

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

**L-ASPARAGİNAZ GENİNİN (*ansB*) FARKLI GRAM-NEGATİF
BAKTERİLERE KLONLANMASI,
İZOLASYONU VE EKSPRESYONU**

ŞEBNEM ÖZALP ERENLER

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

MALATYA

2007

Tezin Başlığı : L-Asparaginaz Geninin (*ansB*) Farklı Gram-Negatif Bakterilere Klonlanması, İzolasyonu ve Ekspresyonu.

Tezi Hazırlayan : Şebnem ÖZALP ERENLER

Sınav Tarihi : 10.07.2007

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Ana bilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Murat ÖZMEN İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL İnönü Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Süleyman AYDIN Fırat Üniversitesi

Prof. Dr. Ali ŞAHİN

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Doktora Tezi olarak sunduğum “L-Asparaginaz Geninin (*ansB*) Farklı Gram-Negatif Bakterilere Klonlanması İzolasyonu ve Ekspresyonu” 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.

Şebnem ÖZALP ERENLER

ÖZET

Doktora Tezi

L-ASPARAGİNAZ GENİNİN (*ansB*) FARKLI GRAM-NEGATİF BAKTERİLERE KLONLANMASI, İZOLASYONU VE EKSPRESYONU

Şebnem Ö. Erenler

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
ix +116 sayfa
2007

Danışman: Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL

Kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan *L-asparaginaz* enzimi sadece birkaç gram-negatif bakteri tarafından sentezlenmektedir. Bu enzimin sitotoksik etki mekanizması L-asparagin bakımından oksotrof olan kanser hücrelerini bu amino asitten yoksun bırakmasına dayanır. Kanser hücrelerinin L-asparagin gereksinimi tamamen eksojen kaynaklı olup, bu kaynak kesildiğinde protein sentezi durur ve hücreler apoptosise sürüklenir. Normal hücreler L-asparagin bakımından prototrof olduklarından böyle bir uygulamadan etkilenmezler.

Buradaki çalışmada L-asparaginaz sentezi ile bilinen üç tür gram-negatif bakteri ve onların *Vitreoscilla* hemoglobin geni (*vgb*) veya L-asparaginaz geni (*ansB*) klonlanmış rekombinantları kullanılmıştır. Ayrıca, bu çalışmada *ansB* klonladığımız *Enterobacter aerogenes* rekombinantı Ea[pB-PGA] olarak adlandırılmış ve tüm konakçı ve rekombinantların çeşitli besinsel ortamlarda L-asparaginaz sentezleri çalışılmıştır. Oksijen ve çeşitli azot ve karbon kaynakları ile ileri derecede regüle olduğu bilinen *ansB* geninin farklı bakterilerde ve onların rekombinant suşlarında farklı regülasyonu konusunda bu detayda yapılan ilk çalışmadır.

Çalışılmış olan çeşitli karbon kaynakları arasında en yüksek L-asparaginaz sentezi *E. aerogenes*'de glukozla sağlanırken, bu bakterinin rekombinantları gliserol ortamında glukozla göre 3 kata varan fazla L-asparaginaz aktivitesi göstermişlerdir. *Escherichia coli* ve onun *ansB* suşunda en yüksek enzim sentezi laktoz içeren ortamda görülürken, *Pseudomonas aeruginosa* ve onun *vgb* rekombinantı (PaJC)'nda en yüksek enzim aktivitesi gliserollü ortamda kaydedilmiştir. PaJC suşu bu ortamda konakçı hücreye göre 2 kat fazla enzim aktivitesi göstermiştir. Tüm bakterilerde mannitol en elverişsiz karbon kaynağı olarak belirlenmiştir. Azot kaynakları bakımından genel olarak tüm bakteriler ve rekombinantları için L-asparagin ve L-glutamin içeren ortamlar L-asparaginaz sentezi için en elverişli ortamlar iken, en elverişsiz azot kaynağı olarak amonyum klorür kaydedilmiştir.

