

172550

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RASTGELE MUTASYONLA YÜKSEK L-ASPARAJİNAZ AKTİVİTESİNE  
SAHİP *ENTEROBACTER AEROGENES* SUŞLARININ ELDESİ

MİRAC UÇKUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

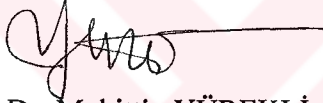
MALATYA  
TEMMUZ 2006

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

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



Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA  
(Başkan)



Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ  
(Üye)



Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL  
(Danışman)

Onay

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

...../...../2006



Prof. Dr. Ali ŞAHİN  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### RASTGELE MUTASYONLA YÜKSEK L-ASPARAJİNAZ AKTİVİTESİNE SAHİP *ENTEROBACTER AEROGENES* SUŞLARININ ELDESİ

Miraç UÇKUN

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

55 + ix sayfa

2006

Danışman: Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL

DNA mutasyonları organizma veya hücrede kanserleşme ve çeşitli metabolik bozukluklar gibi bozuk fonksiyonlarla kendini gösterebildiği gibi, mutasyonlar aynı zamanda bu organizma veya hücrelerin değişen ortamlara uyum sağlayarak nesillerinin devam ettirilmesinde en önemli rolü oynayabilirler. Mutasyonlar, bir organizmanın genomunu oluşturan nükleotid dizisinde kendiliğinden veya çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanlarla indüklenerek meydana gelen kalıtsal değişimlerdir. DNA sentezi (replikasyonu) kusursuz bir olay değildir. *Esheria coli*'de kendiliğinden mutasyon oranı zincire giren her 1 milyon nükleotitten yaklaşık birine tekabül eder. Bu tür bir değişiklik (mutasyon) tamamen rasgele olup genomun herhangi bir yerinde olabilir. Ancak, bu çeşit bir rastgele mutasyon oranı çeşitli kimyasal veya fiziksel ajanlarla önemli ölçüde artırılabilir. Bu çalışmada, kimyasal bir mutajenik ajan olan etilmetan sülfonat (EMS) kullanılarak gram-negatif bir bakteri olan *Enterobacter aerogenes*'in L-asparajinaz enzimini yüksek düzeyde üreten mutantları seçilmiştir. İnsanlarda bulunmayan bu enzim kanser kemoterapisinde yaygın kullanımı ile bilinmekte olup, *E. aerogenes* ve diğer birkaç gram-negatif bakteri kullanılarak üretilmektedir.

Bu çalışmada, mutant eldesi için optimal EMS konsantrasyonu belirlenerek, mutantların seçilimi ve enzim düzeyindeki değişimler yabancıl tip bakteri ile kıyaslanmıştır. EMS ile mutasyona tabi tutulmuş bakteri hücrelerinden L-asparajinaz mutantlarının seçilimi için indikatör ortam kullanılmış ve yaklaşık 100,000 koloni arasından 3 adet koloninin L-asparajinaz düzeyinde belirgin bir artış görülmüştür. Bu 3 koloni izole edilerek araştırmanın ileri safhalarında kullanılmışlardır. Genel olarak, bu 3 mutantın, değişik oranlarda olmakla beraber (% 30-65) yabancıl tipe göre daha yüksek düzeyde L-asparajinaz enzimi aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Mutantlar arasında ise en yüksek enzim seviyesi *E. aerogenes ansmu-2* mutanlığı için belirlenmiştir. Bununla birlikte, EMS mutagenez'i ile elde edilmesi bütün mutantların yüksek L-asparajinaz seviyesi yoktur. Ancak, EMS ile elde edilen mutantların çoğunda L-asparajinaz seviyesi orijinal yabancıl tipten daha düşük olduğundan bu tür mutantlar çalışmanın ileri safhalarına dahil edilmemişlerdir.

ANAHTAR KELİMELER: Raslantısal Mutagenez; Etilmetan sülfonat (EMS); L-asparajinaz; kemoterapötik enzimler

## ABSTRACT

Master Thesis

### TO GET *ENTEROBACTER AEROGENES* STRAINS HAVING HIGH L-ASPARAGINASE ACTIVITIES VIA RANDOM MUTATION

Miraç UÇKUN

Department of Biology  
Institute of Natural Sciences  
Inonu University

55+ ix pp

2006

Supervisor: Hikmet GEÇKİL, Associate Professor

While DNA mutations are the causes of malfunctions as cancer and various metabolic diseases in an organism or cell, mutations also can play important role in adaptation of organisms or cells to changing conditions for the continuing existence. Mutations are the inheritable changes occurring in nucleotide sequence of genome of an organism and they can be arisen spontaneously or induced by various physical and chemical agents. The DNA synthesis (replication) is not an error-free process. In *Escherichia coli* there is about 1 error per million nucleotide introduced. Such a change (mutation) is completely random and can happen in any region on the genome. However, such a low mutation rate can be substantially increased by various chemical and physical agents. In this study, high L-asparaginase producing mutants of gram-negative bacterium *Enterobacter aerogenes* were selected through use of the mutagenic agent ethyl methane sulfonate (EMS). This enzyme which is not found in humans is widely used in cancer chemotherapy and is produced from several gram-negative bacteria including *E. aerogenes*.

In this study, optimal EMS concentration for producing mutants was determined and the enzyme levels of these mutants were compared with the wild-type strain. An indicator medium for the selection of high L-asparaginase producing mutants was utilized and among about 100,000 colonies screened 3 showed a distinctly higher enzyme level than the wild-type strain. These 3 mutants were further isolated and used in the rest of study. In general, all three mutants showed considerably higher L-asparaginase activities, ranging from 30 to 65 %, than the wild-type strain. Among the 3 mutants *E. aerogenes* ansMU-2 was determined to have the highest enzyme level. However, not all mutants produced by EMS mutagenesis had high L-asparaginase levels. Most of the mutants showed lower L-asparaginase levels than the original wild-type strain and thus were not further included in the study.

**KEY WORDS:** Random Mutagenesis; Ethyl methane sulfonate (EMS); L-asparaginase; Chemotherapeutic enzymes

## TEŞEKKÜR

Bu alıőmanın her aőamasında yardım, öneri ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın **Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL**'e;

Çalıőmalarım esnasında yardım ve desteklerini esirgemeyen, **Salih GENCER, Ufuk ÖZER, Arő.Grv.Burhan ATEŞ, Arő. Grv. Dr. Hüseyin KAHRAMAN** ve ayrıca **Biyoloji Bölümü**'ne;

Üniversite hayatım boyunca her konuda bana destek veren sevgili **Aysel ALKAN**'a

Tüm hayatım boyunca yardımlarını ve desteklerini gördüğüm **AİLEM**'e;

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİ</b>	<b>2</b>
2.1. Mutasyon	2
2.1.1. Kendiliğinden Mutasyon	3
2.1.2. İndüklenmiş Mutasyon	6
2.1.2.1. Kimyasal Mutageniz	6
2.1.2.2. Radyasyon Mutageniz	9
2.2. Nokta Mutasyonları	9
2.3. Geri (Reversiyon) Mutasyonlar	19
2.4. Mutageniz	20
2.5. Rastlantısal Mutageniz	20
2.6. Enzimler	21
2.6.1. L-asparajinazlar (L-asparajin aminohidrolazlar; EC 3.5.1.1 )	22
2.6.2. L-asparajinazların Yapısal ve Biyokimyasal Özellikleri	23
2.6.3. L-asparajinazın Etki Mekanizması	25
2.6.4. L-asparalinazın Klinik Farmakolojisi	26
<b>3. ÇALIŞMA İLE İLGİLİ KAYNAK ÖZETLERİ</b>	<b>27</b>
<b>4. MATERYAL VE METOT</b>	<b>31</b>
4.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Ayıraçlar	31
4.1.1. Nessler Ayırıcı	31
4.2. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	31
4.3. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamlarının Hazırlanması	31
4.4. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Üretilmesi ve Stok Kùltürler	32
4.5. Rastlantısal Mutageniz İçin Bakteri Kùltürleri	33
4.6. Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi	33
4.7. Kùltürlerin Etilmetil Sulfonata Maruz Bırakılması	33

4.8.	Mutantların Seçilimi	34
4.9.	Kültürlerin Toplam Kütle (OD <sub>600</sub> ) ve pH Değerlerinin Belirlenmesi	35
4.10.	Kültür Ortamı Amonyum Konsantrasyonunun Belirlenmesi	35
4.11.	Periplazmik L-asparajinaz'ın salınımı için potasyum fosfat-hekzan sulu faz sistemi ile membran permeabilizasyonu	36
4.12.	Enzim Tayini	36
<b>5.</b>	<b>ARAŞTIRMA BULGULARI</b>	<b>38</b>
5.1.	Zamana ve EMS Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi	38
5.2.	Mutant Hücrelerin Seçilimi	39
5.3.	EMS Uygulamasının <i>E. aerogenes</i> 'in L-asparajinaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi	40
5.4.	<i>Enterobacter aerogenes</i> ve Onun ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 Mutant Suşlarının LB Ortamındaki Kültürlerinin pH Değerleri	42
5.5.	<i>Enterobacter aerogenes</i> ve Onun ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 Mutant Suşlarının LB Ortamındaki Kültürlerinin Amonyak Miktarları	42
<b>6.</b>	<b>TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>48</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>54</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b>	Normal Baz Eşleşmeleri	4
<b>Şekil 2.2.</b>	Hatalı Baz Eşleşmeleri	4
<b>Şekil 2.3.</b>	Mutasyon Oluşumu	5
<b>Şekil 2.4.</b>	O6-etilguanin Oluşumu	7
<b>Şekil 2.5.</b>	EMS'nin Mutajenik Etkisi	8
<b>Şekil 2.6.</b>	MNNG'nin Mutajenik Etkisi	8
<b>Şekil 2.7.</b>	Muhtemel Baz Çifti Değişimlerini Belirlemek İçin Genel Yöntem	11
<b>Şekil 2.8.</b>	Delesyon Mutasyonu	12
<b>Şekil 2.9.</b>	İnsersiyon Mutasyonu	13
<b>Şekil 2.10.</b>	Yanlış Anlamalı Mutasyon	14
<b>Şekil 2.11.</b>	Anlamsız Mutasyon	16
<b>Şekil 2.12.</b>	Anlamsız Mutasyonun Translasyon Üzerine Etkisi	16
<b>Şekil 2.13.</b>	Çerçeve Kayması Mutasyonu	17
<b>Şekil 2.14.</b>	Sessiz Mutasyon	18
<b>Şekil 2.15.</b>	Nötral Mutasyon	18
<b>Şekil 2.16.</b>	L-asparajinaz II'in Homotetramer Yapısı	24
<b>Şekil 2.17.</b>	L-asparajinazın Hareket Mekanizması	25
<b>Şekil 4.1.</b>	Kültürlerin Etil metil Sulfonata Maruz Bırakılması	34
<b>Şekil 5.1.</b>	Zamana ve EMS Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak Canlı Hücre Sayısı	39
<b>Şekil 5.2.</b>	Mutant Seçilimi	40
<b>Şekil 5.3.</b>	<i>Enterobacter aerogenes</i> ve onun ansMU 1, ansMU 2 ve ansMU 3 Mutant Suşlarının LB Ortamındaki Kültürlerinin L-asparajinaz Aktiviteleri	41
<b>Şekil 5.4.</b>	<i>Enterobacter aerogenes</i> ve onun ansMU 1, ansMU 2 ve ansMU 3 Mutant Suşlarının LB Ortamındaki Kültürlerinin pH Değerleri	43
<b>Şekil 5.5.</b>	<i>Enterobacter aerogenes</i> ve ansMU 1, ansMU 2 ve ansMU 3 Mutant Suşlarının LB Ortamındaki Kültürlerinin Amonyak Miktarları	44



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 6.1.</b>	Luria-Bertani (LB) Besi Yerinin İçeriği	32
<b>Çizelge 6.2.</b>	Luria-Bertani (LB) Katı Besi Yerinin (Agar) İçeriği	32
<b>Çizelge 6.3.</b>	Yarı Sentetik Katı (M9 Agar)Besi Yerinin İçeriği	32



## SİMGELER VE KISALTMALAR

LB	Luria Bertani Zengin Besi Yeri
M9	Yarı sentetik besi yeri
EMS	Etil metan sulfonat
<i>ansA</i>	Sitoplazmik L-asparajinaz (L-asparajinaz I) geni
<i>ansB</i>	Periplazmik L-asparajinaz (L-asparajinaz II) geni
ansMU	L-asparajinaz mutanti
KPi	Potasyum fosfat
TCA	Trikarboksilik asit
FNR	Fumarat <u>n</u> itrat <u>r</u> edüksiyon proteini
CRP	<u>c</u> AMP <u>r</u> eseptör proteini
ArcA	Aerobik <u>r</u> espirasyon <u>k</u> ontrol
PEG	Polietilen glikol

## 1. GİRİŞ

Enzimler, vücut sıcaklığı ve pH koşullarında çalışmaları ve yüksek katalitik oranları ve substratlarına karşı oldukça özgün çalışmaları ile kimyasal katalizörlere göre daha avantajlıdırlar. Enzimler günümüzde endüstri, tıp ve çevre gibi pek çok alanda uygulama bulmaktadırlar. Günümüzde endüstriyel enzimlerin % 90'ından fazlası ürün saflığını ve üretim maliyetini maksimize etmek amacıyla rekombinant olarak üretilmektedir. Bu tür bir üretim için en yaygın kullanılan iki organizma grubunu fungus ve bakteriler oluşturmaktadır [1].

Enzimler yalnız günlük hayatta ve endüstri alanlarında değil, tıpta teşhis ve tedavide de önemli yer almaktadır. Bazı mikrobiyal orijinli enzimlerin kemoterapide kullanım potansiyellerinin keşfedilmesi ile enzimler üzerine bu yöndeki çalışmalar hız kazanmıştır. Bu tür enzimlerden biri olan ve bu çalışmanın da konusunu teşkil eden L-asparajinaz, kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan bakteriyel orijinli bir enzimdir. Bu enzim çocuk lösemisi başta olmak üzere bir çok kanser çeşidinde kemoterapötik ilaç olarak kullanılmaktadır. L-asparajinazın yapısı ve klinik farmakolojide uygulaması ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen bu enzimin üretimi konusunda çok az çalışma olup, bu çalışmalar da birkaç gram-negatif bakteri türü ile sınırlıdır. Katalitik performans, substrat özgüllüğü, sıcaklık ve pH kararlılığı gibi çeşitli enzim özelliklerini değiştirmek veya artırmak için raslantısal mutagenез yöntemleri (kimyasal raslantısal mutagenез, site-directed mutagenез, Error-prone PCR, Cassette Mutagenез vb.) geliştirilmiştir [2]. Diğer birçok enzim ve proteinin üretimini artırmaya yönelik olarak yapılan kimyasal ve fiziksel raslantısal mutagenез çalışmaları sağlık endüstrisinde yüksek değeri olan böyle bir enzim için (L-asparajinaz) yapılmamıştır. Bu çalışmada rastlantısal mutagenезe maruz kalmış bir gram-negatif bakteri olan *Enterobacter aerogenes*'in yüksek L-asparajinaz üreten mutantlarının seçilimi ve karakterizasyonu yapılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Mutasyon

Evrimsel açıdan mutasyonların dezavantajlarının yanı sıra, canlı kalabilmek için avantajlar da sağladığı bilinmektedir. Mutasyonun klasik tanımı, genetik materyalde meydana gelen kalıtsal bir değişikliktir. Mutasyon, gen rekombinasyonu dışındaki nedenlerle, bir organizmanın genomunu oluşturan nükleotid dizisinde meydana gelen kalıtsal değişikliklerdir. Bir organizmanın gelişimi ve görevleri, büyük ölçüde genler tarafından kontrol edildiğinden, buralarda meydana gelecek bir değişiklik (mutasyon) organizmanın aktivitesi üzerinde yaşamsal etki meydana getirebilir. Mutasyonlar kendiliğinden (spontan) ortaya çıkabilecekleri gibi, çeşitli fiziksel ve kimyasal mutajenlerle de indüklenebilirler. Spontan mutasyonlar genel olarak DNA replikasyonu sırasında oluşmakta ve oluşan mutasyonun organizmadaki etkisi organizmanın yararına olabileceği gibi çoğu zaman organizmayı bir takım özelliğinden dezavantajlı duruma da sokabilir. [3].

Mutasyon frekansının artışına neden olan endojen faktörler (ör. mutator genler, mutator suşlar, mutator virüsler) mutator olarak adlandırılır. Mutasyonlar, kalıtsal materyal olan DNA'daki A-T ve G-C baz çiftlerinin oluşturduğu dizilerde meydana gelen değişimlerden ortaya çıkmaktadır. Mutasyon terimi geniş anlamda kromozom yapısı, kromozom sayısı değişmelerini ve genlerin yapısındaki fiziksel ve kimyasal değişimleri ifade etmek için kullanılmaktadır. Bu bölümde daha çok moleküler biyoloji açısından önem taşıyan genlerin yapısındaki fiziksel ve kimyasal değişimleri ifade eden gen mutasyonları ele alınmıştır. Gen mutasyonlarının oluşum mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için DNA ve protein molekülleri düzeyinde analiz yapmak gerekmektedir. Her hücre doğru zamanda ve doğru yerde doğru bir şekilde görevini yerine getirebilmek için binlerce proteine gereksinim duymaktadır. Bazen gen mutasyonları proteinlerin bir ya da birkaçının gerektiği gibi çalışmasına engel olur. Sentezlenecek olan proteine ait şifreyi taşıyan DNA'daki genetik kodda yani gen bilgisinde meydana gelecek bir mutasyon, ya ilgili proteindeki amino asit diziliminin değişmesine ve o proteinin ifadesinin tamamen yok olmasına veya azalmasına neden olabilir. Çünkü DNA dizisindeki bir mutasyon kodlanan bütün protein kopyalarını etkileyeceğinden özellikle bir hücre ya da organizma için daha zararlı olabilir. Bunun aksine, RNA ya da protein moleküllerinin sentezleri sırasında bu moleküllere ait

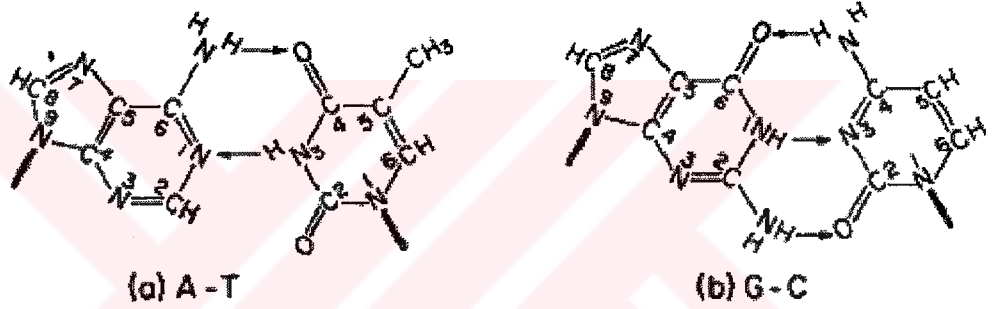
dizilerde meydana gelecek değişimler, sadece o molekülleri etkileyeceğinden etkileri çok daha kısa süreli ve lokal olacaktır [4, 5, 6].

