

***Vitreoscilla* Hemoglobin Geninin *Erwinia herbicola*'ya Klonlanması ve L-DOPA Üretimi Üzerine Etkisi¹**

Emel Aytan², Aslı Giray Kurt³, Hikmet Geçkil⁴

Özet

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.

GİRİŞ

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 titremeye 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 artırılabilceği 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.

¹ Bu çalışma Emel AYTAN'ın yüksek lisans tezinin bir kısmından oluşmaktadır.

² M. Sc., ³ Biyolog, ⁴Prof. Dr., İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Malatya. Yazışmadan Sorumlu Yazarın e-posta Adresi: eaytan@inonu.edu.tr

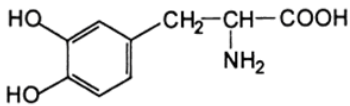
L-DOPA

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). L-DOPA, adrenal medullada ve beyinde *tirozin hidroksilazın* (TOH) tirozini hidroksilemesi sonucu oluşmaktadır. Ayrıca L-DOPA nörotransmitter ve hormonlar gibi önemli biyolojik fonksiyonu olan katekolaminlerin (dopamin, norepinefrin ve epinefrin) biyosentezinde önemli bir öncüdür (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 kiralılık 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 kullanılmaya başlanmıştır (9).

Son yıllarda, dopamin öncülü olmasına ek olarak L-DOPA'nın merkezi sinir sisteminde nöromodulator veya nörotransmitter olarak da rol aldığı rapor edilmiştir (10, 11).

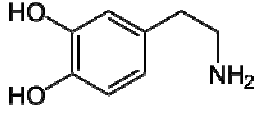


Şekil 1. L-DOPA

DOPAMİN

Dopamin, memeli merkezi sinir sistemi nörotransmitterleri olan norepinefrin ve epinefrin hormonlarının öncüsüdür (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 kardiyostimulant olarak terapötik kullanıma sahiptir (13). Ayrıca kardiyak verimi ve kan basıncını artırmadaki özelliğinden dolayı nörodejenaratif hastalıklar başta olmak üzere çeşitli hastalıklarda terapötik etkisinin olduğu bilinmektedir (14). Dopamin vücuda enjekte edildiğinde muhtemelen spesifik dopaminerjik reseptörlere bağlanarak renal ve mezenterik 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 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 kısmı 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 salınıncı *adenom* denilen kitleler oluşmakta ve bu adenomların çevresindeki dokulara zarar verdiği bilinmektedir (15, 16).

L-DOPA VE DOPAMİNİN BAKTERİYEL SENTEZİ

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.

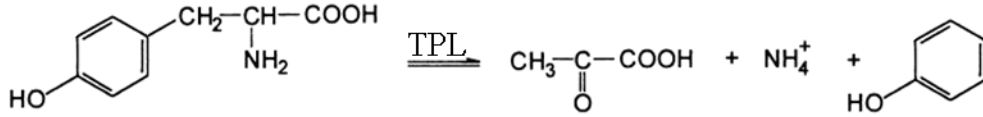
Birinci basamağında çeşitli substratlardan L-DOPA oluşumunu katalizleyen *tirozin fenol liyaz* (TPL, EC 4.1.99.2) ve ikinci basamağı olan L-DOPA'dan dopamin oluşumunu katalizleyen *dopa dekarboksilaz* (DDC, EC 4.1.1.28) enzimleri farklı bakterilerde çalışıldığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda 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).

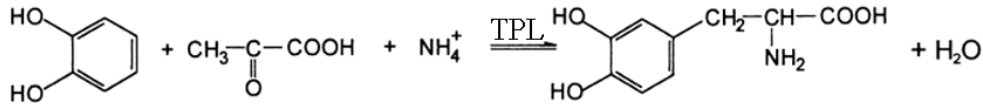
L-DOPA Sentezi

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 3).



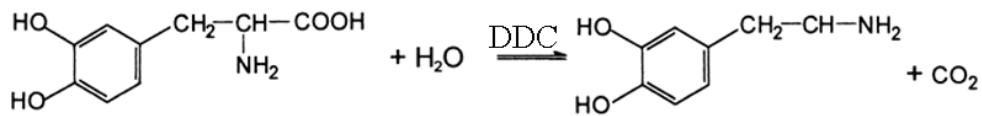
Şekil 3. L-tirozinin TPL enzimi ile pirüvat, amonyak ve fenole dönüştürülmesi.

Ortama katekol ilavesi yapıldığında fenol ile katekol yer değiştirerek TPL enzimi aracılığı ile katekol, amonyak ve pirüvattan L-DOPA oluşumunu sağlamaktadır (Şekil 4).