Endüstriyel atıklar arasında vinas ve melas genel olarak tüm bakterilerde enzim sentezini en iyi destekleyen ortamlar olmuşlardır. Tarafımızdan oluşturulan klonun (Ea[pB-PGA]) konakçısına göre bu ortamlarda 3 kat fazla enzim sentezi yaptığı kaydedilmiştir. Benzer şekilde *E. coli*'nin *ansB* klonu konakçısına göre melas ortamında yaklaşık 7 kat fazla enzim aktivitesi göstermiştir. *P. aeruginosa*'da vinas ortamında kaydedilen L-asparaginaz aktivitesi tez kapsamında kullanılan tüm ortamlar içinde ölçülmüş olan en yüksek değer olarak kaydedilmiştir. Bu ortamdaki enzim aktivitesi diğer atıklarda belirlenenin 14 katına varan oranlarda bulunmuştur.

Kullanılmış olan zengin besi ortamları arasında tüm bakteriler için en yüksek enzim sentezi Terrific Broth (TB) ortamında olmuştur. *E. coli* ve onun *ansB* suşu bu ortamda diğer iki zengin ortama göre 2.5-7 kat fazla enzim aktivitesi göstermiştir. Üç ortamda da (TB, LB ve SOB) Ea[pB-PGA] ve PaJC rekombinantı konakçılarından sırası ile 2-10 ve 2-4 kat fazla L-asparaginaz aktivitesi göstermişlerdir.

Anahtar kelimeler: L-asparaginaz, *Vitreoscilla* hemoglobini, Kemoterapötik enzimler, *ansB*, *vgb*

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

CLONING, ISOLATION AND EXPRESSION OF L-ASPARAGINASE GENE (*ansB*) IN DIFFERENT GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Sebnem O. Erenler

Inonu University
Institute of Applied Sciences
Division of Biology
ix + 116 pages
2007

Advisor: Hikmet GECKIL, Assoc. Prof.

L-asparaginase, an enzyme widely used in cancer chemotherapy, is synthesized by several gram-negative bacteria. The cytotoxic effect of this enzyme resides on its clearance of L-asparagine amino acid for which cancer cells are auxotroph. When cancer cells are deprived of L-asparagine amino acid, which is acquired exogenously only, the protein synthesis in these cells is blocked and they are destined for apoptosis. Since normal cells are prototroph for L-asparagine they are not affected from such treatment.

In this study three gram-negative bacteria known for L-asparaginase synthesis and their *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) or L-asparaginase gene (*ansB*) cloned recombinants were used. An *ansB* carrying *Enterobacter aerogenes*, constructed in this study, was named Ea[pB-PGA] and all bacterial hosts and their recombinants were studied with respect to L-asparaginase synthesis in various nutrient media. Given the tight regulation of *ansB* by oxygen and its carbon catabolite repression and nitrogen regulation, this is the first study in this detail to show differential regulation of this gene in different bacteria and in their recombinant strains.

Among carbon sources studied the highest L-asparaginase synthesis in *E. aerogenes* was achieved with glucose, while the recombinants of this bacteria had 3-fold higher enzyme synthesis in glycerol containing medium than in glucose. *Escherichia coli* and its *ansB* strain showed the highest enzyme synthesis in lactose medium. This was the case in glycerol containing medium for *Pseudomonas aeruginosa* and its *vgb* recombinant (PaJC). The PaJC strain showed 2-fold higher enzyme activity than the host strain in this medium. Mannitol was determined to be the poorest carbon source with respect to L-asparaginase synthesis in all bacteria. Regarding the nitrogen sources, L-asparagine and L-glutamine were determined as the most suitable sources, while ammonium chloride was the least appropriate one.

Molasses and vinasse were the most suitable industrial wastes supporting L-asparaginase synthesis in all bacteria. The *ansB* recombinant (Ea[pB-PGA]) constructed in this study had 3-fold higher enzyme levels than the host strain in these media. Similarly, *ansB* clone of *E. coli* had 7-fold higher L-asparaginase activity in molasse than that of host strain. L-asparaginase level of *P. aeruginosa* in vinasse was the highest level determined throughout the study. In this medium the enzyme activity was up to 14-fold higher than in other industrial wastes.