### 2.1.1. Kendiliğinden Mutasyon

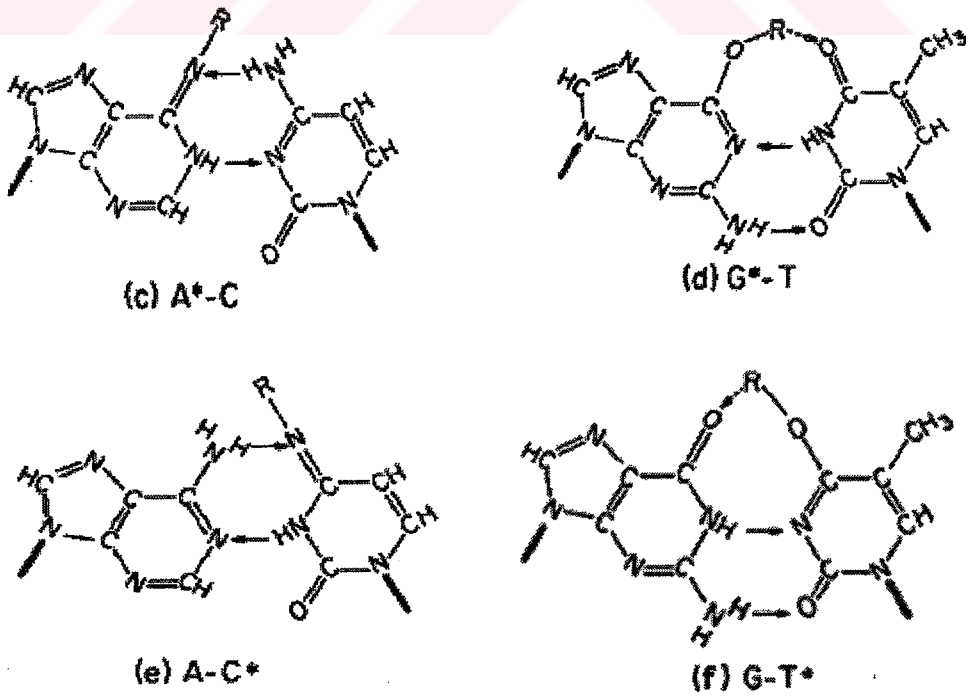
Her ne kadar DNA molekölü kromozom denen yapılarda iyi bir şekilde paketlenmiş durumdaysa da, yine de bazı iç ve dış etkenlerin bozucu ve yıkıcı etkileriyle karşı karşıya kalabilmektedir. Kendiliğinden mutasyonlar, mutajenik nükleotit substratları, iç DNA lezyonlarını ve hasarlı DNA zincirinin replikasyonu sırasında meydana gelen hataları kapsayan çeşitli kaynaklardan türevlenir. Bu kaynaklar, kendiliğinden mutasyonların frekanslarını değiştirirler ve DNA dizisi, DNA işlevleri ve hücrel metabolizma tarafından farklı bir şekilde etkilenirler. Organizmalar kendiliğinden mutagenез'i baskılamak için çeşitli hücrel fonksiyonlara sahiptirler ve her bir fonksiyonun özgülüğü ve etkisi kendiliğinden mutasyonların baskılanmasında belirleyici rol oynar. Bazıların yer değişimi ve tek bazlı çerçeve kaymaları, kendiliğinden ortaya çıkan mutasyonların iki büyük sınıfını oluşturur. Hedef DNA dizileri içinde daha yüksek düzeyde kendiliğinden mutasyon ortaya çıkmasını sağlayan "sıcak bölgeler" (hotspotlar) vardır. Yüksek mutasyon bölgeleri, genomdaki mutasyon frekansının, mutasyon oluşma olasılığının, çok yüksek oranda artırıldığı bölge olarak tanımlanır. Yüksek mutasyonun nedeni, replikasyon hatalarından çok, iç DNA lezyonlarına bağlanabilir [7, 8].

Kendiliğinden mutasyonların oluşumları ile ilgili olarak hiçbir özgün etken yoktur ve genellikle genlerin nükleotid dizilerinde rastgele olan değişiklikler olarak kabul edilirler. Bu mutasyonların çoğu, genlerin azotlu bazlarının yapısını değiştiren organizmadaki normal kimyasal süreçlerle ilgilidir. Mutasyonların kendiliğinden oluşma olasılıkları, pürin ve pirimidin bazlarının karasızlığından ve DNA replikasyonu sırasındaki hatalardan dolayı artar. Kendiliğinden mutasyonların bir diğer nedeni ise DNA replikasyonu sırasında meydana gelen kopyalama hatalarıdır. Normalde bir DNA molekölü kendini yüksek oranda doğrulukla eşler. Bu eşleşmenin doğru olmasında A ile T ve G ile C'in fizikokimyasal bakımdan uygunluk göstermesi önemli rol oynar. Yine A ile T arasında meydana gelen iki G ile C arasında meydana gelen üç hidrojen bağı sayesinde bu eşleşmeler mümkün olur. Ancak, keto grubu taşıyan G ve T gibi bir moleköl ile amino grubu taşıyan A ve C gibi bir moleköl daha değişik formlarda da bulunabilir. DNA'da her bazın keto formu yer alır fakat amino grubu bulunmaz. Bir

molekülün proton ve elektronlarının yeniden dizilmesi olayına tautomerizasyon denir. Tautomerik değişim sonucu keto grubu taşıyan T ve G ile amino grubu taşıyan A ve C azotlu bazları daha az kararlı olan enol ve imino formlarına döndürürler. DNA eşleşmesi sırasında bu tautomerik formlar ortamda bulunursa, nükleotidler arasındaki eşleşmeler değişebilir. Normalde, A ile T, G ile C eşleşirken (Şekil 2.1.) ortamda tautomerik formlar bulunduğu A'nin C'nin tautomerik formuyla eşleşecektir. Bunun sonucunda, A-C ve G-T baz çiftleri oluşacaktır. Bu eşleşmeler hangi gende meydana gelmişse, o gen artık normal genden farklı bir baz sırasına sahiptir, yani mutant bir gendir. Örnek olarak, şekil 2.2.f'de olduğu gibi Timin'in O<sup>2</sup> atomunun substitusyonu , N<sup>3</sup> protonunun pozisyon değiştirmesiyle O<sup>4</sup> atomunun yer değiştirmesini taklit eder. Primidinin 5,6 çift bağlarının doyması muhtemelen Timinin enol formuna (şekil 2.2.f, R=H) ya da Sitozinin imino formuna tautomerizasyonunu kolaylaştırmaktadır [3, 9].

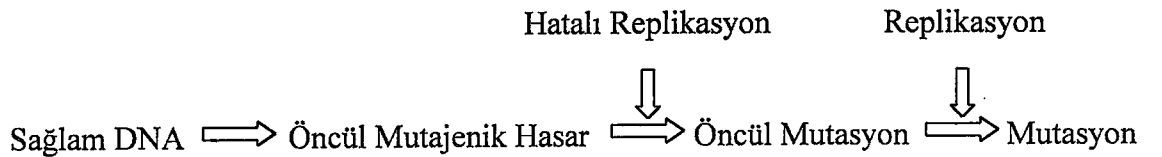


Şekil 2.1. Normal Baz Eşleşmeleri



Şekil 2.2. Hatalı Baz Eşleşmeleri

İki özdeş DNA molekülünün oluşabilmesi için, DNA polimeraz enzimlerinin, A ile T ve G ile S eşleşmeleri sonucu oluşan orijinal kalıp zincirlerin her birine komplementer yeni zincirleri sentezlemesi gerekir. Polimerazların çoğu işlevlerini kusursuz yerine getiremez ve 1000 nükleotidden bir tanesi yanlış olarak kopyalanabilir. Her baz kendisinin de dahil olduğu diğer dört bazla yanlış eşleşme yapabilir. A-A, A-S, A-G, S-S, S-T, G-G, G-T, ve T-T olmak üzere muhtemel sekiz yanlış eşleşme ihtimali vardır. Mutasyon oranı DNA'nın her iki zinciri için aynı değildir. Kesikli sentezlenen (lagging) zincir, düz yapılan (leading) zincire göre 20 kat daha fazla mutasyona eğilimlidir. Çünkü sadece kesikli polinükleotid zincir sentezine giren DNA polimeraz I esas replikasyon enzimi olan DNA polimeraz III'ten daha zayıf bir hata düzelticidir [10]. Replikasyon enzimlerinin hatalı hareketleri sonucu meydana gelen eşleme hatalarından üç tipi karakterize edilmiştir: (1) Bir bazın yer değiştirmesine (substitusyonuna) neden olan tek bazlık yanlış eşleşme, (2) çerçeve kaymasına neden olan tek bazlık artış (veya azalış), (3) Bir baz dizisinin yer değiştirmesine neden olan çok sayıdaki bazın yanlış eşleşmesi. Her mutasyon, DNA'nın mutajenik hasarından türevlenmektedir (şekil 2.3.). DNA'nın mutajenik hasarı, DNA sentezine katılan özel bir DNA polimeraz çeşidi ya da DNA replikasyon elemanları ile hatalı replikasyonun gerçekleşmesinde öncül-mutasyon olarak rol oynar ve bir sonraki DNA replikasyonunda mutasyona dönüştürülmektedir. Mutajenik hasarın nedenleri: (a) Sağlam DNA zinciri ve olağan dNTP'lerin katıldığı DNA replikasyonu sırasındaki replikasyon elemanlarının hatalı işlevleri, (b) DNA replikasyonu sırasında, kararlı olmayan baz eşleşme özgülüğüne sahip bir mutajenik nükleotidin DNA dizisine hatalı eklenmesi, (c) Aktif oksijen türleri gibi endojen mutajenlerle kimyasal reaksiyon ve DNA bazlarının kendiliğinden ayrışması [7].



**Şekil 2.3.** Mutasyon Oluşumu

Her genom için kendiliğinden mutasyon oranı, genel organizma grupları içinde dikkate değer bir şekilde benzerlik gösterirken, gruplar arasında ise göze çarpan bir şekilde farklılık göstermektedir. Genomları  $10^4$  baz içeren RNA virüslerinde mutasyon

oranları, litik virüsler için yaklaşık olarak genom/replikasyon başına 1 iken, HIV (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü) gibi retrovirüsler ve bir retrotranspozon için bu oran yaklaşık 0.1'dir.. *Escherichia coli*'de ortalama olarak her 1-10 milyon nükleotidde 1 tane hata girebilir. Ancak, bu hatanın yanlış eşleşmenin düzeltilmesi mekanizmasından (mismatch repair) geçtiğini varsayarsak bu hata oranı daha da küçülür ( $10^9$ ). Genel olarak yaklaşık 1 milyon baz çiftinden oluşan bir bakteri genomundan mutant bir genom elde etmek için ( $10^9/10^6$ ) o genomun 1000 defa kendi kopyasını yapması gerekir. Daha yüksek ökaryotlarda mutasyon oranları yaklaşık olarak 0.1-100 genom/nesil'dir [11]. Bununla birlikte, organizmalar artan mutasyon oranlarını tolere etme yeteneklerinde farklılık gösterirler. Genel olarak, çok hücreli organizmalar mutasyonlara karşı hoş görülme eğilimindedir ve artan mutasyon oranları insan hücrelerinde kanser riskini artırmaktadır. Tek bir hücrenin ölümü bütün popülasyonun geleceğini tehlikeye atmayacağından, tek hücreli organizmalar daha yüksek mutasyon oranlarını tolere edebilirler. Mutatorların varlığı, bir popülasyonun yaşama şansını artırabilir. Hastalık etkeni olan *E. coli* ve *Salmonella* türleri arasında yaygın olan mutator hücrelerdir. Bu hücreler, uygun olmayan stresli laboratuvar koşullarında normal hücrelere göre daha fazla gelişebilirler. Mutator hücreler hemen hemen fenotip bakımından çok az farklılık gösteren birçok bireyi oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Bu nedenle, yeni çevresel koşullara uyum sağlayan bazı hücreler gelişebilir. Bununla birlikte, stres ortamı ortadan kalktığı zaman mutasyon oranı azalacağından, mutasyondaki geçici artışlar daha da yararlı olabilir [10].

## **2.1.2. İndüklenmiş Mutasyon**

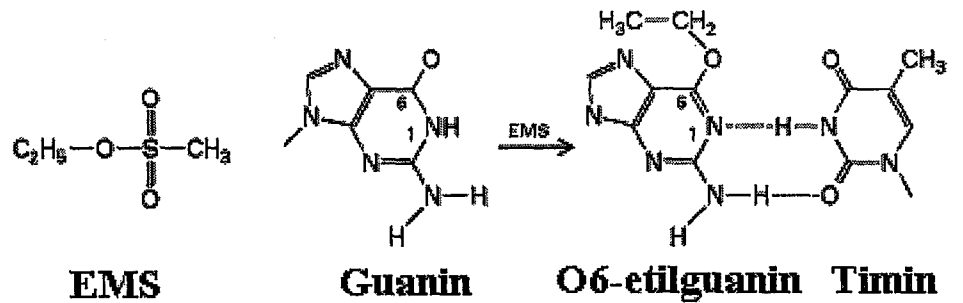
### **2.1.2.1. Kimyasal Mutagenез**

Hem prokaryotik hem de ökaryotik sistemlerde rutin olarak kullanılan kimyasal mutajenlerin birçoğu alkilleyici ajanlardır. Alkilleyici ajanlar, mutajenlerin sekonder ürünler üreten en büyük grubunu oluştururlar. Bu ajanlar, transisyon, transversiyon ve hatta çerçeve kayması mutasyonlarına bile yol açabilirler. Alkilleyici ajanlarla indüklenen mutasyonlar, alkillenmiş DNA'nın bir sonraki replikasyonu sırasında da meydana gelirler. Alkilasyonun kimyasal özgüllüğü, alkilleyici ajan ve uygulama koşullarına bağlıdır. Polinükleotidlerin bütün oksijen ve azotları (şekere bağlı azot hariç) pH = 7 olan sulu solusyonda alkilenebilirler. Alkilasyonla mutagenез farklı iki mekanizma ile meydana gelir, bunlar; doğrudan indüklenen hatalı eşleşme ve hatalı

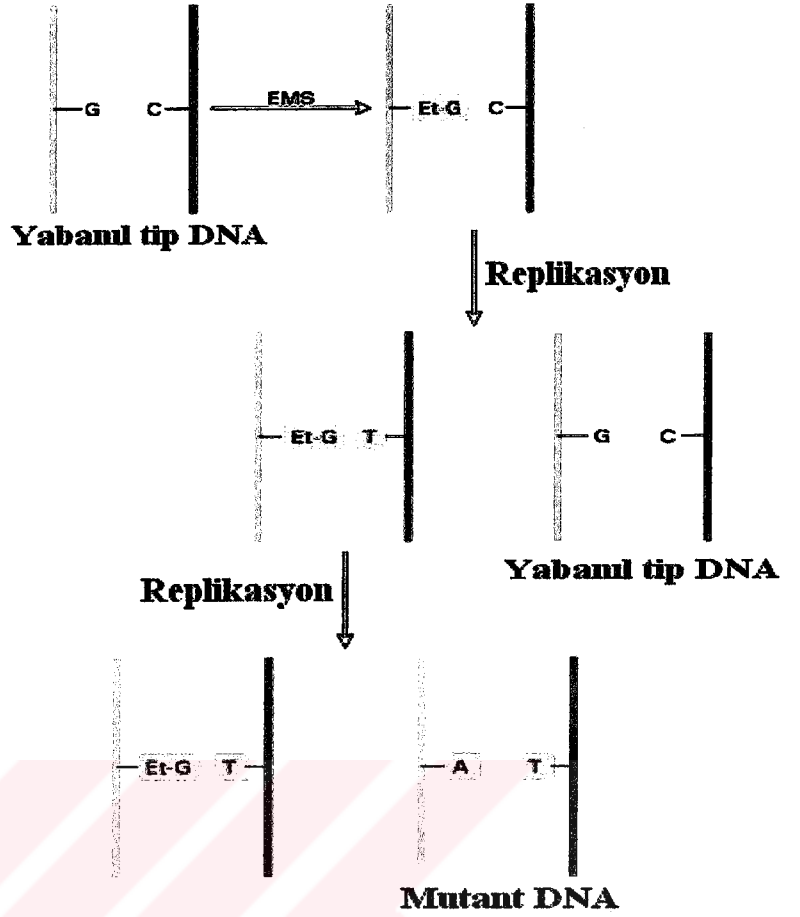


onarımıdır. Alkilasyonla doğrudan indüklenen hatalı eşleşme, spesifik olarak *in vivo* koşullarda 4 bazı da içeren eşleşme reaksiyonları ile transisyonları (A-T↔G-C) oluşturur. DNA'daki normal bazlar, çevreden kolayca etkilenebildiklerinden dolayı, bir ya da birtakım reaksiyon koşulları dizisi altında çeşitli alkilleyici ajanlar ile alkilenirler. Bu ajanlar, guanini N<sup>7</sup>, adenini N<sup>1</sup> ve N<sup>3</sup>, timini ve sitozini N<sup>1</sup> pozisyonunda alkiler. Doğrudan indüklenen alkilasyon mutagenesi için en iyi örnekler; adenin N<sup>3</sup>, guanin N<sup>3</sup>, guanin O<sup>6</sup>, timin O<sup>4</sup> ve sitozin N<sup>4</sup>'ün alkilasyonudur. Guanin O<sup>6</sup> ve timin O<sup>4</sup>'ün alkilasyonu ve mutagenesi arasında önemli bir ilişki vardır. Hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda alkilleyici ajanların nükleik asitlerle reaktivite sıralaması metil > etil > daha büyük homologlar şeklindedir [3, 9, 12]. Alkilleyici ajanlar, DNA'ya katılmazlar fakat bir bazı yanlış eşleşmeye neden olacak şekilde değiştirirler. EMS ve MNNG gibi bazı alkilleyici ajanlar bu şekilde çalışırlar [13].

**Etil metan sulfonat (EMS)** : EMS, yaygın olarak kullanılan bir mutajen olup, kuvvetli bir alkil donörü olarak hareket eden alkilleyici bir ajandır. Timin ya da guaninin N7 glikozidik bağına alkil grubu bağlayarak G-T hatalı eşleşmelerine ve AT→GC ve GC→AT transisyon mutasyonlarının oluşumuna neden olur. Etilmetan sulfonat (EMS), guanin bazının 6 numaralı keto grubunu alkilleyerek O6-etilguanin oluşumuna neden olur. Oluşan O6-etilguanin bir sonraki replikasyonda Sitozin yerine Timin ile eşleşir (Şekil 2.4.). Bir sonraki replikasyonda bu olağandışı eşleşmenin ürünü normal (yani G=C) baz çiftinden tamamen farklı olan mutant A=T baz çifti olacaktır (Şekil 2.5.). Hücrelerde etil grubunu O6-etilguanin'den ayırıp onu normal Guanin haline dönüştüren tamir enzimleri de vardır [2, 14].

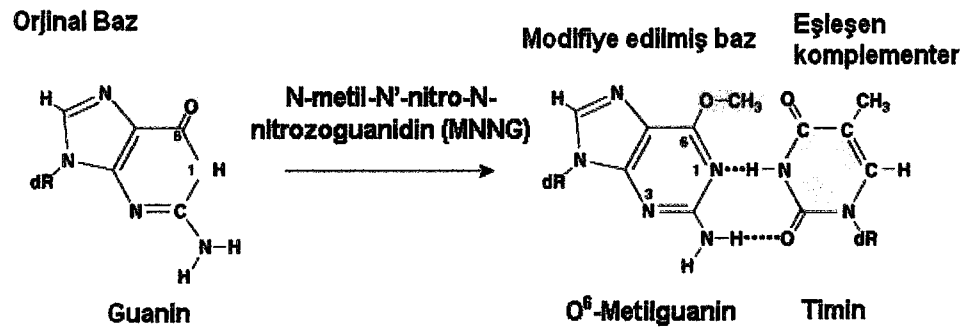


**Şekil 2.4.** O6-etilguanin oluşumu



Şekil 2.5. EMS'nin mutajenik etkisi

*N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidin (MNNG): *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidin (MNNG) güçlü bir mutajen olup öncelikle DNA replikasyonu üzerine etki eder ve tercihen replikasyon noktasını mutajenize eder. Transisyon ve transversiyonlara neden olurken, çerçeve kayması mutasyonlarına neden olmaz [12]. Guanin bazının 6 numaralı keto grubunu alkiler (metil grubu ekler). Oluşan *O*6-metilguanin Sitozin yerine Timin ile eşleşerek replikasyonun bir sonraki basamağında GC→AT transisyonunu meydana getirir (şekil 2.6.) [9].



