

**T.C**  
**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTİKANSEROJENİK L-ASPARAGİNAZIN FARKLI  
GRAM-NEGATİF BAKTERİLERDE ÜRETİMİ, KİMYASAL  
KARAKTERİZASYONU VE *İN VİTRO* UYGULAMASI**

**BURHAN ATEŞ**

**DOKTORA TEZİ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**MALATYA**  
**MART 2007**

Tezin Başlığı: Antikanserojenik L-Asparaginazın Farklı Gram-Negatif Bakterilerde Üretimi, Kimyasal Karakterizasyonu ve *In Vitro* Uygulaması”

Tezi Hazırlayan: **Burhan ATEŞ**

Sınav Tarihi: 09.03.2007

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Kimya Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Sınav Jürisi Üyeleri**

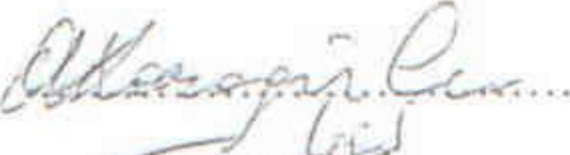
Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ



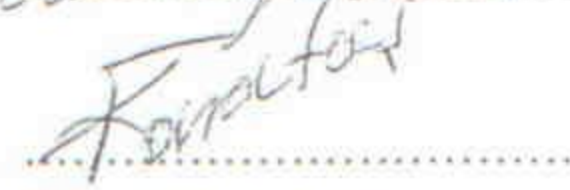
Doç. Dr. İsmet YILMAZ (Danışman)



Doç. Dr. A. Alev KARAGÖZLER



Doç. Dr. Fikret KARATAŞ



Yrd. Doç. Dr. Türkan KUTLU



Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL  
(İkinci Danışman)



Prof. Dr. Ali ŞAHİN  
Enstitü Müdürü

## ONUR SÖZÜ

Doktora Tezi olarak sunduğum “**Antikanserojenik L-Asparaginazın Farklı Gram-Negatif Bakterilerde Üretimi, Kimyasal Karakterizasyonu ve *İn Vitro* Uygulaması**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Burhan ATEŞ

## ÖZET

Doktora Tezi

### ANTİKANSEROJENİK L-ASPARAGİNAZIN FARKLI GRAM-NEGATİF BAKTERİLERDE ÜRETİMİ, KİMYASAL KARAKTERİZASYONU VE *İN VİTRO* UYGULAMASI

Burhan ATEŞ

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

xii + 70 sayfa

2007

**Danışman:** Doç. Dr. İsmet YILMAZ     **İkinci Danışman:** Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL

Bakteriyel L-asparaginaz akut lenfoblastik lösemi(ALL) başta olmak üzere belli kanser türlerinde yüksek terapötik değeri ile bilinen bir enzimdir. Bu çalışmada, karbon katabolit baskılanma gösteren ve oksijenle regüle olduğu bilinen bu enzimin değişik gram-negatif bakterilerde farklı ortam koşulları altındaki sentezi çalışılmıştır. Bu amaçla; *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* ve bu bakterilerin rekombinant etkin bir oksijen alım sistemi, *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb), içeren suşları kullanılmıştır. Bu çalışmada bakterilerin doğal konakçıları ve onların VHb içeren rekombinantlarında enzimin karbon katabolit baskılanmaya verdiği cevap değişik karbon kaynakları (glukoz, fruktoz, sukroz, laktoz ve gliserol) kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, farklı azot kaynaklarının (L-asparagin, L-glutamin, üre ve sodyum nitrit) enzimin sentezi üzerine etkisi araştırılmıştır. En yüksek enzim sentezinin görüldüğü suş kullanılarak enzimin kısmi saflaştırılması (amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon-değişim kromatografisi) yapılmış ve çeşitli kimyasal karakteristikleri (optimum ve maksimum aktivite sıcaklık aralıkları, optimum pH, kinetik parametreler ve depo kararlılığı) belirlenmiştir. Ayrıca, *in vivo* bir sistemi simüle eden *in vitro* bir düzenek ile enzimin muhtemel terapötik bir uygulama için kararlılığı saptanmıştır.

L-asparaginaz üretiminin değişik gram-negatif bakterilerde kompleks regülatör mekanizmalarla olduğu ve bir bakteri için geçerli optimal sentez koşullarının benzer bir diğer bakteriye uygulanamayabileceği saptanmıştır (örneğin, azot kaynaklarında glutamini hariç bırakırsak, VHb varlığında, *E. coli*'de bir indüklenme görülürken, buna benzer bir bakteri olan *E. aerogenes*'de baskılama görülmüştür). Özellikle terapötik değeri kanıtlanmış ve ticari olarak üretilen *E. coli* L-asparajinazlarının üretiminde, VHb'nin böyle pozitif bir regülasyon göstermesi önemli bir bulgudur. Saflaştırılmış olan enzimin kimyasal karakterizasyonu yapılmış, termostabil bir enzim olarak bilinen bu enzimin optimum aktivitesi 40 °C'de ve pH 9.0'da, maksimum aktivitesi ise 60 °C'de belirlenmiştir. Bu bağlamda, enzimin yüksek depo kararlılığına ve diğer L-asparaginazlara benzer kinetik parametrelere sahip olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** L-asparaginaz, *Vitreoscilla* hemoglobin, katabolik represyon, terapötik enzimler, enzim saflaştırma.

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### PRODUCTION, CHEMICAL CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* APPLICATION OF ANTI-CANCEROGENIC L-ASPARAGINASE FROM DIFFERENT GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Burhan ATES

Inonu University  
Institute of Natural Sciences  
Department of Chemistry

xii + 70 pages

2007

**Advisor:** Ismet YILMAZ, Assoc. Prof. **Co-Advisor:** Hikmet GECKIL, Assoc. Prof.

Bacterial L-asparaginase is an enzyme of high therapeutic value, due to its use in certain kinds of cancer therapies, mainly in acute lymphoblastic leukemia (ALL). This study was carried out to further clarify how the synthesis of this enzyme is affected from various culture conditions, given the fact that L-asparaginase is an enzyme regulated by oxygen and carbon catabolite repression. For this objective, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* and their recombinant strains carrying a recombinant oxygen uptake system, the *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb), were used. In this study, these host bacteria and their recombinants carrying the VHb were studied with respect to carbon catabolite repression inflicted by various carbon sources (glucose, fructose, sucrose, lactose and glycerol). Furthermore, the effect of different nitrogen sources (L-asparagine, L-glutamine, urea and sodium nitrite) on the enzyme synthesis was investigated. The strain with the highest enzyme activity was used for L-asparaginase isolation and purification (ammonium sulfate precipitation and ion-exchange chromatography). The purified enzyme was analyzed for various chemical characteristics (the temperature range for optimum and maximum activities, optimal pH, kinetic parameters and stability). Moreover, an *in vitro* setting simulating that of *in vivo* system was utilized to determine the stability of the enzyme, an important parameter for possible therapeutic application of the enzyme.

It has been determined that the production of L-asparaginase in different bacteria is governed by complex regulatory mechanisms and conditions required for the optimal synthesis of the enzyme in one bacterium may not be applicable to other (e.g., except glutamine in nitrogen source, the presence of VHb in *E. coli* has a stimulatory effect on the enzyme synthesis, while in *E. aerogenes* its presence is inhibitory). This positive effect of VHb on L-asparaginase synthesis is an important finding since the enzyme with cancer therapeutic activity has mainly been produced and commercialized using *E. coli*. The chemical characterization of purified enzyme revealed an optimal activity at 40 °C and pH 9.0 while the maximum activity was recorded at 60 °C a finding in accordance with its known thermostable nature. In this context, enzyme was determined to have a high stability during its storage at different temperatures and similar kinetic parameters to that of other L-asparaginases.

**Key words:** L-asparaginase, *Vitreoscilla* hemoglobin, catabolic repression, therapeutic enzymes, enzyme purification.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aőamasında yardımlarını gördüğüm, beni yönlendiren danışman hocalarım Sayın Doç. Dr. İsmet YILMAZ ve Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL'e;

Deneysel alıőmalar döneminde desteklerini esirgemeyen Biyoloji Bölümü Doktora öğrencileri Salih GENCER, Miraç UÇKUN ve Ufuk ÖZER'e ve Kimya Bölümünden Arő. Grv. Selim ERDOĞAN ve Arő. Grv. Ali ERDOĞAN'a;

Ayrıca tüm hayatım boyunca bana destek veren ve bu günlere gelmemde büyük katkıları bulunan AİLEM'e;

Teşekkür ederim.

**“2004–93 nolu proje kapsamında bu çalıőmayı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.”**

## İÇİNDEKİLER

ONUR SÖZÜ .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. L-Asparaginaz .....	3
1.1.1. Tarihsel gelişim .....	3
1.1.2. Moleküler yapısı .....	4
1.1.3. Biyokimyasal özellikleri.....	4
1.1.4. L-Asparaginazın kemoterapötik etkisi .....	6
1.1.5. Farmakokinetik.....	7
1.1.6. Klinik etki ve ilaç etkileşimleri .....	8
1.1.7. Asparaginaz preparatları.....	9
1.1.8. L-Asparaginazın toksisitesi.....	10
1.1.9. L-Asparaginaz üretiminin regülasyonu .....	11
1.2. <i>Vitreoscilla</i> Hemoglobin Geni (VHb) .....	12
1.3. Proteinlerin Saflaştırılması .....	13
1.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi .....	13
1.3.2. Diyaliz .....	16
1.3.3. İyon değişim kromatografisi .....	16
1.3.3.1. İyon değiştiricinin seçimi .....	18
1.3.3.2. Örnek tatbiki ve elüsyon.....	20
1.3.4. Elektroforez .....	21
1.3.4.1. Poliakrilamid jeller .....	22
1.3.4.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) .....	24
<b>2. ÇALIŞMAYLA İLGİLİ KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>26</b>
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>29</b>
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	29

3.2.	Nessler Ayırıcının Hazırlanması.....	29
3.3.	Çalışmada Kullanılan Bakteriler .....	29
3.4.	Bakterilerin Üretilmesi ve Stok Kültürler .....	30
3.5.	Kullanılan Besi Ortamlarının Hazırlanması .....	30
3.6.	L-Asparaginaz Sentezi İçin Bakteri Kültürleri.....	31
3.7.	Kültürlerin Toplam Kütle (OD600) Değerlerinin Belirlenmesi.....	31
3.8.	Periplazmik L-Asparaginaz'ın Salınımı İçin Potasyum Fosfat-hekzan Sulu Faz Sistemi ile Membran Permeabilizasyonu.....	32
3.9.	L-Asparaginaz Aktivitesinin Ölçümü .....	32
3.10.	<i>E. aerogenes</i> 'den L-Asparaginazın Kısmi Saflaştırılması .....	33
3.10.1.	Homojenat hazırlanması .....	33
3.10.2.	Amonyum sülfat çöktürmesi .....	33
3.10.3.	Diyaliz .....	34
3.10.4.	DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisinin uygulanışı .....	34
3.11.	Saflaştırılan Enzimin Karakterizasyonu .....	35
3.11.1.	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) .....	35
3.11.2.	Enzimin optimum pH'nın belirlenmesi .....	37
3.11.3.	Enzimin maksimum ve optimum sıcaklığının belirlenmesi .....	37
3.11.4.	Enzimin depo kararlılığı.....	37
3.11.5.	Enzimin Vmax ve Km değerlerinin belirlenmesi.....	38
3.12.	L- Asparaginazın Kandaki Kararlılığı .....	38
<b>4.</b>	<b>ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	<b>39</b>
4.1.	L-Asparaginaz Üretiminde Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	39
4.1.1.	<i>E. aerogenes</i> ve onun VHb- ve VHb+ rekombinantlarında karbon kaynaklarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi.....	39
4.1.2.	<i>P.aeruginosa</i> ve onun VHb geni içeren suşunda karbon kaynaklarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi.....	40
4.1.3.	<i>E.coli</i> ve onun VHb- ve VHb+ rekombinantlarında karbon kaynaklarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi.....	41
4.2.	L-Asparaginaz Üretimine Azot Kaynaklarının Etkisi .....	42
4.2.1.	<i>E. aerogenes</i> ve onun VHb- ve VHb+ rekombinantlarında azot kaynaklarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi.....	42
4.2.2.	<i>P.aeruginosa</i> ve onun VHb geni içeren suşunda azot kaynaklarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi.....	43



4.2.3.	<i>E.coli</i> ve onun Vhb- ve Vhb+ rekombinantlarında azot kaynaklarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi.....	44
4.3.	<i>E. aerogenes</i> 'den L-Asparaginaz'ın Saflaştırılma ve Karakterizasyon Sonuçları.....	45
4.3.1.	Amonyum sülfat çöktürmesi .....	45
4.3.2.	İyon-değişim kromatografisi .....	46
4.3.3.	SDS-poliakrilamid jel elektroforezi .....	47
4.3.4.	Optimum ve maksimum sıcaklığın belirlenmesi.....	48
4.3.5.	Optimum pH'ın belirlenmesi.....	49
4.3.6.	Depo kararlılığı.....	50
4.3.7.	Kinetik verilerin saptanması.....	51
4.4.	<i>E. aerogenes</i> 'den Saflaştırılan L-Asparaginazın Kan Ortamında Aktivitesindeki Değişimin Sonuçları .....	52
5.	<b>TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	54
6.	<b>KAYNAKLAR</b> .....	62
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	69

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Periferal dokulardaki L-asparagin kaynakları.....	2
Şekil 1.2.	<i>E. coli</i> ' den saflaştırılmış L-asparaginaz homotetramerinin kuarternar yapısının grafiksel gösterimi.....	5
Şekil 1.3.	<i>E. coli</i> ' den saflaştırılmış L-asparaginaz dimerinin grafiksel gösterimi.....	5
Şekil 1.4.	L-asparaginaz reaksiyonu.....	6
Şekil 1.5.	Glukoz'un enzim sentezindeki regülasyonunun gösterimi.....	12
Şekil 1.6.	İyon değiştiriciler.....	17
Şekil 1.7.	İyon değişim kolonundan tuz konsantrasyonu ile elüsyon.....	21
Şekil 1.8.	Poliakrilamid jelin oluşmasındaki polimerleşme reaksiyonu.....	23
Şekil 4.1.	<i>E. aerogenes</i> , Ea[pUC8] ve Ea[pUC8:15]'in farklı karbon kaynaklarının bulunduğu MMY ortamında L-asparaginaz enzim aktiviteleeri.....	39
Şekil 4.2.	<i>P. aeruginosa</i> (Pa) ve <i>vgb+</i> rekombinantı (PaJC)'in farklı karbon kaynaklarının bulunduğu MMY ortamında L-asparaginaz enzim aktiviteleeri.....	41
Şekil 4.3.	<i>E. coli</i> (JM103), MK57 ve MK79'in farklı karbon kaynaklarının bulunduğu MMY ortamında L-asparaginaz enzim aktiviteleeri.....	42
Şekil 4.4.	<i>E. aerogenes</i> , Ea[pUC8] ve Ea[pUC8:15]'in farklı azot kaynaklarının bulunduğu MMY ortamında L-asparaginaz enzim aktiviteleeri.....	43
Şekil 4.5.	<i>P. aeruginosa</i> (Pa) ve <i>vgb+</i> rekombinantı (PaJC)'in farklı azot kaynaklarının bulunduğu MMY ortamında L-asparaginaz enzim aktiviteleeri.....	44
Şekil 4.6.	JM103, MK57 ve MK79 'in farklı azot kaynaklarının bulunduğu MMY ortamında L-asparaginaz enzim aktiviteleeri.....	45
Şekil 4.7.	<i>E. aerogenes</i> 'den L-asparaginaz saflaştırılmasında iyon-değişim kromatografisi sonrası fraksiyonlara ait aktivite-absorbans grafiği.....	46
Şekil 4.8.	SDS-PAGE sonucu elde edilen standart grafik.....	47
Şekil 4.9.	SDS-PAGE fotoğrafı. (A) Kurutulmuş jel, (B) Elektroforez sonrası jel....	48
Şekil 4.10.	<i>E. aerogenes</i> 'den saflaştırılan L-asparaginazın optimum ve maksimum sıcaklık grafiği.....	49
Şekil 4.11.	<i>E. aerogenes</i> 'den saflaştırılan L-asparaginazın optimum pH grafiği.....	50

Şekil 4.12. <i>E. aerogenes</i> 'den saflaştırılan L-asparaginazın depo kararlılığının grafiği. ....	51
Şekil 4.13. <i>E. aerogenes</i> 'den saflaştırılan L-asparaginaz enzimini için L-asparagin substratı ile elde edilen Lienewear-Burk grafiği. ....	52
Şekil 4.14. <i>E. aerogenes</i> 'den saflaştırılan L-asparaginazın kan ortamındaki aktivite grafiği. ....	53

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	0 °C'de istenen doygunluğa ulaşılması için çözeltiye eklenmesi gereken katı amonyum sülfat miktarı.....	15
Çizelge 1.2.	Yaygın kullanılan iyon değiştiriciler.....	19
Çizelge 3.1.	Yarı Sentetik (MMY) besi yerinin içeriği.....	31
Çizelge 3.2.	Luria-Bertani (LB) besi yerinin içeriği.....	31
Çizelge 4.1.	<i>E. aerogenes</i> 'den L-asparaginazın saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları.....	45
Çizelge 4.2.	L-asparaginazın iyon-değişim kromatografisi sonrası birleştirilmiş fraksiyonlara ait saflaştırma sonuçları.....	47
Çizelge 4.3.	<i>E. aerogenes</i> 'den saflaştırılan L-asparaginazın optimum ve maksimum sıcaklık değerleri.....	48
Çizelge 4.4.	<i>E. aerogenes</i> 'den saflaştırılan L-asparaginazın optimum pH sonuçları.....	49
Çizelge 4.5.	<i>E. aerogenes</i> 'den saflaştırılan L-asparaginazın depo kararlılığı sonuçları.....	50
Çizelge 4.6.	<i>E. aerogenes</i> 'den saflaştırılan L-asparaginaz enzimini için L-asparagin substratı ile elde edilen Vmax ve Km sonuçları.....	51
Çizelge 4.7.	<i>E. aerogenes</i> 'den saflaştırılan L-asparaginazın kan ortamındaki aktivite sonuçları.....	52

## SİMGELER VE KISALTMALAR

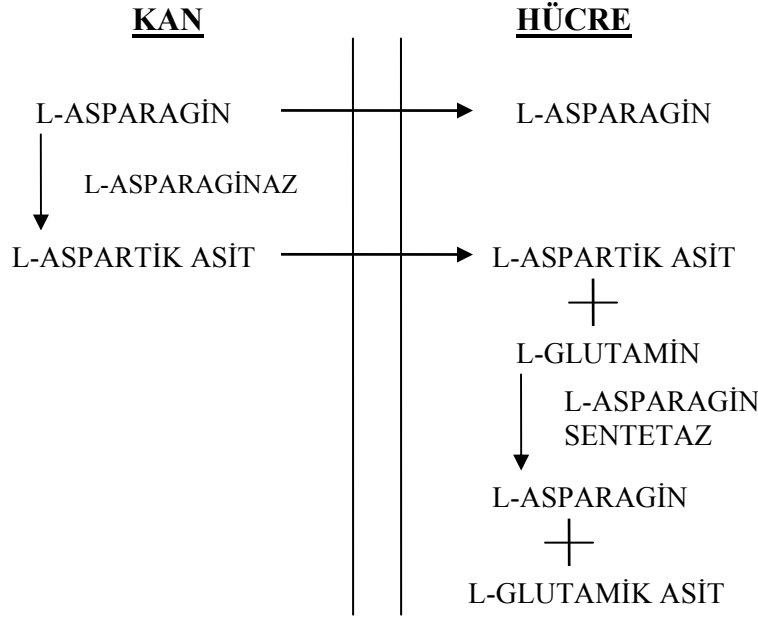
Ea	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Ea [pUC8]	pUC8 plazmidini içeren <i>Enterobacter aerogenes</i>
Ea [pUC8:15]	pUC8:15 plazmidini içeren <i>Enterobacter aerogenes</i>
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PaJC	Kromozomunda bakteriyel hemoglobin geni taşıyan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
JM103	<i>Escherichia coli</i>
MK57	<i>vgb-</i> rekombinant <i>Escherichia coli</i>
MK79	<i>vgb+</i> rekombinant <i>Escherichia coli</i>
<i>vgb</i>	Bakteriyel hemoglobin sentezleyen gen
VHb	<i>Vitreoscilla</i> hemoglobin
MMY	Yarı sentetik besi yeri
LB	Luria Bertani zengin besi yeri
DEAE	Dietilaminoetil
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

## 1. GİRİŞ

Bazı enzimlerin çeşitli kemoterapilerde kullanım potansiyellerinin keşfedilmesi ile bu yönde etkileri olan başka enzimlerin bulunması ve karakterizasyonu konusundaki çalışmalarda önemli oranda artış olmuştur. Buradaki çalışmanın da konusunu oluşturan **L-asparaginaz** böyle bir enzim olup, çocuk lösemisi (akut lenfoblastik lösemi, ALL) başta olmak üzere bu enzimin birçok kanser türünde terapötik etkisinin olduğu saptanmıştır. Normal hücreler kadar malignant hücrelerin de büyüme ve çoğalmalarında en önemli olaylardan biri hücrenin hemen hemen bütün işlevlerini sağlayan belli proteinlerin belli oranlarda sentezleridir. Protein sentezinde bir çok faktör kritik rol oynamakla beraber en önemlileri proteinlerin yapı taşları olan amino asitlerdir. Değişik proteinlerin sentezi bu yapı taşlarının uygun zamanda ve uygun oranlarda yapılması ile ilişkilidir. Ancak, proteinlerin yapısına giren 20 standart amino asidin yaklaşık yarısı insan hücreleri tarafından üretilemez. Dolayısı ile bu esansiyel amino asitlerin ya besinlerle ya da insan gastro-intestinal sisteminde yer alan mikrobiyal flora tarafından yapıp kana verilmeleri ve böylece hücrelerin kullanımına sunulmaları gerekir. Burada çalışılan L-asparaginaz enziminin doğal substratı olan L-asparagin normal hücreler için esansiyel olmayan bir amino asittir. Bu amino asit L-aspartik asidin transaminasyonu ile sentezlenir (Şekil 1.1) [1]. *L-asparagin sentetaz* tarafından katalizlenen bu reaksiyonda amin grubu L-aspartik aside aktarılır. Bu enzim dokuların çoğunda bulunurken, özellikle lenfotik türevli bazı insan malignasilerinde eksiktir ya da yoktur. Tümör hücrelerinde L-asparagin sentetaz eksikliği bu hücrelerin L-asparagini plazmadan almasını zorunlu hale getirir. Kanser hücresi ve normal hücreler arasındaki bu besinsel temel farklılık aynı zamanda L-asparaginazın kemoterapötik özelliğinin temelini oluşturur.

Sadece bazı bitki ve mikroorganizmalarda bulunan fakat insan hücrelerinde bulunmayan **L-asparaginaz** ( L-asparagin amidohidrolaz, EC 3.5.1.1), L-asparagini aspartik asit ve amonyağa çevirir. L-asparaginaza bugün olan ilgi, 1953 yılında Kidd'in yaptığı bir çalışmada kemirgenlerde transplante lenfomaların büyümesinin inhibe olduğunu rapor etmesi ile başlamıştır [2]. On yıl sonra ise Broome, bu inhibisyondan sorumlu faktörün L-asparaginaz olduğunu göstermiştir [3]. Daha sonraki çalışmalarda *Escherichia coli* [4] ve *Erwinia chrysanthemi*'den [5] elde edilen yüksek saflıktaki L-asparaginazın özellikle ALL' de tümör baskılayıcı bir enzim olduğu ortaya konmuştur. Yapılan klinik çalışmalarda L-asparaginazın kemoterapötik ajan olarak kullanıldığında

çocukluk dönemi ALL hastalarının % 80'ninden daha fazlasının 5 yıl boyunca hastalıktan tamamen kurtuldukları, yetişkinlik dönemi ALL hastalarında ise bu oranın % 35-50 arasında olduğu gösterilmiştir [6-7].



**Şekil 1.1.** Periferal dokulardaki L-asparagin kaynakları [1].

**L-asparaginaz** enzimi birkaç hayvan (insan hariç), bitki, fungus ve bakteri gibi farklı kaynaklardan sentezlense de, kemoterapötik değeri olan enzimin sadece birkaç gram negatif bakteride bulunduğu rapor edilmiştir [1]. Enzimin klinik uygulamalarda etkili bir antikanser ajan olarak başarılı bir şekilde kullanılmasına rağmen, sınırlı üretimi onun pahalı bir kemoterapi ajanı olmasına neden olmakta ve bu da onun yaygın kullanımı önündeki en önemli engel olarak görünmektedir. Bu bağlamda, enzimin klinik uygulamaları hakkında birçok çalışma bulunmasına rağmen, onun etkin üretimi ve bunu regüle eden etmenlerin ne olduğu konusundaki çalışmalara ise neredeyse rastlanılmamıştır. Ayrıca, enzimin kimyasal karakterizasyonu ile ilgili de fazla bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışma, temelde enzimin bu yönlerini araştırmayı konu almıştır.

## 1.1. L-Asparaginaz

### 1.1.1. Tarihsel gelişim

1953 yılında Kidd, bazı hayvanlardan aldığı serumların at ve tavşanlardaki serumların aksine fare ve sıçanlardaki tümör büyümesini inhibe ettiğini ve daha sonraki çalışmalarında saf serumların tümörün tamamen baskılanmasında (gerilenmesinde) yeterli olduğunu gözlemledi [2]. Broome ise tümör gerilemesine neden olan bu maddenin serumdaki bir tamamlayıcı değil, bağlı substrat spesifikliği gösteren ve asparagin amino asidini aspartik asit ve amonyağa hidrolizleyen L-asparaginaz enzimi olduğunu gösterdi [8].

Neumann ve McKoy tarafından yapılan çalışmalarda Walker carcinosarcoma 256'nın *in vitro* olarak çoğalması için aslında esansiyel olmayan asparagin amino asidine ihtiyaç duyulduğu ispatlandı [9]. Benzer şekilde, Haley ve arkadaşları [10], murine L5178Y lösemi hücrelerinin *in vitro* olarak çoğalmak için asparagine ihtiyaç duyduklarını gösterdiler [11].

Mashburn ve Wriston 1964 yılında klinik kullanım için başka L-asparaginaz kaynaklarını araştırmış ve *E. coli*' den elde edilen enzimin benzer anti-tümör aktivitesine sahip olduğunu göstermişlerdir [12]. Bu bağlamda, ALL hastalarındaki ilk klinik denemeler *E. coli*'den hazırlanan asparaginazla gerçekleştirilmiş ve enzimin klinik olarak istenen etkiyi gösterdiği kanıtlanmıştır [11, 13]. Daha sonraki çalışmalarda ise *E.coli*'de asparagini hidrolize eden iki çeşit enzimin bulunduğu; bu enzimlerden birinin (Aspaz I) sitoplazmik olduğu diğerinin (Aspaz II) ise özellikle periplazmik boşlukta lokalize olduğu saptanmış ve sadece Aspaz II'nin önemli sayılabilir bir anti-tümör aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir [14]. Bu iki izoenzim arasındaki bu fark onların asparagine karşı olan ilgisi (Km) ile açıklanabilir. Genel olarak anti-tümör aktiviteye sahip Aspaz II, sitoplazmik izoenzimine (Aspaz I) göre daha düşük bir Km değerine sahiptir. Dolayısı ile Aspaz II çok daha etkin olarak L-asparagin amino asidini aspartik asit ve amonyağa dönüştürmektedir. Bir diğer fark Aspaz I'in konstitütif, Aspaz II'nin ise indüklenebilir bir enzim olmasıdır.