The enzyme synthesis for all bacteria was highest in Terrific Broth (TB) compared to other rich media used. *E. coli* and its *ansB* strain had 2.5-7-fold higher activity in TB than in other rich media. In all three media used, Ea[pB-PGA] recombinant showed 2-10-fold and PaJC recombinant strain 2-4-fold higher activity than their hosts, *E. aerogenes* and *P. aeruginosa*, respectively.

Key words: L-asparaginase, *Vitreoscilla* hemoglobin, Chemotherapeutic enzymes, *ansB*, *vgb*

TEŞEKKÜR

Bu çalışma boyunca her aşamada değerli bilgi birikimlerinden yararlandığım ve çalışmalardaki titizliği sonucunda idealim olan moleküler genetik alanındaki bu tezin oluşumuna sağladığı katkılar ve özellikle yazım aşamasındaki yardımları için danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL'e;

Çalışmamı yönlendirmedeki katkıları ve destekleri için, bilimsel anlayış ve insani tavırlarını her zaman örnek alacağım tez izleme komitemdeki çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA ve Sayın Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ'ye;

Tez sürecinde gerekli donanım ve malzeme sağlamadaki katkıları ve yol göstericiliği için Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e;

Tezime sağladıkları (2005/25 nolu proje ile) maddi katkı için İnönü Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimine;

Çalışmam boyunca sevinç ve üzüntülerime ortak olan, her an desteğini hissettiğim çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Dilek ASMA'ya,

Desteği ve samimiyeti için sevgili arkadaşım Arş. Grv. Gülçin AKBULUT'a;

Yaşamım boyunca ve akademik çalışma hayatında her zaman en büyük desteği aldığım Türk Milli Eğitiminin iki neferi Muazzez-Ali ÖZALP'e, canım Anneme ve Babama;

Zor ve stresli çalışma sürecinde gösterdiği sabır ve sevgi için, sevgili eşim Nüvit Eray ERENLER'e ve destekleri için ERENLER ailesine;

En zor ve ümitsiz anlarımda varlığı ile güç veren, tezimin manevi mimarı biricik oğlum Emir ERENLER'e;