Şekil 2.6. MNNG'nin mutajenik etkisi

### 2.1.2.2. Radyasyon Mutageniz

**UV radyasyonu:** Pürin ve pirimidinler UV ışığı yaklaşık olarak 260 nm dalga boyunda yoğun olarak absorbe ederler. UV, çoğunlukla GC→AT ya da C→T transisyonlarına neden olan çerçeve kayması, delesyon ve baz çifti yer değişimlerini indükler. UV radyasyonunun nükleik asitlerdeki zararlı etkisi, özellikle iki timin bazı arasında dimerlerin oluştuğu pirimidinler üzerinedir. UV radyasyonu sonucu oluşan DNA'daki UV fotoürünler, siklobütan pirimidin dimerleri, dihidrotimin, sitozin hidrat, komplementer zincirler arasındaki çapraz bağlar ile sistemin neden olduğu DNA-protein çapraz bağlarıdır. Dimerler, DNA konformasyonunu bozar ve normal replikasyonu durdurur. Pirimidinler, hem kesip-çıkarma onarımı hem de replikasyon sırasında DNA'da tek zincir boşluklarının oluşumuna neden olurlar. Bu boşlukların yanlış onarımı ise mutasyonlara neden olur [12, 13].

**İyonize Radyasyon:** İyonize radyasyon radyasyonun daha kuvvetli bir formu olup X-ray, kozmik gama gibi kısa dalga boylu ışınları içermektedir. Bu yüksek enerjili radyasyonlar karşılaştığı moleküllerin atomlarından elektronlar eksildir. Böylece kararlı moleküller ve atomlar serbest radikallere, reaktif iyonlara dönüştürülür. Bu reaksiyonlar doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyali etkiler ve pürin ve pirimidinleri değiştirerek nokta mutasyonlarını oluşturur. Fosfodiester bağlarını da kırarak kromozomların bütünlüğünü bozar ve çeşitli bozukluklar oluşturur. İyonize radyasyon sonucu oluşan etkili kimyasal türler arasında, serbest radikallerin en önemlisi olan hidroksil radikali (OH·) gelmektedir. Serbest radikaller, hücredeki makromoleküllerden en önemlisi olan DNA ile tepkimeye girerek onu yapı ve fonksiyonunu bozarlar [15, 16].

### 2.2. Nokta Mutasyonları

Bazı genler yüzlerce kilobaz çifti (kb) uzunluğundadır (1 kb = 1000 baz çifti). DNA'nın herhangi bir baz çifti mutasyona uğrayabilir. Bununla birlikte, tek bazlık değişim, genetik bilginin değişmesi için yeterlidir. Bir genin kromozom üzerindeki yerini değiştirmeksizin, o genin baz diziliminde sadece bir baz çiftinin değişmesine neden olan mutasyonlar nokta mutasyonlarıdır. Nokta mutasyonları iki şekilde meydana gelir: (1) DNA'nın doğrudan kimyasal modifikasyonu, bir bazın farklı bir baza

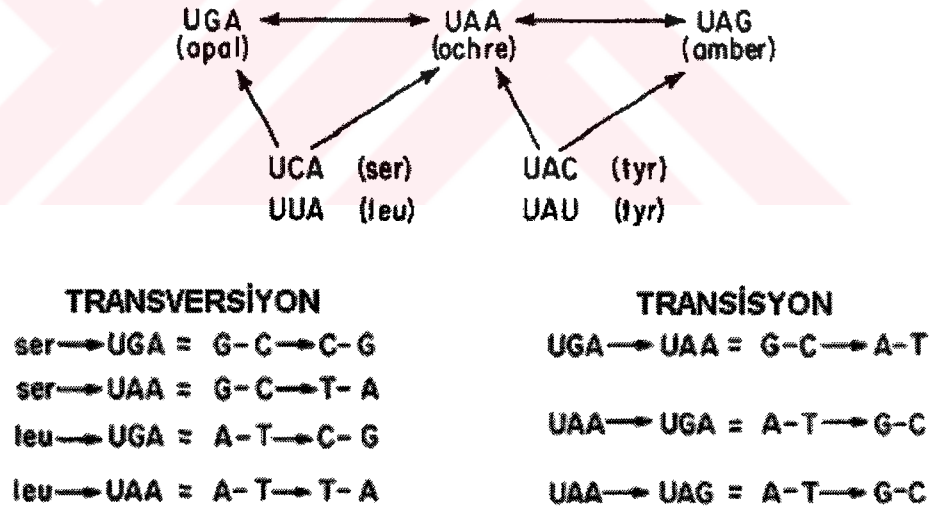
değişmesine, bir başka deyişle baz çifti yer değiştirmelerine neden olur. (2) DNA replikasyonu sırasındaki bir hata, ya polinükleotid zincirine hatalı bir bazın girmesine (insersiyon) ya da bir bazın kaybolmasına (delesyon) neden olur [7, 10].

Viral ve bakteriyal sistemlerle yapılan çalışmalarda görülen amino asit yer değiştirmeleri, baz çifti yer değiştirmelerinin tek tek meydana gelmesinden kaynaklanır. Bu değişimler, genellikle bir kodonun ya üçüncü pozisyonunda bulunan ya da üçüncü bazına bitişik olan her baz çiftinde meydana gelen değişimlerdir. Tek baz çiftini içeren mutasyonun en yaygın tipi, DNA dizisindeki bir noktada bulunan tek bir bazın başka bir bazla yer değiştirdiği baz yer değiştirmesi mutasyonlarıdır [12]. Baz çifti yer değiştirmeleri, DNA düzeyinde değişimin doğasına bağlı olarak transisyon ve transversiyon olmak üzere ikiye ayrılır:

**Transisyon:** Bir genin herhangi bir yerindeki bir pürin bazı yerine başka bir pürin veya bir pirimidin bazı yerine başka bir pirimidin bazının geçmesi şeklindeki mutasyonlardır (Şekil 2.7.). (bir pürin olan A yerine G veya G yerine A; bir pirimidin olan T yerine S veya S yerine T). Hücrede çoğunlukla kendiliğinden meydana gelen bu tip mutasyonlar, 5-bromourasil (BrdU) ve 2-aminopürin (2-AP) gibi baz analoglarının, nitröz asit hidroksilamin ve alkilleyici ajanların hücreye verilmesiyle yapay olarak da meydana getirilebilir. 5-bromourasil, bir Timin analogu olup Timinin metil grubu ile yer değiştiren bir brom atomuna sahiptir. BrdU, Timin yerine DNA'ya katılabilir ve tautomerik bir kaymaya neden olabilir. Brom atomunun varlığı, bazın yapısındaki keto formunu ( =O ) enol ( - OH ) formuna dönüştüren bir değişikliğe neden olur. Enol formu Guanin ile baz eşleşmesi yapar ve bir replikasyon döngüsünden sonra, orijinal A=T yerine G=S şeklinde bir transisyon oluşur. Nitröz asitin primer etkisi, Adenin ve Sitozin'den oksidatif deaminasyonla amino grubunu koparmak, böylece onları hipoksantin ve Urasil'e dönüştürmektir. Hipoksantin Sitozin ile ve Urasil ise Adenin ile eşleşebilir, sonraki replikasyon döngüsünde transisyonel değişimlere götürür ve böylece A yerine G ve S yerine T geçmiş olur. 5-halojenatlı Urasillerin kristal yapısı, Timin'in O<sup>4</sup> atomu ile Guanin'in N1 protonu arasında tek bir hidrojen bağının oluşmasıyla, bir pürine komşu bir 5-halojenatlı Urasil'in ya da bir 5-halojenatlı Urasil'e komşu bir Timin artığının sıra ile kısmi değişimlerine imkân veren kuvvetli etkileşimlere sahiptir [7, 9, 12]. Diğer taraftan hidroksilamin (HA), GC→AT transisyonuna neden olabilmektedir. Onun etkisi daha çok bakteriyofajlarda ve *Neurospora*'da görülür. HA, Sitozin'in 4 nolu atomundaki amino nitrojeni hidroksilleyerek N-4-hidroksisitozini

meydana getirir ve bu da Timin gibi davranarak Adeninle eş yapar. Bir sonraki replikasyonda ise G-C eşleşmesi A-T eşleşmesine döndürür [3]. Adenin bir analogu olan 2-aminopürin (2AP), DNA'ya eklendiğinde, daha sonraki replikasyonlar esnasında sitozinle hatalı eşleşerek A:T→G:C transisyonlarını oluşturabilir. Ya da eğer 2AP sitozinle hatalı eşleşerek araya girerse, bu G:C→A:T transisyonları ile sonuçlanacaktır. Yukarıdaki çalışma ile uygun olarak genetik çalışmalar 2-AP'nin transisyonlara özgü olduğunu göstermiştir. *E.coli*'de *trpA* reversion ile ilgili yapılan çalışmalar, transversiyonlar ile çerçeve kaymalarının bazı bölgelerde düşük bir oranda 2AP ile indüklenebileceğini göstermiştir [13].

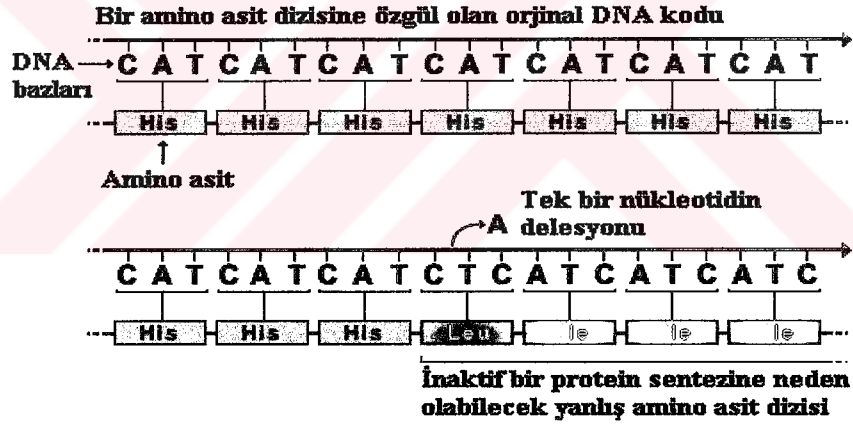
**Transversiyon:** Transversiyonlar kendiliğinden kolaylıkla meydana gelir. Mutasyon sonucu bir pürin bazının yerini (A ve G) bir pirimidin (T ve S) veya bir pirimidin bazının yerini bir pürin bazının almasıyla oluşur (Şekil 2.7.). A-T veya G-S çiftinin yerine T-A veya S-G çiftinin geçmesi birer transversiyondur. Hemoglobinin  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirlerindeki mutasyonun yarısı bu şekilde olmuştur [7, 9, 12].



Şekil 2.7. Muhtemel bütün baz çifti değişimlerini belirlemek için genel bir yöntem

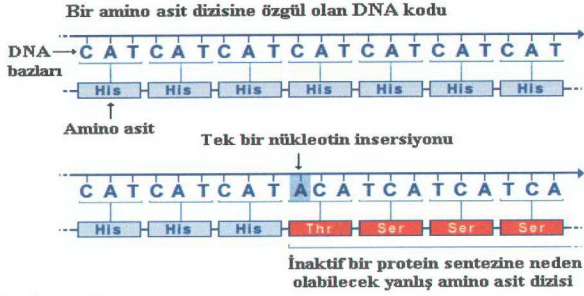
Baz çifti yer değiştirmeleri, protein düzeyinde değişimin doğasına bağlı olarak delesyon, insersiyon, yanlış anlamlı, anlamsız, sessiz ve çerçeve kayması olmak üzere dörde ayrılır:

**Delesyon:** Bir ya da daha fazla baz çiftinin DNA'dan uzaklaştırılmasıyla bir gende meydana gelen DNA baz sayısının eksilmesi. Bir ya da birkaç baz çiftinin uzaklaştırılması olan mikrolelesyonlar çoğunlukla çerçeve kayması (frameshift) mutasyonlarıdır (Şekil 2.8.). Bununla birlikte, delesyonlar, yüzlerce ya da binlerce baz çifti kaybını içeren makrolelesyonları da kapsayabilir. Herhangi bir geni içeren büyük bir DNA parçasının delesyonu, o genin fonksiyonunun tamamıyla kaybetmesine ya da değişmesine neden olur. Makrolelesyonlar, bir genin hepsini ya da komşu olan birkaç geni de uzaklaştırabilir. Eğer bu genlerden biri esansiyel ise, bu genin delesyonu durumunda mutasyon letal olacaktır. Böyle delesyonlar geri mutasyonlar aracılığıyla onarılamazlarken, genetik rekombinasyon aracılığıyla onarılabilirler. Nokta mutasyonları, makrolelesyonlardan farklı olarak geri mutasyonlar aracılığıyla tersine çevrilebilirler. Delesyonlar, yüksek pH veya sıcaklık etkisiyle meydana geldiği gibi replikasyon hataları sonucu da oluşabilir. Hatta hücrelerin proflavin gibi maddelerle muamelesi sonucu deneysel olarak da meydana getirilebilen bu çeşit delesyonlar kendiliğinden oluşmazlar [12].



**Şekil 2.8.** Delesyon mutasyonu

**İnserisyon:** DNA molekülüne fazladan bir ya da birkaç baz çiftinin girmesi sonucu meydana gelirler. Tek bir baz ya da birkaç bazı içerebilen mikroinsersiyonlar, genellikle çerçeve kayması mutasyonlarına neden olurlarken (Şekil 2.9.), delesyonlarda olduğu gibi replikasyon hataları sonucu da oluşabilirler. Fakat makroinsersiyonlar genetik rekombinasyon esnasında meydana gelen hataların bir sonucu olarak artar. Hücrelerin akrinin türevleriyle muamele edilmesi sonucu deneysel olarak da oluşturulabilirken kendiliğinden meydana gelmezler.

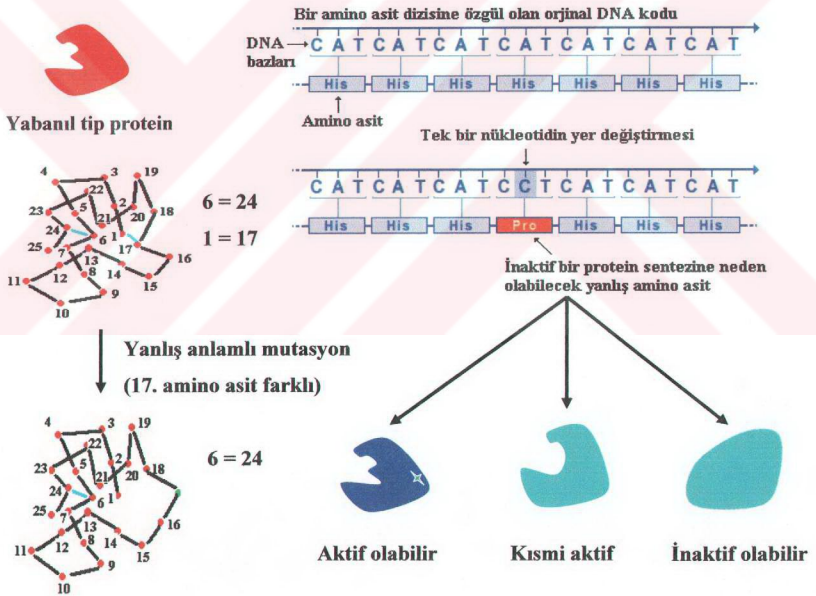


**Şekil 2.9.** İnsersiyon mutasyonu

Gerek delesyon gerekse insersiyon tipi mutasyonlarda, genetik şifrede büyük değişiklikler meydana gelmekte ve buna bağlı olarak da genin fonksiyonu ve ifade ettiği protein değişmektedir. Bu durumda ya o gen tarafından şifrelenen enzim tamamen inaktif olmaktadır ya da enzimin faaliyetinde veya özelliklerinde bir değişim meydana geldiği için sentezlenen proteinler çok farklı olmaktadır ve fenotipinde değişiklik ortaya çıkmaktadır [7, 12].

**Yanlış Anımlı Mutasyon:** Bir gen tarafından şifrelenen proteinde bir amino asidin hatalı bir amino asitle yer değiştirmesine neden olacak bir DNA baz çifti substitusyonu missense mutasyonu olarak adlandırılır. Bir proteini kodlayan gende bir baz substitusyonu meydana gelirse gen tarafından transkribe edilen mRNA, baz yer değişiminin meydana geldiği noktada hatalı bir baz taşıyacaktır. mRNA proteine transle edildiği zaman, hatalı baz proteinde hatalı bir amino asidin insersiyonuna neden olabilir. Baz yer değişimi, sentezlenmiş proteinde hatalı bir amino asit değişimi ile sonuçlanırsa, DNA'daki bu değişim yanlış anlamlı mutasyon olarak bilinir. mRNA'nın triplet kodonunun 1. ya da 2. bazında meydana gelen yanlış anlamlı mutasyon genellikle protein aktivitesinde meydana gelen bir değişime neden olur (Şekil 2.10.). Bu değişim protein için zararlı ya da faydalı olabilir. Yanlış anlamlı mutasyonun etkisi, proteindeki değişimin pozisyonuna bağlıdır. Eğer değişim aktif bölgede meydana gelirse kısmi ya da total inaktivite arasında değişen çok büyük bir etkiye sahip olabilir. Bir başka ifade kodlanmış bir proteinin aktivitesi ya da üç boyutlu yapısı için gerekli olan bir amino asit değişmişse fenotipin değişmesine neden olur. Protein yapısının fonksiyonel grup içermeyen bir yerinde değişim meydana gelirse proteinin aktif bölgelerini içeren tersiyer yapısı üzerine yok edici etkisi olmaz. Örnek olarak, tirozin amino asidinin

mRNA'daki orijinal kodonu olan UAC'nın AAC kodonuna dönüşümü, proteindeki tirozin amino asidinin asparajin amino asidine değişimiyle sonuçlanır. Meydana gelen polipeptitteki kimyasal anlam, yani amino asitlerin dizisi değiştiğinden dolayı yanlış anlamlı mutasyon olarak bahsedilir. Böyle mutasyonların etkileri dramatik olabilir. Örnek olarak, hemoglobinin protein bileşeni olan globini kodlayan gendeki tek bir baz değişimi olarak hücre anemisine neden olur. Hemoglobinin  $\beta$  zinciri geninin 17. nükleotidinde Adenin nükleotidinin bir Timin nükleotidine dönüşümü olan tek bir yanlış anlamlı mutasyon, proteindeki glutamik asidin, valin amino asidine dönüşümü ile sonuçlanır. Bu dönüşümün etkisi, düşük oksijen koşulları altında hemoglobin molekülünün şekil değiştirmesine neden olur. Kırmızı kan hücrelerinin değişen şekli, küçük kılcal kan damarları boyunca hücrelerin hareketini büyük ölçüde engeller [10].