Asparaginazın farklı potansiyel kaynaklardan eldesi ve karakterizasyonu için daha sonraki yıllarda bazı çalışmalar gerçekleştirmiş ve bu çalışmalar *E. coli* gibi bir başka gram-negatif bakteri olan *Erwinia chrysanthemi*'nin daha yüksek asparaginaz aktivitesi gösterdiğini ortaya koymuştur. Dolayısı ile daha sonraki yıllarda enzim üretimi için bu



bakteri özellikle tercih edilmiştir [15]. Ayrıca, başka bir gram-negatif fakültatif bakteri olan *Serratia marcescens* ve yine gram-negatif anaerob bir bakteri olan *Vibrio succinogenes*'in de lenfomalar üzerinde etkili asparaginazlara sahip oldukları saptanmıştır [16]. Bununla beraber sadece çeşitli *E.coli* türlerinde ve *E. chrysanthemi*'den elde edilen doğal L-asparaginazın klinik kullanımı devam etmektedir.

### 1.1.2. Moleküler yapısı

Bakterilerden saflaştırılan L-asparaginazların moleküler ağırlığı yaklaşık 136,000-141,000 dalton olup genellikle her biri 326 amino asit uzunluğunda ve yaklaşık 35 kDa büyüklüğünde 4 alt üniteden oluşmuşlardır (Şekil 1. 2) [16-18]. Homotetramerik yapıyı oluşturan her alt ünite komşu alt ünitelerle iki tip ilişki kurarak kuarternar yapıyı oluşturmaktadır. Bunlardan birincisi dimer oluşumuna yol açan yakın ilişki diğeri ise dimerler arasındaki uzak ilişkidir.

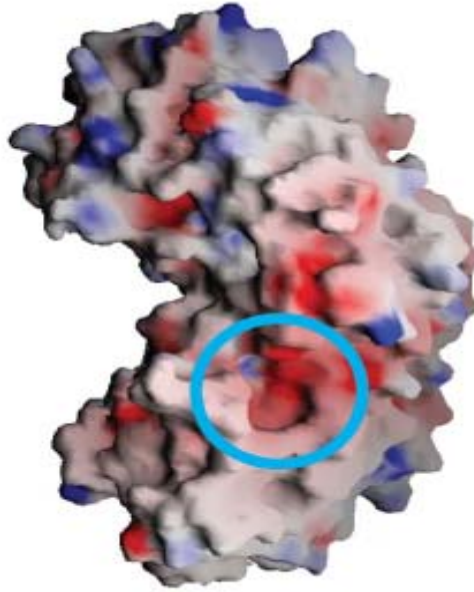
Başlangıç dimeri oluştuğunda yüzeyler arası (interface) bölgede iki ayrı aktif merkez oluşur. Bu dimerin diğere gerek duymadan enzimatik reaksiyonu gerçekleştirebildiğine dair deliller vardır [19]. Şekil 1. 3'de *E.coli*'den saflaştırılan L-asparaginaz II (EcAspaz-II) dimerinin yapısı gösterilmiştir. Mavi ile daire içine alınmış bölge dimerde bulunan aktif bölge olup diğere tip L-asparaginazlardan farklı olarak daha esnek [19].

### 1.1.3. Biyokimyasal özellikleri

L-asparaginaz, L-asparagin amino asidinin “L-aspartik asit” ve “amonyağa” hidrolizi reaksiyonunu katalizler (Şekil 1.4) [20]. Bu reaksiyonda L-asparagin amino asidindeki amid bağı hidrolize edilmektedir [21]. Reaksiyonda substrat olan L-asparagin ve reaksiyon ürünü olan L-aspartik asit, protein sentezinde yapıtaşı olarak kullanılmalarının yanında diğere önemli rollere de sahiptirler. L-asparagin protein sentezinde tekrar kullanılan azotun taşınması ve depolanması için önemli amino asit iken, reaksiyon ürünü L-aspartat amino asidi Krebs ve üre döngüsünde, pürin ve pirimidin sentezinde önemli rollere sahiptir [20].



**Şekil 1.2.** *E. coli*' den saflaştırılmış L-asparaginaz homotetramerinin kuarternar yapısının grafiksel gösterimi [16].

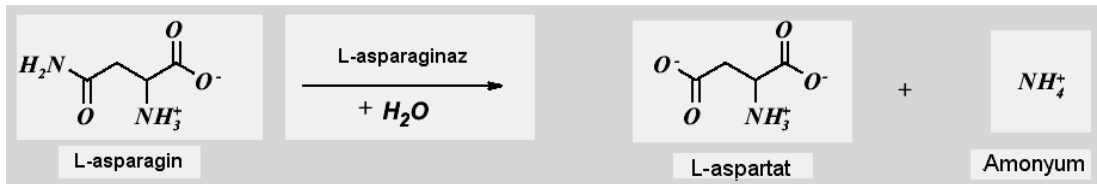


EcA-II

**Şekil 1.3.** *E. coli*' den saflaştırılmış L-asparaginaz dimerinin grafiksel gösterimi [19].

L-asparaginazın izoelektrik noktadaki pH değeri 4.9 olup, aktivite gösterdiği pH skalası 4.0-9.5 arasındadır. Diğer bir deyimle bu enzim oldukça geniş bir pH aralığında aktivitesini koruyabilmektedir. pH < 4.0 ve > 12 değerlerinde ise enzim tamamen inaktif durumda bulunmaktadır. L-asparaginaz termostabil bir enzim olup, optimal aktivite 30-43 °C, maksimum aktivite ise 50-60 °C arasında ve optimum pH' sının da 8.6'da olduğu gözlenmiştir [22]. Enzim, alternatif substrat (asparagin analogu) olan 5-diazo-4-oxo-L-norvalin tarafından kompetitif olarak inhibe edilir [23, 24].

L-asparaginaz aktivitesi üzerine bazı divalent metal katyonların etkileri çalışılmış, mangan ve çinkonun bütün çalışılmış konsantrasyonları enzimin sentezini tamamen inhibe ederken, bakırın sadece yüksek konsantrasyonlarda enzim sentezini baskıladığı gösterilmiştir [25, 26]. Bir başka çalışmada ise demirin düşük konsantrasyonlarının (0.5-1.0 mM) enzim aktivitesini arttırdığı, yüksek konsantrasyonlarının (20 mM) ise aktiviteyi inhibe ettiği belirlenmiştir [27]. Aynı şekilde, nikelin de düşük konsantrasyonlarının (0.5 mM) enzim aktivitesini indüklediği ancak yüksek konsantrasyonlarının (1.0-2.0 mM) aktiviteyi inhibe ettiği belirlenmiştir [27]. Buna karşın kobalt ve magnezyumun kullanılan konsantrasyonların hepsinde enzim aktivitesini arttırıcı bir rol aldıkları saptanmıştır [26].



Şekil 1.4. L-asparaginaz reaksiyonu [20]

#### 1.1.4. L-Asparaginazın kemoterapötik etkisi

L-asparaginaz enzimi, çeşitli kanser (çocuk lösemisi başta olmak üzere, lenfosarkoma, melanosarkoma, non-Hodgkin, vb.) türlerindeki yüksek terapötik değeri ile bilinmektedir [28]. Geni insanlarda bulunmayan bu enzimin anti-lösemik etkisi sirkülasyonda bulunan L-asparagin amino asidini hızlı bir şekilde yıkmaya dayanır. Enzim, asparagini *aspartat* ve *amonyağa* çevirerek kanserli hücrelerin büyümek ve bölünmek için ihtiyaç duydukları bu amino asitten yoksun bırakır. Enzimin normal hücreler üzerinde böyle bir etkisi söz konusu değildir. Çünkü, normal hücreler kendi

asparagin amino asidini aktif şekilde üreten *asparagin sentetaz* enzimine sahipken, kanserli hücrelerde bu enzim ya bulunmaz ya da normal hücrelerdeki seviyede sentezlenmez. Dolayısı ile kanserli hücrelerde, sağlıklı hücrelerin tersine yeterince L-asparagin sentezi yapılamamaktadır. Bu nedenle, kanserli hücreler dışardan alınan veya sağlıklı hücreler tarafından yapılarak kana verilen asparagine bağımlıdırlar. Dolaşımda serbest bulunan bu amino asitin, enjekte edilen L-asparaginazla yıkılması sonucu neoplastik hücrelerde protein sentezi bloke edilmiş olur. Protein sentezindeki bu blok, yapımları yine protein olan çeşitli polimerazlarla gerçekleşen DNA ve RNA sentezinin inhibisyonu ile sonuçlanır [11]. Dolayısı ile hücrede protein sentezi ile beraber hücrenin genetik bilgisi de kopyalanamaz ve hücreler büyüyüp çoğalamazlar. Bunun sonucunda tüm hücre fonksiyonlarının zarar gördüğü ve belli bir süre sonra hücrelerin normal apoptosis (programlanmış hücre ölümü) ile ortadan kalktıkları saptanmıştır [29]. Enzim tedavisi görmüş lösemili çocuklarda, kanserli kan hücrelerinin zamanla ortadan kalktığı saptanırken, çeşitli kanser tümörlerinin ise büzüşerek kayboldukları rapor edilmiştir [30].

### **1.1.5. Farmakokinetik**

Kemoterapötik olarak L-asparaginaz intravenöz ve intramuskular yoldan uygulanır. İntramuskular yolla uygulanması hipersensitivite reaksiyonların görülme sıklığını azaltır. Ancak, intramuskular uygulama sonrası absorpsiyon yavaş gerçekleştiğinden enzimin uygulamadan yaklaşık 1 saat sonra kanda belirdiği tespit edilmiştir. İntramuskular uygulamadan sonra plazma aktivitesi sonuçları, intravenöz tedaviyi takiben gözlenenlerin yaklaşık olarak yarısı kadar gerçekleşmektedir. Araştırmaların çoğunda yapılan konsantrasyon zaman eğrisi 4-15 saatin plazma yarı ömrü olduğunu göstermiştir [31, 32]. Bununla beraber enzimin yarılanma ömrünü doz uygulama sıklığı ve miktarı, yaş, cinsiyet, hastalık durumu ve renal fonksiyonlar belirler [33]. Hücresel protein ve enzimatik aktivite değerleri karşılaştırıldığı zaman, bir lineer ilişki ve doza bağlı plazma aktivitesi gözlenmiştir [32, 34].

Yapılan çalışmalarda özellikle kemoterapötik olarak kullanılan *E.coli* asparaginazının yarı ömrü, *Erwinia* asparaginazına göre önemli derecede yüksektir. Ayrıca, kemoterapötik L-asparaginazın bakteriyel orijinli olması sebebiyle insanda bu proteine karşı gelişen immün yanıtı ortadan kaldırmak ve hem de enzimin plazma yarı ömrünü arttırmak için enzim polietilen glikol ile konjuge edilerek veya kapsüle edilerek

uygulanmaktadır [35]. L-asparaginazın bu modifikasyonu enzimin kandaki yarı ömrünü arttırmakta ve enzime karşı geliştirilen immünolojik yanıtları azaltmaktadır [11, 35]. L-asparaginaz, ALL başta olmak üzere Hodgkin hastalığı, akut miyeloblastik lösemi, kronik lenfoblastik lösemi, lenfosarkoma ve miyelosarkomada kemoterapötik ilaç olarak yaygın kullanım aralığına sahiptir [33].

#### **1.1.6. Klinik etki ve ilaç etkileşimleri**

L-asparaginazın kanserdeki terapötik yönü ile ilgili birçok klinik çalışma vardır ve bu çalışmalarda kanserin türüne ve fazına göre enzim diğer kemoterapötik ajanlarla kombine kullanıldığı gibi, bazı uygulamalarda enzimin salt kendisi de kullanılmıştır. L-asparaginazın en başarılı uygulamaları özellikle hematolojik kanserlerde olmakla beraber, solid tümörlerin tedavisinde de başarılı sonuçlar elde edilmiştir [36]. Farklı kaynaklardan gelen asparaginazların nispeten farklı seviyelerde terapötik etki gösterdiği ve % 95'e varan oranlarda terapinin gerçekleştiği çalışmalar vardır [37]. Bu bağlamda *Erwinia* asparaginazı uygulanan hastaların % 62'sinde, *E.coli* asparaginazının ise % 75'inde başarılı olduğu görülmüştür. Bu farkın en önemli nedeni olarak *E.coli* asparaginazının daha uzun plazma yarı-ömrüne sahip olmasının yattığı ifade edilmiştir [38].

Klinik olarak asparaginaz, kanserli hücre üzerine etkisini protein sentezini ve bununla bağlantılı olarak DNA ve RNA sentezini bozarak göstermektedir. Bu enzimin doğal substratı olan L-asparagin bakımından oksotrofik olan kanser hücreleri bu amino asidi ya beslenme ya da bu enzim bakımından prototrofik olan normal hücrelerden sağlarlar. Bu nedenle L-asparaginaz uygulaması ile dolaşımdaki L-asparagin yıkılır ve dış kökenli L-asparagine ihtiyaç duyan kanserli hücreler protein sentezi bakımından kaosa girip büyüme ve çoğalmalarını durdurup kendilerini apoptosise sürüklerlerken, normal hücreler asparagin amino asidini sentezleme yeteneğine sahip olduklarından böyle bir uygulamadan etkilenmezler. Bu şekilde protein sentezini inhibe eden ajanların tek başlarına ya da birlikte uygulanmalarının bu ajanların sitotoksik etkilerini oldukça arttırdığı gösterilmiştir [39]. L-asparaginazın en başarılı kombinasyonun methotrexate (MTX) ile birlikte uygulandığında olduğu rapor edilmiştir [40].

### 1.1.7. L-Asparaginaz preparatları

Protein orijinli terapötik ajanların plazma yarı ömürlerinin kısa olması, bu ajanların klinik uygulamalarda başarılı kullanımlarının önündeki en önemli engellerdendir. Bu nedenle son yıllardaki çalışmalar proteinlerin bu yöndeki kararlılığını arttıracak çeşitli kimyasal modifikasyonlar üzerine yoğunlaşmıştır. Post-translasyonel olarak çeşitli inert maddelerin bu proteinlere konjugasyonu ile onların plazma yarı ömürleri önemli derecede artırılabilir. Bu çalışmalarda en yaygın kullanılan madde lineer, non-toksik ve non-immünogenetik oluşu nedeniyle polietilen glikol (PEG) olmuştur. Daha sonraki yıllarda bu çeşit protein modifikasyon tekniği (polietilen glikolasyon) yaygın bir şekilde ilaç olarak kullanılan proteinlere uygulanmaya başlanmıştır. Enzimlerin terapötik uygulanması sonrasında polipeptid yapısı en fazla birkaç saat içinde dolaşımdan tamamen temizlenir. Bu çeşit kısa bir yarı ömre katkıda bulunan en önemli etmen ise dolaşımda bulunan proteazlardır. Dolaşımdaki ekzo ve endopeptidazlar, dışardan (yabancı bir kaynaktan) gelen peptidleri hızlı bir şekilde parçalarlar. Bu nedenle son yıllarda enzim terapötiklerinin *in vivo* yarı ömürlerini uzun kılacak bir takım post-translasyonel modifikasyon mekanizmaları geliştirilmiştir. PEG'in yüksek oranda çözünürlüğü, düşük viskozitesi ve düşük derecedeki immünitesi onun ideal bir enzim konjugasyonu ve enzimi taşıma maddesi olarak seçilmesini sağlamıştır. Polipeptid zincirinin PEG ile konjugasyonu genellikle böbrekte süzulemeyen büyüklükte (>50 kDa) bir moleküler kompleks yaratır ve böylece enzimin böbrekler vasıtası ile dolaşımdan uzaklaştırılması da engellenmiş olur. PEG ile konjuge edilmiş enzimin bir diğer özelliği onun aynı zamanda dolaşımdaki birçok proteaza karşı da daha dirençli olması ve hedef dokulara varması için gereken süre boyunca aktif halde plazmada kalabilmesidir. PEG ile yapılan modifikasyondan başka bu tür enzimlerin ekzo ve endopeptidazlara karşı dirençli kılınması onların yapılarında meydana getirilen diğer post-translasyonel modifikasyonlarla da sağlanabilir. Bu tür çalışmalarda genel olarak enzimin N (amino) ucu asetillenir veya glikozillenirken, C (karboksil) ucuna bir amid grubu eklenir. L-asparaginaz için bu yöndeki çalışmalar onun PEG ile konjuge edilerek hastaya verilmesidir. PEG genel olarak peptidlerin N veya C uçlarına bağlanır. Böylece, enzimin molekül büyüklüğüne yaptığı katkının yanında onun dolaşımdaki ekzo ve endopeptidazlar tarafından sindirimini de bloke etmiş olur. Bu gelişmelerin sonucu olarak son zamanlarda ticari olarak *E.coli* ve *Erwinia chrysanthemi*'den elde edilen L-asparaginazlar PEG-asparaginaz şeklinde pazarlanmaktadır.

Yapılan alışmalar PEG ile modifiye edilmiş olan L-asparaginazın doğal L-asparaginaza göre hem daha uzun bir plazma yarılanma ömrüne sahip olduğunu ve hem de tedavi sırasında hastanın bu konjuge enzime daha az immün yanıt gösterdiği belirlenmiştir. Bu bağlamda, L-asparaginaza karşı hipersensitif reaksiyon oranı % 32 iken, PEG-asparaginazda bu oran % 18' dir [41]. Enzim ve preparatlarının yarı ömrü ile ilgili çalışmalar, enzimin hastaya uygulanma şeklinin oldukça önemli olduğunu ortaya koymuştur. İntamuskular (kas içi) enjeksiyon sonrası doğal *E.coli* asparaginazı için yarı ömür 1.24 gün, PEG bağlı *E.coli* asparaginazının yarı ömrü ise 5.73 gün olarak belirlenmiştir. İntavenz (damar) uygulama sonrasında ise PEG-asparaginaz ile modifiye olmamış L-asparaginazın yarı-ömrü sırasıyla 56 ve 2.9 saat olarak gerçekleşmiştir. Bu yarı mrdeki artışın temelinde PEG ile modifiye edilmiş L-asparaginazın proteazlara karşı dayanıklı olması yatmaktadır [35].

### **1.1.8. L-Asparaginazın toksitesisi**

L-asparaginaz toksitesisinin temelinde iki ana neden vardır; biricisi yabancı bir proteine karşı gelişen immonolojik reaksiyon, ikincisi ise asparagin havuzunun tükenmesi sonucu gelişen protein sentezindeki inhibisyonudur. L-asparaginaz tedavilerinde hipersensitif reaksiyonlar özellikle ölümcül sonuçlar doğurmasından dolayı dikkat çekmiştir. L-asparaginazın tek olarak kullanıldığı tedavilerde, hastaların % 40'ında duyarlılık gelişmiş ve özellikle de bunlar yüksek tansiyon ve kalp spazmları olarak ortaya çıkmıştır [42]. Bununla beraber nadiren de olsa tedavi sürecinin sonrasında birkaç hafta içinde eklem yangısı ve yüksek ateş görülebilmektedir. Bu alerjik reaksiyonların görülmesinde L-asparaginazın elde edildiği kaynak çok önemlidir. Örneğin; *Erwina*'dan elde edilen L-asparaginazın *E.coli*'den elde edilenlere göre hastalarda daha fazla hipersensitif etki yarattığı rapor edilmiştir [43]. Bu nedenle hipersensitif hastalarda özellikle PEG-asparaginazların kullanılması önerilmektedir. Yine alerjik reaksiyonların ortaya çıkabileceği düşünülerek ilaç uygulaması öncesi hastaya deri testinin yapılması önerilmektedir. Hipersensitif hastalara yapılan bu testlere rağmen hastalarda ortaya çıkacak tepkiyi tamamen kestirmek zordur. Genellikle hipersensitif hastaların tümünde hem immunoglobulin E hem de immunoglobulin G görülmesine karşın hastaların yarısından azında alerjik reaksiyonlar gelişmiştir. Bu nedenle antikor testleri hastanın vereceği alerjik tepkiyi tahmin etmede bize sınırlı bilgiler sağlamaktadır [11].

Protein sentezi sonucu oluşan diğer toksik etkiler; kan pıhtılaşma faktörlerinde ve serum insülin düzeyinde azalmalar ile hiperglisemi oluşumu ve serumda lipoproteinler, albumin, kolesterol, transferin, seruloplazmin ve beta globulin azalışları, transaminaz, alkalin fosfataz ve bilirubin düzeyinde yükselişleri içerir [44].

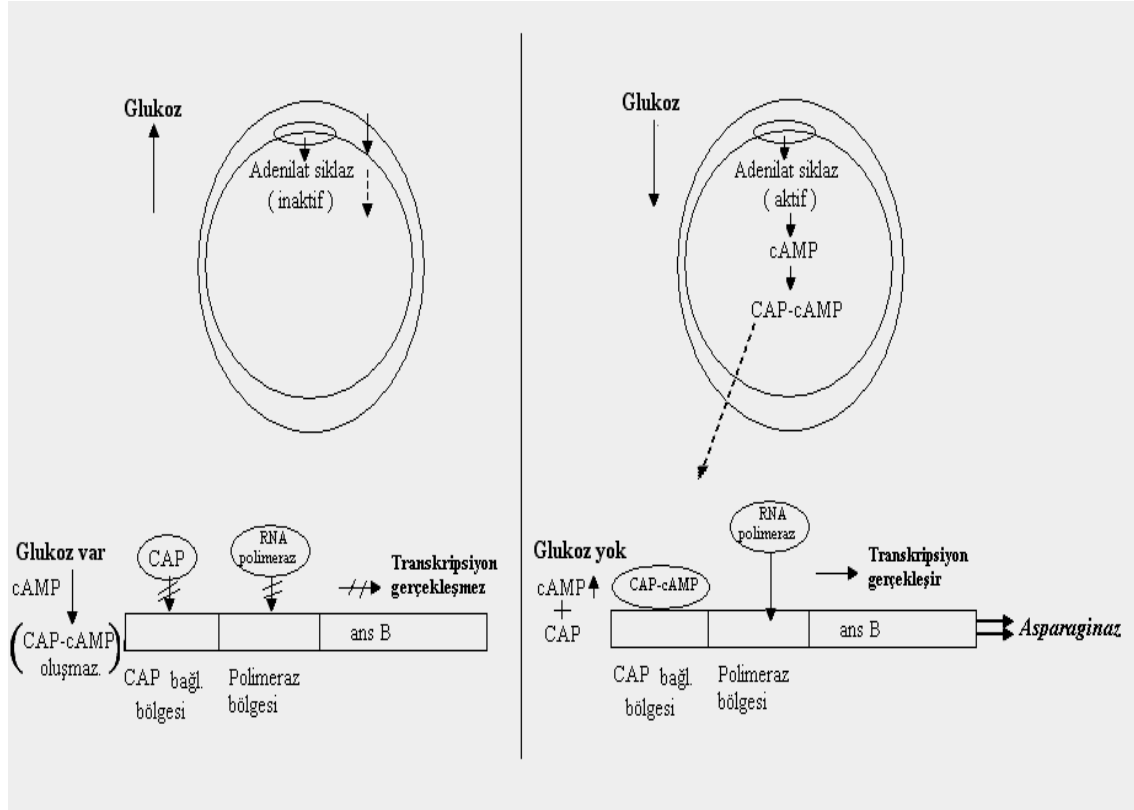
### 1.1.9. L-Asparaginaz üretiminin regülasyonu

Enzimin üretimi ile ilgili literatürde fazla çalışma bulunmamasına karşın, enzimin ticari üretimi genel olarak *E. coli* ve *Erwinia chrysanthemi* kullanılarak yapılmaktadır [45]. Enzim üretimi konusunda bu tür bir kaynak (sadece iki bakteriden üretilmesi) eksikliği ve sadece birkaç ticari firma tarafından üretilmesi onun pahalı bir kanser tedavi ajanı olmasının en önemli nedenleri arasındadır. Bu nedenle enzimin etkin üretimi ile ilgili çalışmalar önem kazanmış ve indüklenebilir bir enzim olan L-asparaginazın regülasyonunu hedef alan çalışmaların yapılmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu enzimi üreten genin (*ansB*) oksijene duyarlı ve karbon katabolit represyona maruz kaldığı bilinmektedir. Dolayısı ile hem oksijen ve hem de enzimi üreten bakterilerin çoğaltılması için kullanılan karbon kaynakları enzimin optimal üretimi için sınırlayıcı rol oynamaktadır. Genin oksijenle regülasyonu onun Fnr ve Arc global regülatörlerine karşı duyarlı olmasından kaynaklanır. Dolayısı ile *ansB* geninin regülatör bölgesinde bu global düzenleyici faktörlerin bağlandığı özel diziler vardır. Fnr (fumarat nitrat redüksiyonu) anaerobik solunumun kontrolü için görev yaparken, Arc (anaerobik respirasyon kontrolü) ise aerobik solunumda kontrol için işlev görmektedir. Bu gen aynı zamanda karbon kaynağı (ör. glukoz) duyarlı bir ekspresyon sergileyerek katabolik regülasyon ile de kontrol edilir [46]. Siklik adenozin monofosfat (cAMP), anaerobik koşullar ve enzimin substratı L-asparaginaz enziminin başlıca indükleyicileridir. cAMP miktarının artması (ve düşük glukoz seviyeleri) enzimin üretimini artırmaktadır (Şekil 1.5). Çünkü cAMP bu enzimin üretiminde katabolitik regülatör olarak görev yapan katabolit reseptör proteine bağlanıp RNA polimerazın bu enzimi üreten *ansB* promotoruna daha kolay bağlanmasını sağlayarak genin transkripsiyonunu artırmaktadır. cAMP miktarı ortamdaki glukoz miktarı ile değişmekte olup glukoz miktarının artması ile cAMP miktarı ters orantılı olarak azalmaktadır [47].

Anaerobiosis ile de enzimin üretimi artmaktadır. Çünkü anaerobik koşullarda bu enzimin üretiminde global regülatör olarak görev yapan fnr proteini aktif hale geçer ve bu da RNA polimerazın genin promotör bölgesine bağlanması üzerinde sinerjistik bir



etki yaparak *ansB*'nin transkripsiyonunu artırır. Enzimin substratı olan L-asparagin de enzimin üretimini indüklemektedir. Ortamın oksijene doymun olması ise enzimin sentezi üzerine önemli derecede azaltıcı bir etki yaratır.



**Şekil 1.5.** Glukoz'un enzim sentezindeki regülasyonunun gösterimi.

## 1.2. *Vitreoscilla* Hemoglobin Geni (VHb)

Son yıllara kadar hemoglobinler, ökaryotik orijinli proteinler olarak bilinmiştir. Fakat 1986 yılında Webster ve ark. tarafından ilk prokaryotik hemoglobin belirlenmiştir. Araştırmacılar, gram-negatif bir bakteri olan *Vitreoscilla*'nın doğal olarak hemoglobin (VHb) içerdiğini göstermişlerdir [48]. Bunun yanında, *Vitreoscilla* hemoglobini karakterizasyonu en iyi yapılan ilk prokaryotik orijinli hemoglobindir. Sonraki çalışmalar, VHb'nin ökaryot orijinli hemoglobinlerin genellikle oksijen bağlama ve taşımadaki rolleriyle beraber başka amaçlar için de kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Örneğin, VHb'nin bazı redoks reaksiyonlarını katalizlediği ve doğal konakçısını (*Vitreoscilla*) oksidatif stresten koruyarak, düşük oksijenli ortamlara uyum

sağlamada kolaylık sağladığı düşünülmektedir [48]. Bütün klonlanmış olduğu hücelere daha iyi bir oksijen alım ve kullanım potansiyeli kazandırırken [49-51] bu proteinin hücre büyüme ve çoğalması üzerine olan etkisi konusunda farklı sonuçları içeren çalışmalar mevcuttur [52-56]. Bununla beraber proteinin ikincil metabolit üretiminden çeşitli zararlı aromatik maddeleri parçalamaya kadar geniş bir yelpazedeki muhtemel potansiyeli de araştırılmıştır [57-59]. *Vitreoscilla* hemoglobin geni (*vgb*) oksijenle regüle olan bir gen olup, mikroaerofilik şartlarda maksimum derecede uyarılmakta ve VHb hücre içi konsantrasyonu 40-50 kat yükselmektedir [60-62]. Özellikle oksijen miktarında değişimin bulunduğu koşullarda VHb'nin ortam oksijen değişimlerine karşı bir tampon görevi görerek mikroorganizmanın büyüme ve çoğalmasında önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir [62-64]. Mikroorganizmaların çoğu için belli oksijen konsantrasyonu, ortamdaki oksijen değişimlerinin algılanması ve değişimlere adaptasyon sağlaması onların büyüme ve çoğalması için büyük önem taşımaktadır. Büyüme ortamındaki oksijen konsantrasyonu belli sınırların altına düştüğü zaman, bütün hücrelerin fizyolojik ve metabolik aktivitelerinde önemli değişimler görülür ve hatta hücrelerin büyümesi dururken hücrede parçalanmalar artar. Bu tür durumlarda VHb'nin hücrelerin daha iyi büyümelerini/çoğalmalarını sağladığı ve metabolik aktivitelerini düzenlediği ortaya konmuştur [65].