Sonsuz Teşekkürlerimi Sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONUR SÖZÜ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 L-asparaginaz.....	3
1.1.1. Enzimin Substratları ve Biyosentezleri.....	5
1.1.2. L-asparaginaz Geni (<i>ansB</i>).....	7
1.1.3. L-asparaginazın Bulunduğu Organizmalar.....	8
1.1.4. Bakteriyel Orjinli Diğer Onkolitik Enzimler.....	9
1.1.5. L-asparaginaz ve Anti-kanser Mekanizması.....	11
1.1.6. L-asparaginaz Sentezi.....	15
1.1.7. <i>ansB</i> klonlama çalışmaları.....	17
1.1.8. Bu Çalışmada Kullanılan <i>ansB</i> Klonları.....	17
1.2. Vitreoscilla Hemoglobini (VHb).....	20
1.2.1. Bakteriden İnsana Hemoglobinler.....	24
1.2.2. Vitreoscilla Hemoglobin Geni (<i>vgb</i>).....	30
1.2.3. Vitreoscilla Hemoglobinin Sentezi.....	31
1.2.4. Vitreoscilla Hemoglobinin Klonlandığı Organizmalardaki Etkileri.....	31
1.2.5. Metabolik Mühendislikteki Potansiyeli.....	31
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	36
3. MATERYAL VE METODLAR.....	40
3.1. Kimyasal ve Ayırıcılar.....	40
3.2. Kullanılan Bakteriler Stok Kültürleri ve Besi Ortamları.....	40
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamlarının Hazırlanması.....	41
3.2.2. Bakteri Stoklarının Hazırlanması.....	43
3.2.3. Kullanılan <i>vgb</i> Klonları.....	43
3.2.4. Endüstriyel Atıklardan L-Asparaginaz Üretimi.....	45
3.3. Klonlama Çalışmaları.....	45
3.3.1. Plazmid Transformasyonu ve Rekombinantların Seçilimi.....	46
3.4. Bakterilerin Kültürü.....	50
3.4.1. Biyokütle Ölçümü.....	50
3.4.2. Bakterilerin Oksijen Alımı.....	50
3.4.3. Kültürlerin Asit Üretimi.....	52
3.4.4. Kültür Ortamı Amonyak Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	52
3.4.5. L-Asparaginaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	55
4.1. Farklı Azot-Karbon Kaynaklarının ve Besi Ortamlarının L-Asparaginaz Sentezi Üzerine Etkisi.....	55
4.1.1. L-Asparaginaz Aktivitesine Çeşitli Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	56
4.1.2. L-Asparaginaz Sentezine Çeşitli Azot Kaynaklarının Etkileri.....	62
4.1.3. Çeşitli Atık Ortamlarında L-Asparaginaz Sentezi.....	67
4.1.4. Zengin Besi Ortamlarında L-Asparaginaz Sentezi.....	72
4.2. Ortam Optimizasyonu Çalışmaları.....	76
4.2.1. pH Etkisi.....	76
4.2.2. Sıcaklık Etkisi.....	81
4.3. Optimal L-Asparaginaz Aktivitesi.....	85
4.3.1. pH Optimizasyonu.....	85
4.3.2. Sıcaklık Optimizasyonu.....	86
4.4. Bakterilerin Oksijen Tüketim Karakteristikleri.....	87
5. TARTIŞMA.....	90
6. KAYNAKLAR.....	103
ÖZGEÇMİŞ.....	116