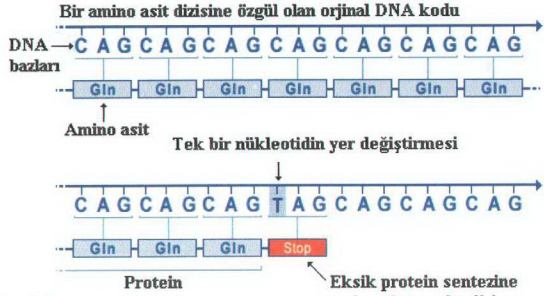
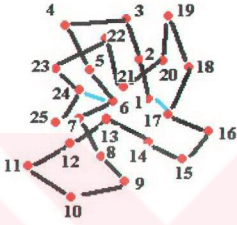
Şekil 2.10. Yanlış anlamlı mutasyon



**Anlamsız Mutasyon:** Bir amino aside özgül olan kodon, bir mutasyon sonucu nükleotid değişimi ile mRNA'daki dur kodonlarından birine (UAA = okre, UAG = amber veya UGA = opal) dönüşür. Translasyonun vaktinden önce sonlanmasına neden olacak dur kodonlarından biri fonksiyonel olmayan tamamlanmamış bir proteinin sentezlenmesine yol açar. Bir amino aside özgül olan anlamlı bir kodonun (sense kodon), bir mutasyon sonucu nükleotid değişimi ile mRNA'daki dur kodonlarından birine yani anlamsız (nonsense) bir kodona değişiminden dolayı bu tip mutasyonlar anlamsız mutasyonlar olarak adlandırılır (Şekil 2.11). mRNA'daki durdurma kodonları, normal olarak bir polipeptid zincir sentezinin sonlandığını belirten genetik koddaki noktalama işaretleri olarak hareket ederler ve hiçbir amino asidi şifrelemeyen dur sinyalleridir. Bir tRNA molekülü tarafından tanınmadıkları için translasyon bu üçlülere geldiğinde son bulur. mRNA'daki bu durdurma kodonlarından biri bir polipeptidi kodlayan dizide bulunursa; (1)- Polipeptid zincir sentezinin zamanından önce tamamlanmasına, (2)- Amino uçlarını içeren eksik sentezlenmiş bir polipeptidin oluşumuna, (3)- Okuma çerçevesine ait mutasyon yönündeki bütün kodonların translasyonunun iptal edilmesine ve tamamlanmamış bir proteinin sentezine neden olur. Kromozomlar, çift sarmal DNA molekülünün iki zincirinden birine komplementer olan RNA molekülünün sentezlenmesiyle DNA'daki genetik bilginin RNA'ya aktarılması anlamına gelen transkripsiyonun başlatıldığı ve sonlandırıldığı yerlerle sınırlandırılmış üniteler halinde organize edilirler. Bu üniteler transkripsiyon ünitesi olarak ifade edilir. Transkripsiyonel üniteler tek bir gen içerdikleri gibi birden fazla gen de içerebilirler. mRNA'da bulunan bir transkripsiyon ünitesinin 5' ucundaki nükleik asit dizisinde bir mutasyon meydana gelirse, mutasyon, bu mutasyonel bölgeyi takip eden ünitenin 3' ucuna lokalize olmuş genlerin şifrelediği proteinlerden biri ya da hepsi üzerinde bir polar etki gösterir. Polarite derecesi, transle edilmemiş RNA'nın bir sonlandırıcı ilmi oluşturması ve bu yüzden transkripsiyonu engellemesi ile ilgilidir. Sonuç olarak, ribozomdan erken ayrılma söz konusu olduğu için kısmen sentezlenmemiş, normale göre kısa bir polipeptid ortaya çıkar [4, 10, 17].



## Yabancıl tip protein



6 = 24

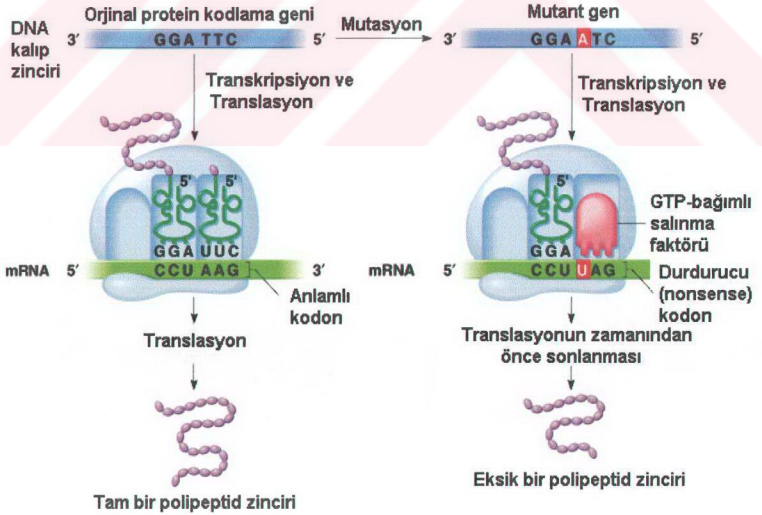
1 = 17

Anlam taşımayan muatsyon  
11. amino asidi kodlayan kodon  
dur kodonuna dönüşmüştür.



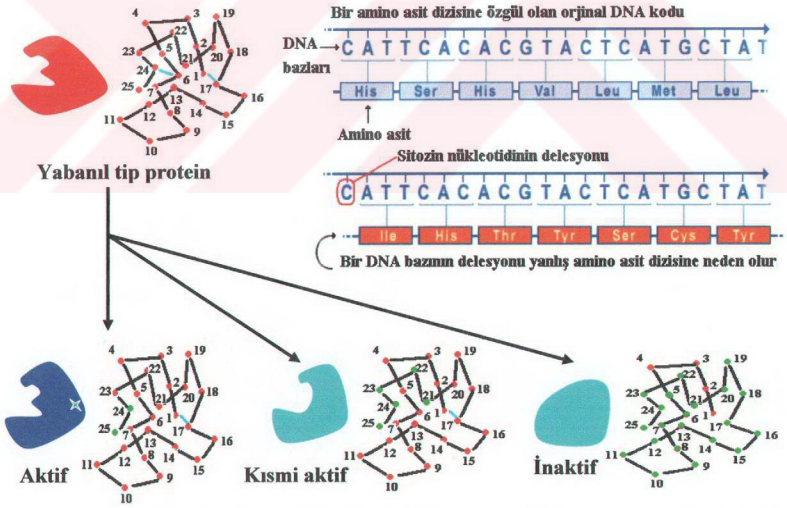
İnaktif Protein

Şekil 2.11. Anlamsız mutasyon



Şekil 2.12. Anlamsız Mutasyonun Translasyon Üzerine Etkisi

**Çerçeve Kayması Mutasyonları:** Bakterilerde ribozom, başlama kodonu olan AUG'nin önünde altı ribonükleotitten oluşan (AGGAGG) ve yalnızca pürin bazlarını içeren Shine Dalgarno kutusuna bağlandığı zaman, sonraki üçlü ribonükleotit gruplarının doğru translasyonunun yapılmasını sağlayan okuma çerçevesi kurulur. Bir okuma çerçevesi, her biri bir amino asidi kodlayan üçlü (triplet) baz gruplarından oluşur. İnsersiyon ve delesyonlar üçün katları halindeki nükleotitleri içeriyorsa daha az tehlikelidir. Çünkü orijinal çerçevesini korur. Gen içinde herhangi bir noktaya üçün katları dışında ( $3n + 1$ ,  $3n + 2$  vb.) herhangi bir sayıda bazın girmesi (insersiyon) veya çıkması (delesyon), sadece meydana geldikleri kodonu değil, mutasyonel bölgeyi takip eden 3' yönündeki bütün kodonların anlam içeriğini de değiştirirler. Amino ucu normal olmasına rağmen, bir çerçeve kaymasını takip eden 3' yönündeki bütün nükleotidler yanlış olarak gruplanır. Bunun sonucunda nükleotidlerin kodonlar şeklinde triplet gruplanması değişeceğinden translasyonel okuma çerçevesi de değişir ve 3' yönünde yanlış amino asitler şifrelenir (Şekil 2.13.). Sonuç olarak çerçeve kayması mutasyonları, hem anlamsız hem de normaline göre kısa proteinlerin sentezlenmelerine yol açarlar [10, 12, 18].



Oluşum yerine bağımlı olarak aktif, kısmi aktif veya inaktif (ör. mutasyon 24. kodonda ise aktif, 21. kodonda ise kısmen aktif, 5. kodonda ise inaktif protein)

Şekil 2.13. Çerçeve Kayması Mutasyonu

**Sessiz ve Nötral Mutasyon:** DNA'nın 4 nükleotidi üçlü kombinasyonlarla,  $(4)^3 = 64$  şifre kodunu meydana getirir. 64 kodon, hücredeki 20 çeşit amino asidi şifrelemek için yeterlidir. Genetik koddaki bu gereğinden fazla çeşitlilikten dolayı, bazı durumlarda, aynı amino asit bir den fazla kodon tarafından şifrelenebilir. Bu gereğinden fazla çeşitlilik, protein kodlayan gende mutasyonların hepsi proteinde değişime neden olmazlar. Yani çoğu amino asidin birçok alternatif kodon tarafından kodlanmasından dolayı, meydana gelen yeni kodon, aynı amino asidi yine de kodlayabilir (Şekil 2.14.). Örnek olarak, bir tirozin kodonunu (ATG) kodlayan DNA, mutasyona maruz kaldığı zaman, olabilecek birçok muhtemel sonuç vardır. DNA'nın kodladığı bir tirozin kodonu olan ATG'nin mRNA'daki karşılığı olan UAC kodonunun, UAU kodonuna değişimi, UAU kodonunun da bir tirozin kodonu olması nedeniyle protein aktivitesinde görülebilir bir etkiye sahip olmayacaktır. Kodlama bölgesindeki sessiz mutasyonlar genellikle, mRNA kodonun üçüncü lokasyonunda meydana gelen bir baz değişimi sonucu meydana gelir ve protein aktivitesinde değişime neden olmaz. Nötral mutasyonlar ise, fonksiyonları aynı fakat yapıları farklı olan amino asitlerin farklı kodonlarla şifrenmesidir. Mutasyon sonucu meydana gelen nükleotid değişimi (baz substitusyonu), kodonun değişmesine neden olur (Şekil 2.15). Bunun sonucunda proteindeki amino asit değişir, fakat meydana gelen amino asit yer değiştirmesi protein aktivitesinde fark edilir bir değişime neden olmaz. [4, 10, 19].



**Şekil 2.14.** Sessiz Mutasyon: Lizin amino asidine özgül olan kodonun üçüncü pozisyonundaki AT-GC transisyonu, yine aynı amino asidi şifreleyen başka bir kodona dönüştürmüştür.



**Şekil 2.15.** Nötral Mutasyon: Lizin amino asidine özgül olan kodonun üçüncü pozisyonundaki AT-GC transisyonu, yine aynı amino asidi şifreleyen başka bir kodona dönüştürmüştür.

### 2.3. Geri (Reversiyon) Mutasyonlar

Yabani tip fenotipini kaybeden bir mutant organizmanın kendiliğinden ya da indüklenmiş mutasyona maruz kalması, orijinal mutasyonun (fenotipteki değişimi) etkisini tersine çevirerek yabani tip fenotipin yeniden elde edildiği yeni mutasyonlara neden olabilir. Bu olay tersinir ya da geri mutasyon olarak bilinir. Mutantta kaybedilen yabani tip fenotipin, ikinci bir mutasyonla yeniden kazanıldığı suş ise revertant olarak tanımlanır. Bir geni inaktive eden mutasyonlar olarak bilinen ileri mutasyonların etkisi, geri mutasyonlarla tersine çevrilebilir. Geri mutasyonlar, meydana geldikleri yere bağlı olarak farklı mekanizmalara sahiptirler [20].

**Gen İçi (İntragenik) Reversiyon:** Aynı gen içerisinde meydana gelen mutasyonlardır. İki farklı tipi mevcuttur: **(i)-Aynı bölge reversiyonu:** Orijinal mutasyonun meydana geldiği gen dizisinde ikinci bir mutasyonun meydana gelmesidir. Mutasyon sadece aynı gen dizisinde meydana gelmez, orijinal yabani tip dizinin geri kazanılmasına da yol açar ya da orijinal amino asidin, protein aktivitesini kısmen ya da tamamen karşılayabilecek diğer bir amino asitle yer değiştirmesine de neden olur. Çünkü meydana gelen bir baz çifti değişikliğine rağmen sentezlenen protein normal bir protein gibi görevini sürdürebilir. **(i)-İkinci bölge reversiyonu:** Genellikle aynı genin farklı bir bölgesinde ilk mutasyonun etkisini baskılayan ikinci bir mutasyonun meydana gelmesidir. Örnek olarak, çerçeve kayması mutasyonuna neden olan bir baz delesyonunun gen içinde meydana geldiği yere yakın bir bölgede bu delesyonun etkisini baskılayan bir bazın eklenmesi, orijinal okuma çerçevesinin yeniden kurulmasını sağlar [20].

**Genler Arası (İntergenik) Reversiyonlar:** Baskılayıcı mutasyonlar olarak adlandırılan bu tip mutasyonlar, tRNA genlerinde görülen mutasyonlardır ve zincir sonlanma sinyalinin anlamlı kodon olarak okunmasını sağlar. Bir tRNA geni, kendi antikodon bölgesinde, mRNA'daki bir dur kodonu ile hatalı eşleşmeye neden olacak bir mutasyonel olaya maruz kalırsa, anti-kodonlar tarafından dur kodonunun tanınması sonucu bir amino asit polipeptid zincirine sokularak translasyon tamamlanır. Ancak, proteinin yapısı önemli şekilde değişmezse, protein normal işlevini gösterebilir. Bu yüzden bu ikinci mutasyon dur kodonuna neden olan ilk değişikliğin mutant karakterini baskılamıştır. Örnek olarak, Glutamine özgül olan tRNA, 3'GUC 5' antikodonuna

sahiptir ve bu tRNA için iki gen bulunur. tRNA<sup>Gln</sup> genlerinden biri mutasyona uğradığı zaman, Gln tRNA<sup>GUC</sup>, Gln tRNA<sup>AUC</sup>’ye dönüşebilir. Sonuçta translasyon sırasında Gln tRNA<sup>AUC</sup>’nin mRNA’daki karşılığı olan UAG (amber) dur kodonu tanınacağından, bu kodonun meydana geldiği her yerde bir Glutamin asidi sıraya sokularak translasyon tamamlanır [20].

## 2.4 Mutagenез

Bu yüzyılın başlangıcından beri mutagenез, genetiğin ilgi çekici bir yönü olarak kalmıştır. Gen kopyalanması ve gen ifadesinin aydınlatılması ile mutagenез üzerine yapılan çalışmalar ilerlemiştir. Bu alana ilgi, birçok çevresel ajanın insanlarda mutasyona neden olmasının fark edilmesinden sonra daha fazlaşmıştır. Bu mutasyonlar neoplastik hastalıkların yanı sıra, metabolik hastalıklara da yol açabilir. Son 15 yıldaki ilerlemeler, mutajenik mekanizmanın iki büyük sınıfını açığa çıkarmıştır: bunlar doğrudan indüklenen hatalı baz eşleşmesi ve hatalı tamirdir. DNA’da farklı reaksiyon ürünleri üreten birçok alkilleyici ajan vardır, fakat bunların sadece ikisi (O<sup>6</sup>-alkilguanin ve O<sup>4</sup>-alkiltimin) hatalı eşleşme için olası doğrudan indükleyici adaylardır. DNA zincir uzunluğunu kesen DNA lezyonlarına neden olabilen diğer alkilasyon ürünleri genellikle yanlış bir replikasyon sonrası tamir mekanizmasını harekete geçirirler. Mutagenезin biyokimyası, mutajenlerin DNA’da birtakım lezyonları üretmesinden dolayı teknolojik olarak zorlaşmıştır. Bu lezyonların sadece birkaçı mutasyonel mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunabilir [9].

## 2.5. Rastlantısal Mutagenез

Rastlantısal mutagenез belli bir protein (enzim)’in yüksek miktarlarda üretimi veya komple inhibisyonu için kullanılan bir metottür. Bu metot aynı zamanda istenilen özelliklere sahip proteinin, özellikle enzimin, değişik tipteki varyantlarını araştırmada da etkili bir yoldur. Böylece enzimin sıcaklık kararlılığı, pH kararlılığı ve substrat özgülüğü gibi çeşitli özellikleri verimli bir şekilde değiştirilebilir. Nitröz asit, hidroksilamin, etil metan sulfonat gibi mutajen ajanlar kullanılarak oluşturulan rastgele mutasyonlar, son yıllarda geliştirilen PCR metotları ile de oluşturulabilmektedir. Rastlantısal mutagenезin en önemli avantajları arasında, belli kimyasal ajanlarla yüksek düzeyde mutasyon oluşturulabilmesidir. Bütün organizmaların rastgele mutajenizasyonu

için yaygın olarak etil metan sülfonatın (EMS) kullanılmasına rağmen, bilgilerimize göre EMS tanımlı bir gen fragmanının *in vitro* mutagenezi için kullanılmamaktadır [2].

## 2.6. Enzimler

Enzimler, uygun pH ve sıcaklık koşulları altında aktivite gösterme kapasiteleri, reaksiyon spesifiteleri, katalitik afiniteleri gibi özellikleri bakımından insan yapımı katalizörlerden çok daha avantajlıdır. Tedavi amaçlı olarak kullanılan enzimleri, diğer bütün ilaç tiplerinden ayıran iki önemli özellik vardır. Birincisi, enzimler hedeflerine yüksek affinite ve spesifite ile bağlanırlar ve aktivite gösterirler. İkincisi ise, enzimler katalizördürler ve birçok hedef moleküllü arzu edilen ürünlere dönüştürürler. Bu iki özellik, enzimleri küçük moleküllerin vücut içerisinde başaramadığı terapötik biyokimyayı başaran etkili ve spesifik ilaçlar yapmaktadır. Bu özellikler, hastalık tedavisine yönelik olarak bazı enzim ilaçların gelişimine ön ayak olmuştur. İlaçlar gibi enzimlerin de bazı dezavantajlar bulunmaktadır. Bunlar arasında, endotoksinler gibi kontamine edici toksik materyalleri elimine etmek için saflaştırılmalarının gereksinimi, vücutta çoğunlukla hızlı bir şekilde yıkıma uğramaları, immunojenik olmaları, boyutları bakımından dağılımlarının sınırlı olması gibi sebepler gelmektedir. Korunmasız olan terapötik polipeptidler, vücut içerisinde kısa bir *in vivo* yarı ömre ve vücuda girdiklerinde antijenik bir özelliğe sahiptirler. Bu sebepten dolayı, protein ilaçların etkili olması için konakçıya ait bağışıklık sisteminden korunması gerekir. Bu problemlere rağmen, L-asparajinaz akut lenfoblastik lösemi ve diğer lenfoid malignansilerin tedavisinde önemli bir kemoterapötik bir ajan olmaktadır [21]. L-asparajinaz, esansiyel olmayan L-asparajin amino asidini L-aspartik aside ve amonyağa hidrolizini katalizleyen bir enzimdir. L-asparajinaz enzimi birçok hayvandan (özellikle rodentlerin serumlarından), bitkilerden, funguslardan ve bakterilerden izole ve karakterize edilmesine rağmen, insanlarda bulunmamaktadır [22]. En çok akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisinde kullanılan L-asparajinaz enzimi, L-asparajin amino asiti bakımından oksotrof olan kanser hücrelerini bu amino asitten yoksun bırakarak bu hücrelere karşı sitotoksik etki gösterir. Etkin L-asparajin sentetaz enzimine sahip normal hücreler ise L-asparajin amino asidi için prototrof olduklarından böyle bir durumdan etkilenmezler. [23].

