alpha-amylase production of a recombinant Escherichia coli strain,* **Plasmid.,** 24(1990) 190-194.

[150] Y.J. Chung, K.S. Kim, E.S. Jeon, K.I. Park and C.U. Park, *Effects of the Vitreoscilla hemoglobin gene on the expression of the ferritin gene in Escherichia coli,* **J. Biochem. Mol. Biol.,** 31(1998) 503–507.

[151] M. Ramirez, B.Valderrama, R. Arrendondo-Peter, M. Soberon, J. Mora and G. Hernandez, *Rhizobium etli genetically engineered for the heterologous expression of Vitreoscilla sp. hemoglobin Effect on free-living and symbiosis.* **Mol. Plant Microbe Interact.,** 12 (1999) 1008–1015.

[152] W.Chen, D.E. Hughes and J.E. Bailey*, Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin alters the aerobic metabolism of Saccharomyces cerevisiae.* **Biotechnol. Prog.,** 10 (1994) 308–313.

[153] P. Brünker, W. Minas, P.T. Kallio and J.E. Bailey*, Genetic engineering of an industrial strain of Saccharopolyspora erythraea for stable expression of the Vitreoscilla haemoglobin gene (vhb).* **Microbiology.,** 144(1998) 2441–2448.

[154] W. Minas, P. Brünker, P.T. Kallio and J.E. Bailey, *Improved erythromycin production in a genetically engineered industrial strain of Saccharopolyspora erythraea.* **Biotechnol. Prog.,** 14(1998) 561–566.

[155] M.L. Wei , D.A. Webster and B.C. Stark*, Genetic engineering of Serratia marcescens with bacterial hemoglobin gene: effects on growth, oxygen utilization, and cell size,* **Biotechnol Bioeng**., 57(1998) 477-483.

[156] S.K. Magnolo, D.L. Leenutaphong, J.A. De Modena, J.E. Curtis, J.E. Bailey, J.L. Galazzo and D.E. Hughes, *Actinorhodin production by Streptomyces coelicolor and growth of Streptomyces lividans are improved by the expression of a bacterial hemoglobin,* **Biotechnology (NY).,** 5(1991) 473–476.

[157] M.L. Wei, D.A. Webster and B.C. Stark, *Metabolic engneering of Serratia marcescens with the bacterial hemoglobin gene: Alterations in fermentation pathways.* **Biotechnol. Bioeng.,** 59 (1998) 640–646.

[158] J.E. Bailey, A.Sburlati, V. Hatzimanikatis, K.Lee, W.A. Renner and P.S. Tsai, *Inverse metabolic engineering: A strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes*. **Biotechnol. Bioeng.,** 52 (1996) 109–121.

[159] K.M. Khleifat, M.M. Abboud and A.H. Al-Mustafa, *Effect of Vitreoscilla hemoglobin gene (vgb) and metabolic inhibitors on cadmium uptake by the heterologous host Enterobacter aerogenes,* **Process Biochem.**, 41(2006) 930-934.

[160] H. Geçkil, S. Gencer, M. Uckun, *Vitreoscilla hemoglobin expressing Enterobacter aerogenes and Pseudomonas aeruginosa respond differently to carbon catabolite and oxygen repression for production of l-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy*, **Enzyme and Microbial Technology.,** 35 (2004) 182–189.

[161] H. Park, J. Lee, H. Kim, *Production of L-DOPA (3,4-Dihydroxyphenyl-L-alanine) from Benzene by Using A Hybrid Pathway.* **Biotech. and Bioeng.,** 58 (1997) 339–343.

[162] G. J. Zylstra, D. T. Gibson, *Toluene degradation by Pseudomonas putida* F1. **J. Biol. Chem.,** 264 (1989) 14940–14946.

[163] S. Ates, E. Cortenlioglu, E. Bayraktar, U. Mehmetoglu, *Production of l-DOPA using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor,* **Enzyme and Microbial Technology.,** 40 (2007) 683–687.

[164] P. Pialis and B.A. Saville *Production of L-DOPA from tyrosinase immobilized on nylon 6,6: enzyme stability and scaleup* **Enzyme and Micro. Techno.,** 22 (1998) 261–268.

[165] A. İnoue, K. Horikoshi, *A Pseudomonas thrivesin high concentration of toluen* **Nature.,** 338 (1989) 264–265.

[166] J.W. Chung, D.A. Webster, K.R. Pagilla and B.C. Stark, *Chromosomal integration of the Vitreoscilla hemoglobin gene in Burkholderia and Pseudomonas for the purpose of producing stable engineered strains with enhanced bioremediating ability,* **J. Indust**. **Microbiol. Biotechnol.,** 27(2001) 27–33.

[167] S.O. Erenler, S. Gencer, H. Geckil, B.C. Stark and D.A. Webster, *Cloning and expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene in Enterobacter aerogenes: effect on cell growth an oxygen uptake.* **Appl. Biochem. Microbiol.,** 40 (2004) 241-248.

[168] F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and Struhl K (2005). **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons, Inc.

[169] T. Manıatıs, E.F. Frıtsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

[170] J. C. Wriston Jr, Asparajinase. **Method. Enzymol.,** 17(1970) 732–742

[171] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, *7*, 248–254.

[172] M. Lyte, *The role of microbial endocrinology in infectious disease*. **J. Endocrinol.,** 137 (1993) 343–345.

[173] N. Schweigert, A. Zehnder, R. Eggen, *Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals.* **Environ. Micro.,** 3 (2001) 81–91.

[174] T. Koyanagi, T. Katayama, H. Suzuki, H. Kumagai, *Construction of an effective protein expression system using the tpl promoter in Escherichia coli.* **Biotech. Let.,** 27 (2005) 1267–1271.

[175] T. Katayama, H. Suzuki, T. Koyanagi, H. Kumagai, *Cloning and random mutagenesis of the Erwinia herbicola tyrr gene for high-level expression of tyrosine phenol-lyase.* **App. and Environ. Micro.,** 66 (2000) 4764– 4771.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : EMEL AYTAN

Doğum Yeri ve Tarihi **:** Malatya - 30.06.1985

EĞİTİM DURUMU

İlkokul	**:**30 Ağustos İlköğretim Okulu (Malatya, 1991–1996)
Ortaokul	**:**Milli Eğitim Vakfı İlköğretim Okulu (Malatya,1996–1999)
Lise	**:** 20 Mayıs Vakfı Turgut Özal Lisesi (Malatya, 1999–2002)
Lisans	**:** Dicle Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, (Diyarbakır, 2003–2007)
Yüksek Lisans	**:** İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, (Malatya, 2007–2009)

YAYINLANMIŞ ESERLER

1. A.G. Kurt, **E. Aytan**, U. Özer, B. Ateş and H. Geçkil, *Production of L-DOPA and dopamine in recombinant bacteria bearing the Vitreoscilla hemoglobin gene*, **Biotechnology Journal.**

BİLİMSEL FAALİYETLER

1. Ufuk ÖZER, Aslı GİRAY KURT, **Emel AYTAN**, Hikmet GEÇKİL, L-DOPA ve Dopamin'in bakteriyel sentezi, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, 23–27 Haziran 2008, **TRABZON**
2. Bakteriyal pigmentasyon (Seminer, 2009)
3. Uluslar arası Katılımlı Sempozyum: Doğadan Sağlığa Bitkiler, Phytotherapy-Antiaging-Longevity, 29–31 Mayıs 2009, **MALATYA**