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	L-asparaginaz tarafından katalizlenen reaksiyon.....	3
Şekil 1.2.	222-simetrik L-asparaginaz II'nin tetramerik yapısı.....	4
Şekil 1.3.	Anti-kanserojenik bir ajan olarak L-asparaginazın etki mekanizmasının şematizasyonu.....	4
Şekil 1.4.	Normal hücreler için L-asparagin kaynağı.....	5
Şekil 1.5.	L-Asparaginazın Katalizlediği iki reaksiyon.....	5
Şekil 1.6.	Asparagin biyosentezi.....	6
Şekil 1.7.	Glutamin biyosentezi.....	6
Şekil 1.8.	Genel kemoterapötik ajanların etki mekanizmaları	7
Şekil 1.9.	Normal ve kanserli hücrelerin L-asparagin kaynakları.....	11
Şekil 1.10.	<i>ansB</i> geninin klonlanmasında kullanılan pBluescript II fajmidini.....	13
Şekil 1.11.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> genomundan izole edilen ve üzerinde <i>ansB</i> geni taşıyan 3-kb büyüklüğündeki genomik fragmanın genetik ve fiziki haritası.....	18
Şekil 1.12.	pB-PGA plazmidinin oluşturulması.....	19
Şekil 1.13.	pAHZ12 plazmidinde bulunan ve üzerinde 7-kb'lık komple <i>ansB</i> operonunun bulunduğu <i>R. etli</i> 'ye ait genomik fragman	19
Şekil 1.14.	VHb ve sitokrom <i>bo</i> ubiquinonol oksidazların I. alt ünitesi 'i arasındaki ilişkinin muhtemel mekanizması	20
Şekil 1.15.	VHB'nin 3-boyutlu yapısı.....	22
Şekil 1.16.	VHb ekspresyonu yapan <i>E. coli</i> ve orijinal konakçı arasında temel metabolik yollara ait genlerin ekspresyonu.....	23
Şekil 1.17.	Evrimsel süreçte hemoglobin geni.....	24
Şekil 1.18.	Canlıların 3 aleminde globin geni.....	29
Şekil 1.19.	<i>E. coli</i> transkripsiyon sistemi tarafından tanınan <i>vgb</i> promotörü.....	30
Şekil 3.1.	pUC8:15 plazmidinin oluşturulması.....	44
Şekil 3.2.	Transpozon / Transpozaz sistemi (pUT-mini Tn5: <i>vgb</i> -Cm).....	45
Şekil 3.3.	L-asparaginaz aktivitesinin değerlendirilmesi ve kültür ortamına salınan amonyak miktarının belirlenmesi için kullanılan tipik bir amonyum sülfat standart eğrisi.....	53
Şekil 4.1.	Ea[pB-PGA] ve <i>E. coli</i> [pAHZ12] rekombinant bakterilerinden izole edilen plazmidlerin agaroz jeldeki restriksiyon motifleri.....	56
Şekil 4.2.	<i>E. aerogenes</i> ve bu bakterinin <i>vgb</i> ve <i>ansB</i> rekombinantlarının değişik karbon kaynakları içeren MMY ortamında L-asparaginaz seviyeleri.....	57
Şekil 4.3.	<i>E. coli</i> ve bu bakterinin <i>ansB</i> klonlanmış suşunun değişik karbon kaynakları içeren MMY ortamında L-asparaginaz seviyeleri.....	59
Şekil 4.4.	<i>P. aeruginosa</i> ve <i>vgb</i> suşunun değişik karbon kaynakları içeren MMY ortamında L-asparaginaz seviyeleri.....	61
Şekil 4.5.	<i>E. aerogenes</i> ve bu bakterinin <i>vgb</i> ve <i>ansB</i> rekombinantlarının değişik azot kaynakları içeren MMY ortamında L-asparaginaz seviyeleri.....	63
Şekil 4.6.	<i>E. coli</i> ve bu bakterinin <i>ansB</i> klonlanmış suşunun değişik azot kaynakları içeren MMY ortamında L-asparaginaz seviyeleri	64
Şekil 4.7.	<i>P. aeruginosa</i> ve <i>vgb</i> suşunun değişik azot kaynakları içeren MMY ortamında L-asparaginaz seviyeleri.....	66
Şekil 4.8.	<i>E. aerogenes</i> ve bu bakterinin <i>vgb</i> ve <i>ansB</i> rekombinantlarının değişik endüstriyel atıkları içeren ortamlarda L-asparaginaz seviyeleri.....	68
Şekil 4.9.	<i>E. coli</i> ve bu bakterinin <i>ansB</i> klonlanmış suşunun değişik endüstriyel atık ortamlarında L-asparaginaz seviyeleri.....	69
Şekil 4.10.	<i>P. aeruginosa</i> ve <i>vgb</i> suşunun değişik endüstriyel atık ortamlarında L-asparaginaz seviyeleri.....	70
Şekil 4.11.	<i>E. aerogenes</i> ve bu bakterinin <i>vgb</i> ve <i>ansB</i> rekombinantlarının değişik zengin besi ortamlarında L-asparaginaz seviyeleri.....	72
Şekil 4.12.	<i>E. coli</i> ve bu bakterinin <i>ansB</i> klonlanmış suşunun çeşitli zengin besi ortamlarında L-asparaginaz seviyeleri.....	74
Şekil 4.13.	<i>P. aeruginosa</i> ve <i>vgb</i> suşunun çeşitli zengin besi ortamlarında L-asparaginaz seviyeleri	75
Şekil 4.14.	Değişik pH'ya sahip TB ortamında kültürü yapılan <i>E. aerogenes</i> ve bu bakterinin <i>vgb</i> ve <i>ansB</i> rekombinantlarının L-asparaginaz seviyeleri.....	77