### 2.6.1. L-asparajinazlar (L-asparajin aminohidrolazlar; EC 3.5.1.1 )

Başta akut lenfoblastik lösemi olmak üzere lenfosarkoma, melanosarkoma ve non-Hodkin gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde terapötik değere sahip olan bakteriyel L-asparajinaz (L-asparajin amidohidrolaz) enziminin kanser tedavisinde kullanılması 1953 yılında Kidd'in bu konuda yapmış olduğu öncül bir çalışma ile başlamıştır [24]. Kidd çalışmasında, L-asparajinaz aktivitesinin fare ve sıçanlarda tümör gelişimini inhibe ettiğini göstermiştir. Kidd'i takiben yapılan çalışmalar L-asparajinazın tümör baskılayıcı özelliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur ve 1981 yılında Broome tarafından bu enzimin anti-tümör aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir [25]. Çeşitli hayvan (özellikle rodentler), bitki, fungus ve bakteride bulunan L-asparajinazlar arasındaki yapı ve biyokimyasal farklılıklar (Km değerleri arasındaki farklılık gibi) nedeniyle bunların hepsi anti tümör aktivitesi göstermezler [21,26]. Sadece birkaç gram-negatif bakteri türü tarafından üretilen anti-tümör L-asparajinazların genellikle sitoplazmik form (L-asparajinaz I) ve bakteriyel plazma zarı ile hücre duvarı arasına lokalize olmuş periplazmik form (L-asparajinaz II) olmak üzere iki farklı izozimi bulunmaktadır. Bu iki izozime sahip gram-negatif bakterilerin başlıcaları *Serratia marcescens* [27,28], *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi* [29,30], *Escherichia coli* [31,32], *Enterobacter aerogenes* [33,34] ve *Pseudomonas aeruginosa*'dır [35,36]. Periplazmik form olan L-asparajinaz II, memelilerdeki asparajin oksotrofu olan tümörlere karşı yüksek bir antitümör aktivitesi gösterirken, sitoplazmik form olan L-asparajinaz I konstitütif bir enzim ve asparajine karşı çok düşük affiniteye sahip olduğundan protein sentezini engelleme ve tümör gelişimini baskılama yeteneğine sahip değildir [24]. Bu iki enzimin sahip olduğu farklı yapı ve biyokimyasal özellikler, sadece periplazmik formun (L-asparajinaz II) anti tümör aktivitesi göstermesinin nedeni, olarak gösterilebilir. Bu iki enzim izoformu arasındaki diğer önemli bir fark ise sitoplazmik L-asparajinazın konstitütif olması nedeniyle, sentezinin büyüme koşullarından etkilenmemesidir. Periplazmik L-asparajinaz'ın sentezi ortam koşullarına bağlı olarak indüklenebilmektedir [37, 38].



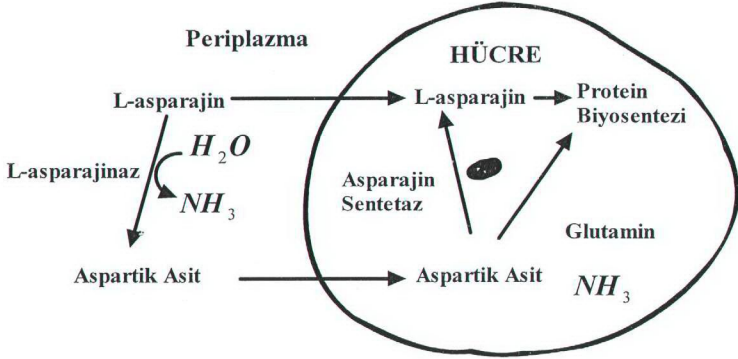
## 2.6.2. L-asparajinazların Yapısal ve Biyokimyasal Özellikleri

Periplazmada bulunması ve ortam koşullarına bağlı olarak indüklenebilmesi yanında L-asparajinaz II, farklı kuaterner yapı ve biyokimyasal özelliklere sahip olması açısından da L-asparajinaz I'den ayrılmaktadır. *E. coli*'den elde edilen ve toplam moleküler büyüklüğü 142 kDa olan L-asparajinaz II, aynı yapıya sahip olan 4 özdeş alt üniteden (homotetramer) oluşmuş bir yapıya sahiptir (Şekil 2.16.) ve bu homotetramerin her bir alt ünitesi 326 amino asit uzunluğunda ve yaklaşık olarak 35 kDa büyüklüğündedir [26, 38]. Tetramerin her bir alt ünitesi komşu alt ünitelerle iki tip bağlantı kurar. Bu bağlantılardan biri, yakın dimerin oluşumuna neden olan çok kuvvetli etkileşimlere sahip sıkı bir bağlantı iken ikincisi ise uzak dimerin oluşumuna neden olan zayıf bağlantı olarak tanımlanabilir. Her L-asparajinaz II tetrameri dört aktif bölge içermektedir. Bu dört aktif bölge, bir yakın dimeri oluşturan iki alt ünitenin birbirleri ile etkileşimde buldukları ara yüzeye lokalize olmuşlardır. Her bir ara yüz için ise iki aktif bölge bulunmaktadır. Uzak dimerler ise aktif bölge içermemektedirler [39]. L-asparajinaz II dört özdeş alt üniteden oluşan homotetramer bir yapıya sahipken L-asparajinaz I homodimer bir yapıya sahiptir [40]. Sitoplazmik ve periplazmik L-asparajinazlar arasındaki diğer önemli bir biyokimyasal fark ise L-asparajinaz II'in sahip olmuş olduğu homotetramer yapıdan kaynaklanan yüksek asparajin affinitesidir. Michaelis-Menten sabitesi bakımından karşılaştırıldıklarında L-asparajinaz II için  $K_m$   $10^{-5}$  M iken L-asparajinaz I için bu değer yaklaşık  $10^{-3}$  M'dır L-asparajinaz I' den daha da düşük substrat affinitesine sahip olan bitkisel L-asparajinazlar için bu değer ise  $10^{-2}$  M'dır [40]. Bu değerler, L-asparajinaz II'in L-asparajinaz I'e göre 100 kat daha yüksek substrat (L-asparajin amino asit) affinitesine sahip olduğunu göstermektedir [25, 38, 41]. L-asparajinaz I ve bitki L-asparajinazlarından farklı olarak L-asparajinaz II daha geniş bir substrat özgüllüğüne sahip olup aynı zamanda L-glutamini de substrat olarak kullanmaktadır ( $K_m$   $10^{-3}$  M). Ancak bu amino asite karşı olan affinitesi L-asparajin amino asidine karşı 100 kat daha düşüktür [23, 25, 33, 37]. Bu farklılıklar, klinik farmakolojide, kemoterapötik ajan olarak neden L-asparajinaz II'in kullanıldığı hakkında fikir vermektedir. Bu çalışma boyunca aksi belirtilmedikçe, "L-asparajinaz" terimi, enzimin periplazmik izoformu olan L-asparajinaz II için kullanılmıştır.



Şekil 2.16. L-asparajinaz II'in homotetramer yapısı.

L-asparajinaz II, *ansB* geni tarafından kodlanırken, L-asparajinaz I, *ansA* geni tarafından kodlanır ve her iki izozime ait bu genler, kromozom üzerinde geniş bir gen grubunu kapsayan farklı regülonlarda bulunurlar. Bu nedenle, L-asparajinaz I geni (*ansA*) ile L-asparajinaz II geni (*ansB*) farklı şekillerde düzenlenirler [37]. L-asparajinaz sentezi karbon, azot kaynağı ve oksijen gibi besinsel ve çevresel faktörler tarafından regüle edilebilmektedir. Bu durum, protein sentezinde görevli olan birtakım transkripsiyonel faktörlerin ve bunun gibi kompleks mekanizmaların, *ansB* geninin indüklenmesini ya da baskılanmasını kontrol etmesinden kaynaklanmaktadır [42-43]. *E. coli*'de L-asparajinazın sentezi, anaerobik koşullarda 100 ile 1000 kat kadar artırılabilir [38]. Bu enzim anaerobiosis sırasında, anaerobik global transkripsiyon sinyali olarak davranan fumarat nitrat redüksiyon (FNR) proteini tarafından etkin bir şekilde indüklenmektedir. Ayrıca, L-asparajinaz biyosentezinin, aerobik respirasyon kontrol (ArcA) ve cAMP reseptör proteini (CRP) ile de pozitif regüle olduğu rapor edilmiştir. Enzimin sentezinin anaerobiosis ile indüklenmesine rağmen glukoz gibi katabolik repressörle baskılandığı saptanmıştır [37, 44, 45].



Şekil 2.17. L-asparajinin hareket mekanizması

L-asparajinaz, esansiyel olmayan L-asparajin amino asidini L-aspartik aside ve amonyağa hidrolizini katalizler (Şekil 2.17.). H<sub>2</sub>O kullanımına dayanan bu hidrolitik reaksiyon sırasında L-asparajin amino asitindeki amid bağı L-asparajinaz tarafından hidroliz edilmektedir [46]. Bu enzimatik reaksiyonun ürünü olan L-aspartat, insanda DNA ve RNA yapısına katılacak pürin ve pirimidinlerin sentezinde ve ornitin döngüsünde önemli rol oynayan ürün iken, bu reaksiyonun substratı olan L-asparajin ise bitkilerde azot protein sentezinde tekrar kullanılması için hem depolama hem de taşıma görevini üstlenmiş en önemli bir amino asittir [40].

### 2.6.3. L-asparajinin Etki Mekanizması

İnsanlarda bulunmayan [22] L-asparajinaz enzimi kan dolaşımında bulunan L-asparajin amino asidini hızlı bir şekilde hidrolize ederek anti-neoplastik etkisini gösterir. Hücre döngüsünde protein sentezinin gerçekleştiği G1 fazında L-asparajinin bu etkisinin olduğu ve G1 fazında kanserli hücreleri tutuklayarak normal programlanmış hücre ölümüne (apoptosis) sürüklediği ileri sürülmüştür [23, 47]. Kanserli hücrelerin hücre döngülerini (büyümek ve bölünmek) tamamlayabilmeleri için gereksinim duydukları asparajin amino asidinin, L-asparajinaz enzimi tarafından aspartik aside ve amonyağa çevrilmesi, tümör hücrelerinin L-asparajinden yoksun bırakılmasına neden olur. Asparajin sentetaz enzimine sahip olan sağlıklı hücreler kendi asparajin amino asidini yaparken, kanserli hücrelerde ise bu enzim ya bulunmadığından yada normal

hücrelerdeki göre seviyenin çok altında sentezlendiğinden dolayı, normal hücrelerden farklı olarak kanserli hücrelerde yeterince asparajin sentezi yapılmamaktadır. Bu nedenle, kanserli hücreler asparajin gereksinimlerini tamamen dışarıdan alınan besinlerin yapısındaki veya sağlıklı hücreler tarafından kan dolaşımına katılan asparajin amino asidinden karşılarlar. Kemoterapi sırasında enjekte edilen L-asparajinaz enzimi ile, kan dolaşımında bulunan asparajin amino asidinin yıkılması sonucu, kanserli hücreler büyümek ve bölünmek için gereksinim duydukları asparajin amino asidini alamadıklarından dolayı protein sentezi bloke olur. Buna bağlı olarak hücre büyümesini tamamen durduracak DNA sentezi (replikasyon) ve RNA sentezi (transkripsiyon) inhibisyonu gerçekleşir. Hücre döngüsünü bloke eden bu olaylar dizisi sonucu kanserli hücreler apoptosis (normal programlanmış hücre ölümü) ile yıkılırlar [25, 48, 49].

#### 2.6.4. L-asparajinazın Klinik Farmakolojisi

L-asparajinaz uygulaması genel olarak damar veya kas yolu ile olup, tek başına veya başka anti-neoplastik ajanlarla birlikte kombinasyon terapi şeklinde olup, plazma yarı ömrü 12-24 saat kadardır. Ancak, bu enzim mikrobiyal orijinli olması sebebiyle insanda bu proteine karşı gelişen immün cevabı [49, 50] ortadan kaldırmak ve hem de enzimin plazma yarı ömrünü arttırmak için son yıllarda enzim **polietilen glikol (PEG)** ile konjuge edilerek (PEG-asparajinaz) veya enkapsüle (ör., lipozom) edilerek verilmektedir [51-52]. Asparajinazın bu modifikasyonu enzimin serum yarı ömrünü arttırmakta ve enzime karşı geliştirilen immünolojik reaksiyonları azaltmaktadır [49]. Pegasparajinazın plazmadaki yarı ömrü yaklaşık olarak 6 gündür [49]. PEG ile modifikasyon, muhtemelen enzimi serumdaki proteazlardan ve antikorların bağlanmasından korumaktadır [51].

### 3. ÇALIŞMA İLE İLGİLİ KAYNAK ÖZETLERİ

İbrahim ve O'Sullivan 1999'da insanlarda laktoz kötü emilim semptomlarını tedavi etmeye yönelik probiyotik bakterilerde  $\beta$ -galaktosidazın üretimini artırmak amacıyla klasik bir kimyasal mutagenез yöntemi geliştirmişlerdir. İki *Bifidobacterium* türü (*B. breve* ve *B. longum*) ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ile *Streptococcus thermophilus*'un her bir suşu, kimyasal mutajenler olan etilmetan sulfonat (EMS) ve N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin'e (MNNG) bir defalık maruz bırakılarak test edilmiştir. Yüksek oranda  $\beta$ -galaktosidaz ( $\beta$ -gal) üretimine sahip mutantların seçimi için, her bir suşa ait EMS ve MNNG'ye maruz bırakılmış türler X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranosid) içeren BHI (beyin kalp infüzyonu) agarlara ekilmiştir. O-nitrofenil- $\beta$ -galaktosid (ONPG) kullanılarak kantitatif  $\beta$ -gal aktiviteleri için mavi renge boyanmış koloniler seçilmiştir. Gözlemlenen 2 milyon koloniden 75 mutant elde edilmiş ve bunların yabani tip suşlara göre yüksek  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi gösterdikleri gözlenmiştir. EMS'in dört suştan üçünde MNNG'ye oranla daha yüksek oranda  $\beta$ -gal üretimine sahip mutant oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir [53].

Yu-Ping Lai ve arkadaşları 2003'de in vitro raslantısal mutagenезin etilmetan sulfonat (EMS) kullanılarak gerçekleştirilmesine yönelik yeni bir sistem tanımlamışlardır. Bu çalışmada fibrinolitik aktiviteye sahip olan bir serin proteaz enzimini kodlayan *Bacillus aprN18* geni hedef gen olarak kullanılmıştır. Kodlama bölgesinde meydana gelen mutasyonları araştırmak için bütün plazmid yerine bir plazmidten 1.4 kb'lık gen fragmenti kesilmiş ve 37 °C'de bir saat boyunca 10 mM EMS'ye maruz bırakılmıştır. Muamele görmüş fragment daha sonra orijinal ifade vektörüne yeniden bağlanmış ve proteaz aktivitesinden yoksun *Bacillus subtilis* suşundan bir mutantlar kütüphanesi kurulmuştur. Değiştirilmiş enzim aktivitelerine sahip mutantların aktivite değişimleri, sıvı kültür süpernatantı kullanılan bir yarı kantitatif enzim deneyi yapılarak gözlenmiştir. Değiştirilmiş enzim aktivitelerine sahip 5 koloni dizi analizi için rastgele seçilmiştir. Nokta mutasyonları arasında sırasıyla GC→AT transisyonu %42.1, AT→GC transisyonu %34.2 ve GC/CG transversiyonu %23.7 oranlarında bulunmuştur. Bu çalışma, tanımlı bir DNA dizisinin in vitro mutagenезisi için EMS 'nin ilk uygulamasıdır [2].

Bir başka çalışmada EMS ile UV'nin *Thermococcales*, *Pyrococcus* ve *Thermococcus*'un dokuz arkeal suşu üzerine letal ve mutajenik etkileri araştırılmıştır.

Her iki uygulama sonucunda da güçlü bir şekilde indüklenmiş bir mutajenitenin olduğu saptanmış ve mutajenle muamele sonunda kendiliğinden mutasyon frekansının sıklığının EMS ile 150 kat, UV ile 400 kat yükseldiği gözlenmiştir [54].

EMS'nin yararlı mutasyonlar oluşturduğuna dair yapılan bir çalışmada, kitin agarındaki kitin bağlayıcı beyaz M2R boya kullanılarak potansiyel kitinolitik bakterilerin seçilimi amacıyla basit ve hızlı bir teknik geliştirilmiştir. Yüksek kitinolitik potansiyele sahip olan mikroorganizmalar, 24-48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra UV ışık altında beyaz bir bölge oluşturmuşlardır. EMS muamelesi sonucunda oluşan *Alkaligenes xylosoxydans* 'ın hiperkitinaz mutantlarının yabani tiplerine göre 3-4 kat daha fazla kitinaz üretimine sahip olduğu bulunmuştur [55].

Enzim sentezini artırmaya yönelik yapılan benzer bir çalışmada *Bacillus pumilis*'in yabani bir suşu selüloz üretimi için araştırılmış ve bu suşun farz edilen mutantları bir mutajenik ajan olan EMS kullanılarak yapılan kimyasal mutagenезisten sonrası katabolit baskılama duyarsızlığı için seçilmiştir. EMS uygulanması sonucu meydana gelen mutasyon, selüloz sentezinin katabolit baskılmasını gösteren *Aspergillus terreus*, *A. nidulans* ve *Trichoderma reesei* gibi diğer selüloz üreticileriyle karşılaştırıldığında, glikoz varlığında yaklaşık 10 kat daha fazla selüloz üreten yeni türlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur [56].