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

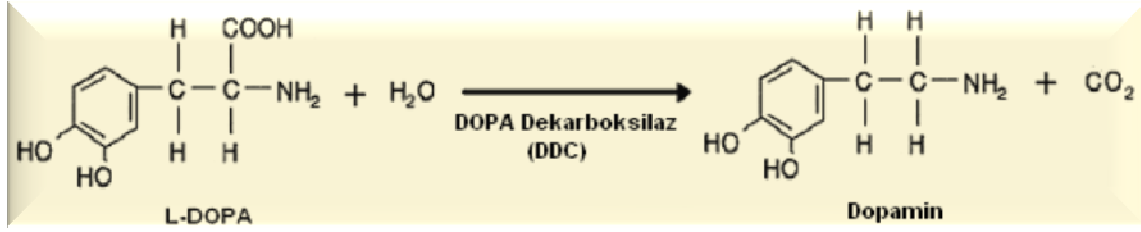
Dopamin ise tek bir enzimatik basmakta (L-DOPA dekarboksilaz enzimi yardımı ile) L-DOPA'dan yapılır (Şekil 5).



Şekil 5. L-DOPA'dan dopamini oluşumu

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 6).



Şekil 6. L-DOPA'dan Dopamin Sentezi

Sentez sırasında açığa çıkan CO₂ ortam pH'sının düşmesine yol açmaktadır. Bundan dolayı dopamin verimde bir azalma olmaması için reaksiyon ortamının sürekli kontrol altında olması gerekmektedir (20).

SONUÇ

L-DOPA ve dopaminin bakteriyel sentezinde VHb/vgb sistemini içeren rekombinant mikroorganizmalar kullanılarak *vitreoscilla* 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 sentezlerinin aktarılabileceğini göstermektedir. Eh[pUC8:15] hücreleri L-DOPA ve dopamin üretiminde etkili bir şekilde kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S., (1964) *Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis*. J. Biol. Chem., 239, 2910-17.
2. Raju B.G.H., Ayyanna C., (1993) *Bioconversion of L-tyrosine to L-DOPA Using Aspergillus oryzae*. CBS Publishers., 106–110.
3. Fling G., and Paul J., (2001) *Radiation induced production of L-3,4 dihydroxy phenylalanine by Aspergillus oryzae*. Journal of Analytical Chemistry., 67,185–187.
4. Haq I., Iqbal F., and Qadeer M.A., (1998) *Production of L-DOPA from L-tyrosine by Aspergillus oryzae*. Biologia., 44, 31–39.
5. Sih C.J., Foss P., Rosazza J., and Lembar M., (1969) *Microbial synthesis of L-3,4-dihydroxy phenylalanine*. Journal of Amniotic and Chemistry Society., 91, 62–64.
6. Katzenschlager R., Lees A. J., (2002) *Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice* J. Neurol., 249, 1119–1124.
7. Hornykiewicz O. , (2002) *L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent*, Biomedical and Life Sciences., 23, 65-70.
8. <http://www.nobelprize.org/chemistry/laureates>

9. Montgomer E.B. (1992) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa *Neurology* 42–17.
10. Misu Y., Goshima Y., (1993) *Trends Pharmacol., Sci.* 14, 119–123.
11. Misu Y., Goshima Y., Miyamae T., (2002) *Trends Pharmacol., Sci.* 23 262–268.
12. Kruk Z. L., Pycock C. J., (1991) *Dopamine. In: Neurotransmitters and drugs*, 3rd ed. Suffolk, UK: St. Edmundsbury Press., 87–115.
13. Hoffman B. B., Lefkowitz R. J., (1996) *Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists*. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, editors. *The pharmacological basis of therapeutics.*, 199–248.
14. Lisbon A., (2003) *Dopexamine, dobutamine and dopamine increase splanchnic blood flow: What is the evidence?* *Chest.*, 123 460–463.
15. Ganong W. F., (1995) *Review of Medical Physiology*. 17th edition, Appleton & Lange., 89–93, 248, 327, 331, 390–391.
16. Noyan A., (1999) Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, 11. baskı 243–245, 295, 301–303, 446, 798, 1008–1010, 1079, 1085, 1142.
17. Patton H.D., Fuchs A. F., Hille B., Scher A.M., Steiner R., (1989) *Textbook of Physiology. Circulation, Respiration, Body Fluids, Metabolism and Endocrinology*. 21st edition, W. B. Saunders International Edition., 2:1209.
18. Lee S., Hong S., Sung M., (1999) *Development of an enzymatic system for the production of dopamine from catechol, pyruvate, and ammonia*. *Enzyme and Micro. Techno.*, 25, 298–302.
19. Elsworth J.D., Roth R.H, (1997) *Dopamine synthesis, uptake metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease*. *Exp Neurol.*, 144, 4–9.
20. Lee S., Hong S., Sung M., (1999) *Development of an enzymatic system for the production of dopamine from catechol, pyruvate, and ammonia*. *Enzyme and Micro. Techno.*, 25, 298–302.