Şekil 4.15.	<i>E. coli</i> ve bu bakterinin <i>ansB</i> klonlanmış suşunun değişik pH'ya yarılanmış TB ortamında L-asparaginaz seviyeleri.....	78
Şekil 4.16.	Farklı pH'ya ayarlanmış TB ortamında <i>P. aeruginosa</i> ve <i>vgb</i> suşunun L-asparaginaz seviyeleri	80
Şekil 4.17.	TB ortamında değişik ısılarda kültürü yapılan <i>E. aerogenes</i> ve bu bakterinin <i>vgb</i> ve <i>ansB</i> rekombinantlarının L-asparaginaz seviyeleri.....	81
Şekil 4.18.	TB ortamında değişik sıcaklıklarda kültürü yapılmış <i>E. coli</i> ve <i>ansB</i> klonlanmış suşunun L-asparaginaz seviyeleri.....	83
Şekil 4.19.	TB ortamında farklı sıcaklıklarda kültürü yapılmış olan <i>P. aeruginosa</i> ve <i>vgb</i> suşunun L-asparaginaz seviyeleri	84
Şekil 4.20.	L-Asparaginaz Enziminin Aktivitesine farklı pH derecelerinin etkileri.....	86
Şekil 4.21.	L-Asparaginaz Enziminin Aktivitesine farklı sıcaklık derecelerinin etkileri.....	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	L-asparaginazı üreten başlıca firmalar ve enzim için kullandıkları generik isimleri.....	13
Çizelge 1.2.	Vitreoscilla hemoglobinin çeşitli heterolog organizmalardaki etkisi.....	33
Çizelge 3.1.	Kullanılan besi ortamları ve içerikleri (g L ⁻¹).....	41
Çizelge 3.2.	Melasın İçeriği (g L ⁻¹).....	42
Çizelge 3.3.	Vinasın İçeriği (g L ⁻¹).....	42
Çizelge 3.4.	Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun İçeriği (g L ⁻¹).....	42
Çizelge 3.5.	Peynir Altı Suyunun İçeriği (g L ⁻¹).....	43
Çizelge 3.6.	Alkali Lizis Plazmid İzolasyonu yönteminde kullanılan çözeltiler.....	49
Çizelge 4.1.	<i>E. aerogenes</i> ve <i>vgb</i> ve <i>ansB</i> rekombinantlarının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	58
Çizelge 4.2.	<i>E. coli</i> ve <i>ansB</i> rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	60
Çizelge 4.3.	<i>P. aeruginosa</i> ve <i>vgb</i> rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	61
Çizelge 4.4.	<i>E. aerogenes</i> ve <i>vgb</i> ve <i>ansB</i> rekombinantlarının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	63
Çizelge 4.5.	<i>E. coli</i> ve <i>ansB</i> rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	65
Çizelge 4.6.	<i>P. aeruginosa</i> ve <i>vgb</i> rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	66
Çizelge 4.7.	<i>E. aerogenes</i> ve <i>vgb</i> ve <i>ansB</i> rekombinantlarının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	68
Çizelge 4.8.	<i>E. coli</i> ve <i>ansB</i> rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	70
Çizelge 4.9.	<i>P. aeruginosa</i> ve <i>vgb</i> rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	71
Çizelge 4.10.	<i>E. aerogenes</i> ve <i>vgb</i> ve <i>ansB</i> rekombinantlarının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	73
Çizelge 4.11.	<i>E. coli</i> ve <i>ansB</i> rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	74
Çizelge 4.12.	<i>P. aeruginosa</i> ve <i>vgb</i> rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	76
Çizelge 4.13.	<i>E. aerogenes</i> ve <i>vgb</i> ve <i>ansB</i> rekombinantlarının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	78
Çizelge 4.14.	<i>E. coli</i> ve <i>ansB</i> rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	79
Çizelge 4.15.	<i>P. aeruginosa</i> ve <i>vgb</i> rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	80
Çizelge 4.16.	<i>E. aerogenes</i> ve <i>vgb</i> ve <i>ansB</i> rekombinantlarının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	82
Çizelge 4.17.	<i>E. coli</i> ve <i>ansB</i> rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	83
Çizelge 4.18.	<i>P. aeruginosa</i> ve <i>vgb</i> rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı.....	85
Çizelge 4.19.	Kullanılan bakterilerin ve rekombinantlarının değişik kültür fazlarında oksijen tüketimi....	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