### **1.3. Proteinlerin Saflaştırılması**

Bir hücre ve dokudan istenilen bir proteinin saf halde izole edilmesi ticari açıdan önemli olması ile beraber oldukça da zor bir olaydır. Bu nedenle saflaştırılacak proteini binlerce farklı protein arasından ayırmak ve saf halde elde etmek için bu proteine uygun olan saflaştırma tekniklerinin seçilmesi gerekir. Saflaştırmada kullanılan yöntemlerden bir veya birkaçı arka arkaya kullanılarak istenilen protein belli ölçüde saf halde elde edilebilmektedir. Bu bağlamda bahsedilecek saflaştırma adımları, tez kapsamında L-asparaginazın kısmi saflaştırılmasında kullanılan teknikleri içermektedir.

#### **1.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi**

Nötral tuzla çöktürme “salting-out” proteinlerin konsantre edilmesinde ve saflaştırılmasında geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. Çöktürülen proteinler genellikle denatüre değildir ve aktivite peletin tekrar çözünmesiyle geri kazanılır. Nötral tuzlar

proteinleri denatürasyona, proteolize veya bakteriyal kontaminasyona karşı stabilize ederler. Çökmenin nedeni izoelektrik nokta faktöründen farklıdır. Salting-out proteinlerin yüzeyindeki hidrofobik bölgelerin dağılımına bağlıdır. Genelde proteinin iç kısımlarında bulunmakla beraber yüzeyde bölgesel olarak dağılan hidrofobik gruplar, ortamda bulunan su molekülleriyle içe doğru sıkıştırılır. Sulu ortamda iyonlarına ayrılan tuzun artan konsantrasyonlarında proteinin yüzeyinden daha fazla miktarda su molekülleri uzaklaştırıldığından dolayı proteinin hidrofobik bölgeleri açıkta kalır. Protein molekülünün yüzeyinde açıkta kalan hidrofobik bölgelerin birbiri ile etkileşimi nedeniyle kümelenmeler ve çökelmeler meydana gelir. Bir araya gelen hidrofobik bölgeler, daha az miktarda hidrofobik bölgeler içerenlerden daha önce çökülürler. Bu durum, proteinlerin fraksiyonlanarak ayrılmasına olanak verir.

Tuz etkisiyle çöktürmede tuzun anyonik karakteri ve çok değerlikli oluşu önemli olup etki sırası fosfat > sülfat > sitrat > asetat > nitrat şeklindedir. Tek değerlikli katyonlar arasındaki etki sırası ise;  $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$  'dır. Çöktürme işleminde genellikle etkinliği ve çözünürlüğü yüksek, pH'yı fazla etkilemeyen, çözeltide fazla ısınmaya yol açmayan, ucuz ve etkin bir tuz olan amonyum sülfat  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  kullanılır [66-68].

Amonyum sülfatla çöktürme ile genelde 2-5 kat arasında bir saflaştırma işlemi gerçekleştirilir. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası fazla tuzun uzaklaştırılması için diyaliz, jel filtrasyonu veya ultrafiltrasyon işleminin gerçekleştirilmesi gerekebilir. Amonyum sülfat çöktürmesinde kullanılacak konsantrasyon (% doyumluk) değerleri ve eklenecek amonyum sülfat miktarları çizelge 1.1'de verilmiştir. Bu tablodaki değerler aşağıdaki formülden hesaplanmıştır [67].

$$g = \frac{505 (S_2 - S_1)}{100 - 0,285 S_2}$$

$g$  = 1 litre çözeltiye eklenmesi gereken gram amonyum sülfat miktarı

$S_1$  = Amonyum sülfatın başlangıç konsantrasyonu (%)

$S_2$  = Amonyum sülfatın son konsantrasyonu (%)

**Çizelge 1.1.** 0 °C’de istenen doygunluğa ulaşılması için çözeltiye eklenmesi gereken katı amonyum sülfat miktarı [67].

<b>Amonyum Sülfatın son konsantrasyonu, 0 °C’de % doygunluk</b>																	
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
<b>Amonyum Sülfatın başlangıç konsantrasyonu(% )</b>																	
↓	<b>100 mL çözeltiye eklenecek gram amonyum sülfat miktarı</b>																
0	10.7	13.6	16.6	19.7	22.9	26.2	29.5	33.11	36.6	40.4	44.2	48.3	52.3	56.7	61.1	65.9	70.7
5	8.0	10.9	13.9	16.8	20.0	23.2	26.6	30.0	33.6	37.3	41.1	45.0	49.1	53.3	57.8	62.4	67.1
10	5.4	8.2	11.1	14.1	17.1	20.3	23.6	27.0	30.5	34.2	37.9	41.8	45.8	50.0	54.5	58.9	63.6
15	2.6	5.5	8.3	11.3	14.3	17.4	20.7	24.0	27.5	31.0	34.8	38.6	42.6	46.6	51.0	55.5	60.0
20	0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.5	17.7	21.0	24.6	28.0	31.1	35.4	39.2	43.3	47.6	51.9	56.5
25		0	2.7	5.7	8.5	11.7	14.8	18.2	21.4	24.8	28.4	32.1	36.0	40.1	44.2	48.5	52.9
30			0	2.8	5.7	8.7	11.9	15.0	18.4	21.7	25.3	28.9	32.8	36.7	40.8	45.1	49.5
35				0	2.8	5.8	8.8	12.0	15.3	18.7	22.1	25.8	29.5	33.4	37.4	41.6	45.9
40					0	2.9	5.9	9.0	12.2	15.5	19.0	22.5	26.2	30.0	34.0	38.1	42.4
45						0	2.9	6.0	9.1	12.5	15.8	19.3	22.9	26.7	30.6	34.7	38.8
50							0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.3	27.2	31.2	35.3
55								0	3.0	6.2	9.4	12.9	16.3	20.0	23.8	27.7	31.7
60									0	3.1	6.3	9.6	13.1	16.6	20.4	24.2	28.3
65										0	3.1	6.4	9.8	13.4	17.0	20.8	24.7
70											0	3.2	6.6	10.0	13.6	17.3	21.2
75												0	3.2	6.7	10.2	13.9	17.6
80													0	3.3	6.8	10.4	14.1
85														0	3.4	6.9	10.6
90															0	3.4	7.1
95																0	3.4
100																	0

### 1.3.2. Diyaliz

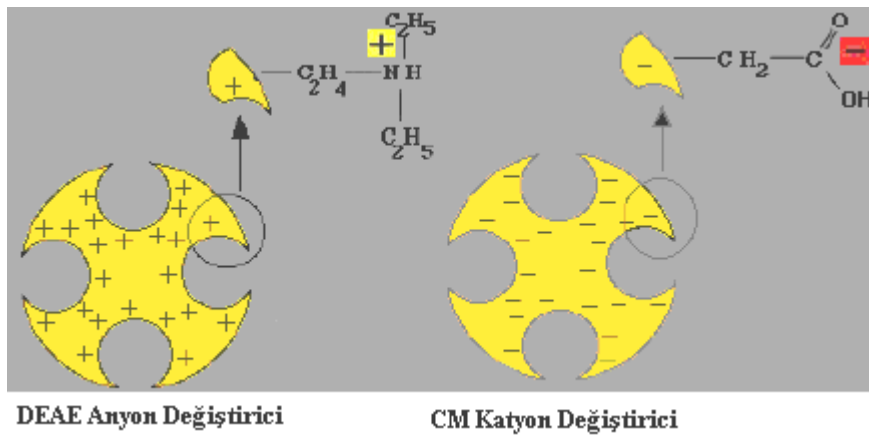
Proteinleri daha küçük molekül ağırlığa sahip moleküllerden ayırmak için diyaliz yöntemi kullanılır. Bu yöntem yarı geçirgen bir membran içerisine konulan protein çözeltisinin, düşük molekül ağırlıklı biyomoleküller ve tuz gibi küçük moleküllerin membranın ultramikroskopik porlarından suya ya da tampona geçirilerek ayrılmasına dayanır. Sistemin işleyişi, membranla ayrılan iki faz arasındaki konsantrasyon yani kimyasal potansiyel farkına dayalı difüzyonla (osmoz) gerçekleşmektedir. Diyaliz işleminde küçük moleküllerin geçişi, membranın her iki yüzeyinde potansiyel farkı eşit oluncaya kadar devam eder. Protein saflaştırılmasında, özellikle amonyum sülfat'la proteinlerin çöktürülmesi sonrası iyon değişim kromatografisi uygulanacaksa, düşük iyon şiddetli tampon ile değişim zorunludur. Diyaliz işlemi, por çapı 1-20 nm arasında olan selüloz asetat veya selüloz nitrattan üretilmiş diyaliz torbaları veya tüpleri ile gerçekleştirilmektedir [69]. Diyaliz torbaları, kullanılmadan önce bazı protein ve nükleazların inhibitör faktörü olan ağır metal iyonlarının ön işlemlerle uzaklaştırılması gerekebilir. Bu amaçla; sırasıyla % 0.005'lik EDTA, % 0.2'lik sodyum karbonat çözeltisinde ve ardından saf suda iki kez 10 dakika kaynatılır. Mikrobiyal kirlenmeyi önlemek amacıyla % 20'lik etanol veya % 0.1'lik sodyum azid çözeltisinde +4 °C'de 3 ay süreyle kullanıma hazır saklanabilir. Diyaliz torbasının uçları, diyaliz sonrası hacmin iki kat veya daha fazlası artabileceği dikkate alınarak kapatılmalıdır. Diyaliz torbası düşük iyon şiddetli +4 °C'deki tampona yerleştirilir ve tampon karıştırılır. Torbadaki porlardan tuzlar, geçebilen proteinler, peptidler, nükleotidler, koenzim, ATP dışarıya difüze olurlar ve torbadaki iyon şiddeti azalır. Membran içindeki ve dışındaki iyon şiddetinin dengeye gelmesi 3-5 saat sürebilir. Aktivite kayıplarını minimize etme amacıyla işlem +4 °C'de gerçekleştirilir. İşlem bitiminde diyaliz torbası önce tampon ardından suyla yıkanır ve depolama koşullarında saklanabilir [66-68].

### 1.3.3. İyon değişim kromatografisi

İyon değişim kromatografisi, elektrostatik çekim gücüne dayanan adsorpsiyon kromatografisinin bir türü olup, örnekte bulunan bileşenler yüklü durağan faza olan affinitelerine göre ayrılırlar. İyon değiştiriciler iki kısımdan oluşur. Birinci kısım içinde ve yüzeyinde kimyasal olarak (kovalent bağlarla) bağlanmış yüklü gruplar içeren üç boyutlu, çapraz bağlarla bağlanmış çözünür olmayan dolgu maddesidir. İkincisi ise

hareketli karşı iyonlardır ve tersinir olarak aynı yükteki başka iyonlarca, çözünür olmayan dolgu maddesinde herhangi bir değişikliğe yol açmadan değiştirilebilirler.

Bu teknikte proteinler yada amino asit karışımları belirli bir pH'da taşıdıkları yüke göre birbirlerinden ayrılırlar. Matriks, jel elemesinde olduğu gibi nötral olmayıp, iyonize olabilen fonksiyonel gruplarla donanmıştır. Protein izolasyonun da kullanılan iyon değiştiriciler, jel kromatografisinde kullanılan matrikslere dietilaminoetil (DEAE) ya da karboksimetil (CM) gruplarının eklenmesi ile elde edilir. DEAE türü iyon değiştiriciler (+) yük taşırlar ve anyon değiştirici görevi görürler; CM türü iyon değiştiriciler pH 4'ün üzerinde (-) yük taşırlar ve katyon değiştirici görevi görürler (Şekil 1.6). Bir protein karışımı belirli bir pH'da iyon değiştiriciye uygulandığında, matriksle aynı tür yük taşıyan bileşikler, iyon değiştiriciye tutunamayarak ilk başta kolondan çıkarlar. Matriks yüküne karşıt yük taşıyan proteinler ise, elektrostatik etkileşimle matrikse bağlanırlar. Bunlar sonradan elüsyon şartları değiştirilerek kolondan sökülürler. Bir proteinin matrikse ne derece sıkı bir şekilde bağlanacağı, öncelikle proteinin üzerindeki yük miktarına bağlıdır. Bir katyon değiştiriciyi ele alırsak, belirli bir pH'da bu matrikse uygulanan protein karışımında en sıkı bağlanan bileşen, en fazla (+) yük taşıyan (izoelektrik noktası en yüksek olan) bileşendir. Bu protein aynı zamanda matriksten en güç sökülebilen protein olacaktır [70-72].



Şekil 1.6. İyon değiştiriciler [70].

Biyolojik maddelerin ayırımında ilk kullanılan iyon değiştiriciler selüloz iyon değiştiricileridir. Hidrofilik tabiatı sebebiyle selülozun proteinleri denatüre etme eğilimi çok düşüktür. Pharmacia Fine Chemicals firması tarafından geliştirilen modifiye

dekstran olan Sephadex, çapraz bağlı agaroz olan Sepharose ve epiklorohidrin ile çapraz bağlanarak kuvvetlendirilmiş selüloz olan Sephacel iyon değiştiricileri, küresel tanecikli yüksek gözenekli ilk iyon değiştiricileridir. Bu günlerde çok farklı destek maddesi vardır ancak protein fraksiyonu için en yaygın tercih edilen destek maddesi selülozdur [71].

Yaygın olarak kullanılan iyon değiştiricilerin, değiştirdikleri iyon yüklerine göre türleri, destek maddeleri, destek maddesine kovalent olarak bağlı iyonik grupları, karşı iyonları, pH kullanım aralıkları ve zayıf veya kuvvetli iyon değiştirici türleri çizelge 1.2’de özetlenmiştir. İyon değiştiricilerin karşı iyonları adsorblama kabiliyeti kantitatif olarak kapasite olarak tanımlanır. İyon değiştiricisinin kapasitesi destek maddesinin gözeneğinin fonksiyonudur. İyon değiştiricisinin total kapasitesi, o iyon değiştiricisinin kuru gramında bulunan yüklü grupların miktarıdır. Genel olarak miligram kuru ağırlık başına iyonlaşabilen grupların miliekivalentleri olarak ifade edilir ve deneysel olarak titrasyonla tayin edilir.

### **1.3.3.1. İyon değiştiricinin seçimi**

Amfoterik maddeler olan proteinlerin net yükleri değişken olup düşük pH’ larda pozitif, yüksek pH’larda negatif ve izoelektrik noktada (pI) ise yüksüzdür. Proteinlerde etkileşime giren yük grupları başlıca karboksil, amino veya tersiyer amino gruplarıdır. Genel kaide olarak toplam aspartik asit ve glutamik asit artışı değişken proteinler anyonik değiştiriciler ile ayrılırken, lizin, arjinin ve histidin içeriği farklı proteinler katyonik değiştiricilerle ayrılabilirler. Ancak, bu kaide kesin bir kaide değildir, zira bağlanmayı etkileyen birçok faktör vardır. Bu sebeple proteinlerin ayrılmasına başlamadan önce protein karışımının hem asidik hem de bazik şartlarda poliakrilamid jellerle elektroforezinin yapılmasında fayda vardır. Elektroforetik ayırımlar, yaklaşık olarak anyon ve katyon değişim kromatografisinin analitik versiyonları olarak hizmet ederler. Örneğin, eğer karışımın iyi bir ayırımı alkali koşullardaki elektroforezle elde edilirse o zaman preparatif olarak benzer pH’ta anyon değiştirici ile de ayrılabilir. Prensipde amfoterik moleküller hem anyon hem de katyon değiştiricileriyle bağlanabilirler ama büyük biyomoleküllerle çalışırken kararlı olduğu pH aralığının da dikkate alınması lazımdır.

Çoğu kez ayrılmak istenen proteinin izoelektrik noktası bilinmez ve bir protein karışımındaki proteinlerin birbirlerinden ayrılabilmesi için ne tip bir iyon değiştirici

kullanılacağı ancak deneme yanılma yöntemi ile gerçekleştirilir. Az bir miktar örnek tampon çözeltide çözülür ve farklı iyon değiştiricilerin bulunduğu farklı test tüplerine eşit olarak konular. 10-15 dakika bekletildikten sonra santrifüjlenerek çözeltinin 280 nm de absorbanası okunur. Relatif olarak en düşük absorbanas veren test tüpteki iyon değiştirici en uygun değiştiricidir [68].

**Çizelge 1.2.** Yaygın kullanılan iyon değiştiriciler [68].

<b>İyonik Grup</b>	<b>pH Kullanım Aralığı</b>	<b>Mevcut Maddeleri</b>
<b><i>Zayıf Anyon Değiştirici</i></b>		
Dietilaminoetil (DEAE) Fonksiyonel Grup: -O-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> HCl <sup>-</sup> Karşı İyon: Cl <sup>-</sup>	2-9	dekstran, agaroz, selüloz, lifli selüloz, mikrogranüler selüloz
<b><i>Kuvvetli Anyon Değiştirici</i></b>		
Kuaterner aminoetil (QAE) Fonksiyonel Grup: -O-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub> Cl <sup>-</sup> Karşı İyon: Cl <sup>-</sup>	2-10	dekstran, lifli selüloz
<b><i>Zayıf Katyon Değiştirici</i></b>		
Karboksimetil (CM) Fonksiyonel Grup: -O-CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> Na <sup>+</sup> Karşı İyon: Na <sup>+</sup>	3-10	dekstran, lifli selüloz, mikrogranüler selüloz, agaroz
<b><i>Kuvvetli Katyon Değiştirici</i></b>		
Sülfopropil (SP) Fonksiyonel Grup: -O-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Na <sup>+</sup> Karşı İyon: Na <sup>+</sup>	2-12	mikrogranüler selüloz, dekstran



### 1.3.3.2. Örnek tatbiki ve elüsyon

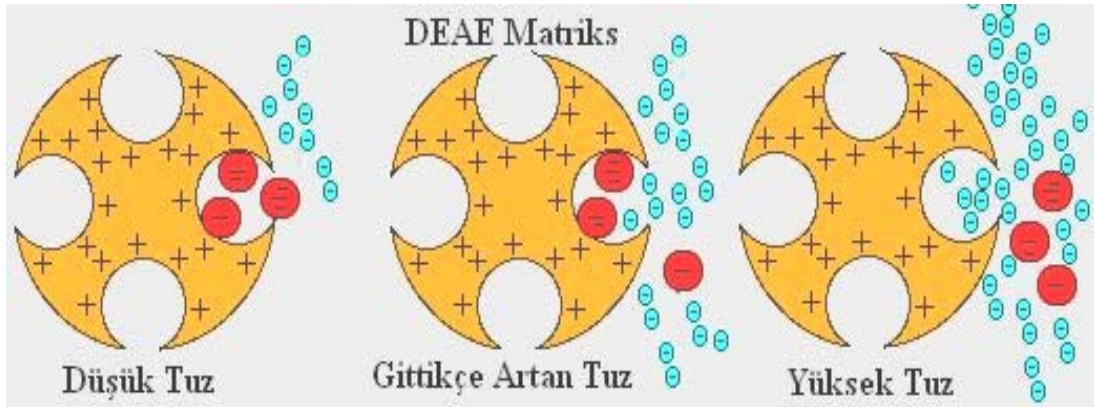
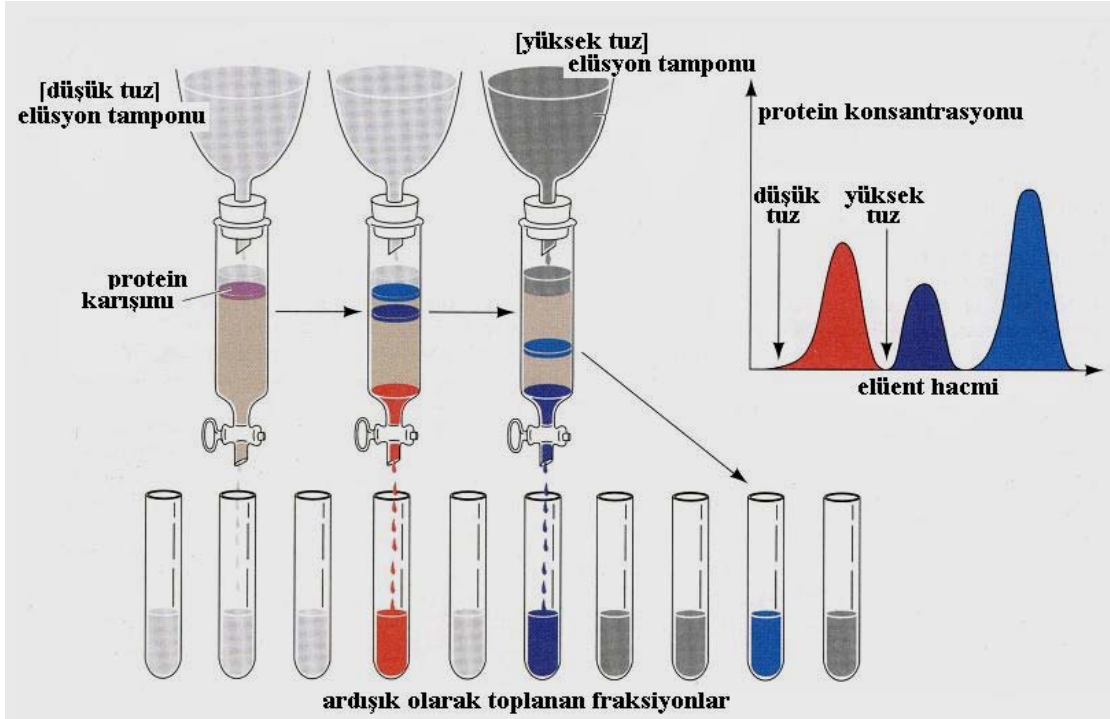
İyon değişim kromatografisi ile ayırımında temelde iki etap vardır: ilk etap örnek tatbiki ve iyon değiştirici üzerinde adsorpsiyon, ikinci etap ise adsorbe edilen örnek bileşenlerinin kolondan ayrılmış olarak elüe edilmeleridir.

Örnek, uygulamada kolaylık oluşturması açısından % 5 glukoz ya da sukroz ile yoğunlaştırılabilir. Örnek uygulanmadan önce, çıkış tüpü kapatılır. Jel yüzeyindeki tamponun fazlası Pasteur pipeti ile alınır. Bu işlem esnasında jel yüzeyinin bozulmamasına ve kurumamasına dikkat edilmelidir. Örnek Pasteur pipeti ile kolonun iç kenarında süzdürülerek tüm jel yüzeyine homojen bir şekilde uygulanır ve çıkış tüpü açılarak örneğin jelin içine girmesi sağlanır. Jel yüzeyinin kurumamasına dikkat edilmelidir. Örnek jelin içine girdikten sonra Pasteur pipeti ile jel yüzeyinden 4-5 cm yukarıya kadar tampon doldurulur. Tampon rezervi bağlanarak uygulama başlatılır. Örneğin tatbikinden sonra kolon, hacminin iki katı hacimdeki başlangıç tamponu ile yıkanarak bağlanmamış proteinin tamamı kolondan elüe edilebilir. Bir fraksiyon toplayıcısı yardımıyla, 3-4 mL'lik fraksiyonlar toplanır ve fraksiyonlarda örnek analizi yapılır [72].

Absorplanan proteinin elüsyonu iki şekilde gerçekleştirilebilir;

**Tuz yıkamasıyla:** Bu yöntemle örnek düşük iyonik kuvvette bir tamponla dengelenmiş kolona uygulandıktan sonra, yıkama tamponuna kademeli olarak ya da düzgün bir gradient teşkil edecek şekilde, sodyum veya potasyum klorür gibi basit bir tuz eklenerek, iyonik kuvvet yükseltilir. Eklenen tuzun iyonları reçinedeki fonksiyonel gruplar ile proteinler arasındaki etkileşimi zayıflatarak proteinlerin kolondan sökülmesini sağlar. Protein ne kadar sıkı bir şekilde bağlanmış olursa, kolondan yıkanması için o kadar yüksek iyonik kuvvette tampon gerekir (Şekil 1.7).

**Elüsyon pH'sı değiştirilerek:** Anyon değiştiricilerde tampon pH'sı düşürülerek, katyon değiştiricilerde ise tampon pH'sı yükseltilerek, ilk başta kolona bağlanan proteinlerin yükü matriks yüküne benzetilir; elektrostatik itiş ile proteinler kolondan sökülür. Her protein için net yükün (-) den (+) ya, (+) dan (-) ye geçtiği pH değişiktir ve proteinlerin izoelektrik noktasına bağlıdır. Proteinler, izoelektrik noktanın üzerindeki pH'larda (-), altındaki pH'larda ise (+) yük kazanırlar [72] .



**Şekil 1.9.** İyon değişim kolonundan tuz konsantrasyonu ile elüsyon [70].

### 1.3.4. Elektroferez

Elektroferez terimi, bir elektrik alanın etkisi altında yüklü parçacıkların göç etmesi olarak tanımlanabilir. Amino asitler, peptidler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler gibi önemli biyolojik moleküller iyonize olan gruplar içermektedirler. Bu nedenle herhangi bir pH'da çözelti içerisinde elektrikçe yüklü katyonlar (+) veya anyonlar (-) olarak bulunurlar. Bir elektrik alan etkisi ile bu yüklü partiküller net yüklerine bağlı olarak katoda veya anoda doğru göç ederler. Elektriksel alanda göç hızları veya

mobiliteleri; alanın şiddetine, moleküllerin net yüküne, büyüklüğüne, şekillerine ve moleküllerin hareket ettikleri ortamın iyonik şiddetine, vizkozitesine ve sıcaklığına bağlıdır [70].

Proteinler, hem asidik hem de bazik yükleri bir arada içermelerinden dolayı, amfoterik bileşiklerdir. Net yükleri, buldukları ortamın pH'sına göre belirlenir. Her protein; amino ve karboksil grup içeren amino asitlerin sayısına ve türüne bağlı olarak kendi karakteristik yük özelliklerine sahiptir. Her protein için net yükün sıfır olduğu, izoelektrik nokta (pI) olarak tanımlanan bir pH değeri vardır. İsoelektrik noktanın üzerindeki bir pH değerinde protein net negatif yüke sahiptir ve anoda doğru hareket eder. İsoelektrik noktanın altında ise protein pozitif yüklüdür ve katoda doğru hareket eder.

Elektroforezde örnek, bir destek matriksi üzerinde göç eder. Bu matriks; kağıt, selüloz asetat, nişasta, agaroz veya poliakrilamid jeli olabilir. İşlem sırasında ısı açığa çıkması sebebi ile olabilecek yayılmalar ve difüzyonun engellenmesi ve ayrılmış proteinlerin immobilizasyonunun zenginleştirilmesi, bu destek materyali tarafından sağlanır. En yaygın olarak kullanılan destek matriksleri agaroz ve poliakrilamittir. Bunlar fiziksel ve kimyasal yapıları açısından birbirlerine hiç benzememesine rağmen, her ikisi de gözenekli jeller oluştururlar.

**Agaroz;** büyük gözenekli jeller oluşturması nedeniyle, genelde daha büyük molekül kütleli, nükleik asitler ve protein komplekslerinin ayrılmasında kullanılırlar.