L-asparajinaz geni (*ansB*) oksijene duyarlı ve karbon katabolit represyonla aktivitesi kontrol edilebilen bir promotora sahiptir. Oksijenin bu regülondaki etkisi promotor üzerinde anaerobik global transkripsiyon faktörlerini (Fnr, ArcA/B) tanıyan konsensus dizilerin bu faktörleri bağlaması ile olurken, karbon katabolit represyon cAMP/CRP ile olmaktadır [57, 58]. L-asparajinaz enziminin moleküler yapısı [23, 25, 26, 31, 37, 40], geni (*ansB*)'nin bulunduğu regülön [27, 59, 33, 37, 42] ve enzimin anti-lösemik ve anti-neoplastik klinik uygulamaları [26, 49, 50, 52] hakkında bir çok çalışma bulunmasına rağmen, bu enzimin üretimi konusunda çok az sayıda çalışma olup, bunlar da genellikle *E. coli* başta olmak üzere birkaç bakteri ile sınırlıdır. Enzimin çalışılan bakteride optimal üretimi için kimyasal ve fiziksel şartların tam olarak çalışılmamış olması ve buna bağlı olarak az miktarlardaki üretimi, bu enzimin marketteki pahalı değerinin en önemli sebeplerindendir [35]. Bu da oldukça etkin bir onkolitik ajan olan enzimin yaygın kullanımını mümkün kılmamaktadır. Karbon katabolit represyon, nitrojen ve oksijenle ileri derecede regüle olan bu enzimin üretimi için farklı karbon, azot ve atmosferik içeriğe sahip ortamlar kullanılmış, farklı bakterilerde ve hatta bir bakterinin aynı türünde bile farklı sonuçlar elde edilmiştir [33, 34, 36]. Çalışmaların

birinde [33] *Enterobacter aerogenes*'in L-asparajinaz üretimi için gerekli olan besin ve oksijen koşulları çalışılmış ve bu enzimin üretimi için en uygun karbon ve nitrojen kaynakları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmadaki bulgulara göre, en iyi karbon kaynağı olarak sodyum sitrat, en iyi nitrojen kaynağı olarak da diamonyum hidrojen fosfat belirlenmiştir. *E. coli*'de L-asparajinaz sentezi üzerine glukozun etkisinin çalışıldığı bir başka çalışmada [60], % 5'lik glukoz içeren büyüme ortamında enzim sentezinin hemen hemen tamamen baskılandığı saptanmıştır. Burada, L-asparajinaz sentezini inhibe eden tek faktörün, glukozun neden olduğu hücre içi cAMP seviyesindeki azalış olmadığı, ancak, oluşan asit ortamının da bunda etkili olduğu ileri sürülmüştür. Enzim sentezinin nitrojenle regülasyonu konusunda ise, çözünür azot kaynağı olarak L-asparajin, L-glutamin ve L-glutamik asit gibi amino asitler ve üre enzim sentezini stimüle ederken, amonyum bileşiklerinin enzim sentezini baskıladığı saptanmıştır [43, 61, 62]. Ancak, bunun tersini rapor eden çalışmalar da olmuştur [63]. Bu bağlamda, bir çalışmada glukoz ve amonyum iyonlarının ortama eklenmesi ile L-asparajinaz üretiminin baskılandığı belirlenirken [64], *Klebsiella aerogens* ile yapılan benzer bir çalışmada ise glukozun bu bakteride L-asparajinaz üretimini inhibe etmediği görülmüştür [65]. Atmosferik içeriğin L-asparajinaz sentezi üzerine olan etkisi konusunda da karbon ve azot kaynakları gibi farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Bazı bakterilerde iyi bir havalandırma L-asparajinaz sentezini indüklerken [33], diğerlerinde baskıladığı gözlenmiştir [34, 38, 66, 67]. Örneğin, *E. coli*'de enzim sentezinin anaerobik koşullarda aerobik koşullardakinden 100 ile 1000 kat kadar daha fazla olduğu rapor edilirken [38], aynı bakteri ile yapılan bir başka çalışmada artan erimiş oksijen seviyesine paralel olarak L-asparajinaz sentezinin de arttığı gösterilmiştir [98]. *E. aerogenes* ve onun *vgb<sup>+</sup>* ve *vgb<sup>-</sup>* rekombinanat suşları ile yapılan bir başka çalışmada ise genel olarak, enzim aktivitesi hem yüksek havalandırma hem de oksijensiz koşullarda düşmektedir. Tüm suşlar için en yüksek enzim aktivitesi düşük havalandırma ve çalkalama koşulundaki kültürlerde görülmüştür. Bu kültürlerin yüksek havalandırma/çalkalama ve anaerobik /düşük çalkalama koşullarındaki kültürlerden 2 kat kadar daha yüksek enzim aktivitesi gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca, enzim üretimi üzerine farklı glukoz konsantrasyonlarının katabolik baskılama gösterdiği rapor edilmiştir. Yüksek konsantrasyonda (%1) glukoz bulunan LB ortamında üretilen kültürler, %0,1 glukoz (düşük glukoz konsantrasyonu ) bulunan LB ortamında üretilen kültürlerden 100 kat kadar daha düşük L-asparajinaz aktivitesi gösterdikleri görülmüştür [34].

*E. coli*'de yüksek düzeyde L-asparajinaz biyosentezi için hücre duvarının uzaklaştırılmasına dayanan sferoplast füzyon tekniği geliştirilmiş ve bu amaçla bakteriyel suşlar, kromozomal DNA transformasyonuna bağlı olarak antibiyotik dirençliliği bakımından işaretlenmiştir. % 46.5 ve % 78 oranında daha yüksek L-asparajinaz üretimine sahip yedi transformat sferoplast füzyon için seçilmiş ve seçilen altı rekombinant suşun, yabancı suşlara göre 2-3 kat daha fazla enzim aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır ve bu rekombinant suşlardan bazılarının üç ay boyunca yüksek enzim aktivitelerini korudukları görölmüştür [41].



## 4. MATERYAL VE METOT

### 4.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Ayırıcılar

Bu çalışmada kullanılan etilmetil sulfonat, L-asparajin, trikloroasetik asit, amonyum sulfat, hekzan, Tris-HCl, potasyum fosfat (KPi), Nessler ayırıcı gibi kimyasallar (HgI<sub>2</sub>, KI, NaOH) analitik saflık derecesinde olup Sigma şirketinden temin edilmiştir. Besiyeri hazırlamasında kullanılan kimyasallar da aynı firmadan sağlanmıştır.

#### 4.1.1. Nessler Ayırıcı

Nessler ayırıcı solüsyon A ve solüsyon B adı verilen iki solüsyonun karışımından oluşur [68]. Solüsyon A, 35g KI ve 50g HgI<sub>2</sub>'nin 200 mL distile suda çözülmesiyle hazırlanırken, solüsyon B ise 50g NaOH'nın 250 mL distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Solüsyon A ve B soğutulduktan sonra solüsyon B solüsyon A'ya eklenmiş ve karışım (Nessler ayırıcı) ışıktan korunacak şekilde karanlıkta muhafaza edilmiştir. Bu karışım en az bir hafta çökeltme için bekletildikten sonra dipteki çökeleğe dokunulmadan üstteki kısım kullanılmıştır.

### 4.2. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Bu çalışmada Gram-negatif bakteri olan *Enterobacter aerogenes* (NRRL B-427) kullanılmıştır. *E. aerogenes* Amerikan Tarım Bakanlığı Kültür Koleksiyonundan (USDA Culture Collection, Peoria, Illinois, USA) temin edilmiştir.

### 4.3. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamlarının Hazırlanması

Bu çalışmada zengin besi yeri olarak LB (pH 7.0) ve sınırlı bir besinsel değeri olan yarı sentetik agar (M9 agar) besi ortamı kullanıldı. Bu besi ortamlarının içeriği çizelge 3.1 ve çizelge 3.2'de verilmiştir. Besi ortamları 125 mL kapasiteli erlenlerde 20 mL besi ortamı olacak şekilde 25 dakika süresince otoklavda 120°C'de 1 atm basınçta otoklav edilmiştir. Kullanılan karbohidratlar, stok solüsyonlar olarak (% 25 konsantrasyonda) hazırlanmış, benzer şekilde otoklav edilmiş ve karamelizasyonu

önlemek için besi ortamına otoklavdan sonra uygun son konsantrasyonu sağlayacak miktarlarda ilave edildi.

**Çizelge 6.1** Luria-Bertani (LB) Besi Yerinin İçeriği (L<sup>-1</sup>)

NaCl	10 g
Pepton	10 g
Maya Özü	5 g

**Çizelge 6.2** Luria-Bertani (LB) Katı Besi Yerinin (Agar) İçeriği (L<sup>-1</sup>)

NaCl	10 g
Pepton	10 g
Yeast ekstrat	5 g
Agar	15 g

**Çizelge 6.3** Yarı Sentetik Katı Besi (Medium 9)Yerinin (Agar) İçeriği (L<sup>-1</sup>)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	6.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 g
NaCl	0.5 g
L-asparajine	5.0 g
1 M MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.0 mL
0.1 M CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.0 mL
% 20 Glukoz Stok	10.0 mL
Agar	20.0 g
Fenol Red	0.0225 g
Distile Su	1000 mL

#### 4.4. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Üretilmesi ve Stok Kùltürler

Çalışmada kullanılan bakterilerin uzun süreli stokları % 20 gliserol (v/v) içeren sıvı Luria-Bertani (LB) besi ortamı içinde hazırlandı. Bunun için konakçı bakteriler (*E. aerogenes*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*) sıvı LB ortamına ekim yapıldı ve 1 gece (15 saat kadar) 37 °C, çalkalamalı koşullarda (200-rpm) inkübatörde inkübe edildiler. Bu kùltürlerden 1 mL alınarak Eppendorf tüplerine transfer edildi ve 10,000-rpm'de 5 dak.

oda sıcaklığında santrifüj edilerek pelletlere 800 µl LB ve 200 µl gliserol eklenerek hafife vortekslendi. Bu şekilde hazırlanmış olan hücre süspansiyonları -20 °C'de muhafaza edildiler. Bu şekilde hazırlanan stoklarda hücrelerin 2 yıl kadar canlılıklarını korudukları (koloni oluşturma) belirlenmiştir. Ancak, çalışmada kullanılan bakteriler bu stok kültürlerden değil, LB içeren agar plakalar üzerine ekilen ve +4 °C'de muhafaza edilen hücrelerden yapılmıştır.

#### **4.5. Rastlantısal Mutageniz İçin Bakteri Kültürleri**

Bunun için, katı besiyerinden bir öze ile bir koloninin bir kısmı alınarak 20 mL LB içeren 125 mL kapasiteli erlenlere ekim yapılmış ve 1 gece süresince boyunca çalkalamalı koşullarda (200-rpm) 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu kültürlerden yeni besi ortamlarına 1/100 bakteri olacak şekilde (ör. 20 mL LB içeren erlenlere 200 µL kültür) transfer edilerek, rastlantısal mutageniz çalışması için yukarıdaki gibi inkübasyona (200-rpm, 37 °C) bırakıldılar.

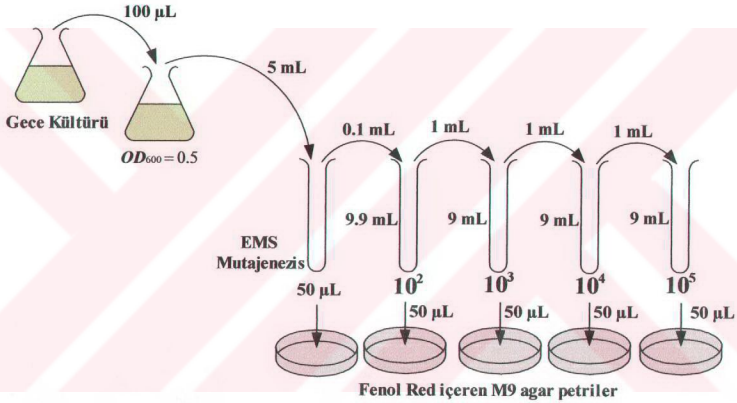
#### **4.6. Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi**

Mutant eldesi için optimal mutageniz koşulları belirlenmiştir. Zaman ve farklı EMS konsantrasyonlarının canlı hücre sayısı üzerine etkisini belirlemek amacıyla 1 gece (yaklaşık 15 saat) 200 rpm ve 37 °C'de inkübasyona bırakılan kültürlerden 1.5 mL ependorflara steril bir şekilde alınarak oda sıcaklığında 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Toplanan pellet daha sonra 1.5 mL LB ile suspense edilmiş ve üzerine son konsantrasyon 0.065 M, 0.13 M, 0.325 M ve 0.65 M olacak şekilde EMS eklenerek 0, 10, 30, 60, 90 ve 120 dakika boyunca 200 rpm ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücre sayımı için uygun sulandırım yapılarak LB katı besiyerlerine ekimleri yapılmış ve 37°C'de 17-18 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücre sayımları yapılarak optimal mutageniz koşulları için en uygun zaman ve EMS konsantrasyonu belirlenmiştir.

#### **4.7. Kültürlerin Etilmetil Sulfonata Maruz Bırakılması**

Bölüm 4.5'de açıklandığı gibi yeni besi ortamlarına 1/100 bakteri kültürü transfer edildikten sonra  $OD_{600} = 0.5$  olana kadar (yaklaşık olarak  $2.5 \times 10^8$  hücre/mL)

200-rpm, 37 °C' de inkübasyona bırakıldılar. Bu log fazı kültüründen santrifüj tüplerine 5 mL alınarak oda sıcaklığında 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra hücre pelletleri elde edildi. Bu pelletler 2 defa 5 mL LB ile yıkandı ve her yıkama sonunda tekrar santrifüj edilerek pelletler toplandı. En son yıkamada elde edilen pelletler 2.5 mL LB içine alındı ve son konsantrasyon 0.1 M olacak şekilde uygun EMS eklendi (ör. 2.5 mL LB'de içine-ekleme örnek için 35 µL EMS ) ve 1 saat boyunca 200-rpm, 37 °C' de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu iki defa yine 5 mL LB ile yıkandı ve santrifüj edilerek pelletler toplandı. Pellet 2 mL LB içerisinde süspansiyon edildi. EMS'ye maruz bırakılmış süspansiyon uygun sulandırım yapılarak Fenol Red ayırıcı içeren M9 agarlara ekim yapıldı ve yüksek düzeyde L-asparajinaz üreten mutant bakterilerin seçimleri için 18 - 48 saat 37 °C' de inkübasyona bırakıldı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Kültürlerin Etilmetil Sulfonata Maruz Bırakılması

#### 4.8. Mutantların Seçilimi

Çalışmanın bu kısmı, yüksek düzeyde L-asparajinaz üreten mutantların seçilimine yönelik geliştirilmiş yeni ve yarı kantitatif bir yöntemi içermektedir [69]. Bu yöntem, yüksek düzeyde L-asparajinaz üreten mikrobiyal kolonilerin etrafındaki pembe zon oluşumuna bağlı olarak L-asparajinaz aktivitesinin tayin edilmesini temel almaktadır. Burada yüksek düzeyde L-asparajinaz üreten mikrobiyal kolonilerin etraflarına salmış oldukları amonyaktan dolayı koloni çevresinde oluşan pembe rengin yoğunluğuna dayanmaktadır. Yüksek düzeyde L-asparajinaz üretimi yapan mutantların

izolasyonu, L-asparajinaz enziminin substratı olan asparajin amino asidini ve bir pH indikatörü olan Fenol Red'i içeren yarı sentetik M9 katı besi ortamı kullanılarak yapılmıştır. Fenol Red, asidik pH'da sarı, alkali pH'da ise pembe renge dönüşür. L-asparajinaz aktivitesi sonucu asparajin amino asidinin yıkılması ile açığa çıkan amonyak ( $\text{NH}_4^+$ ) ortam pH'sını alkali (bazik) yaptığundan L-asparajinaz üreten mikrobiyal kolonilerin etrafında pembe zon oluşur [69]. Yabani suşlarına göre daha geniş zon ve yoğun renk gösteren koloniler muhtemel mutantlar olarak seçilmiştir. Çünkü yüksek düzeyde L-asparajinaz üretimi yapan mutant kolonilerin etrafında oluşan pembe zon çapı ve yoğunluğunun yabani türlere göre daha geniş olması beklenir. Seçilen mutant kolonilerin LB agarlara tek koloni düşecek şekilde pasajlar yapılarak 18 saat 37 °C' de inkübasyona bırakıldı.

Yabani suş ve seçilmiş mutant kolonilere kolonilerden bir kısmı alınarak 20 mL LB içeren 125 mL kapasiteli erlenlere ekim yapıldı ve gece boyunca çalkalamalı koşullarda (200-rpm) 37 °C'de inkübe edildiler.

#### 4.9. Kültürlerin Toplam Kütle ( $\text{OD}_{600}$ ) ve pH Değerlerinin Belirlenmesi

Hücre kültürlerinde çoğalma indikatörü olarak toplam ortam türbiditesinin optik densitesi kullanıldı. Kültürlerin optik dansiteleri 600 nm dalga boyunda 24 saat aralıklarla kaydedildi.  $\text{OD}_{600} > 0.5$  olduğu zaman kültürler uygun şekilde (1/5 veya 1/10) dilüsyon yapılarak  $\text{OD}_{600}$  değerleri kaydedildi. Kültürlerin asit üretimi pH değeri olarak yine aynı zaman aralıklarında (24 saat) pH-metre kullanılarak ölçüldü.

#### 4.10. Kültür Ortamı Amonyum Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bakterilerin kültür ortamına salmış oldukları amonyak tayini için kültürler oda sıcaklığında 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra hücre peletleri elde edildi. Bu peletler daha sonraki enzim (L-asparajinaz) tayinleri için muhafaza edilirken, supernatantlar ortama salınmış serbest amonyak içerikleri bakımından analiz edildiler. Bunun için 100  $\mu\text{L}$  supernatant alınarak içinde 4.65 mL distile su bulunan tüplerine eklendi. Bu karışımın üzerine 0.25 mL Nessler ayırıcı konularak vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında tutulduktan sonra  $\text{OD}_{480}$  değerleri kaydedildi. Bu değerler, amonyum sülfat kullanılarak oluşturulan standart eğriye göre değerlendirilerek

ortamdaki amonyak konsantrasyonu belirlendi. Bu şekilde amonyum tayininde alt limitinin 10  $\mu$ M olduğu saptanmıştır.

#### **4.11. Periplazmik L-asparajinaz'ın salınımı için potasyum fosfat-hekzan sulu faz sistemi ile membran permeabilizasyonu**

Tarafımızdan geliştirilen bir metotla hücreler permeabilize edilerek, ortama salınan L-asparajinaz aktivitesi ölçüldü [70]. L-asparajinaz üretimi için üretilen hücreler, oda sıcaklığında santrifügasyon (10,000 rpm ve 5 dak) aracılığıyla elde edildi. 0.05 M potasyum fosfat (KPi) tamponu (pH 8.6) ile bir kez yıkandı ve %1 hekzan içeren aynı tamponda,  $A_{600} = 5.0$  olacak şekilde yeniden süspanse edildi. Bu süspanسیون oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı ve her 10 dakikada bir vorteks ile karıştırıldı. Süre bitiminde tüpler ağız açık bir şekilde 5 dakika havalandırılarak L-asparajinaz aktivite analizine geçildi.

#### **4.12. Enzim Tayini**

L-asparajinaz aktivitesi, L-asparajinin aspartik asite ve amonyağa yıkılmasından açığa çıkan amonyağın belirlenmesine dayanan ve yaygın olarak kullanılan Nessler reaksiyonu [71] ile belirlendi. Toplam 1 mL olan reaksiyon karışımı 0.9 mL 0.05 M Tris-HCl (pH 8.6) içinde taze olarak hazırlandı. 0.01 M L-asparajin ve 0.1 mL hücre özütü (veya permeabilize edilmiş hücre filtratı) içermektedir. Her bir örnek için paralel hazırlanmış körlere özüt konulmadan önce 0.1 mL 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) konuldu. Örnekler ve kendi körleri 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra reaksiyonu durdurmak için örnek tüplerine 0.1 mL 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) konuldu. Reaksiyon karışımı daha sonra 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 1 mL süpernatant 3.5 mL distile su içeren tüplere transfer edildi. Bu karışıma 0.5 mL Nessler ayırıcı eklenerek tüpler vortekslendi, 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu ve  $A_{480}$  değerleri körlere karşı okundu. Bir L-asparajinaz ünitesi (U), 37°C'de 1 dakikada 1  $\mu$ mol amonyak açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Spesifik aktivite ise miligram toplam hücre proteinine karşılık enzim ünitesi olarak ifade edilmiştir. Örneklerdeki amonyak konsantrasyonu, daha önce amonyum sülfatla hazırlanmış olan standart eğri yardımı ile hesaplanmıştır. Bu metotla amonyak belirleme sınırı yaklaşık

10  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Örneklerdeki total protein miktarı, BSA ile çizilmiş standart eğriden yararlanılarak Lowry (1951) metoduna göre saptanmıştır [72].