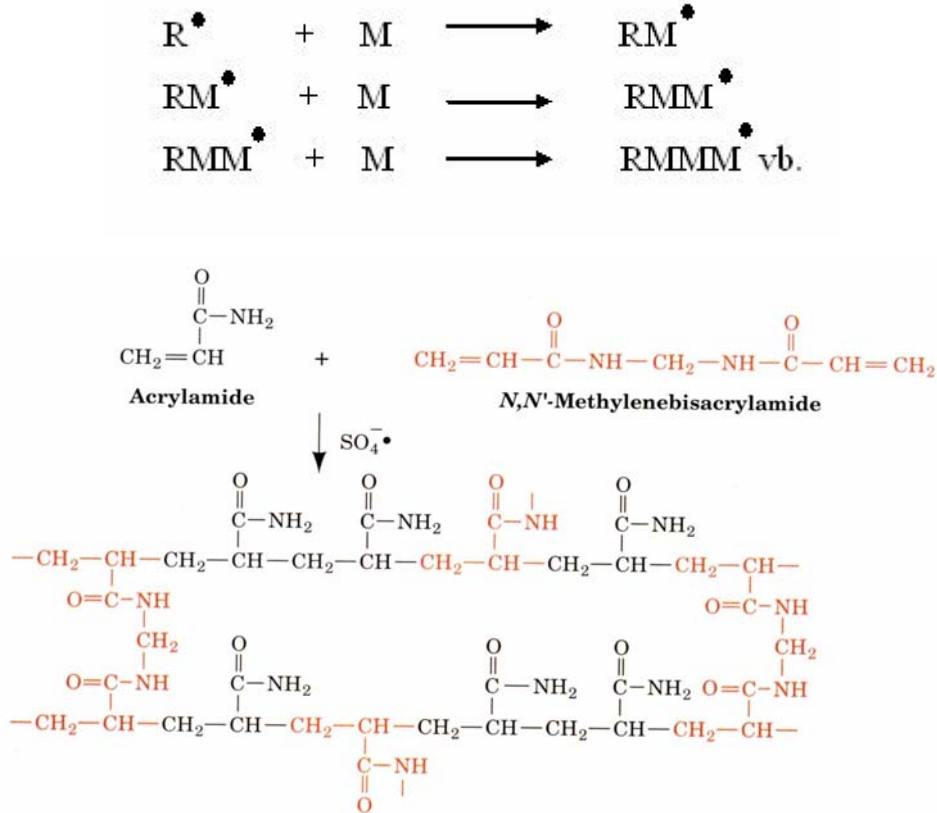
**Poliakrilamid;** küçük gözenekli jeller oluşturur, birçok proteinin ve küçük oligonükleotidlerin ayrılmasında kullanılırlar.

Protein saflaştırılmasında genel olarak Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE); protein saflığının kontrolü, fraksiyonlama, saf proteinin alt birim yapısının incelenmesi, molekül kütlesi tayini, izoelektrik nokta tayini, izoenzimlerin belirlenmesi vb. kullanım alanlarına sahiptir. PAGE'nin anyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında gerçekleştirilmesi ile proteinlerin moleküler büyüklüğüne göre karakterize edilmesi en çok kullanılan türüdür.

#### 1.3.4.1. Poliakrilamid jeller

Poliakrilamid jelleri, akrilamid monomerlerinin bir çapraz bağlayıcı ajanla polimerizasyonu sonucu meydana gelir. Poliakrilamid jeller için, en çok kullanılan çapraz bağlayıcı ajan N,N-metilen bisakrilamid'tir. Akrilamid polimerizasyonu serbest

radikal katalize bir örnektir. Reaksiyon, amonyum persülfat ve N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) ile başlatılır. TEMED, persülfat iyonunun dekompozisyonunu katalizleyerek serbest bir radikal oluşumunu sağlar. Eğer bir serbest radikal; R• olarak gösterilirse (•: çiftleşmemiş e<sup>-</sup> nu ifade eder) ve M akrilamid monomer molekül olarak alınır, bu durumda polimerizasyon aşağıdaki gibi gösterilebilir (Şekil 1.8). Çapraz bağlayıcı yüzdesi arttıkça, gözenek boyutu küçülür.



**Şekil 1.8.** Poliakrilamid jelin oluşmasındaki polimerleşme reaksiyonu [70]

Fotopolimerizasyon, akrilamid jellerinin, polimerizasyonunda kullanılacak alternatif bir metottür. Amonyum persülfat ve TEMED yerine riboflavin kullanılır ve UV-ışıkta 2-3 saat sonunda riboflavinin dekompozisyonu sonucu serbest radikal oluşumu ile polimerizasyon başlar.

Jeller, slab veya tübe döküldüklerinde, üst kısımda menusküs oluşur. Bu ihmal edilirse bantların şekillerinde bozukluk görülebilir, buna engel olmak için, ince bir tabaka su veya n-bütanol polimerizasyondan önce yüzeye bırakılmalıdır [66].

### 1.3.4.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Poliakrilamid jel elektroforezinin en yaygın olarak kullanılanıdır ve protein karışımlarının özelliklerini analizlemek açısından önemlidir. Protein saflık kontrolünün bir ölçüsüdür ve proteinin boyutuna göre bir ayırım yapması sebebiyle bağıl moleköl kütleleri tayininde de kullanılır.

Sodyum dodesil sülfat, anyonik bir deterjandır. Proteinlerin, büyük bir kısmı, gram protein başına 1.4 g SDS bağlarlar. Bu şekilde, etkin olarak polipeptid zincirlerinin net yükü maskelenir ve negatif yüklü SDS molekülleri içeren bir seri oluşur. Elektroforetik ayırma sadece etkin moleköl kütleyle bağıdır ve jeldeki moleköl elek doğrultusunda ayrılma gerçekleşir. Kullanılan poliakrilamid jel konsantrasyonu etkin ayırmayı sağılayan olgudur. SDS-PAGE'e uygulanacak örnekler; merkaptotanol, SDS, bromfenol blue ve sükroz veya gliserol içeren tamponla muamele edilirler. Merkaptotanol; proteinin tersiyer yapısını bir arada tutan disülfid bağlarını koparır. SDS ise proteini denatüre edip kuvvetli olarak bir SDS molekölü iki aminoasit artığına bağlanarak, proteinin yükünü maskeler. Bromfenol blue; iyonize olabilen bir boyadır ve elektroforezin kolay izlenebilmesi açısından ortama ilave edilir. Sükroz veya gliserol ise örnek çözeltisine bir yoğunluk kazandırması ve elektroforez hücrelerine uygulandığında, örneğin elektroforez tamponunda kolayca çökmesini sağılamak açısından kullanılır [66-68].

SDS-PAGE için en çok kullanılan sistem Laemmli [73] tarafından geliştirilmiştir. Heterojen tampon sistemi temelini dayanır, ortamda ilave olarak % 0.1 SDS mevcuttur. Laemmli sisteminin ayırma kapasitesi çok iyidir, çünkü çalışılan proteinler; yürütme jeline girmeden önce düzenleyici (stacking gel) jelde; elektroforez tamponu ve jel arasındaki pH ve iyonik şiddet vasıtasıyla dengelenir ve konsantre edilirler. Negatif yüklü protein-SDS kompleksleri uzunluk başına aynı net yüke sahip oldukları için uygulanan elektrik alanda moleköl kütlelerine göre moleköler elekleme prensibine uygun olarak anoda doğru ilerlerler. Küçük proteinler daha hızlı hareket ederken, jelin gözenek boyutuna bağılı olarak, büyük proteinler sürtünme etkisi ile daha yavaş hareket edeceklerdir. Jel yüzdesi, ilgili proteinin moleköl kütlelerine bağılı olarak seçilmelidir.

Elektroforez sonunda akım kesilir ve boyama işlemleri yapılarak jeller değerlendirilir. Bu amaçla en çok Bromphenol Blue, Food Green 3, Amido Black ve Coomassie Blue gibi organik boyalar kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda duyarlılığı

çok daha iyi olan, metal tabanlı boyalar (Gümüş boyama) tercih edilmektedir. Gümüş boyama tekniği en yüksek duyarlılığa sahip olup, en çok kullanılan boyama tekniği olan Coomassie Blue ile kıyaslandığında, 100 kat daha duyarlı olduğu görülmektedir.

SDS-jel elektroforezi, saflaştırma protokolünün her adımından sonra saflık derecesinin kontrolü amacı ile de uygulanabilir. Saf bir protein SDS-PAGE’de tek bir bant verir. Ancak proteinin alt birimlerinin farklı moleküler kütlede olması durumunda ise birden fazla bant görmek mümkündür. Ayrıca; aynı veya benzer molekül kütlelerine sahip proteinler bu yöntemle ayrılamazlar. Bu sistemde, birçok proteinin SDS ile bağlanma oranının sabit olduğu düşünülmektedir. Buna ilaveten protein olmayan bölgeler içeren proteinler (Örn; glikoproteinler, fosfoproteinler, lipoproteinler, nükleoproteinler) özelliklerine göre değişen oranlarda SDS bağlarlar ve sonuçta anormal mobilitelerle karşılaşılabilir.

Bu yöntemin en ciddi dezavantajı, elektroforez sonrasında proteinlerin enzimatik ya da biyolojik aktivitelerini yitirmeleridir. Bununla beraber en büyük avantajı ise, proteinlerin molekül kütlelerinin tayinine olanak sağlamasıdır. Bu amaçla; bilinen molekül kütlelerine sahip standart proteinler ve karakterize edilecek olan örnek aynı jel üzerine uygulanır. Standart proteinlerin moleküler kütlelerinin logaritması ve  $R_f$  değerleri arasındaki lineer ilişkiye dayalı standart eğri türetilebilir ve analizlenen proteinin molekül kütlesi hesaplanabilir [66-70].

## 2. ÇALIŞMAYLA İLGİLİ KAYNAK ÖZETLERİ

L-asparaginaz enzimine olan ilgi onun çocuk lösemi türlerindeki terapötik değerinin belirlenmesiyle büyük artış kazanmıştır. Ancak, enzim birçok canlı sistemde bulunmasına rağmen terapötik değere sahip enzim sadece birkaç gram negatif bakteride mevcuttur. L-asparaginaz enziminin moleküler yapısı [74-76], ve klinik uygulamaları [77-81] hakkında bir çok çalışma bulunmasına rağmen, bu enzimin üretimi ve saflaştırılması konusunda fazla sayıda çalışma olmayıp, bulunanlar ise birkaç bakteri ile sınırlıdır. Enzimin, çalışılan bakterilerde optimal üretimi için katabolik şartların tam olarak çalışılmamış olması ve buna bağlı olarak az miktarlardaki üretimi, enzimin fiyatının oldukça yüksek olmasına neden olmaktadır. Bu da oldukça etkin bir onkolitik ajan olan enzimin yaygın kullanımını mümkün kılmamaktadır [82].

Günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda sadece *Escherichia coli* ve *Erwinia chrysanthemi*'den elde edilen yüksek saflıktaki L-asparaginazın terapötik olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir [11, 23]. Çalışmalar terapötik olarak kullanılan enzimin oldukça stabil olduğunu ( pH 4-12 gibi ekstrem bir aralıkta aktivite göstermesi) ve optimum aktiviteye pH 8.6 ve 30-43 °C'de sahip olduğunu göstermiştir [22]. *E. coli* ve *Erwinia* asparaginazlarının homotetramer bir yapıya sahip olduğu ve *E. coli*'de her alt ünitenin yaklaşık 32 kDa, *E. chrysanthemi*'de ise yaklaşık 40 kDa olduğu belirlenmiştir [83]. *Erwinia*'den elde edilen saf enzimin spesifik aktivitesinin yaklaşık 300-400 µmol S→P/mg protein ve Km değerinin  $1.10^{-5}$  mol/L olduğu da saptanmıştır [84]. Farklı bakterilerden elde edilmiş L-asparaginazlar ve onların kimyasal karakterizasyonu konusunda çok az çalışmaya rastlanmıştır. Bu yöndeki bir çalışmada L-asparaginaz termofilik bir bakteri olan *Thermus thermophilus*'dan saflaştırılarak karakterize edilmiştir [85]. Bu enzim yaklaşık 200 kDa moleküler ağırlığa sahip bir hegzamer olup, optimum pH'sı 9.2 ve Km değerinin ise 2.8 mM olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde termostabil özelliği sayesinde bu enzimin 77 °C'de bile lineer bir kinetik aktivite sergileyebildiği saptanmıştır.

L-asparaginazın klinik uygulamaları ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Enzimin yarılanma ömrünün tespitine yönelik bir çalışmada intramuskular enjeksiyon sonrası doğal *E.coli* asparaginazı için yarı ömür 1.24 gün, intravenöz uygulama için de bu değer 2.9 saat olarak rapor edilmiştir [35].

Yetişkin kanser hastalarına intramuskular olarak 10.000 U/m<sup>2</sup> olarak uygulanan *E.coli* asparaginazının plazmada sadece 14-24. saatler arasında takip edebildiği ve bu süreçteki enzim aktivitesinin pik değerinin 1.12 U/mL olduğu belirlenmiştir. Aynı dozu intravenöz olarak uyguladıklarında ise 4 kat daha yüksek aktivite saptanmıştır [86]. Bununla beraber enzim klinik uygulamalarında yüksek oranda immünolojik reaksiyon sergilediği görülmüştür. Bu immünolojik reaksiyonları azaltma çalışmalarında, PEG ile enzimin çapraz bağlanmış formunun enzimin aktivitesini değiştirmeden immünolojik reaksiyonları ortadan kaldırdığı saptanmıştır [87]. Bu yöndeki çalışmalardan bir başkasında ise enzimin dekstrana konjuge edilmiş formunun yüksek stabiliteye sahip olmakla birlikte PEG-asparaginaz formuna göre immünolojik reaksiyonları ortadan kaldırmakta daha az etkili olduğu da rapor edilmiştir [88]. *In vitro* hayvan çalışmalarında PEG ile enzimin modifikasyonu sonucu yarılanma ömrünün yaklaşık 10-20 kat arasında arttığı belirlenmiştir [89].

Enzimin üretiminin karbon katabolit baskılama, azot ve oksijenle yüksek oranda regüle olması enzimin üretiminde bu özelliklerin araştırılmasının önemini ortaya koymuştur. Bu yöndeki çalışmalarda farklı bakterilerde ve hatta aynı bakterinin değişik suşlarında bile farklı sonuçlar elde edilmiştir [90-93]. Glukoz bu enzimin üretiminde en yaygın kullanılan karbon kaynağı olarak bildirilmesine rağmen yapılan çalışmaların bazılarında glukozun enzimin sentezini önemli ölçüde baskıladığı rapor edilmiştir. Glukoz, *Serratia marscences*, *E. coli* ve *P. vulgaris* gibi bakterilerde enzimin sentezini baskılarken, *Serratia marscences*'in kullanıldığı başka bir çalışmada ise artışa neden olduğu rapor edilmiştir [89, 90, 92, 94]. Glukozla L-asparaginaz üretiminin represyonu bakteriden bakteriye değişmektedir. Bununla beraber glukozun bu baskılama etkisinin temelinde belli konsantrasyonun üstüne çıkıldığında bu karbon kaynağının bakteri tarafından kullanılması sonucu ortam asitliğinin artması ve pH düşmesinin yattığı ileri sürülmektedir [90, 95]. Enzimin üretimi üzerine ortamın pH' sının etkisini içeren bir çalışmada ise *E. coli* L-asparaginazının düşük ve yüksek pH'larda üretiminin düştüğü ve pH 7.5'de ise en yüksek enzim üretimini gösterdiği saptanmıştır [95].

*Enterobacter cloacae*' da L-asparaginaz üretimin çalışıldığı bir araştırmada ise karbon kaynakları arasında maltoz ve galaktoz'un yüksek enzim aktivitesine neden olurken sorboz ve laktöz'un ise düşük enzim üretimine yol açtığı saptanmıştır [26]. Bu çalışmada azot kaynakları içinde, L-asparaginazın yüksek enzim üretimine neden olurken amonyum içeren bileşiklerin enzim üretimini belli ölçüde baskıladığı ortaya konmuştur.



Başka bir çalışmada ise *Enterobacter aerogenes*'de L-asparaginaz üretimi için karbon ve azot kaynağı olarak uygun ortamın % 1'lik sodyum sitrat ve % 0.16'lık amonyum hidrojen fosfat olduğu rapor edilmiştir [92]. Bu bulgulardan ortaya çıkan sonuç, bakteriler için alternatif karbon ve azot kaynaklarının araştırılması ve her bakteri için kritik oksijen konsantrasyonlarının saptanması bu enzimin ticari ölçeklerde üretimi için bir gerekliliktir.

*Vitreoscilla* hemoglobini (VHb) taşıyan rekombinant bakterilerin yaklaşık 10 kat daha fazla oksijen alımı yaptıkları gösterilmiştir [96, 97]. VHb geni (*vgb*) *E. coli* [98], *Enterobacter aerogenes* [99], *Saccharomyces* türleri [100] gibi bakterilere aktarılarak VHb'nin bu organizmaların fizyolojik ve metabolik aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. VHb ekspresyonu yapan bakterilerin genel olarak daha iyi çoğaldıkları, daha iyi metabolit ürettikleri gözlenmiştir. Ayrıca, VHb içeren bakterilerin kontrollerine göre daha yüksek bir ATP düzeyine sahip oldukları belirlenmiştir Bu da bakterilere, ortamdaki besin maddelerini daha yüksek oranda okside etme olanağı sağlamaktadır [101]. L-asparaginazın sentezi üzerine oksijenin etkisi konusunda farklı bakteri türleri için farklı sonuçlar rapor edilmiştir. VHb ekspresyonunun *Enterobacter aerogenes*'de L-asparaginaz sentezini önemli derecede inhibe ettiği görülmüştür. Özellikle farklı havalandırma/çalkalama koşullarında LB ortamında üretilen Ea[pUC8:15] suşu, Ea ve Ea[pUC8] suşlarından birkaç kattan 100 kata kadar daha düşük L-asparaginaz aktivitesi sergilediği saptanmıştır. Aynı çalışmada Ea ve Ea [pUC8] suşlarında hem oksijenli hem de oksijensiz koşullar altında benzer seviyede L-asparaginaz aktivitesi gözlenmiştir [90]. VHb'nin yukarıda bahsettiğimiz özelliklerinden dolayı, bu proteini taşıyan hücrelerin L-asparaginaz gibi oksijenle regüle olan ve karbon katabolit represyon gösteren bir enzimin üretiminde karbon ve azot kaynaklarını nasıl etkileyeceği konusu önemli bulgular ortaya koyabilir.

Bu çalışma L-asparaginaz enzimi üzerine olup temel olarak iki kısım içermektedir. Birinci kısım etkili bir oksijen alım sistemi olan *Vitreoscilla* hemoglobinin (VHb/*vgb*) bulunduğu *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* bakterilerinde L-asparaginaz üretiminin farklı karbon ve azot kaynakları ile regülasyonu, ikinci kısım ise enzimin *Enterobacter aerogenes*'den kısmi saflaştırılması, kimyasal karakterizasyonu ve *in vitro* uygulamasıdır.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar L-asparagin, L-glutamin, DEAE-sephadex, trikloroasetik asit, amonyum sülfat, hekzan, Tris-HCl, potasyum fosfat (KPi), Nessler ayırıcı kimyasalları (HgI<sub>2</sub>, KI, NaOH) analitik saflık derecesinde olup Sigma şirketinden sağlanmıştır. Diğer kimyasallar ve besiyeri hazırlamasında kullanılan kimyasallar da aynı firmadan sağlanmışlardır.

#### 3.2. Nessler Ayırıcının Hazırlanması

Nessler ayırıcı çözelti A ve çözelti B adı verilen iki çözeltinin karışımından oluşmaktadır [102].

A Çözeltisi: 35g KI + 50g HgI<sub>2</sub> alınarak toplam hacim 200 mL olacak şekilde distile su için de çözünerek hazırlandı.

B Çözeltisi: 50g NaOH alınarak toplam hacim 250 mL olacak şekilde distile su için de çözünerek hazırlandı.

Nessler ayırıcı soğutulmuş A ve B çözeltilerinden B çözeltisinin A'ya eklenmesi ile hazırlanır. Bu karışım karanlıkta muhafaza edilmiş ve en az bir hafta presipitasyon için bekletildikten sonra üstte kalan berrak kısım kullanılmıştır.

#### 3.3. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Çalışmada Gram-negatif bakteriler olan *Enterobacter aerogenes* (NRRL B-427), *Escherichia coli* (NRRL JM 103) ve *Pseudomonas aeruginosa* (NRRL B-771) ve bu bakterilerin *Vitreoscilla* hemoglobini klonlanmış rekombinant suşları kullanılmıştır. *E. aerogenes*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* Amerikan Tarım Bakanlığı Kültür Koleksiyonundan (USDA Culture Collection, Peoria, Illinois, USA) elde edilmişlerdir. *E. aerogenes* ve onun *vgb-* ve *vgb+* rekombinantları sırasıyla “Ea”, “Ea[pUC8]” ve “Ea[pUC8:15]” olarak isimlendirilmiştir. *E. Coli* ve onun *vgb-* ve *vgb+* rekombinantları ise sırasıyla “JM103” “MK57” ve “MK79” olarak adlandırılmıştır. *P. aeruginosa* “Pa” ve onun “PaJC” olarak adlandırılan *vgb+* suşu ise Illinois Institute of Technology, Chicago (USA)’dan sağlanmıştır [103].

### 3.4. Bakterilerin Üretilmesi ve Stok Kùltürler

Çalışmada kullanılan bakterilerin uzun süreli stokları % 20 gliserol (v/v) içeren sıvı Luria-Bertani (LB) besi ortamı içinde hazırlanmıştır. Bunun için konakçı bakteriler (*E. aerogenes*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*) sıvı LB, bunların rekombinantları olan Ea[pUC8], Ea[pUC8:15], MK57 ve MK79 100 µg/mL amfisisilin ve PaJC ise 500 µg/mL kloramfenikol içeren LB ortamına ekim yapılmış ve gece boyu 37 °C, çalkalamalı koşullarda (200-rpm) inkübe edilmişlerdir. Bu kùltürlerden 1 mL alınarak ependorf tüplerine transfer edilmiş ve 10,000-rpm'de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj edilerek pelletlere 800 µl LB ve 200 µl gliserol eklenerek hafifçe vortekslenmiştir. Hazırlanmış olan bu hücre süspansiyonları -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir. Bu tür bir hücre stoğunda hücrelerin 1 yıldan fazla bir süre canlılıklarını korudukları tesbit edilmiştir. Ancak, çalışmada kullanılan bakteriler bu stok kùltürlerden değil, LB ve rekombinantlar için LB + antibiyotik içeren agar plakalar üzerine ekilmiş, +4 °C'deki ve 1 ayı geçmeyen kolonilerden taze pasajlar alınarak yapılmıştır.

### 3.5. Kullanılan Besi Ortamlarının Hazırlanması

Çalışmanın enzim üretimi ile ilgili kısımlarında ise sınırlı bir besin değeri olan yarı sentetik MMY (pH 7.0) besi ortamı kullanılmış ve içeriği çizelge 3.1'de verilmiştir. Besi ortamları 125 mL hacimlik erlenlerde 20 mL besi ortamı olacak şekilde 20 dakika süresince otoklavda 120°C'de 1 atm basınçta otoklavlanmıştır. Kullanılan karbon ve azot kaynakları stok çözeltiler olarak hazırlanıp benzer şekilde otoklav edilmiştir. Karbon ve azot kaynaklarının bu stok çözeltileri belli dereceye kadar soğutulmuş (<50 °C) besi ortamına, otoklavdan sonra uygun son konsantrasyonu sağlayacak miktarlarda ilave edilmiştir.

Yine çalışmada temel besi yeri olarak zengin bir besi ortamı olan LB (pH 7.0) kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.1.** Yarı Sentetik (MMY) Besi Yerinin İçeriği (g L<sup>-1</sup>)

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01
KCl	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
Yeast ekstrat	0.5

**Çizelge 3.2.** Luria-Bertani (LB) Besi Yerinin İçeriği (g L<sup>-1</sup>)

NaCl	10
Pepton	10
Yeast ekstrat	5

### 3.6. L-Asparaginaz Sentezi İçin Bakteri Kültürleri

20 mL LB içeren 125 mL'lik erlenlere pasajlardan bir koloninin bir kısmı alınarak ekim yapılmış ve gece boyunca çalkalamalı koşullarda (200-rpm) 37 °C'de inkübe edilerek gece kültürleri hazırlanmıştır. Bu kültürlerinden yeni besi ortamlarına 1/100 inokulum transfer edilerek, enzim sentezi çalışması için 24 saat inkübasyona (200-rpm, 37 °C) bırakılmışlardır. Yarı sentetik besi ortamına da (MMY) aynı şekilde gece kültürlerinden ekim yapılmıştır. Karbon kaynakları (glukoz, fruktoz, sukroz, laktoz ve gliserol) MMY ortamına son konsantrasyon % 0.1 olacak şekilde ilave edilmişlerdir. Azot kaynakları olarak L-asparagin (Asn), L-glutamin (Gln), üre ve sodyum nitrit (nitrit) % 0.15 konsantrasyonlarda ortama eklenmiştir.

### 3.7. Kültürlerin Toplam Kütle (OD<sub>600</sub>) Değerlerinin Belirlenmesi

Hücre kültürlerinde çoğalma belirteci olarak toplam biyokütleyi gösteren ve bunu ortamın türbiditesi ile ilişkilendiren spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Bunun için kültürlerin optik dansiteleri 600 nm dalga boyunda 24 saat sonunda belirlenmiştir.

### **3.8. Periplazmik L-Asparaginaz'ın Salınımı İçin Potasyum Fosfat-Hekzan Sulu Faz Sistemi ile Membran Permeabilizasyonu**

Tarafımızdan geliştirilen bir metotla hücreler permeabilize edilerek, ortama salınan L-asparaginaz aktivitesi ölçülmüştür [104]. Kısaca özetlenirse; L-asparaginaz üretimi için kültürü yapılan hücreler, oda sıcaklığında santrifügasyon (10,000 rpm ve 10 dk.) aracılığıyla çöktürülüp, pelletler 0.05 M potasyum fosfat (KPi) tamponu (pH 8.6) ile bir kez yıkanmış ve % 1 hekzan içeren aynı tamponda,  $A_{600} = 5.0$  olacak şekilde ayarlanıp yeniden süspansiyon edilmiştir. Bu süspansiyon oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve her 5 dakikada bir çalkalanmıştır. Süre bitiminde tüpler ağzı açık bir şekilde 5 dakika evapore edilerek hekzanın ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra aşağıdaki prosedüre göre L-asparaginaz aktivitesi belirlenmiştir.

### **3.9. L-Asparaginaz Aktivitesinin Ölçümü**

L-asparaginaz aktivitesi, bu enzim tarafından L-asparagin aspartik asite ve amonyağa yıkılmasından açığa çıkan amonyağın ölçülmesi esasına dayanan ve yaygın olarak kullanılan Nessler reaksiyonu (neslerizasyon) [102] ile belirlenmiştir. Toplam 1 mL olan reaksiyon karışımı 0.9 mL 0.05 M Tris-HCl (pH 8.6) içinde taze hazırlanmış 0.01 M L-asparagin ve 0.1 mL hücre ekstraktı (veya permeabilize edilmiş hücre) içermektedir. Her bir örnek için hazırlanmış olan paralel körlere ekstrakt konulmadan önce 0.1 mL 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra örnek tüplerindeki reaksiyonu durdurmak için 0.1 mL 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) konulmuştur. Daha sonra reaksiyon karışımı 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 0.5 mL süpernatant 1.75 mL distile su içeren tüplere transfer edilmiştir. Bu karışıma 0.25 mL Nessler ayırıcı eklenerek tüpler vortekslenmiş, 10 dakika oda sıcaklığında tutulmuş ve  $A_{480}$  değerleri körlere karşı okunmuştur. Bir L-asparaginaz ünitesi (U), 37°C'de 1 dakikada 1  $\mu$ mol amonyak açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Örneklerdeki amonyak konsantrasyonu, daha önce amonyum sülfatla hazırlanmış olan standart eğri yardımı ile hesaplanmıştır. Bu metotla en düşük belirleme konsantrasyonunun 10  $\mu$ M amonyak olduğu belirlenmiştir. Total protein ise bovin serum albumininin (BSA) standart olarak kullanıldığı Lowry (1951) metoduna göre yapılmıştır [105].