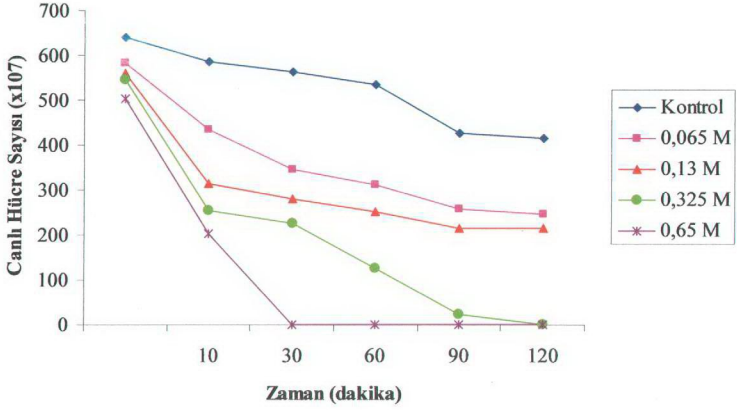
## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. Zamana ve EMS Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi

Canlılık testi için 15-17 saat inkübe edilen kültürleri kullanılmıştır. Kültürler 10, 30, 60, 90 ve 120 dakika 0,065 M, 0,13 M, 0,325 M ve 0,65 M EMS'ye maruz bırakılmış ve daha sonra LB agarlara inokule edilerek 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası canlı hücre sayıları saptanmıştır (Şekil 5.1.). Sonuçlar EMS uygulanmayan hücrelerle (kontrol) birlikte karşılaştırılmıştır. EMS uygulandığı anda (0. dakika) ekimi yapıp inkübe edilen petrilerdeki hücre sayıları kontrol grubuna göre benzerlik göstermektedir. EMS konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlı olarak yaşayan hücre sayısı değişmiştir. EMS'nin uygulandığı ilk andan itibaren bir toksik etkinin olup olmadığını anlamak amacıyla bütün konsantrasyonlar için uygun sulandırımolar yapılarak hücre sayımları kontrol grupları ile karşılaştırılmış ve sırasıyla %9, %12, %15 ve %21'lik bir azalış olduğu görülmüştür. 0.065 M EMS uygulaması sonucu 10, 30, 60, 90 ve 120 dakikalık sürelerle bağlı olarak hücre sayısında sırasıyla %26, %41, %47, %56 ve %58'lik bir azalış, 0.13 M EMS uygulaması sonucu hücre sayısında sırasıyla %44, %50, %55, %61 ve %62'lik bir azalış, 0.325 EMS uygulaması sonucu hücre sayısında sırasıyla %53, %58, %77, %96 ve %100'lük bir azalış, 0.65 M EMS uygulaması sonucu ise hücre sayısında sırasıyla %60 ve sonraki sürelerde ise tamamen %100'lük letal etki görülmüştür.

Bu sonuçlara dayanarak raslantısal mutagenез için en uygun zaman ve konsantrasyon 60 dakika ve 0,13 M seçilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda hücre sayısının yüksek olması ve yüksek konsantrasyonlarda yeterince hücre olmaması seçim için uygun değildir. Optimal mutagenез çalışması için süre de önemli olduğundan düşük konsantrasyondaki hücre sayısındaki fazlalık mutant seçimini zorlaştıracığı gibi zaman kaybına da neden olacaktır. Yüksek konsantrasyonun toksik etkisi nedeniyle hücrelerin ölümü mutant olabilecek hücrelerin bulunmasını engellemektedir. Buna bağlı olarak, optimal mutagenез koşullarının sağlanması için (en uygun EMS konsantrasyonun ve süresinin) çalışmamızda konsantrasyon olarak 0.13 M EMS ve süre olarak 60 dakika seçilmiştir.

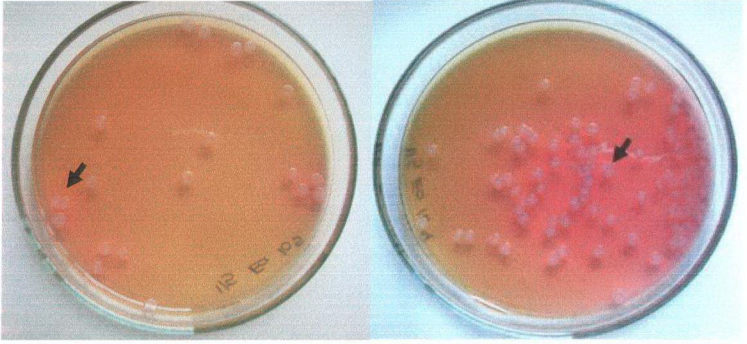




Şekil 5.1. Zamana ve EMS konsantrasyonlarına bağlı olarak canlı hücre sayısı.

## 5.2. Mutant Hücrelerin Seçilimi

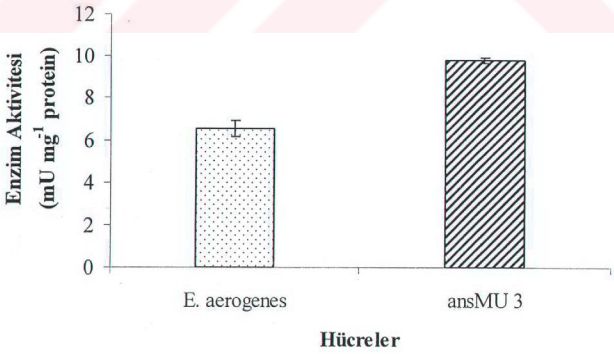
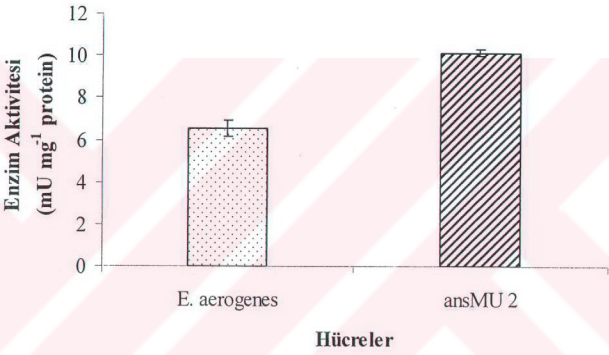
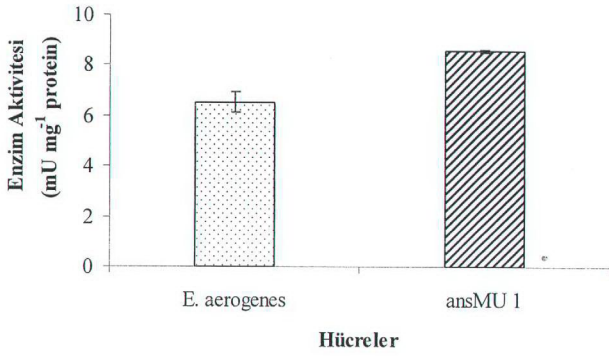
Mutant kolonilerin seçilimi için kullanılan bu yöntem temelinde L-asparajinaz üreten mikrobiyal kolonilerin etrafında L-asparajinaz aktivitesi sonucu pembe zon oluşumuna sebep olan amonyum miktarının tayin edilmesine dayanmaktadır. Seçilimde fenol red indikatör olarak kullanılmıştır. Fenol red pH değişikliklerine göre renk değiştiren bir indikatördür. Fenol red düşük pH değerlerinde sarı renk verirken yüksek pH değerlerinde pembe renk vermektedir. Dolayısıyla bu indikatörü içeren M9 katı besiyerlerinde L-asparajinaz aktivitesine bağlı olarak L-asparajin amino asidinin hidrolizi sonucu açığa çıkan amonyak miktarındaki artış ortam pH'sini yükselteceğinden ilgili alanın pembe renkte olması beklenmektedir. Yüksek düzeyde L-asparajinaz üreten mutant kolonilerin etrafında bu enzimin yüksek aktivitesi sonucu gerçekleşen amonyak salınımı fazla olacağından oluşan pembe zon çapı ve koyuluğuna bağlı olarak mutant hücreler seçilmiştir (Şekil 5.2.). Yaklaşık 100.000 koloni arasında sadece 3 mutant koloni olduğu saptanmıştır. Bu nedenle mutasyon hızımız  $3 \times 10^{-5}$  genom/nesil olmaktadır.



Şekil 5.2. Mutant seçilimi

### 5.3. EMS Uygulamasının *E. aerogenes*'in L-asparajinaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi

EMS uygulaması yapılan hücrelerin L-asparajinaz enzim aktivitesi, kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiş ve bir saatlik EMS uygulanması sonucu yaklaşık olarak 100.000 koloni arasında 3 mutant koloninin enzim aktivitesinde artış saptanmıştır. Bu koloniler, ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 olarak adlandırılmıştır. EMS mutagenesi sonucu elde edilen ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 mutant hücrelerinin kontrol grublarına göre enzim aktiviteleri Şekil 5.3.'de verilmiştir. ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 mutant hücrelerinin enzim aktivitelerinde sırasıyla % 30, % 50, % 65 oranında artış saptanmıştır. Ancak çalışmamızda EMS uygulamasına ve zamana bağlı olarak bazı hücrelerin enzim sentez yetenekleri negatif yönde etkilenmiştir. Mutagenез sonucu, yüksek L-asparajinaz aktivitesinin tersine, düşük L-asparajinaz aktivitesine sahip kolonilerin sayısı daha fazla olmuştur. Bu koloniler, deneylerimizin ileriki safhalarında çalışmaya dahil edilmemiştir



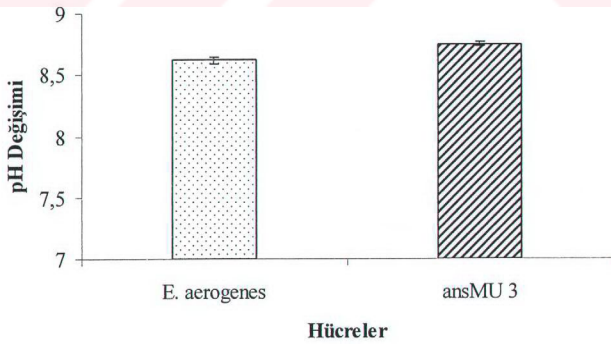
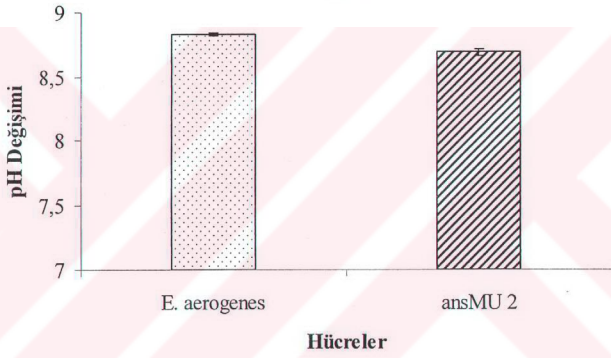
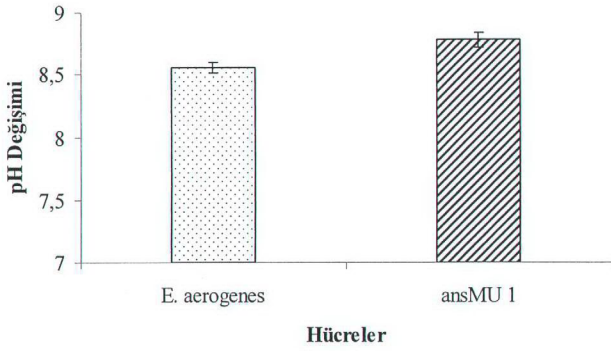
Şekil 5.3. *Enterobacter aerogenes* (□) ve onun ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 Mutant Suşlarının (▨) LB Ortamındaki Kültürlerinin L-asparajinaz Aktiviteleri

#### **5.4. *Enterobacter aerogenes* ve Onun ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 Mutant Suşlarının LB Ortamındaki Kültürlerinin pH Değerleri**

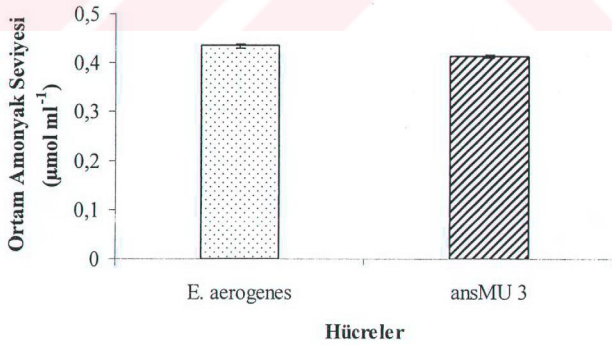
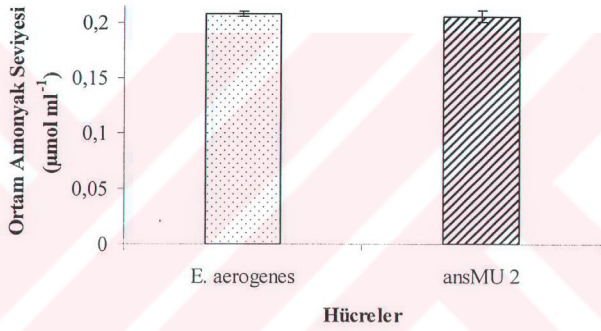
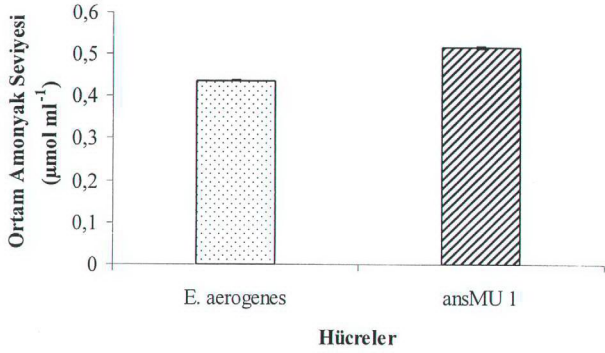
EMS uygulaması sonucu elde edilen ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 mutant hücrelerinin yabancıl tür olan *E.aerogenes*'e göre pH değişimleri Şekil 5.4.'de gösterilmiştir Enzim aktivitelerinde artış görülen ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 mutant hücrelerine ait pH değişimleri sırasıyla 0.22, 0.14, 0.13 olduğu saptanmıştır. Mutant suşlarla kontrol grubu arasında önemli bir fark görülmemiştir.

#### **5.5. *Enterobacter aerogenes* ve Onun ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 Mutant Suşlarının LB Ortamındaki Kültürlerinin Amonyak Miktarları**

*E.aerogenes* ve onun mutant hücrelerinin ortama saldıkları amonyak miktarları OD<sub>480</sub>'de ölçülmüştür. ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 mutant hücrelerinin yabancıl tür olan *E.aerogenes*'e göre hücre amonyak salınımları arasındaki değişimler şekil 5.5.'de gösterilmiştir. Enzim aktivitelerinde artış görülen ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 mutant hücrelerine ait hücre amonyak salınımları arasındaki değişimlerin sırasıyla 0.079, 0.002, 0,022 olduğu saptanmıştır. Mutant suşlarla kontrol grubu arasında önemli bir fark görülmemiştir.



Şekil 5.4. *Enterobacter aerogenes* (□) ve onun ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 Mutant Suşlarının (▨) LB Ortamındaki Kültürlerinin pH Değerleri



**Şekil 5.5.** *Enterobacter aerogenes* (□) ve onun ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 Mutant Suşlarının (▨) LB Ortamındaki Kültürlerinin Amonyak Miktarları

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Rastlantısal mutagenез belli bir proteinin (enzim) yüksek miktarlarda üretimi veya komple inhibisyonu için kullanılan bir metottur. Genetik materyal mutasyonlara karşı önemli derecede korunma mekanizmalarına sahip olmasına rağmen, mutasyonlar nadiren de olsa kendiliğinden ortaya çıkarlar. Ancak, mutasyon oranı belli kimyasal ve fiziksel mutajenler kullanılarak önemli ölçüde artırılabilir. Rastlantısal mutajenez istenilen özelliklere sahip proteinin, özellikle enzimin, değişik tipteki varyantlarını araştırmada da etkili bir yoldur. Böylece enzimin sıcaklık ve pH kararlılığı ve substrat özgülüğü gibi çeşitli özellikleri daha iyi bir hale dönüştürülebilir [2]. Ancak, bu tür bir çalışmada başlıca problemlerden biri, amaca uygun mutantın seçilimidir. Genellikle kimyasal bir mutajen kullanıldığından, mutajenin az kullanılması istenen mutantın elde edilme şansını zorlaştırırken, konsantrasyonun belli sınırların üzerine çıkması ise ortamda canlı hücre sayısını önemli oranda düşürmekte ve yine birinci duruma benzer olarak istenen mutantın elde edilme şansı oldukça azalmaktadır.

Herhangi bir mutagenез çalışmasının başarısı, mutasyonları rastlantısal olarak oluşturacak etkili bir metodun yanısıra mutantların kısa sürede seçilimine izin verecek bir stratejiyi gerektirir. Çalışmamızda seçim metodu kolay ve uyumlu bir metod olup, her bir seçim katı besiyeri üzerine homojen olarak yayılmış kolonilerin sayısı ile sınırlandırılmıştır. Çalışmamızda yaklaşık olarak 100,000 koloni bu amaç için taranmıştır. Buradaki sonuçlar, bu yeni uygulamanın yüksek oranda başarılı, kolay ve pahalı olmayan bir metod olduğunu göstermiştir. Burada kullanılan rastlantısal mutasyonun ile nispeten pratik olarak seçilebilecek az sayıda yüksek L-asparajinaz reten mutant koloni elde edilmiştir. Bunun tersine, mutantların önemli kısmının daha orijinal konakçıya göre daha düşük bir enzim aktivitesine sahip oldukları gözlenmiştir. Bu düşük aktivite gösteren mutantlar çalışmanın ileri basamaklarında ele alınıp çalışılmamışlardır. Böyle bir çalışmadan bekeleneyeği gibi her ne kadar az sayıda isteğe uygun mutant seçilimi ve karakterizasyonu yapılmışsa da, sonuçlarımız, *in vitro* EMS mutagenезinin *in vitro* enzim/protein gelişiminde etkili bir yol olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda kullanılan *Enterobacter aerogenes*'in canlılığını sürdürebileceği optimal mutagenез koşulları için farklı zaman aralıkları ve EMS konsantrasyonları (0,065M; 0,13M; 0,325M; 0,65M) denenmiştir. Bu konsantrasyonlar literatürde çalışılan konsantrasyonlara göre belirlenmiştir (Miraç, buraya bir referans koy). Bakteri hücrelerinin bu konsantrasyonlarda yaşama direnci farklı olmuştur. Aynı koşullar (pH,

sıcaklık, inkübasyon süresi) altında farklı EMS konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerin koloni sayıları kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir. Raslantısal mutagenез için en uygun zaman aralığı ve EMS konsantrasyonu bu sayılara göre saptanmıştır. Farklı zaman ve EMS konsantrasyonlarına bağlı olarak optimal mutagenез koşullarını belirlemeye çalışan başka bir çalışmada bu değerler 60 dakika ve 0.1 M olarak belirlenmiştir Bu çalışmada EMS ile UV'nin *Thermococcales*, *Pyrococcus* ve *Thermococcus*'un dokuz arkeal suşu üzerine letal ve mutajenik etkileri araştırılmıştır ve her iki uygulama sonucunda da mutajenitenin güçlü bir şekilde indüklenmiş olduğu gözlenmiştir [54]. Mutajenle muamele sonunda mutasyon frekansının sıklığının EMS ile 150 kat, UV ile 400 kat yükseldiği gözlenmiştir [54]. Ayrıca İbrahim ile O'Sullivan 1999'da insanlarda laktöz kötü emilim semptomlarını tedavi etmeye yönelik probiyotik bakterilerde  $\beta$ -galaktosidazın üretimini artırmak amacıyla bakterilerin potansiyelini geliştirmek için klasik bir kimyasal mutagenез yöntemi geliştirmişlerdir. EMS ve MNNG ile yapmış oldukları raslantısal mutagenез sonucunda farklı bakteri kültürlerinde yüksek düzeyde  $\beta$ -galaktosidaz üretimini gerçekleştiren mutantlar elde etmişler ve bu mutantlardaki  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinin % 70 ile % 222 kat arttığını rapor etmişlerdir [53]. Vaidya tarafından EMS'nin yararlı mutasyonlar oluşturduğuna dair yapılan bir çalışmada, kitin agarındaki kitin bağlayıcı beyaz M2R boya kullanılarak potansiyel kitinolitik bakterilerin seçilimi amacıyla basit ve hızlı bir teknik geliştirilmiştir. EMS muamelesi sonucunda oluşan *Alkaligenes xylosoxydans* 'ın hiperkitinaz mutantlarının yabancıl tiplerine göre 3-4 kat daha fazla kitinaz üretimine sahip olduğu bulunmuştur [55]. Bizim çalışmamızda da EMS uygulaması sonucu elde edilen mutantlarda L-asparajinaz aktivitesinde % 30 ile % 65 oranında artış gözlenmiştir.