### **3.10. E. aerogenes'den L-Asparaginazın Kısmi Saflaştırılması**

L-asparaginazın kısmi saflaştırılmasında amaca uygun olarak literatür bilgilerinden yararlanıp bir saflaştırma yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem temelde amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon-değişim kromatografisini içermektedir.

#### **3.10.1. Homojenat hazırlanması**

2 litre LB ortamında 24 saat boyunca inkübe edilen *Enterobacter aerogenes*, 10,000 g'de 10 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüş ve süpernatant atılmıştır. Hücre peleti 3 g/mL olacak şekilde % 0.02 merkaptoetanol içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 8.5) ile süspanse edilmiştir. Sonikasyon işleminde hücreyi tamamen parçalamadan daha çok periplazmik L-asparaginazın salınımını sağlayan bir sonikasyon süresi için ön denemeler yapılmıştır. Ön denemeler sonunda 4x15 sn'lik bir sonikasyon uygulanması sonrası hücreler 10,000 g'de 30 dk. santrifüj edilerek hücre artıkları uzaklaştırılmış ve bundan sonraki işlemlerde gerekli yedeklemeler yapılarak burada elde edilen süpernatantlar kullanılmıştır.

#### **3.10.2. Amonyum sülfat çöktürmesi**

Amonyum sülfat çöktürmesinde 25 mL homojenat kullanılmıştır. İlk adım olarak % 45 amonyum sülfat çöktürmesi için standart tablodan belirlenen 6.550 g katı amonyum sülfat, enzim çözeltisine köpürmeyi dolayısı ile denatürasyonu en aza indirmek için +4 °C'de yavaş yavaş ilave edilmiştir. Çöken proteinlerin uzaklaştırılması için 10,000 g'de 30 dakika santrifüj edildi. Pellet atıldıktan sonra ikinci adım olarak üst faza % 85 doygunlukta çöktürme uygulanmıştır. Bunun için standart tablodan belirlenen 6.670 g amonyum sülfat alınıp tekrar aynı şekilde karıştırılarak ilave edilmiştir. Bu aşama sonrasında çöktürülen enzim 10,000 g'de 30 dakika santrifüjlenerek ayrılmış ve pellet 15 mL % 0.02 merkaptoetanol içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 8.5) ile süspanse edilmiştir.

### 3.10.3. Diyaliz

Amonyum sülfat ilavesi ile çöktürme sonrası tuzların uzaklaştırılması amacıyla diyaliz işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla kullanılan diyaliz torbası (Sigma-D9527, Por büyüklüğü:12,000 Da) aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

- 1 dk. 80 °C' de % 0.3' lük Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> içinde bekletildi,
- 2 dk. % 0.2' lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içinde bekletildi,
- Asidin uzaklaştırılması için 60 °C' deki saf su ile yıkandı.

Bu şekilde hazırlanmış olan diyaliz torbası daha sonra diyaliz işlemlerinde kullanılmak için saf suda saklanmıştır. Hazırlanan diyaliz torbasına konan enzim çözeltisi, % 0.02 merkaptolanol içeren 50 mM fosfat tamponuna (pH 8.5) karşı 24 saat süreyle diyalize tabi tutularak enzimin rejenerasyonu sağlanmıştır [66]. Diyaliz esnasında tampon çözelti iki kez değiştirilmiş ve bunun sonucunda diyaliz sonrası enzim çözeltisine amonyum testi yapılarak tuz iyonlarının uzaklaştırıldığı saptanmıştır.

### 3.10.4. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisinin uygulanışı

Kolon olarak XK 20x2.6 cm (Biochem) kolonu ve kolon dolgu maddesi olarak ise DEAE-Sephadex (Sigma A50120, Tanecik büyüklüğü: 40-125 µm, Por büyüklüğü: 200 kDa) kullanılmıştır [72]. Kolonun hazırlanması ve örneğin uygulanmasında aşağıdaki işlem basamakları izlenmiştir:

- 66 mL olan kolon hacmi için 4 gr DEAE-Sephadex tartılmış,
- Aktif gruplarının ortaya çıkarılması için 1 gr kolon dolgu maddesine karşılık 15-20 mL 0.1 N HCl alınarak 30 dk. karıştırılmıştır.
- Aynı işlemler bir kez de 0.1 N'lik NaOH ile tekrarlanmıştır.
- Matriks, şişmesi için 1 gün boyunca 50 mM'lık fosfat tamponunda (pH 8.5) bırakılmıştır.
- Daha sonra kolona doldurulup sürekli tampon çözelti geçirilerek kolonun dengelenmesi ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde paketlenmesi sağlanmıştır. Bu esnada 280 nm'de protein taraması yapıp absorbans minimum dereceye gelene kadar tamponla yıkamaya devam edilmiştir.
- Kolon akış hızı 0.5 mL/dk. olarak ayarlandıktan sonra 10 mL enzim çözeltisi kolona uygulanmış ve kolon hacmi kadar aynı tampon çözeltiden uygulanmıştır.

- Elüsyon işlemi ise 50 mM ile 0.5 M arasındaki fosfat tamponu (pH 8.5) ile gerçekleştirilmiştir. Elüsyonlar 1.5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanıp 280 nm'de absorbans taraması ve ayrıca enzim aktivitesi tayin işlemleri gerçekleştirilmiştir.
- Enzim aktivitesi görülen fraksiyonlar birleştirilerek enzim havuzu oluşturulmuş ve bundan sonraki tüm işlemler bu havuzdaki enzim kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.11. Saflaştırılan Enzimin Karakterizasyonu

#### 3.11.1. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Enzimin saflığı ve molekül ağırlığının belirlenmesi SDS-PAGE, Laemmli [73] yöntemine göre gerçekleştirilmiştir.

##### *Ayrırma Jeli (pH 8.8), 7.5 mL*

<b>Jelin % 'si</b>	<b>% 12.5</b>
Akrilamid:bisakrilamid (% w/v 30: 0.8)	3.1 mL
1.0M Tris-base pH 8.8	3 mL
20% SDS	50 µl
<u>Distile H<sub>2</sub>O</u>	<u>1.28 mL</u>

Yukarıdaki oranlar yaklaşık 7.5 mL toplam hacimli mini jele göre verilmiştir. Jelin polimerizasyonu için, bu karışıma % 10'luk taze hazırlanmış amonyum persülfat (APS)'tan 50 µl ve TEMED'den 10 µl eklendikten sonra jel dökümü yapılmıştır. Jelin üzerindeki hava kabarcıklarını yok etmek ve daha düzgün yüzey elde etmek için jelin üst kısmına distile su ilave edilmiş ve 15 dakika bekledikten sonra distile su jel ters çevrilerek uzaklaştırılmıştır. Jel kalıbının en üst kısmına aşağıdaki oranlarda hazırlanmış sıkıştırma jeli dökülmüştür.

##### *Sıkıştırma jeli (pH 6.8), 5 mL*

% 12.5'luk olarak hazırlanan ayırma jeli için % 6'lık sıkıştırma jelinin hazırlanışı:

<b>Sıkıştırma jelinin % 'si</b>	<b>% 6</b>
Akrilamid:bisakrilamid (% w/v 30: 0.8)	1 mL
1.0 M Tris-base pH 8.8	630 µl
% 20 SDS	25 µl
<u>Distile H<sub>2</sub>O</u>	<u>3.29 mL</u>



Jelin polimerizasyonu için, bu karışıma % 10'luk taze hazırlanmış amonyum persulfat (APS)'tan 40 µl ve TEMED'den 10 µl eklenip, sıkıştırma jeli tarakla kapatılmış mini tanka uygulanmıştır.

### **Örneklerinin hazırlanması ve yürütülmesi**

Örnekler 1X Laemmli boyası olarak isimlendiren yükleme tamponunda hazırlanmış ve 15-20 µg/mL protein içeren örneklere iki kat (v/v) 1X Laemmli boyası eklenip 3 dk. kaynatıldıktan sonra her jel kuyucuğuna 50 mL hazırlanmış bu örneklerden uygulanmıştır. Jeller 150 volt, 30 mA'de 3 saat kadar elektroforetik yürümeye tabi tutulmuştur. Jel boyaması, Coomassie brilliant blue içeren bir çözeltide (1.8 g Blue-R250: 450 mL metanol: 90 mL glasiyel asetik asit 1 litreye distile suyla tamamlanır) 20 dakika kadar bekletilerek yapılmış ve fazla boyanın jelden uzaklaştırılması için jeller 20 dakika-1 saat jel yıkama çözeltisinde (400 mL metanol: 100 mL glasiyel asetik asit 1 litreye distile suyla tamamlanır) bekletilmiştir. Gerek duyulması halinde jellerin daha açılması için bu yıkama işlemi yıkama çözeltisi değiştirilerek birkaç kez tekrarlanmıştır.

### ***Örnek yükleme tamponu (Laemmli yükleme boyası), 3X stok***

2.4 mL 1M Tris-base pH 6.8

3 mL 20% SDS

3 mL Gliserol (% 100)

1.6 mL beta-merkaptoetanol

0.006 g Bromophenol blue

4°C'de muhafaza edildi.

### ***Jel yürütme tamponu (Laemmli tamponu), 10X stok***

30.3 g Tris-base

Glisin 144 g

SDS 10 g

Distile H<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlandı.

### **3.11.2. Enzimin optimum pH'sının belirlenmesi**

Kısmi saflaştırılmış L-asparaginaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerini saptamak amacıyla pH 5.0-7.5 aralığında 50 mM fosfat tamponu, pH 8-9.5 aralığında ise 50 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. Her bir pH'daki tampon çözeltisiyle 10 mM L-asparagin çözeltisi hazırlandı ve bunlar kullanılarak enzim aktivitesi ölçümleri gerçekleştirildi. İşlemler sonucunda enzim aktivitesinin maksimum olduğu pH değeri saptandı.

### **3.11.3. Enzimin maksimum ve optimum sıcaklığının belirlenmesi**

L-asparaginazın maksimum ve optimum aktivite ile çalışacağı sıcaklıkların belirlenmesi için enzim aktivitesi ayrı ayrı olarak 10, 20, 30, 37, 40, 50, 60 ve 70 °C'de ölçülmüştür. Enzim aktivitesinin belirlenmesinde 50 mM ve pH 8.5 fosfat tamponu kullanıldı. Enzim aktivitesinde kullanılacak L-asparagin çözeltisi fosfat tamponunda 10 mM olacak şekilde hazırlandı.

Enzimin maksimum aktivite sıcaklığının belirlenmesi esnasında, saflaştırılmış enzim ve substrat çözeltisi reaksiyon başlamadan önce enzimin aktivitesinin belirleneceği sıcaklıkta 10 dk. bekletilerek enzim aktivitesinin ölçüleceği sıcaklığa gelmeleri sağlandı. Daha sonra reaksiyon başlatılarak enzim aktivitesi o sıcaklıkta belirlendi.

Enzimin optimum aktivite sıcaklığının belirlenmesinde ise enzim ve substrat çözeltisi reaksiyon başlatılmadan önce enzim aktivitesinin belirleneceği sıcaklıkta 30 dk. bekletildikten sonra enzim aktivitesinin belirlenmesi için reaksiyon başlatıldı. Buradaki amaç enzimin yapısında aktivite ölçümü esnasında bir bozunma olmadan en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık olan optimum sıcaklığı bulmaktır.

### **3.11.4. Enzimin depo kararlılığı**

Depo kararlılığı, -20 °C ve +4 °C'de bekletilen enzimin belli zaman aralıkları ile enzim aktivitesinin ölçülmesi ile belirlendi. -20 °C'de enzim donacağı ve farklı sürelerde enzim aktivitesine bakılacağı için her bir enzim aktivitesi için bir kez dondurulmuş ve çözülmüş enzim örneği kullanılarak yapılmasına dikkat edildi. 50 mM fosfat tamponunda (pH 8.5) hazırlanmış 10 mM L-asparagin çözeltisi enzim aktivitesinde kullanıldı. Belirli zaman aralıklarında -20 ve +4 °C' de bekletilen enzim örneği

kullanılarak aktivite ölçümü yapıldı ve bu zaman aralıklarında enzim aktivitesinin başlangıçtaki aktiviteye göre ne kadar değiştiği saptandı.

### 3.11.5. Enzimin Vmax ve Km değerlerinin belirlenmesi

Saflaştırılan enzimin maksimum hızını (Vmax) ve hız sabiti (Km)'yi belirlemek için literatürde bu enzim için bildirilmiş olan Km değerlerine dayanılarak çalışılacak substrat konsantrasyon aralıkları belirlenmiştir. Genel olarak bu amaç için 0.1-10 mM L-asparagin kullanıldı. Değişen substrat konsantrasyonlarına karşı enzimin verdiği tepki (aktivite) önce Michealis-Menten kinetik bağıntısı ile ilişkilendirilmiş ve daha sonra substrat konsantrasyonuna paralel olarak enzim aktivitesinin lineer değişim profili için kullanılan Linewear-Burk eğrisi yardımı ile enzimin Km ve Vmax değerleri daha kesin olarak belirlenmiştir.

### 3.12. L- Asparaginazın Kandaki Kararlılığı

Kısmi saflaştırılması yapılan enzimin canlı hayvanlar üzerindeki etkisinin saptanmasının kabul edilebilir bir uygulama olmaması sebebiyle, enzimin dolaşımdaki proteazlara ve diğer faktörlere karşı dirençliliği için sıçanlardan kan alınarak enzimin böyle bir sistemdeki kararlılığı araştırılmıştır. *İn vivo* sistemi simüle eden böyle bir düzenek enzimin terapötik yönü hakkında tam bir bilgi sağlamasa da, onun farmakokinetiği ve kararlılığı için önemlidir. Aşağıdaki şekilde gerçekleştirilen bu işlemde enzimin aktivitesindeki değişim 24 saat boyunca takip edilmiştir.

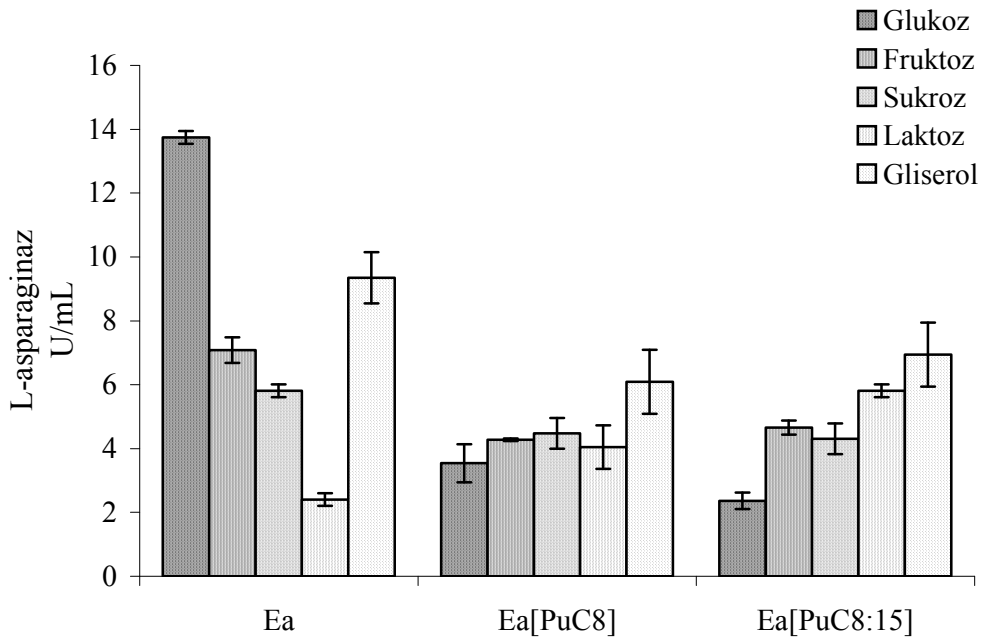
- Wistar Albino türü rattan heparinli tüplere kan örneği alındı,
- 8 adet ependorf tüpüne 600 µl kan ve 150 µl enzim eklenip karıştırıldı,
- Karışım çalkalamalı etüvde 37 °C' de belirlenen sürelerde bekletildi,
- Süreler 0, 10, 30 dk. ve 1, 2, 4, 8, 24. saat olarak gerçekleştirildi,
- Süre bitiminde ependorf tüpleri 15,000 g' de 10 dk. santrifüj edildi.
- Daha sonra süpernatant'tan 100 µl alınarak enzim aktivitesi tayini yapıldı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. L-Asparaginaz Üretiminde Karbon Kaynaklarının Etkisi

#### 4.1.1. *E. aerogenes* ve onun V<sub>Hb</sub><sup>-</sup> ve V<sub>Hb</sub><sup>+</sup> rekombinantlarında karbon kaynaklarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi

Yarı-sentetik (MMY) besi ortamında üretilen *E. aerogenes* ve onun V<sub>Hb</sub><sup>-</sup> ve V<sub>Hb</sub><sup>+</sup> suşlarında L-asparaginaz sentezi üzerine glukoz, fruktoz, sukroz, laktoz ve gliserol'un etkisi şekil 4.1'de özetlenmiştir.



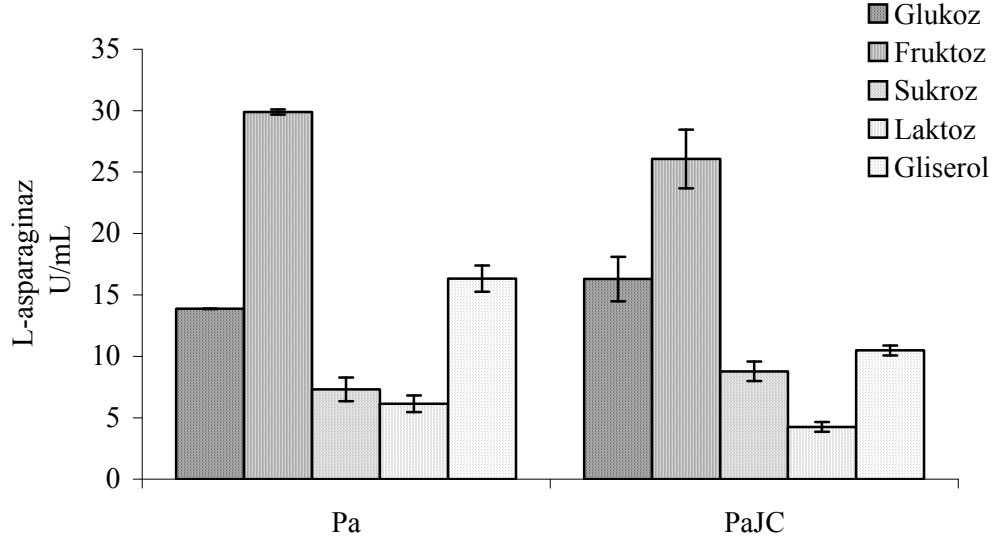
**Şekil 4.1.** *E. aerogenes*, Ea[pUC8] ve Ea[pUC8:15]'in farklı karbon kaynaklarının bulunduğu MMY ortamında L-asparaginaz enzim aktiviteleri. Her veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ( $\sigma_{n-1}$ ) ifade etmektedir

Bu sonuçlara göre laktoz dışındaki tüm karbon kaynakları *v<sub>gb</sub>*<sup>-</sup> ve *v<sub>gb</sub>*<sup>+</sup> rekombinantlarında yabancı tipe (konakçı hücre) göre daha düşük enzim aktivitesi sergilemiştir. Özellikle glukoz yabancı tipe 13.74±0.21 U/mL enzim aktivitesine neden olurken *v<sub>gb</sub>*<sup>-</sup> rekombinantında 3.54±0.60 U/mL olup 3.8 kat ve *v<sub>gb</sub>*<sup>+</sup> rekombinantında 2.36±0.26 U/mL olup 5.8 kat düşük enzim üretimine neden olmuştur. Buna ilaveten

yabanıl tip *E.aerogenes*'de glukoz ve gliserol sırasıyla 13.74±0.21 ve 9.35±0.80 U/mL enzim aktivitesi ortaya çıkarmış ve bu değerler üç suş içindeki en yüksek enzim değerleri olmuştur. Buna karşın *E. aerogenes*'in *vgb-* ve *vgb+* rekombinantlarında glukozun enzim üretimini baskılama yönünde bariz bir etkisi vardır. Bu etki gliserolde görülmemiş olup hatta rekombinant suşlar içinde en yüksek enzim üretimi değerleri olan *vgb-* ve *vgb+* rekombinantlarında sırasıyla 6.09±0.1.01, 6.94±1.00 U/mL'ye ulaşılmıştır. Diğer karbon kaynaklarından farklı olarak yabanıl tipte düşük enzim aktivitesine neden olan laktoz, rekombinant suşlarda yüksek enzim üretimine yol açmıştır. Bu değerler *E. aerogenes*'da ve onun *vgb-* ve *vgb+* rekombinantlarında sırasıyla 2.41±0.20, 4.05±0.68 ve 5.81±0.21 U/mL'dir. Diğer karbon kaynaklarımız olan fruktoz ve sukrozda ise rekombinant suşlar birbirine yakın olmakla birlikte *E. aerogenes*'dan yaklaşık 1.5 kat daha düşük enzim üretimi oluşturmuşlardır. Laktozu ayrı değerlendirip diğer karbon kaynaklarının oluşturduğu aktivitelere baktığımızda rekombinat suşların *E. aerogenes*'de negatif bir baskılama oluşturduğu ve VHb geninin ise bu baskılama etkisine katkıda bulunduğunu söyleyebiliriz.

#### **4.1.2. *P.aeruginosa* ve onun VHb içeren suşunda karbon kaynaklarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi**

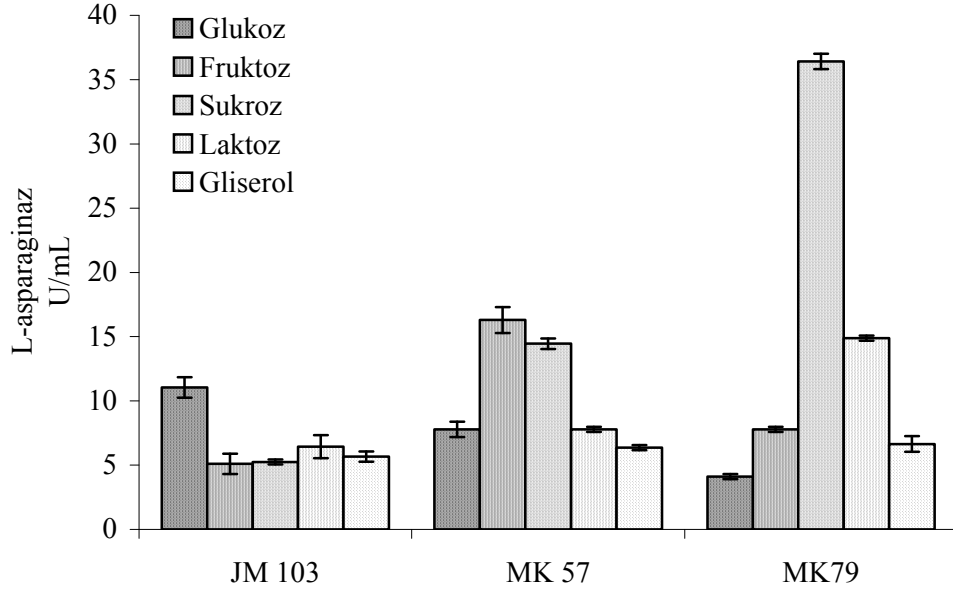
Yarı-sentetik (MMY) besi ortamında üretilen *P. aeruginosa* ve onun *vgb* geni içeren rekombinant suşunda (PaJC) L-asparaginaz sentezi üzerine glukoz, fruktoz, sukroz, laktoz ve gliserol'un etkisi şekil 4.2'de verilmiştir. Hem *P. aeruginosa* ve hem de PaJC'de enzim üretimi için en iyi karbon kaynağı fruktoz olup sırasıyla 29.89±0.21 ve 26.07±2.40 U/mL olduğu belirlenmiştir. Bu karbon kaynağına en yakın aktivite gösteren diğer kaynaklar ise *P. aeruginosa*'da gliserol, PaJC'de ise glukoz olmuştur. Ancak, fruktoz her iki bakteride de bu karbohidratlara (gliserol ve glukoz) göre yaklaşık 2 kat daha fazla L-asparaginaz aktivitesi ortaya çıkmasını sağlamıştır. Buna karşın *P. aeruginosa* ve PaJC'da fruktoza göre sukroz sırasıyla 4.1 ve 3, laktoz ise 4.9 ve 6.1 kat daha düşük enzim üretimine neden olmuştur. Karbon kaynakları *P. aeruginosa* ve PaJC'de kendi aralarında farklı aktiviteler sergilemelerine karşın her bir karbon kaynağı iki suş arasında kendi içinde L-asparaginaz aktivitesi bakımından önemli bir değişim göstermemiştir. Bu ise bize VHb'nin *P. aeruginosa*'de L-aspariganaz aktivitesinde olumlu ya da olumsuz önemli bir katkıya yol açmadığını göstermiştir.



**Şekil 4.2.** *P. aeruginosa* (Pa) ve *vgb+* rekombinantı (PaJC)'ın farklı karbon kaynaklarının bulunduğu MMY ortamında L-asparaginaz enzim aktiviteleri. Her veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ( $\sigma-1$ ) ifade etmektedir.

#### 4.1.3. *E.coli* ve onun Vhb- ve Vhb+ rekombinantlarında karbon kaynaklarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi

*E. Coli* (JM103) ve onun *vgb-* (MK57) ve *vgb+* (MK79) rekombinantlarında L-asparaginaz üretimine glukoz, fruktoz, sukroz, laktoz ve gliserol'un etkisi şekil 4.3'de verilmiştir. Yabancıl tip JM103'de glukoz,  $11.05 \pm 0.80$  U/mL enzim üretimine neden olarak diğer karbon kaynaklarından yaklaşık 2 kat yüksek enzim salınımı oluşturmuştur. Bununla beraber glukoz, *E. Coli*'nin (JM103) *vgb-* (MK57) ve *vgb+* (MK79) rekombinantlarında sırasıyla  $7.79 \pm 0.60$  ve  $4.11 \pm 0.20$  U/mL enzim üretimi oluşturarak bir baskılama sergilemiştir. Diğer karbon kaynaklarından sukroz ve laktoz ise *E. Coli*'ye göre *vgb-* (MK57) rekombinantında yaklaşık olarak sırasıyla 3 ve 1.5 kat, *vgb+* (MK79) rekombinantlarında ise yaklaşık olarak sırasıyla 7 ve 2.5 kat yüksek enzim üretimine neden olmuştur. Bu sonuçlar *E. Coli*'de Vhb geni açısından önemli bir pozitif regülasyon ortaya koymaktadır. Gliserolde ise *E. Coli* ve rekombinantlarında enzim aktivitesi açısından önemli değişimler gözlenmemiştir. Tüm bu sonuçlar bize Vhb'nin *E.coli*'de L-asparaginaz üretiminde glukoz dışında diğer karbon kaynaklarında görülen bir pozitif regülasyon ortaya koymuştur.