Watrin ve Prieur'in yapmış oldukları çalışmada EMS'nin letal etkisini pH'ın etkileyebileceği rapor edilmiştir. Hem yüksek hem de düşük pH değerlerinin üreme açısından optimum pH değerine (6.8) göre daha letal olduğu rapor edilmiştir. En yüksek letal etkiler yüksek pH değerlerinde gözlemlenmiştir [54]. Bu nedenlerden dolayı EMS'ye maruz kalma süresini kısaltması ve uygun üreme koşulu olarak pH 7.2 olarak seçilmiştir.

EMS'nin 50 mM'lık uygulaması, her genom için ~200 nokta mutasyonu yaratabilirken, meydana gelen bu nokta mutasyonlarından ~50'si protein kodlayan bir gende bir amino asidin değişimine neden olur [56]. Raslantısal mutagenез, bir proteinin her pozisyonunda, muhtemel bütün 20 çeşit amino asit kombinasyonlarını yaratabilir. 300 amino asitlik bir protein için bu ihtimal ise  $\sim 20^{300}$ 'dür [74].



pH ve amonyak salınımında bir değişikliğin olmaması, hücrelerdeki genel metabolik olayları kontrol eden genetik faktörlerde herhangi bir mutasyonun olmadığı hakkında az çok fikir verebilirken, L-asparajinaz aktivitesindeki artış ya da azalışlar bize mutasyonun nerde meydana geldiği hakkında yol gösterebilir. EMS, enzim aktivitesinde artış görülen ansMU-1, ansMU-2 ve ansMU-3 mutantlarındaki *ansB* (L-asparajinaz geni) geni üzerinde mutajenik etkisini göstermiştir. EMS, regulator genleri ya da mRNA stabilitesini etkileyerek daha fazla L-asparajinaz sentezine neden olmuş olabilir. Enzimlerin pek çoğunda aktif bölgeye daha yakın olan mutasyonlar, uzak olanlara nazaran daha etkili bir şekilde enzim özelliklerini (substrat seçiciliği, katalitik aktivite gibi) geliştirirler. Aktif bölgenin uzağındaki bölgeler daha çok amino asit içerirken aktif bölgeye yakın olan yerler daha az amino asit içerir. Aktif bölgeye komşu olan bölgelerin az amino asit içermesi rastlantısal mutasyon hızını nispeten arttıracaktır. Bununla birlikte L-asparajinazın sentezinden sorumlu olan *ansB* gen dizisinde meydana gelebilecek bir baz çifti değişimi sonucu enzimin aktif bölgesi dışındaki bir yerde gerçekleşecek bir amino asit yer değişimi böyle bir sonuca neden olmuş olabilir [74].

Ayrıca *ansB* geni tarafından kodlanan L-asparajinaz enziminin sentezi, evrensel transkripsiyonel faktörler olan Fnr, ArcA ve CRP proteinleri tarafından pozitif yönde indüklenmektedir. Bu proteinlerin sentezinden sorumlu olan gen dizilerinde, bu proteinlerin üretimini arttıracak yönde meydana gelebilecek yararlı bir mutasyon L-asparajinaz sentezinin artmasına neden olabilecektir [74].

Sonuç olarak, raslantısal mutagenез sonucu elde edilen mutantlardaki L-asparajinaz aktivitesinin yüksek olması, EMS uygulanması sonucu nokta mutasyonlarının oluşum hızının artırılması ile gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Ayrıca EMS, L-asparajinaz enzimini kodlayan *ansB* genini, regulator genleri ya da mRNA stabilitesini etkileyerek daha fazla L-asparajinaz sentezine neden olmuş olabilir. Bununla birlikte çalışma sonuçlarının daha ayrıntılı çalışmalar ile test edilmesi gerekmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- [1] J. R. Cherry and A. L. Fidantsef, *Directed evolution of industrial enzymes: an update*, **Curr. Opin. Biotechnol.** 14 (2003) 438-443
- [2] Y. P. Lai, J. Huang, L. F. Wang, J. Li, Z. R. Wu, *A New Approach to Random Mutagenesis*, **Biotechnology and Bioengineering**, 86 (2004) 622-627.
- [3] B. Singer and J. T. Kusmierk, *Chemical Mutagenesis*, **Annu. Rev. Biochem.** 51 (1969) 655-693.
- [4] B. Lewin, *Genes VIII*, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 2004
- [5] <http://ghr.nlm.nih.gov/>
- [6] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, L. Zipursky, J. Darnell, **Molecular Cell Biology**, Edition. W. H. Freeman and Company, New York., 2000.
- [7] H. Maki, *Origins of Kendiliğindeneous Mutations: Specifity and Directionality of Base-Substitution, Frameshift, and Sequence- Substitution Mutageneses*, **Annu. Rev. Genet.** 36 (2002) 279-303
- [8] J. W. Drake, *Kendiliğindeneous Mutation*, **Annu. Rev. Genet.** 25 (1991), 125-146.
- [9] J. W. Drake and R. H. Baltz, *The Biochemistry of Mutagenesis*, **Annu. Rev. Biochem.** 45 (1976), 11-37.
- [10] C. G. Cupples, *Mutagenesis Mechanisms*, **Encyclopedia of Life Science**, Nature Publishing Group, 2001.
- [11] J. W. Drake, B. Charlesworth, D. Charlesworth and J. W. Crow, *Rates of Kendiliğindeneous Mutation*, **Genetics**, 148 (1998) 1667-1686.
- [12] J. W. Drake, *Mutagenic Mechanisms*, **Annu. Rev. Genet.** 3 (1969), 247-268.
- [13] J. H. Miller, *Mutational Specificity in Bacteria*, **Annu. Rev. Genet.** 17 (1983) 215-238.
- [14] H. J. Rhaese ve N. K. Boetker, *The Molecular Basis of Mutagenesis by Methyl and Ethyl Methanesulfonates*, **Eur. J. Biochem.** 32 (1973) 166-172.
- [15] W. S. Klug and M. R. Cummings, *Concepts of Genetics*, Prentice Hall, New Jersey, 2000.
- [16] M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker, *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, New Jersey, 2003.

- [17] J. W. Langeler, G. Drews, H. G. Schleger, *Biology of the Prokaryotes*, Blackwell Science, Stuttgart, 1999.
- [18] J. R. Roth, *Frameshift Mutations*, **Annu. Rev. Genet.** 8 (1974) 319-346.
- [19] H. Ochman, *Neutral Mutations and Neutral Substitutions in Bacterial Genomes*, **Molecular Biology and Evolution**, 20 (12) (2003) 2091–2096.
- [20] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
- [21] J. Kurtzberg, **Cancer Medicine**, Section13: *Biotherapeutics, Chemotherapeutic Agents*, Chapter 51, 699-705.
- [22] J. C. Wriston and T. O. Yellin, *L-asparaginase: a review*, **Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.** 39 (1973) 185-248.
- [23] E. Kelo, T. Noronkoski, I. B. Stoineva, D. D. Petkov, I. Mononen, *L-Aspartylpeptides as substrates of L-asparaginases from Escherichia coli and Erwinia chrysanthemi*, **FEBS Letters**, 528 (2002) 130-132.
- [24] J. Kidd, *Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by meansmu of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum*, **J. Exp. Med.** 98 (1953) 565–582.
- [25] J. Broome, *Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects*, **Nature**, 191 (1961) 1114–1115.
- [26] A. L. Stecher , P. Morgantetti de Deus , I. Polikarpov , J. Abrahao-Neto , *Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment*, **Pharmaceutica Acta Helvetiae** , 74 (1999) 1–9.
- [27] B. Heinemann, A. J. Howard, *Production of tumor-inhibitory Lasparaginase by submerged growth of Serratia marscences*, **Appl. Microbiol.**, 18 (1969) 550–554.
- [28] C. M. Haskell, *Cancer Treatment*, second edition, chapter 5, 43-62, WB. Saunders Company, 1985.
- [29] H. M. Treshalina, E. V. Lukasheva, L. A. Sedakova, G. A. Firsova, G. K. Guerassimova, N. V. Gogichaeva, and T. T. Berezov, *Anticancer Enzyme L-Lysine  $\alpha$ -Oxidase*, **Applied Biochemistry And Biotechnology**, 88 (2000) 267-273
- [30] E. V. Lukasheva and T. T. Berezov, *L-Lysine  $\alpha$  Oxidase: Physicochemical and Biological Properties*, **Biochemistry (Moscow)**, 67 (2002) 1394-1402.
- [31] W. R. Barnes, G. L. Dorn, G. R. Vela, *Effect of culture conditions on synthesis of L-asparaginase by Escherichia coli A-1*, **Appl Environ Microbiol.**, 33 (1977) 257-61.

- [32] D. Z. Wei, H. Liu, *Promotion of L-asparaginase production by using n-dodecane*, **Biotechnol. Tech.**, 12 (1998) 129–131.
- [33] J. Mukherjee, S. Majumdar, T. Scheper, *Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by Enterobacter aerogenes*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 53 (2000) 180-184.
- [34] H. Geckil, S. Gencer, *Production of L-asparaginase in Enterobacter aerogenes expressing Vitreoscilla hemoglobin for efficient oxygen uptake*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 63 (2004) 691–697.
- [35] Y. R. Abdel-Fattah, Z. A. Olama., *L-asparaginase production by Pseudomonas aeruginosa in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs*, **Process Biochem.**, 38 (2002) 115–122.
- [36] H. Geckil, 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.
- [37] A. Huser, U. Kloppner, K. H. Rohm, *Cloning, sequence analysis, and expression of ansmuB from Pseudomonas fluorescens, encoding periplasmic glutaminase/asparaginase*, **FEMS Microbiology Letters**, 178 (1999) 327-335.
- [38] H. Cedar and J. H. Schwartz, *Production of L-Asparaginase II by Escherichia coli*, **Journal of Bacteriology**, 96 (1968) 2043-2048.
- [39] M. Sanches, J. Alexandre, R. G. Barbosa, R. T. de Oliveira, J. A. Neto and I. Polikarpova, *Structural comparison of Escherichia coli L-asparaginase in two monoclinic space groups*, **Acta Cryst.** 59 (2003) 416-422.
- [40] D. Borek and M. Jaskólski, *Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity*, **Acta Biochimica Polonica**, 48 (2001) 893-902.
- [41] C. P. Cornea, I. Lupescu, I. Vatafu, V. G. Savoiu, G. H. Campeanu, *Isolation and Characterization of Some L-Asparaginase Producing Recombinant Escherichia coli Strains*, **Roum Biotechnol. Lett.**, 5 (2000) 471-478.
- [42] H. Z. Alesandra, O. O. Leobardo, G. Dupond, D. N. Socorro, A. Loret, M. L. Horacio, and C. N. Jorge, *Isolation and Characterization of Rhizobium etli Mutants Altered in Degradation of Asparagine*, **Journal of Bacteriology**, 179 (1997) 2068-2072.
- [43] K. J. Golden and R. W. Bernlohr, *Nitrogen Catabolite Repression of the L-Asparaginase of Bacillus licheniformis*, **Journal of Bacteriology**, 164 (1985) 938-940.
- [44] M. H. Saier, T. M. Ramseier, *The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria*, **Journal of Bacteriology**, 178 (1996) 3411-3417.

- [45] S. Iuchi and E.C.C. Lin, *Adaptation of Escherichia coli to respiratory conditions: regulation of gene expression*. **Cell**, 66 (1991) 5-7.
- [46] P. Ylikangas and I. Mononen, *A Fluorometric Assay for L-Asparaginase Activity and Monitoring of L-Asparaginase Therapy*, **Analytical Biochemistry**, 280 (2000) 42–45.
- [47] T. Ueno, K. Ohtawa, K. Mitsui, Y. Kodera, M. Hiroto, A. Matsushima, Y. Inada, H. Nishimura, *Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase*, **Leukemia**, 11 (1997)1858-1861.
- [48] H. K. Miller, I. H. Krakoff, J. S. Salser, M. E. Balis, *Sensitivity to L-asparaginase and amino acid metabolism*, **J. Natl. Cancer. Inst.** 44 (1970) 1129-39.
- [49] L. J. Ettinger, A.G. Ettinger, V. I. Avramis and P. S. Gaynon, *Acute Lymphoblastic Leukaemia A Guide to Asparaginase and Pegaspargase Therapy*, **BioDrugs**, 7 (1997) 30-39.
- [50] M. L. Graham, *Pegasparginase: a review of clinical studies*, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 55 (2003) 1293-1302.
- [51] A. L. Soares, G. M. Guimaraes, B. Polakiewicz, R. Nogueira de Moraes Pitombo, J. Abrahao-Neto, *Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of E. coli L-asparaginase*, **International Journal of Pharmaceutics**, 237 (2002) 163–170.
- [52] Y. Fishman and N. Citri, *L-asparaginase entrapped in liposomes: preparation and properties*, **FEBS Letters**, 60 (1975) 17-20.
- [53] S. A. Ibrahim, and D. J. O'Sullivan, *Use of Chemical Mutagenesis for the Isolation Food Grade  $\beta$ -Galactosidase Overproducing Mutants of Bifidobacteria, Lactobacilli and Streptococcus thermophilus*, **J. Dairy Sci.** 83 (2000) 923-930.
- [54] L. Watrin, D. Prieur, *UV and Ethyl Methanesulfonate Effects in Hyperthermophilic Archaea and Isolation of Auxotrophic Mutants of Pyrococcus Strains*, **Current Microbiology** 33 (1996) 377–382.
- [55] R. J. Vaidya, S. L. A. Macmil, P. R. Vyas and H. S. Chhatpar, *The novel method for isolating chitinolytic bacteria and its application in screening for hyperchitinase producing mutant of Alcaligenes xylosoxydansmu*, **Letters in Applied Microbiology**, 36 2003 129-134.
- [56] S. O. Kotchoni and O. O. Shonukan, *Regulatory mutations affecting the synthesis of cellulase in Bacillus pumalis*, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 18 (2002) 487-491.

- [57] P. G. Jerlström, J. Liu, I. R. Beacham., *Regulation of Escherichia coli l-asparaginase II and L-aspartase by the fnr gene product*, **FEMS Microbiol. Lett.**, 41 (1987)127–30.
- [58] H. Geckil, “*effect of bacterial hemoglobin on microorganisms and butanediol production by Enterobacter aerogenes*” PhD Thesis, Illinois Institute of Technology USA, May 1995.
- [59] A. Khan, S. P. Pal, S. R. V. Raghavan, P. K. Bhattacharyya, *Studies on Serratia marscesces L-asparaginase*, **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 41 (1970) 525–533.
- [60] M. M. Garaev, E. I. Golub., *Mechanism of action of glucose on L-asparaginase synthesis by Escherichia coli bacteria*, **Mikrobiologiya**, 46 (1977) 433-9.
- [61] L. Kang, M. L. Keller, P. C. Dunlop and R. J. Roon, *Nitrogen catabolite Repression in a Glutamate Auxotroph of Saccharomyces cerevisiae*, **Journal of Bacteriology**, 151 (1982) 29-35.
- [62] J. Q. Kamerud and R. J. Roon, *Asparaginase II of Saccharomyces cerevisiae: Selection of Four Mutations That Cause Derepressed Enzyme Synthesis*, **Journal of Bacteriology**, 165 (1986) 293-296.
- [63] E. Albanese and D. Kafkewitz, *Effect of Medium Composition on the Growth and Asparaginase Production of Vibrio succinogenes*, **Applied and environmental microbiology**, 36 (1978) 25-30.
- [64] Tetsuya Tosa, Ryujiro Sano, Kozo Yamamoto, Masatoshi Nakamura, Katsuko Ando and Ichiro Chibata, *L-Asparaginase from Proteus vulgaris*, **Applied Microbiology**, 22: (1971) 387-392.
- [65] D. Resnick, B. Magasanik, *L-Asparaginase of Klebsiella aerogenes: activation of its synthesis by glutamine synthetase*, **J. Biol. Chem.**, 251 (1976) 2722–2728.
- [66] H. J. Müller, J. Boos, *Use of L-asparaginase in childhood ALL*. **Crit. Rev. Oncol. Hemat.**, 28 (1998) 97-113.
- [67] C. M. Haskell, *Cancer Treatment*, second edition, chapter 5, 43-62, WB. Saunders Company, 1985.
- [68] 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 producing stable engineered strains with enhanced bioremediating ability*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 27 (2001) 27-33.
- [69] R.Gulati, R.K. Saxena and R.Gupta, *A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms*, **Letters in Applied Microbiology** 24 (1997) 23-26.

- [70 ] H. Geckil, B. Ateş, S. Gencer, M. Uckun, İ. Yılmaz, *Membrane permeabilization of gram-negative bacteria with a potassium phosphate/hexane aqueous phase system for the release of L-asparaginase: an enzyme used in cancer therapy*, **Process Biochemistry**, 40 (2005) 573-579.
- [71 ] Jr J. C. Wriston., *Asparaginase*, **Method. Enzymol.**, 17 (1970) 732-742.
- [72 ] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. **J. Biol. Chem.** 193 (1951) 265.275.
- [73 ] P. D. Keightley, E. K. Davies, A. D. Peters and R. G. Shaw, *Properties of Ethylmethane Sulfonate-Induced Mutations Affecting Life-History Traits in Caenorhabditis elegansmu and Inferences About Bivariate Distributions of Mutation Effects*, **Genetics** 156 (2000) 143-154.
- [74 ] K. L. Morley and R. J. Kazlauskas, *Improving enzyme properties: when are closer mutations beter?*, **TRENDS in Biotechnology**, 23 (2005) 231-237.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : **Miraç UÇKUN**  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Malatya - 20.06.1979  
**Mesleği ve Ünvanı** : Biyolog

### EĞİTİM DURUMU

**İlkokul** : Gazi İlk Öğretim Okulu (Malatya, 1985-1990)  
**Ortaokul** : Atatürk İlk Öğretim Okulu (Malatya, 1990-1993)  
**Lise** : Turgut Özal Anadolu Lisesi (Malatya, 1993-1997)  
**Lisans** : İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Malatya (1999-2003)  
**Yüksek Lisans** : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Malatya (2003-2006)

### YAYINLANMIŞ ESERLER

1. H. Geckil, 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.
2. H. Geckil, B. Ates, S. Gencer, **M. Uckun**, I. Yilmaz, Membrane permeabilization of gram-negative bacteria with a potassium phosphate/hexane aqueous phase system for the release of L-asparaginase: an enzyme used in cancer therapy, **Process Biochemistry**, 40 (2005) 573-579.
3. H. Geckil, S. Gencer, B. Ates, U. Ozer, **M. Uckun**, I. Yilmaz, Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin on production of a chemotherapeutic enzyme, L-asparaginase, by *Pseudomonas aeruginosa*, **Biotechnology Journal**, 1 (2006) 203-208.
4. B. Ates, S. Gencer, S. O. Erenler , M. Uckun, **U. Ozer**, I. Yilmaz ve H. Geckil (2006), Production of L-asparaginase, chemotherapeutic enzyme, in bacteria expressing *Vitreoscilla* hemoglobin; **31.FEBS Congress, Molecules in Health & Disease**, Istanbul/Turkey.



## BİLİMSEL FALİYETLER

- 1- *Vitreoscilla* HEMOGLOBİN GENİ KLONLANMIŞ *Enterobacter aerogenes*' İN ÇOĞALMA VE ANTİOKSİDANT ENZİM SİSTEMLERİ, XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-24 Haziran, Adana. (Poster sunumu).
- 2- Endüstriyel olarak önemli olan enzimleri yüksek düzeyde üretme metodu: rastlantısal mutagenез ve seçilim (seminer).