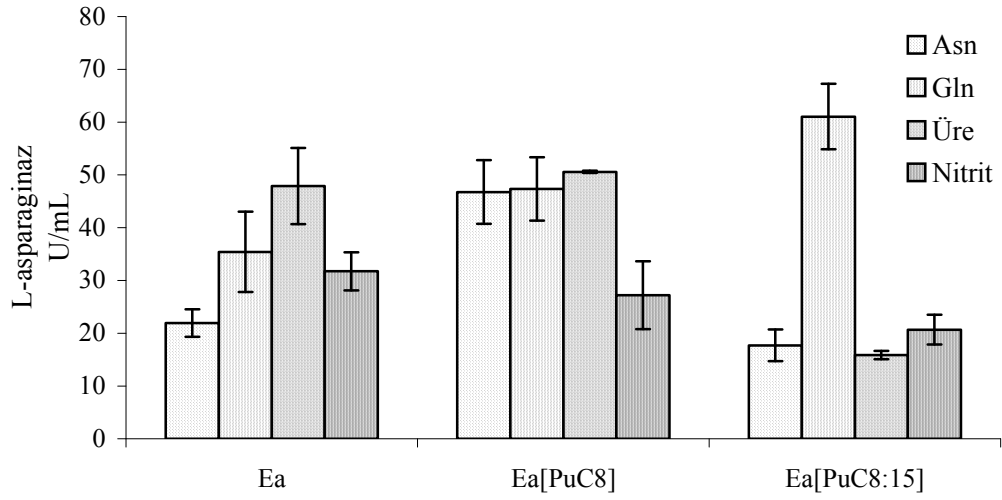


**Şekil 4.3.** E.coli (JM103), MK57 ve MK79'nin farklı karbon kaynaklarının bulunduğu MMY ortamında L-asparaginaz enzim aktiviteleri. Her veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ( $\sigma_{n-1}$ ) ifade etmektedir.

## 4.2. L-Asparaginaz Üretimine Azot Kaynaklarının Etkisi

### 4.2.1. *E. aerogenes* ve onun Vhb- ve Vhb+ rekombinantlarında azot kaynaklarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi

Yarı-sentetik (MMY) besi ortamında üretilen *E. aerogenes* ve onun *vgb+* ve *vgb-* suşlarında L-asparaginaz sentezi üzerine asparagin, glutamin, üre ve soydum nitrit'in etkisi şekil 4.4'de görülmektedir. *E. aerogenes*'de glutamin ve nitrit benzer enzim aktivite profili verirken, en yüksek enzim aktivitesinin üre ile olduğu saptanmıştır. Bu azot kaynağı (üre), asparagine göre yaklaşık 2.2 kat daha yüksek enzim aktivitesi ortaya koymuştur. Ea[pUC8]'de ise asparagin, glutamin ve üre birbirine yakın aktivite gösterirken nitrit en iyi azot kaynağı olarak belirlenmiş ve diğer azot kaynaklarından yaklaşık 2 kat yüksek enzim aktivitesi göstermiştir. Vhb ekspresyonu yapan Ea[pUC8:15] suşunda ise glutamin diğer üç azot kaynağından yaklaşık 3-4 kat yüksek olan  $61.05 \pm 6.21$  U/mL enzim aktivitesine neden olmuştur. Ayrıca *vgb* geni sadece glutamin'de pozitif bir etki göstererek yabancı suşa göre 2 kat yüksek enzim aktivitesi oluştururken üre ve nitrit ise negatif bir etki ortaya koymuştur.

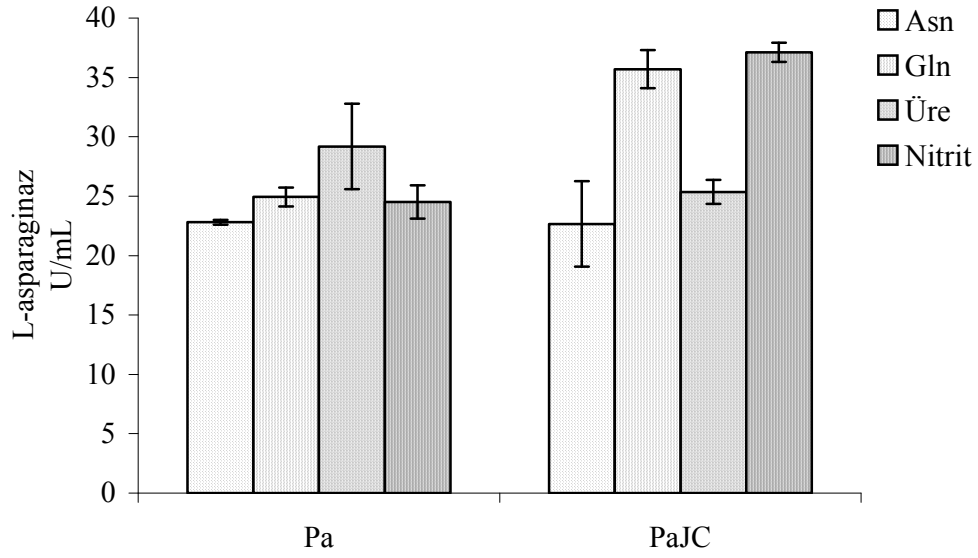


**Şekil 4.4.** *E. aerogenes*, Ea[pUC8] ve Ea[pUC8:15]'ın farklı azot kaynaklarının bulunduğu MMY ortamında L-asparaginaz enzim aktiviteleri. Her veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ( $\sigma_{n-1}$ ) ifade etmektedir

#### 4.2.2. *P.aeruginosa* ve onun VHb geni içeren suşunda azot kaynaklarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi

Yarı-sentetik (MMY) besi ortamında üretilen *P.aeruginosa* ve onun VHb geni içeren suşlarında L-asparaginaz sentezi üzerine asparagin, glutamin, üre ve soydum nitrit'in etkisi şekil 4.5'de verilmiştir. *P. aeruginosa* için kullanılan azot kaynakları arasında enzim aktivitesinde önemli bir fark (yaklaşık 22-29 U/mL arasında değişen) gözlenmemiştir. Ancak, *P. aeruginosa*'nın *vgb+* rekombinant suşunda farklı azot kaynakları oldukça farklı enzim aktivitelerinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Özellikle glutamin ve nitritte sırasıyla  $35.70 \pm 1.61$  ve  $37.11 \pm 12$  U/mL olan enzim aktivitesine ulaşarak diğer azot kaynakları olan asparagin ve üreye göre yaklaşık 1.5 kat enzim üretimini arttırmıştır. Asparagin ve üre, *P. aeruginosa* ve *vgb+* rekombinant suşu arasında enzim aktivitesinde önemli bir fark ortaya çıkarmazken, glutamin ve nitrit, *vgb+* rekombinantında pozitif bir etki göstermiştir.

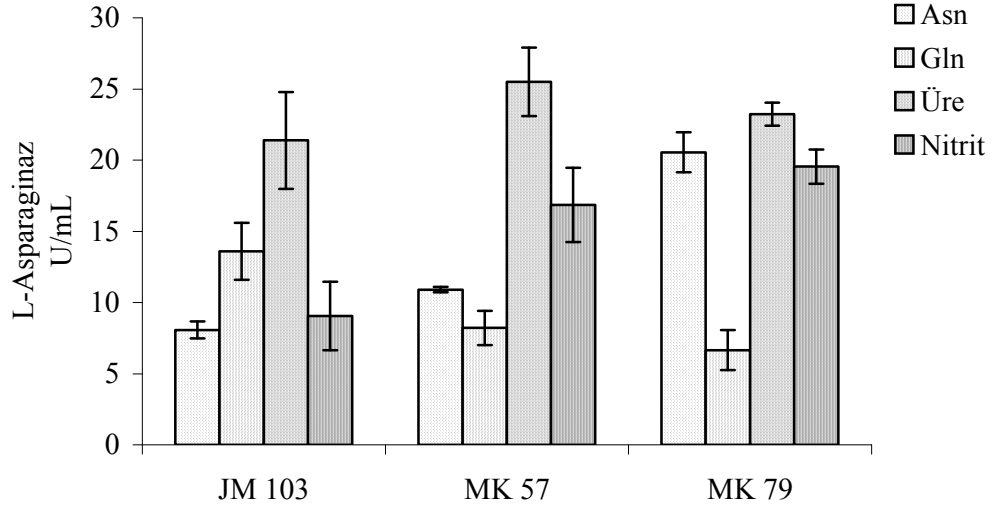




**Şekil 4.5.** *P. aeruginosa* (Pa) ve *vgb+* rekombinantı (PaJC)'ın farklı azot kaynaklarının bulunduğu MMY ortamında L-asparaginaz enzim aktiviteleri. Her veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ( $\sigma-1$ ) ifade etmektedir.

#### 4.2.3. *E.coli* ve onun VHB- ve VHB+ rekombinantlarında azot kaynaklarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi

*E. coli* (JM103) ve onun *vgb-* (MK57) ve *vgb+* (MK79) rekombinantlarında L-asparaginaz üretimine asparagin, glutamin, üre ve sodyum nitritin etkisi şekil 4.6'de verilmiştir. Yabancıl tip olan JM103'de en yüksek enzim aktivitesi  $21.39 \pm 3.41$  U/mL olarak üre ile kaydedilmiştir. Bu azot kaynağı asparagin ve nitritten 2 kat daha yüksek enzim aktivitesinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. MK57'de ise en yüksek L-asparaginaz aktivitesi  $25.50 \pm 2.40$  U/mL ile yine ürede gözlenmiş ve bu aktivite asparagin ve glutaminden 2.5 kat, nitritten ise 1.5 kat daha yüksek olarak kaydedilmiştir. MK79'da ise asparagin, üre ve nitrit birbirlerine yakın enzim aktivitelerinin (yaklaşık 19-23 U/mL arasında değişen) ortaya çıkmasını sağlarken, glutamin bu azot kaynaklarından yaklaşık 3 kat düşük  $6.65 \pm 1.40$  U/mL olan enzim aktivitesi ortaya çıkarmıştır. *E.coli* ile karşılaştırıldıklarında *vgb+* rekombinantında asparagin ve nitritin enzim sentezi üzerinde pozitif bir regülasyon sağladığı gözlemlenmiştir. Üre için ise böyle bir durumun olmadığı belirlenmiştir.



**Şekil 4.6.** JM103, MK57 ve MK79'in farklı azot kaynaklarının bulunduğu MMY ortamında L-asparaginaz enzim aktiviteleri. Her veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ( $\sigma_{n-1}$ ) ifade etmektedir.

#### 4.3. *E. aerogenes*'den L-Asparaginaz'ın Saflaştırılma ve Karakterizasyon Sonuçları

##### 4.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

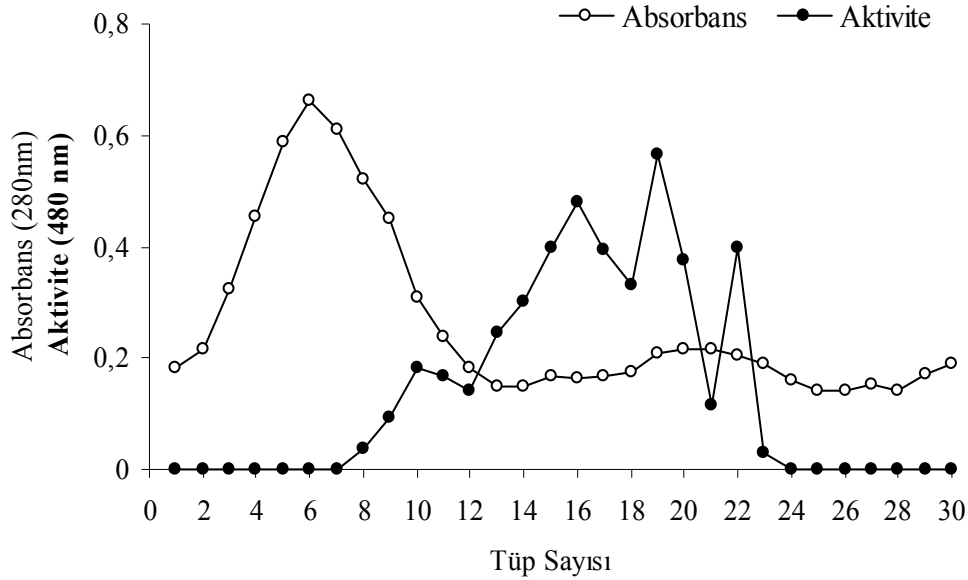
*E. aerogenes*'den L-asparaginazın saflaştırılmasında sonikasyon işleminden sonra homojenat hazırlanmış ve ilk saflaştırma basamağı için homojenata amonyum sülfat (% 45-85) çöktürmesi uygulanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında diyaliz işlemi gerçekleştirilmiş, enzim aktivite tayini ve protein ölçüm sonuçları çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu basamak sonrasında % 92.6 verimlilik (enzim eldesi) ve 2.16 kat saflaştırılma olduğu saptanmıştır.

**Çizelge 4.1.** *E. aerogenes*'den L-asparaginazın saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi

Saflaştırma Basamakları	Protein (mg/mL)	Toplam aktivite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg prot.)	Saflaştırma Katsayısı	% Verim
Homojenat	63.3	1076.7	16.9	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% 45-85)	27.2	997.4	36.6	2.16	92.6

### 4.3.2. İyon-değişim kromatografisi

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonucu elde edilen enzim örneğine DEAE-Sephadex anyon değiştiricinin kullanıldığı iyon değişim kromatografisi uygulanmıştır. Elüsyonlardaki protein miktarı 1 absorbans değeri yaklaşık 1 mg/mL protein kabul edilerek 280 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Enzim aktivitesi 480 nm’de yukarıda materyal ve metod kısmında belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Elüsyonların 280 ve 480 nm’deki absorbans değerleri şekil. 4.7’de gosterilmiştir.



**Şekil 4.7.** *E. aerogenes*’den L-asparaginaz saflaştırılmasında iyon-değişim kromatografisi sonrası fraksiyonlara ait aktivite-absorbans grafiği.

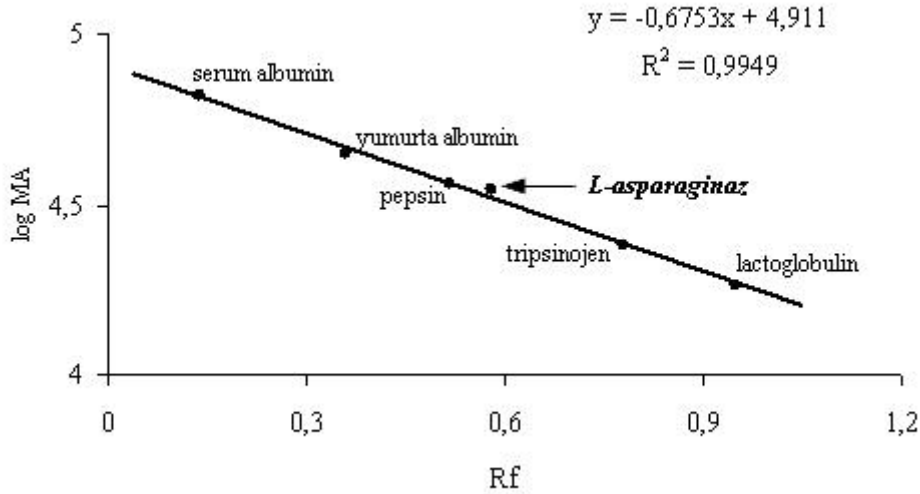
Enzim aktivitesinin yuksek kaydedildiği tüpler ( 10-22 ) enzim havuzu oluşturulmak için birleştirilmiş ve yapılan olmler sonrasında iyon-değişim kromatografisi sonrası L-asparaginaz enziminin başlangıca gore yaklaşık 15 kat saflaştırıldığı belirlenmiştir (izelge 4.2). Bu basamakta enzimin elde edilme verimi % 65.8 olarak kaydedilmiştir.

**Çizelge 4.2.** L-asparaginazın iyon-değişim kromatografisi sonrası birleştirilmiş fraksiyonlara ait saflaştırma sonuçları.

Saflaştırma Basamağı	Protein (mg/mL)	Toplam aktivite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg prot.)	Saflaştırma Katsayısı	% Verim
Kolon Kromatografisi (DEAE-Sephadex)	2.85	708.3	248.9	14.73	65.8

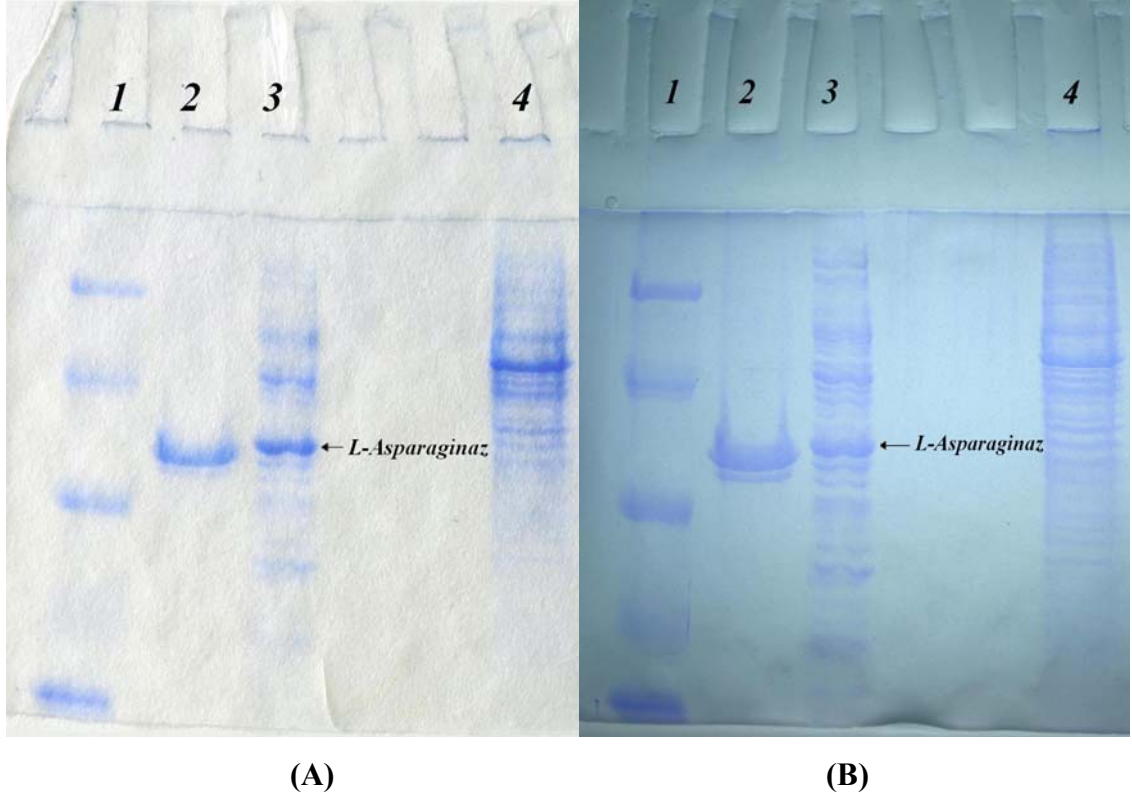
### 4.3.3. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi

Saflaştırma işlemleri sonrası enzimin saflığının kontrolü ve moleküler kütesinin belirlenmesi için kesikli SDS-PAGE uygulanmıştır (Şekil 4.9). SDS-PAGE sonucu standartların R<sub>f</sub> değerleri molekül büyüklükleri bilinen proteinlere karşı grafiklendirilmiştir (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** SDS-PAGE sonucu elde edilen standart grafik.

Standart grafikten yola çıkılarak *E. aerogenes*'den saflaştırılan L-asparaginazın alt birimlerinin moleküler kütesi bağıl olarak ~36,500 Da saptanmıştır. Literatür bilgilerine dayanarak homotetramer olan L-asparaginazın ~146,000 Da molekül kütesine sahip olduğunu ortaya çıkmaktadır.



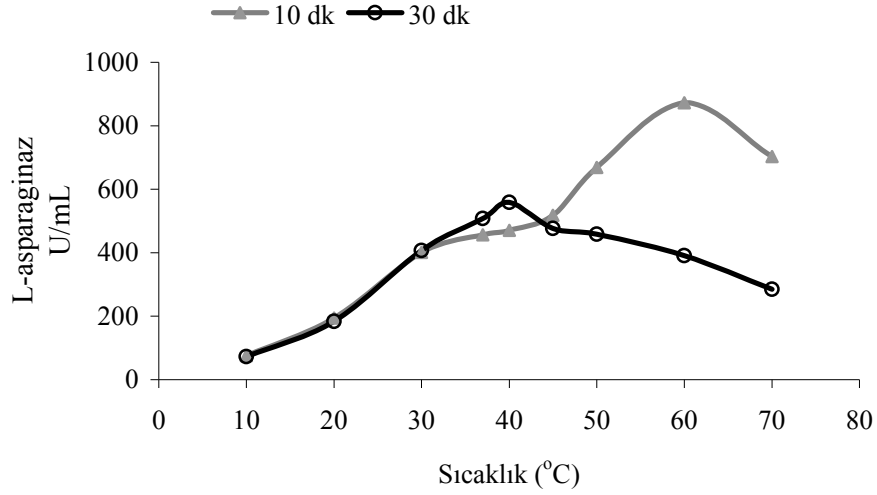
**Şekil 4.9.** SDS-PAGE fotoğrafı. (A) Kurutulmuş jel, (B) Elektroforez sonrası jel. (1- Standartlar, 2-Sigma L-asparaginaz (E.coli), 3-DEAE-Sephadex, 4-Amonyum sülfat çöktürmesi).

#### 4.3.4. Optimum ve maksimum sıcaklığın belirlenmesi

*E. aerogenes*'den izole edilen ve kısmi saflaştırılan L-asparaginaz enziminin belirli sıcaklıklarda ölçülen aktivite değerleri çizelge 4.3'de ve şekil 4.10'de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** *E. aerogenes*'den saflaştırılan L-asparaginazın optimum ve maksimum sıcaklık değerleri.

T (°C)	A <sub>480</sub>		Enzim hacmi (µl)	Aktivite (U/mL)		% Aktivite	
	30 dk.	10 dk.		30 dk.	10 dk.	30 dk.	10 dk.
10	0,128	0.134	50	72.53	75.93	12.99	8.70
20	0.325	0.343	50	184.16	194.37	32.99	22.27
30	0.719	0.708	50	407.43	401.20	72.99	45.97
37	0.897	0.805	50	508.30	456.17	91.07	52.27
<b>40</b>	<b>0.985</b>	0.830	<b>50</b>	<b>558.16</b>	470.33	<b>100</b>	53.90
45	0.842	0.915	50	477.13	518.50	85.48	59.42
50	0.809	1.180	50	458.43	668.67	82.13	76.62
<b>60</b>	0.689	<b>1.540</b>	<b>50</b>	390.44	<b>872.67</b>	69.95	<b>100</b>
70	0.502	1.242	50	284.46	702.67	50.96	80.52



**Şekil 4.10.** *E. aerogenes*'den saflaştırılan L-asparaginazın optimum ve maksimum sıcaklık grafiği.

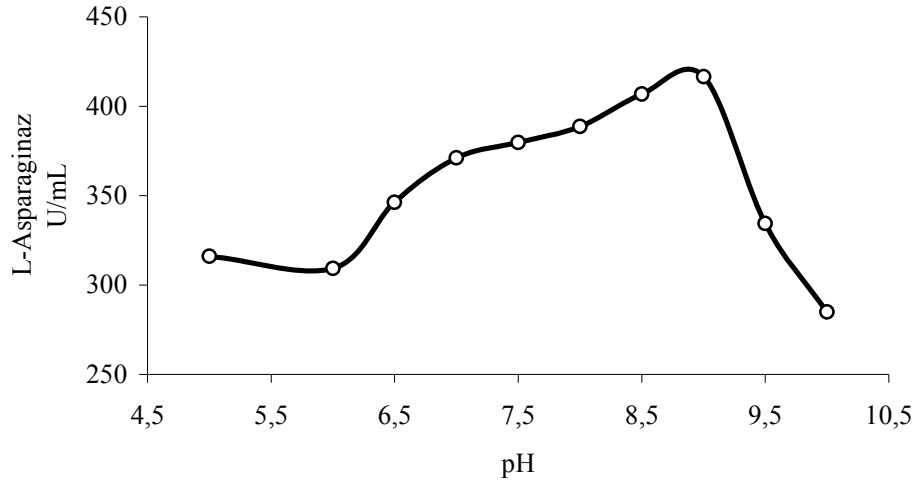
Şekil 4.10'da görüldüğü gibi enzim optimum aktivitesi 40 °C olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber 37 ve 45 °C'de enzim aktivitesi optimum aktivitenin sırası ile % 91 ve 85'i kadar olmuştur. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık ise 60 °C olarak saptanmıştır.

#### 4.3.5. Optimum pH'ın belirlenmesi

*E. aerogenes*'den izole edilen ve kısmi saflaştırılan L-asparaginaz enziminin belirli pH'larda ölçülen aktivite değerleri çizelge 4.4'de ve şekil 4.11'de verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** *E. aerogenes*'den saflaştırılan L-asparaginazın optimum pH sonuçları.

pH	A <sub>480</sub>	Enzim hacmi (µl)	Aktivite (U/mL)	% Aktivite
5	0.558	50	316.20	75.91
6	0.546	50	309.40	74.28
6.5	0.611	50	346.23	83.12
7	0.655	50	371.16	89.11
7.5	0.670	50	379.66	91.15
8	0.686	50	388.73	93.33
8.5	0.718	50	406.86	97.68
<b>9</b>	<b>0.735</b>	<b>50</b>	<b>416.50</b>	<b>100</b>
9.5	0.590	50	334.33	80.27
10	0.503	50	285.03	68.43



**Şekil 4.11.** *E. aerogenes* 'den saflaştırılan L-asparaginazın optimum pH grafiği.

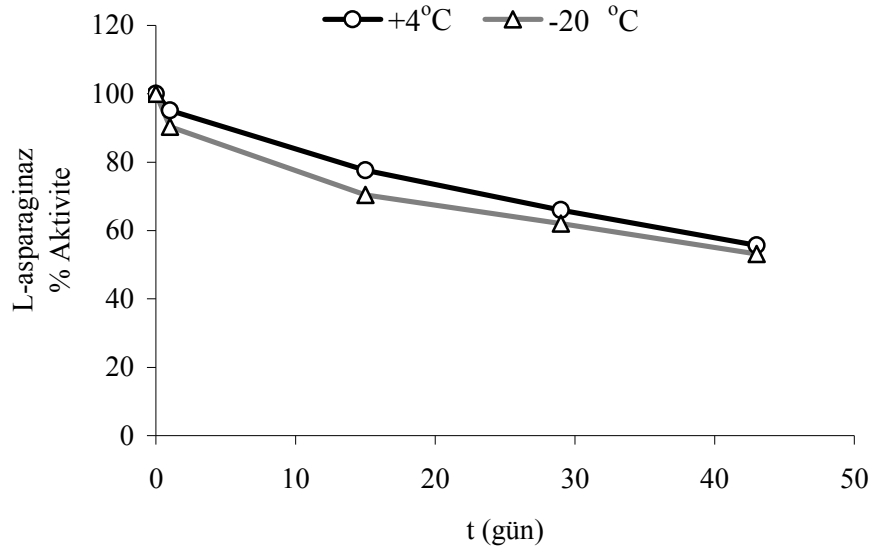
Bu tablo ve şekilden L- asparaginaz için optimum pH'nın yaklaşık 9 olduğu görülmektedir. Bu değer diğer bakterilerden elde edilen L-asparaginazlar için belirlenen optimum pH değerleri ile uyumludur.

#### 4.3.6. Depo kararlılığı

Belirli süre -20 °C ve +4 °C'de muhafaza edilen L-asparaginaz enziminin aktivitesindeki değişim, belirli zaman aralıklarında aktivitenin tayini ile takip edilmiştir. Enzimin depo kararlılığı ile ilgili sonuçlar çizelge 4.5 ve şekil 4.12' de verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** *E. aerogenes* 'den saflaştırılan L-asparaginazın depo kararlılığı sonuçları.

Süre (gün)	$A_{480}$		Enzim hacmi ( $\mu$ l)	Aktivite (U/mL)		% Aktivite	
	+4	-20		+4	-20	+4	-20
0	1.25	1.25	100	354.16	354.16	100	100
1	1.19	1.13	100	337.16	320.17	95.20	90.40
15	0.97	0.88	100	274.83	249.33	77.59	70.39
29	0.825	0.776	100	233.75	219.86	65.98	62.07
43	0.696	0.665	100	197.20	188.41	55.67	53.18



**Şekil 4.12.** *E. aerogenes*'den saflaştırılan L-asparaginazın depo kararlılığının grafiği.

Enzimin yüksek stabilitesi nedeniyle hem -20 hemde +4 °C'de uzun süre saklanabileceği görüldü. 43 günlük sürede bile enzim her iki saklama koşulunda % 50'den daha fazla aktivite gösterebilmiştir.

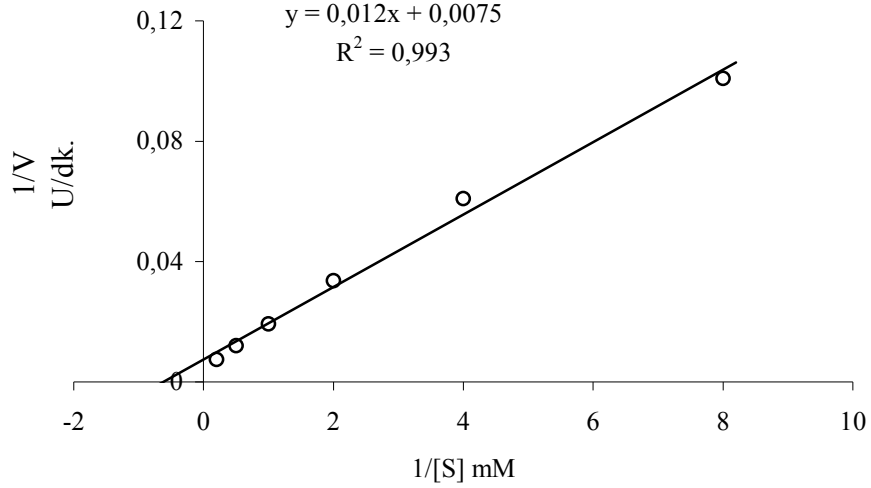
#### 4.3.7. Kinetik verilerin saptanması

Saflaştırılan enzimin maksimum hızını ( $V_{max}$ ) ve substratına karşı olan ilgisini ( $K_m$ )'yi belirlemek için L-asparagin 0.1-10 mM arasındaki konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanarak aktivitesi tayin edilmiştir.  $1/V$  ve  $1/S$  değerlerinden Lineweaver-Burk eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.13),  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplanarak çizelge 4.6'da verilmiştir.

**Çizelge 4.6.** *E. aerogenes*'den saflaştırılan L-asparaginaz enzimini için L-asparagin substratı ile elde edilen  $V_{max}$  ve  $K_m$  sonuçları.

Substrat	$V_{max}$ U/dk.	$K_m$ mM
L-asparagin	133.3	1.6





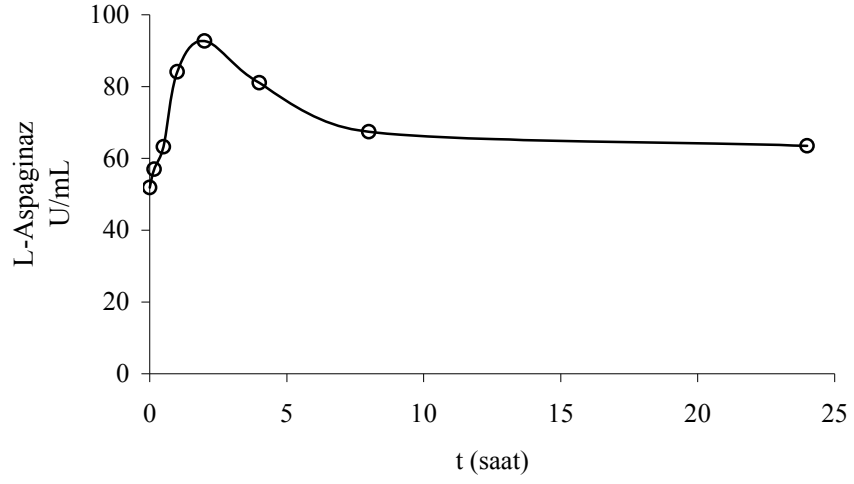
**Şekil 4.13.** *E. aerogenes*'den saflaştırılan L-asparaginaz enzimini için L-asparagin substratı ile elde edilen Lienewear-Burk grafiği.

#### 4.4. *E. aerogenes*'den Saflaştırılan L-Asparaginazın Kan Ortamında Aktivitesindeki Değişimin Sonuçları

*E. aerogenes*'den saflaştırılan L-asparaginazın kan ortamında aktivitesinin takibi için yapılan deney sonuçları çizelge 4.7 ve şekil 4.14'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.7.** *E. aerogenes*'den saflaştırılan L-asparaginazın kan ortamındaki aktivite sonuçları.

Süre (saat)	A <sub>480</sub>	Enzim hacmi (µl)	Aktivite (U/mL)	% Aktivite
0	0.183	100	51.85	55.96
0.17	0.201	100	56.95	61.46
0.5	0.223	100	63.18	68.19
1	0.297	100	84.15	90.82
<b>2</b>	<b>0.327</b>	<b>100</b>	<b>92.65</b>	<b>100</b>
4	0.286	100	81.03	87.46
8	0.238	100	67.43	72.78
24	0.224	100	63.46	68.50



**Şekil 4.14.** *E. aerogenes*'den saflaştırılan L-asparaginazın kan ortamındaki aktivite grafiği.

Enzimin kan ortamına konmasıyla birlikte 2 saate kadar enzim aktivitesinde lineer bir artış ( $R^2=0.92$ ) göstererek en yüksek aktivite değerine ulaşmıştır. 24 saatin sonunda ise enzim aktivitesi 30 dakikada ulaştığı adaptasyon süreci olarak tanımlayacağımız düzeye gelmiştir. Bu sonuçlar enzimin oldukça stabil olduğunun diğer bir göstergesidir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

L-asparaginazın sentezi karbon katabolit represyon ve oksijenle regüle olmaktadır. Son çalışmalar, azot kaynağının özelliğinin de enzimin sentezinde kritik rol oynadığını ortaya koymuştur. Bütün bunlar göz önüne alınarak bu çalışmada ilk defa rekombinant bir oksijen alım sistemi taşıyan bakterilerde farklı kültür şartları altında enzim sentezinin nasıl etkilendiği araştırılmış, enzimin kimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmada *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* ve bu ana konakçı bakterilerin etkili bir oksijen alım sistemi olan *Vitreoscilla* hemoglobinin geni (*vgb*) içeren rekombinantları kullanılarak L-asparaginazın farklı karbon ve azot kaynakları içeren kültür ortamlarındaki sentezi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Ayrıca, enzimin *Enterobacter aerogenes*'den kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve *in vitro* kan ortamındaki aktivite profili çalışılmıştır. Mikroorganizmaların besinsel ve çevresel ihtiyaçlarının belirlenmesi biyoproses çalışmaları için en önemli adımı oluşturur. Birçok biyoproseste olduğu gibi L-asparaginaz üretiminde besinsel açıdan en çok tercih edilen karbon kaynağı glukoz olmasına rağmen, bazı çalışmalar enzimin geni üzerinde en yüksek derecede karbon katabolit represyonun bu karbohidrat tarafından olduğunu göstermiştir. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda glukozun, ortam pH'sını düşürerek enzimin üretimini baskıladığı ile ilgili deliller mevcuttur [95]. Bu nedenle enzimin daha etkin üretimi için glukoz alternatif karbon kaynaklarının çalışılması bir zorunluluktur.

Bu çalışmada L-asparaginaz sentezleri ile bilinen üç adet gram negatif bakteri (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa*) üzerinde yapılan araştırmalar göstermiştir ki; enzimin üretimi her bakteride ve hatta onların rekombinant suşlarında karbon kaynakları bakımından farklı regüle olmaktadır. *E. aerogenes* ve bu bakterinin *vgb*- (Ea[pUC8]) ve *vgb*+ (Ea[pUC8:15]) suşlarında yapılan çalışmalarda L-asparaginaz üretimine karbon kaynaklarının etkisinin Vhb ekspresyonu yapan suşta oldukça farklı olduğu belirlenmiştir. Laktozun dışındaki tüm karbon kaynaklarında *vgb*+ rekombinantı yabanıl tipe göre daha düşük enzim aktivitesi sergilemiştir. Bu da Vhb'nin *E. aerogenes*'de enzim üretimini negatif etkilediğini göstermektedir. Bu enzimin yüksek oksijenli ortamlarda sentezinin olmadığı bilinmektedir. Vhb geninin *E. aerogenes*'de LB ortamında L-asparaginaz sentezini önemli derecede inhibe ettiği sonucu [90] bizim bulgularımızla örtüşmektedir. Dolayısı ile *E. aerogenes* gibi fakültatif aerob bir bakteriye onun daha iyi oksijen alımını

sağlayacak bir sistemin klonlanması ve bakterinin iyi bir havalandırma ortamında çoğaltılması, sentezi düşük seviyede kritik bir oksijen konsantrasyonu gerektiren böyle bir enzimin sentezinde dezavantaj sağlayabilir. Bununla beraber L-asparaginazın oksijenle regülasyonu konusunda sebebi tam olarak açıklanamamış ve birbiri ile çelişen sonuçlar mevcuttur [90, 92]. Bu yöndeki bir çalışmada, *E. aerogenes*'in yüksek oksijen varlığında L-asparaginaz sentezini arttırdığını rapor etmişlerdir [92]. Buna ilaveten yabancı tip *E. aerogenes*'de glukoz ve gliserol en yüksek enzim salınımını sağlamıştır. *E. aerogenes*'nin *vgb-* ve *vgb+* rekombinantlarında, glukoz enzim üretimini baskılayarak gliserol en yüksek enzim üretimine neden olmuştur. Glukozun tersine laktoz içeren ortamda VHB ekspresyonu yapan suş yabancı konakçıya göre daha yüksek L-asparaginaz aktivitesi göstermiştir.

*P. aeruginosa* ve onun *vgb* taşıyan suşu (PaJC) ile yapılan çalışmalarda karbon kaynakları arasında fruktoz en yüksek enzim üretimini sağlayan karbon kaynağı olarak belirlenmiştir. Fruktoz *P. aeruginosa*'da gliserole göre, PaJC'de glukozla göre sırasıyla 1.83 ve 1.63 kat daha fazla enzim üretimine neden olmuştur. Buna karşın *P. aeruginosa* ve PaJC'da fruktoza göre sukroz sırasıyla 4.1 ve 3, laktoz ise 4.9 ve 6.1 kat daha düşük enzim üretimi gerçekleşmesini sağlamıştır. *P. aeruginosa* ve onun *vgb* taşıyan suşu (PaJC) ile elde edilen sonuçlar *E. aerogenes* ve suşlarında elde edilenler ile tamamen farklı bulunmuştur. Özellikle VHB'nin bu bakteride L-asparaginaz üretimi üzerine negatif bir etki göstermediği, tam tersi olarak stimüle edici bir etki gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuç genel olarak *P. aeruginosa*'da global regülasyonun *E. aerogenes*'e göre farklı olması ile açıklanabilir. Gerçekten de, *E. aerogenes* fermentatif bir bakteri iken, *P. aeruginosa* zorunlu aerob bir bakteridir ve her iki bakteri de oldukça farklı oksijen şartlarında optimum çoğalma karakterine sahip olup metabolik akış şemaları da oldukça farklıdır. Örneğin, *E. aerogenes* karbohidratlı bir ortamda oksijen seviyesi belli kritik bir noktanın altına düştüğü zaman fermentatif akış şemalarını devreye sokup, metabolize ettiği substratları önemli oranda asetoin ve bütandiole çevirirken, nispeten oksijenli bir ortamda karışık asit fermentasyonu yapar. *E. aerogenes*'in asit üretimi zamanla pH değerinin başlangıç değeri olan 7.0-7.5'ten 4.5-5.0 seviyelerine düşmesini sağlayabilir. Ancak, zorunlu bir aerob olan *P. aeruginosa*'da böyle bir durum söz konusu değildir ve ileri kültür fazlarında bu bakteri ile yapılan kültürlerde pH değeri böyle bir düşüş göstermemektedir. Hatta bu bakteri kültürlerinde kültür pH değeri zamanla az da olsa bir artış (8.0-8.5) göstermiştir [90]. Bu durum, genel olarak karbon metabolizması için glikoliz yolunu kullanan *E. aerogenes*'in

tersine, *P. aeruginosa*'da Entner-Duodorof yolunun kullanılarak kültür ortamına nispeten nötr metabolik ürünlerin salınması ile açıklanabilir. Dolayısı ile *E. arogenes* ve *P. aeruginosa*'da L-asparaginazın farklı karbon kaynakları ile farklı regülasyonu onların oldukça farklı karbon metabolik yolları ve dolayısı ile farklı oksijen alım ve kullanım yetenekleri ile açıklanabilir. Bu bağlamda, yapılan çalışmalarla VHB ekspresyonunun her iki bakteri türünde oldukça farklı oksijen alımına neden olduğu saptanmıştır [49, 99].

*E. coli* ve onun *vgb<sup>-</sup>* (MK57)ve *vgb<sup>+</sup>* (MK79) rekombinantlarında da karbon kaynakları bakımından farklı enzim profilleri saptanmıştır. *E. coli*'nin VHB ekspresyonu yapan suşunda (MK79) glukoz hariç diğer karbon kaynakları genel olarak enzimin sentezini indükleyici etki göstermişlerdir. Bu suş sukroz içeren ortamda diğer karbohidrat ortamlarına göre 2.6-8.9 kat arasında daha yüksek enzim aktivitesi göstermiştir. Konakçı bakteri (JM103) ise tersine en yüksek enzim aktivitesini glukoz içeren ortamda göstermiştir. Bu bakteride glukozla diğer karbon kaynaklarına göre 2 kat daha fazla enzim aktivitesi gözlenmiştir. Diğer iki suşla karşılaştırıldığında ise, glukoz içeren ortamdaki enzim aktivitesi hariç, JM103 suşu daha düşük enzim aktivitesi sergilemiştir. Glukozun *E. coli*'de VHB ekspresyonu yapan suşta L-asparaginaz üzerindeki repressif etkisi onun VHB ekspresyonu yapan *E. arogenes* suşuna benzerlik göstermektedir. Ancak, diğer karbohidratların VHB içeren *E. coli*'de stimüle edici bir etki ortaya koydukları gözlenmiştir. Kanser kemoterapisinde kullanılan L-asparjinazın ticari olarak sadece *E. coli* ve *Erwinia*'dan elde edilmesi burada elde edilen sonuçların önemini ortaya koymaktadır.

Katabolik baskılama bakteri gibi basit organizmalardan başlayarak yüksek organizasyonlu hayvanlara kadar hemen hemen bütün canlı organizmalarda bulunan evrensel bir olgudur. Katabolik baskılama ile ilgili *E. Coli*' de yapılan ilk çalışmalar sonucunda cAMP ve onun reseptör proteininin dahil olduğu bir mekanizmanın varlığı ortaya konmuştur. Yıllarca bu mekanizmanın bir çok organizmada katabolik baskılamada prototip bir rol oynadığı varsayılırken son çalışmalar bunun sadece bazı enterik bakteriler ve onların yakın akrabalarında önemli olduğunu ortaya koymuştur. Bununla beraber katabolik baskılamanın cAMP-bağımsız ve çok yönlü mekanizmalarda gerçekleştiği de tespit edilmiştir. Bu katabolik mekanizmalarda organizmaların karbonhidrat metabolizmasının ve bunda görev alan enzimlerin önemli etkilerinin olduğu ortaya konmuştur [106]. Bu açıdan bakıldığında buradaki karbon kaynakları ile

ilgili sonuçların farklı bakteri ve aynı bakterinin farklı suşlarında değişik olmasının nedenleri daha iyi anlaşılmaktadır.

Birçok bakteri türü azot kaynağı olarak amonyağı tercih eder. Eğer büyüme ortamında amonyak bulunuyorsa azot asimilasyonundan sorumlu kontrol sistemleri (Ntr) tarafından bakterilerin amino asitler, üre ve inorganik bileşikler gibi alternatif azot kaynaklarını kullanabilme yetenekleri baskılanır [107]. Azot metabolizmasında yer alan L-asparaginaz enziminin geni (ansB)'de azot regülasyonu gösteren bir regülona sahiptir. Bu nedenle bu enzimin üretiminde azot kaynaklarının çalışılması önemlidir. Bu yöndeki çalışmalarımızın sonuçları Vhb geninin karbon kaynaklarında gösterdiği bakteri türüne göre farklı olan etkisine paralel sonuçlar sergilemiştir. *E. aerogenes*'de azot kaynakları içerisinde glutamin ve nitrit birbirine yakın etki göstermekle birlikte en yüksek L-asparaginaz aktivitesi üre içeren ortamlarda gözlenmiştir. Bu bağlamda, en düşük enzim aktivitesi ise enzimin substratı olan L-asparaginin bulunduğu ortamlarda belirlenmiştir. Üre içeren kültür ortamlarında bu enzimin aktivitesi L-asparagin içeren ortamlardan yaklaşık 2.2 kat daha fazla olmuştur. Bu bakterinin *vgb-* suşunda (Ea[pUC8]) ise asparagin, glutamin ve üre içeren ortamlarda L-asparaginaz aktivitesi birbirine benzer kaydedilirken, nitrit içeren ortamda bu üç azot kaynağından yaklaşık 2 kat yüksek enzim aktivitesi belirlenmiştir. *E. aerogenes*'in Vhb ekspresyonu yapan suşunda (Ea[pUC8:15]) ise glutamin içeren ortamda enzim aktivitesi diğer üç karbon kaynağından herhangi birini içeren ortamlara göre yaklaşık 3-4 kat daha yüksek enzim aktivitesi gözlenmiştir. Bu suş aynı zamanda glutamin içeren ortamda diğer iki suşa göre 2 kat yüksek enzim aktivitesi göstermiştir. Ancak, Vhb'inin bu stimüle edici etkisi sadece glutamin içeren ortamda kaydedilmiştir. Diğer azot kaynakları (asparagin, üre ve nitrit) içeren ortamlarda ise Vhb bu şekilde bir etki göstermemiştir. L-asparaginaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisini gösteren çalışma bulunmamakla beraber, ilgili bir çalışmada amonyum hidrojen fosfat içeren bir ortamda bu enzimin sentezinin indüklendiği rapor edilmiştir [92].

*E. aerogenes* ve onun rekombinantları üzerindeki etkilerinin tersine, değişik azot kaynaklarının *P. aeruginosa*'da enzim aktivitesinde önemli bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir. Bununla beraber *P. aeruginosa*'nın *vgb+* rekombinant (PaJC) suşunda farklı azot kaynakları ile değişik enzim aktiviteleri gözlenmiştir. Özellikle glutamin ve nitrit içeren ortamlarda diğer azot kaynaklarını (asparagin ve üre) içeren ortamlara nazaran yaklaşık % 50 kadar daha yüksek enzim aktiviteleri saptanmıştır. Asparagin ve üre içeren ortamlarda *P. aeruginosa* ve *vgb+* rekombinant suşu arasında enzim

aktivitesinde önemli fark gözlenmemiştir. Glutamin ve nitrit içeren ortamlarda VHB'nin enzim sentezi üzerinde stimüle edici bir rol oynadığı saptanmıştır. Benzer bir çalışmada, *P. fluorescence*'de enzimin substratları ve ürünleri olan amino asitleri içeren bir çalışmada enzim üretiminde özellikle glutaminin yüksek enzim salınımına yol açtığı rapor edilmiştir [110]. *P. aeruginosa* 50071 suşunda yapılan bir çalışmada değişik kültür ortamları içinde enzim üretiminde maksimum değere pH 7.9, kazein hidroksilatın % 3.11'lik ve mısırın da % 3.68'lik konsantrasyonundan oluşan ortamda ulaşılmıştır [82].

Yabani tip *E. coli* (JM103)'de en yüksek enzim aktivitesi üre içeren ortamda gözlenirken, en düşük enzim aktivitesi asparagin ve nitrit içeren ortamda olmuştur. Üre içeren ortamdaki enzim aktivitesi asparagin ve nitrit içeren ortama göre 2 kat daha yüksek kaydedilmiştir. MK57 (*vgb-*) suşunda ise en yüksek aktivite yine üre içeren ortamda gözlenmiştir. Bu ortamdaki enzim aktivitesi asparagin ve glutamin ortamlarına göre 2.5 kat, nitrit içeren ortama göre ise % 50 daha yüksek bulunmuştur. MK79 (*vgb+*)'da ise asparagin, üre ve nitrit içeren ortamlarda L-asparaginaz aktiviteleri biri birine benzer bir profil sergilerken, glutamin içeren ortamda 3 kat daha düşük enzim aktivitesi kaydedilmiştir. VHB'nin etkisi bakımından bir karşılaştırma yapıldığında ise, asparagin ve nitrit içeren ortamlarda bu proteinin varlığı indükleyici bir etki yaratırken, glutamin içeren ortamda ise repressif bir etki göstermiştir.

Yukarıda da belirtildiği gibi, L-asparaginaz üzerine besinsel faktörlerin etkisinin çalışıldığı çok az sayıda çalışma vardır. Bu bağlamda, L-asparaginazın üretimine azot kaynaklarının etkisini içeren çalışmalar ise hemen hemen bulunmamaktadır. Bu nedenle L-asparaginazla yapılan hemen bütün çalışmalarda azot kaynağı olarak genellikle kendi substratı olan asparagin kullanılmıştır. Yine elimizdeki sınırlı bilgilerden özellikle amonyum içeren azot kaynaklarının enzim üretimini belli ölçüde baskıladığını bilmekteyiz [26]. Buradaki çalışmada, asparaginın diğer azot kaynaklarına göre enzim üretimi için daha zayıf bir azot kaynağı olarak belirlenmesi önemli bir bulgudur.

Çalışmamızın ikinci fazında temel olarak iki adımda *E. aerogenes*'den L-asparaginaz saflaştırılmıştır. Birinci aşamada amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak % 92.6 verimle 2.16 kat saflaştırılmış enzim elde edilmiştir. İkinci adımda iyon-değişim kromatografisi uygulanarak L-asparaginaz enzimi yaklaşık 15 kat saflaştırılmıştır. Ayrıca enzimin % 65.8 'lik yüksek bir verimle elde edilmesi de önemli bir sonuçtur. Son dönemlerde yapılan iki çalışmada terapötik kullanıma sahip *E. coli* ve *Erwinia chrysanthemi*'de enzimin rekombinant türleri üretilerek affinite ve iyon-değişim

kromatografisi ile kısmi saflaştırılması gerçekleştirilmiş ve sırasıyla 3.3 ve 21.1 kat saf enzim elde edilebildiği ifade edilmiştir [108, 109]. Bu çalışmalardaki enzimlerin elde edilme verimleri sırasıyla % 86 ve % 72 olarak gerçekleşmiştir. Başka bir çalışmada ise *T. Thermophilus*'dan iyon değişim kromatografisi kullanılarak L-asparaginazın 11.5 kat saflaştırılması gerçekleştirilmiş ve buradaki verim % 64 olarak tespit edilmiştir [85].

İyon-değişim kromatografisi sonrası enzimin saflığının kontrolü için SDS-PAGE elektroforezi gerçekleştirildi. Standart grafikten yola çıkılarak yapılan hesaplama sonucunda *E. aerogenes*'den saflaştırılan L-asparaginazın alt biriminin bağıl moleküler kütlesi ~36,500 Da olarak saptandı. Literatür bilgilerine dayanarak enzimin tetramer olduğunu düşünürsek kısmi saflaştırdığımız L-asparaginazın ~146,000 Da molekül kütlesine sahip olduğunu söyleyebiliriz. Körholz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [83] ise *E. coli* ve *Erwinia spp.* asparaginazlarının tetramer yapıya sahip olduğu ve her bir alt subunitenin yaklaşık olarak sırasıyla 32 kDa ve 40 kDa olduğu gösterilmiştir [89]. Bu sonuçlar bizim çalışmada bulduğumuz L-asparaginazın moleküler kütlesi ile paralellik göstermekte olup yaptığımız SDS-PAGE'de kontrol olarak *E.coli*'den elde edilen ticari L-asparaginaz kullanılarak bu sonuç doğrulanmıştır. Bununla beraber *T. thermophilus* yapılan çalışmada enzimin moleküler ağırlığının yaklaşık 200 kDa olduğu ve her bir alt ünitesi 33 kDa olan 6 alt subuniteden oluştuğu rapor edilmiştir [85].

Kısmi saflaştırılan enzimin kimyasal karakterizasyonunda optimum sıcaklık olarak 40 °C tespit edildi. Bununla beraber enzim 37 ve 45 °C'de sırası ile optimum sıcaklıktaki aktivitenin % 91 ve 85'i kadar aktivite göstermiştir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık ise 60 °C'e olarak saptandı. Bu L-asparaginaz enziminin yüksek stabilitesini desteklemektedir. Terapötik olarak kullanılan enzimin biyokimyasal karakterizasyonu ile ilgili çalışmada enzimin oldukça stabil olduğu ve optimum aktiviteyi pH 8.6 ile 30-43 °C'de sıcaklıkta gösterdiği rapor edilmiştir [85]. Ticari olarak satılan L-asparaginazlarla yapılan bir çalışmada ise maksimum sıcaklığının 65 °C olduğu tespit edilmiştir [111]. Yine saflaştırdığımız L-asparaginaz için optimum pH'nın 9.0 olduğu tespit edildi. Bu değer diğer bakterilerden elde edilen L-asparaginazlar için belirlenen optimum pH aralığı ile uyumludur. Örneğin *T. Thermophilus*'dan saflaştırılan L-asparaginazın optimum pH'sının 9.2 olduğu rapor edilmiştir. Bu yönde enzimle ilgili diğer çalışmalarda, optimum pH *Enterobacter cloacae* [26], *Pseudomonas geniculata* [112], ve *Thermus aquaticus*'de [113] sırasıyla 8.5, 9.0 ve 9.5 olarak tespit edilmiştir [26].



Enzimin L-asparagin ile yapılan kinetik parametrelerini belirleme deneyleri sonucunda Km ve Vmax değerleri sırasıyla 1.6 mM ve 133.3 U/mg protein bulunmuştur. Rekombinant suşlarla yapılan bir çalışmada ise L-asparaginaz genini içeren plazmit, *Erwinia chrysanthemi*' e klonlanarak L-asparaginazın üretimi çalışılmış ve saflaştırılan enzimin Km değeri 0.085 mM olarak tespit edilmiştir [114]. Buna ilaveten yapılan çeşitli mikroorganizma L-asparaginazlarının kinetik parametrelerinin belirlenmesi çalışmalarında *Bacillus sp.*, *Aspaergillus terreus* ve *Pseudomonas stutzeri*'de sırasıyla 0.24, 0.58 ve 0.14 mM Km değerlerine ulaşılmıştır [89]. Terapötik enzimler ile ilgili yapılan çalışmalarda ise bu tür L-asparaginazların Km değerinin yaklaşık 0.1-0.01 mM aralığında ve Vmax değerinin 200-400 U/mg protein arasında olduğu rapor edilmiştir [84, 89]. Bu açıdan bakıldığında *E. aerogenes*'den kısmi saflaştırdığımız L-asparaginaz terapötik kullanım için gerekli olan düşük Km değerini tam olarak gösterememiştir. Bu nedenle *E. aerogenes* L-asparaginazın daha kapsamlı saflaştırılması ve ayrıntılı kinetik parametrelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Çünkü enzim, Vmax ve diğer özellikleri açısından terapötik enzimlerde istenen özellikleri taşımaktadır.

Enzimin depolanması konusundaki çalışmamız çok önemli bulgular ortaya koymuştur. Enzimin hem -20 °C hem de +4 °C'de depolanma süresince hemen hemen eş ve uzun süre saklanabileceği görüldü. Enzimin takip edildiği 43 günlük sürede bile her iki saklama koşulunda enzim % 50'den daha fazla aktivite gösterebilmiştir. Enzimin -20 °C ve +4 °C'deki yarılanma ömrünün yaklaşık olarak sırasıyla 45.5 ve 47.3 gün olabileceği görülmüştür. Depolama koşullarında bakteriyel kirlenme ve aktivite koruyucu herhangi bir madde kullanılmamıştır. Böyle bir uygulamanın enzimin yarı ömrünü daha da artıracakı açıktır. Enzimin saklanması liyofilize formunun oldukça kararlı olduğu bilinmektedir. Hatta yapılan bir çalışmada liyofilize enzimin +6 °C'de 360 gün boyunca bekletildiğinde bile aktivitede anlamlı bir kayıp gözlenmemiştir [111]. Buna ilaveten sonuçlarımızdan enzimin çalışma sürecinde saklanması için dondurulmasına gerek olmayacak kadar stabil olduğu söylenebilir.

Enzimin ratların kan ortamında stabilitesi ve aktivitesinin takibi yapılmıştır. Enzimin kan ortamına konmasıyla birlikte 2 saate kadar enzim aktivitesi lineer olarak yaklaşık iki kat artmış ve bu ortamdaki en yüksek değerine ulaşmıştır. Daha sonra enzim aktivitesi 8. saate kadar lineer bir düşüş ve 8-24 saat arasında ise daha stabil seyir sergilemiştir. Bu sonuçlar enzimin oldukça stabil olmasından ve kan bileşenlerinin muhtemel etkilerine karşı direnç göstermesinden kaynaklanmaktadır. Bu konuyla ilgili

bir çalışmada terapötik enzimin insan serumunda aktivitesi takip edilmiştir. İnsan serumunda enzim ilk 2 saat içinde keskin bir düşüş sergileyerek başlangıç aktivitesinin % 85 düzeyine düştükten sonra 2-48 saat arasında enzimin aktivitesinde önemli bir değişim olmamış ve başlangıç aktivitesinin % 80'i düzeyinde oldukça stabil şekilde seyir ortaya koymuştur [111]. Bununla beraber *in vivo* klinik çalışmalarda uygulanma şekline göre değişmekle birlikte *E.coli* L-asparaginazı için ortalama yarılanma ömrü 1-1.2 gün arasında değişmektedir.

Sonuç olarak, özellikle antilösemik etkisi nedeniyle büyük tıbbi ve endüstriyel öneme sahip bakteri orijinli L-asparaginazın değişik gram-negatif bakterilerde sentezinin kompleks regülatör mekanizmalarla olduğu ve bir bakteri için geçerli optimal sentez koşullarının benzer bir diğer bakteriye uygulanamayabileceği saptanmıştır. Bu çalışmayla *E. aerogenes*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'de L-asparaginaz sentezinden sorumlu *ansB* geninin bulunduğu regülonun farklı şekillerde ve kültür ortamının besinsel içeriği ile oksijen transfer oranının kompleks bir bileşimi olduğu ortaya konmuştur. Özellikle terapötik değeri kanıtlanmış ve ticari olarak üretilen *E. coli* L-asparaginazlarının üretiminde, VHB'nin pozitif regülasyon göstererek üretimi artırması önemli bir bulgudur. *E. aerogenes*'den yaklaşık 15 kat saf olarak elde edilen L-asparaginazın kimyasal karakterizasyonu sonucu enzimin moleküler büyüklüğü, stabilitesi, optimum pH ve sıcaklık, maksimum sıcaklık ve yarılanma ömrü açısından terapötik değere sahip L-asparaginazlarla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] <http://demo.ovid.com/demo/ankos/lwwbooks.htm>
- [2] J. Kidd, Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means 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.
- [3] J.D. Broome, Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects: I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance, **J. Exp. Med.**, 118: (1963) 99.
- [4] J.M. Hill, E. Loeb, A. MacLellan, A. Khan, J. Robert, W.F. Schields, N.O. Hill, Response to highly purified L-asparaginase during therapy of acute leukemia, **Cancer Res.**, 29: (1969) 1574-1580.
- [5] T. Ohnuma, J.F. Holland, P. Meyer, Erwinia carotovora asparaginase in patients with prior anaphylaxis to asparaginase from *E. coli*, **Cancer**, 30: (1972) 376.
- [6] G. Todeschini, C. Tecchio, V. Meneghini, G. Pizzolo, D. Veneri, R. Zanotti, M.M. Ricetti, P. Solero, F. Aprili, G. Perona, Estimated 6-year event-free survival of 55% in 60 consecutive adult acute lymphoblastic leukemia patients treated with an intensive phase II protocol based on a high induction dose of daunorubicin, **Leukemia**, 12: (1998) 144.
- [7] S. Daenen, G.W. Van Imhoff, E. Van Den Berg, P.J. De Kam, H. Haaxma-Reiche, E. Vellenga, J.W. Smit, M. Halie, Improved outcome of adult acute lymphoblastic leukaemia by moderately intensified chemotherapy which includes a pre-induction course for rapid tumour reduction: preliminary results on 66 patients, **Br. J. Haematol.**, 100: (1998) 273.
- [8] J. Broome, Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects, **Nature**, 191: (1961)1114–1115.
- [9] R.E. Neuman and T.A. McCoy, Dual requirement of Walker carcinosarcoma 256 in vitro for asparagine and glutamine, **Science**, 124: (1956) 124-125.
- [10] E.E. Haley, G.A. Fischer, A.D. Welch, The requirement for L-asparagine of mouse leukemia cells L5178Y in culture, **Cancer Res.**, 21: (1961) 532-536.
- [11] H.J. Müller and J. Boos, Use of L-asparaginase in childhood ALL, **Crit. Rev. Oncol. Hemat.**, 28: (1998) 97-113.
- [12] L.T. Mashburn and J.C. Wriston, Tumor inhibitory effect from *E.coli*. **Arch. Biochem. Biophys.**, 105: (1964) 450-452.
- [13] H. Whelan and H. Wriston, Purification and properties of asparaginase from *E.coli* B, **Biochem.**, 8: (1969) 2386-2393.
- [14] H.A. Campbell and L.T. Mashburn, L-asparaginase EC-2 from *E.coli*. Some substrate specificity characteristics, **Biochem.**, 8(9): (1969) 3768-3775.
- [15] H.E. Wade, H.K. Robinson, B.W. Philips, The asparaginase and glutaminase of microorganisms, **J. Gen. Microbiol.**, 69: (1971) 299-332.
- [16] M. Kozak and S. Jurga, A comparison between the crystal and solution structures of *Escherichia coli* asparaginase II, **Acta Biochimica. Polonica**, 49: (2002) 509-513.
- [17] 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.
- [18] H. Cedar and J.H. Schwartz, Production of L-asparaginase II by *Escherichia coli*, **J. Bacteriol.**, 96: (1968) 2043-2048.

- [19] M. Yao, Y. Yasutake, H. Morita, I. Tanaka, Structure of the type I L-asparaginase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* at 2,16 Å resolution, **Acta Cryst.**, 61: (2005) 294-301.
- [20] D. Borek and M. Jaskólski, Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity, **Acta Biochimica Polonica**, 48: (2001) 893-902.
- [21] P. Ylikangas and I. Mononen, A Fluorometric Assay for L-Asparaginase Activity and Monitoring of L-Asparaginase Therapy, **Anal. Biochem.**, 280: (2000) 42–45.
- [22] A.L. Stecher, P. Morgantetti de Deus, I. Polikarpov, J. Abrahao-Neto, Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment, **Pharmaceutica Acta Helvetica**, 74: (1999) 1–9.
- [23] J.C. Jr Wriston and T.O. Yellin, L-asparaginase: a review. **Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.**, 39: (1973)185-248.
- [24] R.C. Willis and C.A. Woolpolk, Asparagine utilization in *Escherichia coli*, **J. Bacteriol.**, 118: (1974) 231-241.
- [25] M.S. Nawaz, A.A. Khan, J.E. Seng, J.E. Leakey, P.H. Siitonen, C.E. Cerniglia, Purification and characterization of an amidase from an acrylamide-degrading *Rhodococcus sp.* **Appl. Environ. Microbiol.**, 60: (1994) 3343-3348.
- [26] M.S. Nawaz, D. Zhang, A.A. Khan, C.E. Cerniglia, Isolation and characterization of *Enterobacter cloacae* capable of metabolizing asparagine, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 50: (1998) 568-572.
- [27] M. Dixon, Webb EC Enzyme inhibitors. In: Enzymes, 2nd edn. Longmans green, London, (1964) 365-393.
- [28] L.J. Ettinger, A.G. Ettinger, V.I. Avramis, P.S. Gaynon, Acute lymphoblastic leukaemia: a guide to asparaginase and pegaspargase therapy. **BioDrugs** 7: (1997) 30-39.
- [29] L.J. Reitzer, Sources of nitrogen and their utilization. In: FC Neidhardt, R. Curtiss III, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, B Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter, HE Umberger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1: (1996) 380–390.
- [30] A.L. Stecher, P.M. de Deus, I. Polikarpov, J. Abrahão-Neto, Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment. **Pharmacia Acta Helvetica** 74: (1999) 1–9.
- [31] M. Brueck, D. Koerholz, W. Nuernberger, et al. Elimination of L-asparaginase in children treated for acute lymphoblastic leukemia. **Dev. Pharmacol. Ther.**, 12: (1989) 200-204.
- [32] B.L. Asselin, J.C. Whitin, D.J. Coppola, et al., Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. **J. Clin. Oncol.**, 11: (1993) 1780-1786.
- [33] M.K. Schwartz, E.D. Lash, H.F. Oettigen, F.A. Tomao, L-asparaginase activity in plasma and other biological fluids, **Cancer**, 25: (1970) 244.
- [34] J. Boos, Pharmacokinetics and drug monitoring of L-asparaginase treatment. **Int. J. Clin. Pharm. Ther.**, 35(3): (1997) 96-98.
- [35] B. Asselin, R. Gelber, S. Sallan, Relative toxicity of *E.coli* L-asparaginase (ASP) and PEGasparaginase (PEG) in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), **Med. Pediatr. Oncol.**, 21: (1993) 556.
- [36] E. Nagura, K. Kimura, K. Yamada, K. Ohta, T. Maekawa, F. Takaku, H. Uchino, T. Masaoka, I. Amaki, K. Kawashima, R. Ohno, T. Nomura, J. Hattori, S. Kawamura, A. Shibata, S. Shirakawa, N. Hamajima, Nationwide randomized

- comparative study of doxorubicin, vincristine and prednisolone combination therapy with and without L-asparaginase for adult acute lymphoblastic leukemia, **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 33: (1994) 359-365.
- [37] J.A. Ortega, M.E. Nesbit, M.H. Donaldson, L-asparaginase, vincristine and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia, **Cancer Res.**, 37: (1977) 535-540.
- [38] J. Otten, S. Suci, P. Lutz, U. Benoit, A. Robert, A. Thyss, E. Plouvier, A. Ferster, F. Mechinaud, F. Mazingue, P. Brock, E. Vilmer, G. Solbu, C. Waterkeyn, N. Philippe, The importance of L-asparaginase (A'ase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children: Results of the EORTC 58881 randomized phase III trial showing greater efficiency of *E.coli* (*E.coli*) as compared to *Erwinia* (*Erw*) A'ase, **Blood**, 88: (1996) 669.
- [39] D.S. Martin, Combination versus single drug therapy. **Cancer Chemother. Rep.**, 10: (1969) 57-59.
- [40] P. Sur, D.J. Fernandes, T.E. Kut, R.L. Capizzi, L-asparaginase-induced modulation of methotrexate polyglutamylation in murine leukemia L5178Y. **Cancer Res.**, 47: (1987) 1313-1318.
- [41] J.L. Ettinger, A.G. Ettinger, V.I. Avramis, P.S. Gaynon, Acute lymphoblastic leukemia a guide to asparaginase and pegaspargase therapy, **BioDrugs**, 7: (1997) 30-39.
- [42] P. Metrokos, L. Rosenberg, W.P. Dugoid, G.M. Friend, Prophylactic sandostatin potentiates acute pancreatitis, **Surg. Forum**, 41: (1990) 160-161.
- [43] M. Murokawa, T. Okamura, T. Shibuyo, M. Harada, T. Otsuka, Y. Niko, Use of a synthetic protease inhibitor for the treatment of L-asparaginase-induced acute pancreatitis complicated by disseminated intravascular coagulation, **Ann. Hematol.**, 64(5): (1992) 249-252.
- [44] R. Greenstein, C. Nogueira, T. Ohnuma, A. Greenstein, Management of asparaginase-induced hemorrhagic pancreatitis complicated by pseudocyst, **Cancer**, 43: (1979) 718.
- [45] M. Kozak and S. Jurga, A comparison between the crystal and solution structures of *Escherichia coli* asparaginase II, **Acta Biochimica Polonica**, 49: (2002) 509-513.
- [46] M.H. Saier and T.M. Ramseier, The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. **J. Bacteriol.**, 178: (1996) 3411-3417.
- [47] S.H. Fisher, L.V. Wray, *Bacillus Subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding L-asparaginase, **J. Bacteriol.**, 184: (2002) 2148-2154.
- [48] S. Wakabayashi, H. Matsubara, D.A. Webster, Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*, **Nature**, 322: (1986) 481-483.
- [49] H. Geckil, B.C. Stark, D.A. Webster, Cell growth and oxygen uptake of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* are differently effected by the genetically engineered *Vitreoscilla* hemoglobin gene, **J. Biotechnol.**, 85: (2001) 57-66.
- [50] P.T. Kallio, D.J. Kim, P.S. Tsai, J.E. Bailey, Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions, **Eur. J. Biochem.**, 219: (1994) 201-208.
- [51] M. Joshi and K.L. Dikshit, Oxygen dependent regulation of *Vitreoscilla* globin gene: evidence for positive regulation by FNR, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 202: (1994) 535-542.

- [52] C. Khosla and J.E. Bailey, Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*, **Nature** 331: (1988) 633-635.
- [53] M.L. Wei, D.A. Webster, B.C. Stark, Genetic engineering of *Serratia marcescens* with bacterial hemoglobin gene: effects on growth, oxygen utilization, and cell size, **Biotechnol. Bioeng.**, 57: (1998) 477-483.
- [54] V. Roos, C.I. Andersson, C. Arfvidsson, K.G. Wahlund, L. Bulow, Expression of double *Vitreoscilla* hemoglobin enhances growth and alters ribosome and trna levels in *Escherichia coli*, **Biotechnol. Prog.**, 18: (2002) 652-656.
- [55] C.J. Bollinger, J.E. Bailey, P.T. Kallio, Novel hemoglobins to enhance microaerobic growth and substrate utilization in *Escherichia coli*, **Biotechnol. Prog.**, 5: (2001) 798-808.
- [56] S.C. Liu, D.A. Webster, B.C. Stark, Cloning and expression of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *pseudomonads*: Effects on cell growth, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 44: (1995) 419-424.
- [57] C. Khosla and J.E. Bailey, Evidence for partial export of *Vitreoscilla* hemoglobin into the periplasmic space in *E. coli*, **J. Mol. Biol.**, 210: (1989) 79-89.
- [58] J.A. DeModena, S. Gutierrez, J. Velasco, F.J. Fernandez, R.A. Fachini, J.L. Galazzo, D.E. Hughes, J.F. Martin, The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin, **Bio/Technol.**, 11: (1993) 926-929.
- [59] W. Minas, P. Brunker, P.T. Kallio, J.E. Bailey. Improved erythromycin production in a genetically engineered industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea*, **Biotechnol. Prog.**, 14: (1998)561-6.
- [60] R.L. Boerman and D.A. Webster, Control of heme content in *Vitreoscilla* by oxygen, **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 28: (1982) 35-43.
- [61] P.M.H. Kroneck, W. Jacob, D.A. Webster, R. DeMario, Studies on the bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla*: redox properties and spectroscopic characterization of the different forms of the hemoprotein, **Bio. Metals.**, 4: (1991) 119-125.
- [62] C.D. Georgiou and D.A. Webster, Identification of b,c, and d cytochromes in the membrane of *Vitreoscilla*, **Arch. Microbiol.**, 148: (1987) 328-333.
- [63] K.L. Dikshit, R.P. Dikshit, Y. Liu, D.A. Webster, The bacterial hemoglobine from *Vitreoscilla* can support the aerobic growth of E.coli lacking terminal oxidases, **Arch. Biochem. Biophys.**, 293: (1992) 241-245.
- [64] R.A. Hart, P.T. Kallio, J.E. Bailey, Effect of biosyntheticmanipulation of heme on insolubility of *Vitreoscilla* hemeoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production, **Nature Biotechnol.**, 15: (1997) 244-247.
- [65] L. Kang, M.L. Keller, P.C. Dunlop, R.J. Roon, Nitrogen catabolite repression in a glutamate auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae*, **J. Bacteriol.**, (1982) 151: 29-35.
- [66] A. Telefoncu, J. Salnikow, F. Zihnioğlu, A. Kılınc. Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Kuşadası, 2000.
- [67] G. Temizkan, N. Arda, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004.
- [68] A. Telefoncu, Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, İzmir, 1996.
- [69] F.J. Robyt and B.J. White, Biochemical Techniques, Brooks-Cole Publishing Company, California-USA, 1987.

- [70] [http://tip.erciyes.edu.tr/Ders\\_Notlari/Temel\\_tip/Biyokimya/Kader\\_Kose/ders.htm](http://tip.erciyes.edu.tr/Ders_Notlari/Temel_tip/Biyokimya/Kader_Kose/ders.htm)
- [71] A. Johnstone, R. Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982, 9-16.
- [72] [http://yunus.hacettepe.edu.tr/~umut/lab\\_pdf/408.pdf](http://yunus.hacettepe.edu.tr/~umut/lab_pdf/408.pdf)
- [73] U.K. Lamelli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: (1970) 680–685.
- [74] J. Kurtzberg, *Cancer Medicine, Section13:Biotherapeutics, Chemotherapeutic Agents*, Chapter 51, 699-705.
- [75] 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.
- [76] 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.
- [77] 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) 1129-1139.
- [78] M.L. Graham, Pegasparaginase: a review of clinical studies, **Adv. Drug Delivery Rev.**, 55: (2003) 1293-1302.
- [79] Alexandre Learth Soares, Gledson Manso Guimaraes, Bronislaw Polakiewicz, Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo, Jose Abrahao-Neto, Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase, **Int. J. Pharm.**, 237: (2002) 163–170.
- [80] A.I. Fernandes and G. Gregoriadis, Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics, **Biochimica. Biophysica. Acta**, 1341: (1997) 26-34.
- [81] Y. Fishman and N. Citri, L-asparaginase entrapped in liposomes: preparation and properties, **FEBS Lett.**, 60: (1975) 17-20.
- [82] Y.R. Abdel-Fattah and 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.
- [83] D. Körholz, M. Bruck, W. Nurnberger, Chemical and immunological characteristics of four different L-asparaginase preparations, **Eur. J. Hematol.**, 42: (1989) 417-424.
- [84] J.B. Howerd and F.H. Carpenter, L-asparaginase from *Erwinia caratovora*. Substrate specificity and enzymatic properties, **J. Boil. Chem.**, 247: (1972) 1020-1030.
- [85] A.A. Pritsa and D.A. Kyriakidis, L-asparaginase of *Thermus thermophilus*: Purification, properties and identification of essential amino acids for its catalytic activity, **Mol. Cell Biochem.**, 216: (2001) 93-101.
- [86] D.H. Ho, H.Y. Yap, N. Brown, R.S. Benjamin, E.J. Friereich, G.R. Blumenschein, G.P. Bodey, Clinical pharmacology of intramuscularly administered L-asparaginase, **J. Clin. Pharmacol.**, 21: (1981) 72-78.
- [87] T. Yashimoto, H. Nishimura, Y. Saito, Characterization of PEG modified L-asparaginase from *E.coli* and its application to the therapy of leukemia, **Jpn. J. Cancer Res.**, 77: (1986) 1264-1271.
- [88] F.F. Davis, G.M. Kazo, M.L. Nucci, A. Abuchowski, Reduction of immunogenicity and extension of circulating half-life peptides and proteins. In: Lee VHL, editor. *Peptide and protein drug delivery*. Marcel Dekker, New York, 1991, 831-851.

- [89] U.K. Narta, S.S. Kanwar, W. Azmi, Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia, **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, doi:10.1016/j.critrevonc.2006.07.009.
- [90] H. Geckil and S. Gencer, Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for efficient oxygen uptake, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 63: (2004) 691–697.
- [91] 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, **Enzym. Microbial Technol.**, 35: (2004)182-189.
- [92] 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.
- [93] 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*, **Biotechnol. J.**, 1(2): (2006) 203-208.
- [94] A.A. Khan, S.P. Pal, S.R.V. Raghavan, P.K. Bhattacharyya, Studies on *Serratia marscescens* L-asparaginase, **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 41: (1970) 525–533.
- [95] L.D. Boeck, R.W. Squires, M.W. Wilson, P.P.K Ho, Effect of glucose and low oxygen tension on L-asparaginase production by a strain of *Escherichia coli* B, **Appl. Microbiol.**, 20: (1970) 964-969.
- [96] P.S. Tsai, M. Nageli, J.E. Bailey, Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin modifies microaerobic *Escherichia coli* metabolism through elevated concentration and specific activity of cytochrome o, **Biotechnol. Bioeng.**, 49: (1996) 151-160.
- [97] P.S. Tsai, G. Rao, J.E. Bailey, Improvement of *Escherichia coli* microaerobic oxygen metabolism by *Vitreoscilla* hemoglobin: new insights from NAD(P)H fluorescence and culture redox potential, **Biotechnol. Bioeng.**, 47: (1995) 347-354.
- [98] C. Khosla and J.E. Bailey, Heterologous expression of a bacterial hemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*, **Nature** 331: (1988) 633-635.
- [99] S.O. Erenler, S. Gencer, H. Geckil, B.C. Stark, D.A. Webster, Cloning and expression of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Enterobacter aerogenes*: effect on cell growth an oxygen uptake, **Appl. Biochem. Microbiol.**, 40: (2004) 241-248.
- [100] S.K. Magnolo, D.L. Leenutaphong, J.A. DeModena, J.E. Curtis, J.E. Bailey, J.L. Galazzo, D.E. Hughes, Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemoglobin, **Biotechnol. (N Y)**, 5: (1991) 473-476.
- [101] C.J. Bollinger, J.E. Bailey, P.T. Kallio, Novel hemoglobins to enhance microaerobic growth and substrate utilization in *Escherichia coli*, **Biotechnol. Prog.**, 17: (2001) 798-808.
- [102] J.C. Wriston Jr, Asparaginase, **Method Enzymol.**, 17: (1970) 732-742.
- [103] 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
- [104] 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 Biochem.**, 40: (2005) 573-579.
- [105] 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.
- [106] M.K. Saier, Multiple mechanisms controlling carbon metabolism in bacteria. **Biotechnol. Bioeng.**, 58: (1998) 170-174.
- [107] A.M. Sonawane and K.H. Rohm, A functional *gltB* gene is essential for utilization of asidic amino acids and expression of periplasmic glutaminase/asparaginase (PAG) by *Pseudomonas putida* KT2440, **Mol. Gen. Genomics**, 271: (2004) 33-39.
- [108] A. Khushoo, Y. Pal, B.N. Singh, K.J. Mukherjee, Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II., **Protein Expr. Purif.**, 38: (2004) 29-36.
- [109] J. Krasotkina, A.A. Borisova, Y.V. Gervaziev, N.N. Sokolov, One-step purification and kinetic properties of the recombinant L-asparaginase from *Erwinia caratovora.*, **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 39: (2004) 215-221.
- [110] A. Sonawane, U. Klöppner, C. Derst, K.H. Röhm, Utilization of acidic amino acids and their amides by *pseudomonads*. Role of periplasmic glutaminase-asparaginase. **Arch. Microbiol.**, 179: (2003) 151-159.
- [111] M. Martins, A.F. Barbara, A. Gonçalves, V. Paula, M. Cruz, M. Eugenia, Biochemical characterization of an L-asparaginase biyoconjugate. **Bioconjugate Chem.**, 7: (1996) 430-435.
- [112] G.B. Kitto, G. Smith, T.Q. Thiet, M. Mason, L. Davidson, Tumor inhibitory and non-tumor inhibitory L-asparaginases from *Pseudomonas geniculata*, **J. Bacteriol.**, 137: (1979) 204-212.
- [113] M.P. Curran, R.M. Daniel, G.R. Guy, H.W. Moran, A specific L-asparaginase from *Thermus aquaticus*, **Arch. Biochem. Biophys.**, 214: (1985) 571-576.
- [114] G.A. Kotzia and N.E. Labrou, L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization, **J. Biotechnol.**, (2006), doi:10.1016/j.jbiotec.2006.07.037.

## ÖZGEÇMİŞ

**ADI VE SOYADI** : Burhan ATEŞ  
**DOĞUM TARİHİ** : 24.12.1977  
**DOĞUM YERİ** : Malatya  
**ADRESİ** : İnönü Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi  
Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı  
44280, MALATYA  
E-mail: [bates@inonu.edu.tr](mailto:bates@inonu.edu.tr)

### EĞİTİM DURUMU :

**1995–1999: Lisans**, İnönü Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği

**1999–2001: Yüksek Lisans** (Biyokimya), İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı (İntestinal İskemi-Reperfüzyon Uygulamalarında Değişik Antioksidanların Koruyucu Etkilerinin Araştırılması),

**2001–2007: Doktora** (Biyokimya), İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı (Antikanserojenik L-asparaginazın Farklı Gram-negatif Bakterilerde Üretimi, Kimyasal Karakterizasyonu ve Bazı Klinik Uygulamaları).

### ÖĞRETİM VE ARAŞTIRMA GÖREVİ

**1999-.....: Araştırma Görevlisi**, İnönü Üniv., Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

### YAYINLAR

- 1. Ates B**, Yılmaz I, Geckil H, Iraz M, Birincioglu M, Fiskin K.  
Protective role of melatonin given either before ischemia or prior to reperfusion on intestinal ischemia-reperfusion damage.  
**Journal of Pineal Research**, 2004; 37(3): 149-152.
- 2. Geckil H**, Arman A, Gencer G, **Ates B**, Yılmaz HR  
Vitreoscilla hemoglobin renders *Enterobacter aerogenes* highly susceptible to heavy metals.  
**Biometals**, 2004; 17(6): 715-723.

3. Geckil H, **Ates B**, Gencer S, Uckun M, Yilmaz I.  
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**, 2005; 40(2): 573-579.
4. Orun I, **Ates B**, Selamoglu Z, Yazlak H, Ozturk E, Yilmaz I.  
Effects of various sodium selenite concentrations on some biochemical and hematological parameters of Rainbow trout (*Onchorhynchus Mykiss*).  
**Fresenius Environmental Bulletin**, 2005; 14(1):18-22.
5. Geckil H, **Ates B**, Durmaz G, Erdogan S, Yilmaz I.  
Antioxidant, free radical scavenging and metal chelating characteristics of propolis.  
**American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, 2005; 1(1): 27-31.
6. Eşrefoğlu M, Gül M, **Ateş B**, Yılmaz I.  
Ultrastructural clues for the protective effect of ascorbic acid and *N*-acetyl cysteine against oxidative damage on caerulein-induced pancreatitis.  
**Pancreatology**, 2006; 6: 477-485.
7. Ozdemir I, Selamoglu Talas Z, Gul M, **Ates B**, Gok Y, Esrefoglu M, Yilmaz I.  
Inhibition of DMBA Induced Rat Mammary Duct Damage by Novel Synthetic Organoselenium Compounds.  
**Experimental Animals**, 2006; 55(5):449-455.
8. Geckil H, Gencer S, **Ates B**, Ozer U, Uckun M, and Yilmaz I.  
Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin on production of a chemotherapeutic enzyme, L-asparaginase, by *Pseudomonas aeruginosa*.  
**Biotechnology Journal**, 2006; 1: 203-208.
9. **Ates B**, Dogru MI, Gul M, Erdogan A, Dogru AK, Yilmaz I, Yurekli M, Esrefoglu M. Protective role of caffeic acid phenethyl ester in the liver of rats exposed to cold stress.  
**Fundamental and Clinical Pharmacology**, 2006; 20(3): 283-289.
10. **Ates B**, Gencer S, Erenler SO, Uckun M, Ozer U, Yilmaz I, and Geckil H.  
Production of L-asparaginase, a chemotherapeutic enzyme, in bacteria expressing *Vitreoscilla* haemoglobin.  
**FEBS JOURNAL**, (2006); 273: 139-139.  
<http://www.blackwell-synergy.com/toc/ejb/273/s1>