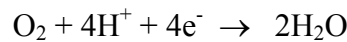
Ea	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Ea [pUC8:15]	[pUC8:15] plazmidini taşıyan <i>Enterobacter aerogenes</i>
Ea [pB-PGA]	[pB-PGA] plazmidini taşıyan <i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. coli</i> JM103	<i>Escherichia coli</i> suşu
<i>E. coli</i> HB101[pAHZ12]	[pAHZ12] plazmidini taşıyan <i>Escherichia coli</i> suşu
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PaJC	Kromozomunda bakteriyel hemoglobin geni taşıyan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>ansB</i>	L- Asparajinaz enziminin geni
<i>vgb</i>	Bakteriyel hemoglobin sentezleyen gen
VHb	<i>Vitreoscilla</i> hemoglobini
SOB	Zengin Besi Yeri
LB	Lauria Bertani zengin besi yeri
TB	Terrific Broth zengin besi yeri
MMY	Yarı sentetik besi yeri
Hb	Hemoglobin
ZYFA	Zeytinyağı fabrikası atık suyu
PAS	Peynir altı suyu

1 GİRİŞ

Dünyamızda sayıları milyonlarla ifade edilen canlı türleri olmasına rağmen, tüm bu çeşitlilik içinde bu canlılar arasında ortak yapı ve karakterler de mevcuttur. Bakteri ile insan gibi oldukça farklı iki canlının intermediyer metabolizması neredeyse aynı enzim veya enzim sistemlerine sahipken, diğer yönleri ile her iki tür canlı oldukça farklı bir genomik ve proteomik içeriğe sahiptir. Yüksek yapılı canlılarda daha çok “gen duplikasyonları” başta olmak üzere çeşitli mekanizmalarla genomun gen içeriği nispeten artış göstermiştir. Dolayısı ile bu canlılarda çeşitli genlerin kopya sayısı artarken, bazı genler ise yeni genler ortaya koyacak şekilde yeniden düzenlenmiştir. Diğer bazı genler ise ya tamamen ortadan kalkmış, ya da her hangi bir protein veya RNA kodlamayan suskun genlere (pseudogenler) dönüşmüşlerdir.

Dolayısı ile yukarıdaki bakteri ve insan örneğine tekrar dönersek, insanlarda bakterinin sahip olduğu birçok gene sahip bulunmanın yanında, bakteriye göre gen çeşitliliğinde önemli bir artış söz konusudur. Ancak, bütün bunlara rağmen bakterilerde olup da bizde olmayan bazı genler de mevcuttur. Bilim adamları son yıllarda bu genlerden bazılarının kodladıkları proteinlerin kemoterapotik önem taşıyabileceğini belirlemişlerdir. Aslında endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizma kaynaklıdır. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal kaynaklara göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, daha kararlı ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir. Kemoterapik ajan olarak enzim kullanımı bu avantajlardan doğan yeni uygulama alanlarından biridir.

Hemen bütün canlıların ortak özelliklerinden biri onların oksijen (O₂) kullanmalarınıdır. Oldukça küçük bir anaerobik bakteri grubu hariç organizmaların çoğu için oksijen hayati bir önem taşır. Birinci olarak, organizmaların enerjilerinin (ATP) büyük kısmını sağladıkları oksidatif fosforilasyon olayının gerçekleşmesi için oksijene ihtiyaç vardır. Bu durum canlıların enerjilerinin % 90'ından fazlasının solunan oksijenin % 90'ının ökaryotlarda mitokondrial, bakterilerde plazma mebranındaki sitokrom oksidaz sistemi tarafından kullanılması ile açıklanabilir. Bu enzim oksijenin dört elektronla redüksiyonunu katalizler ve bu olay sonucunda O₂ molekülü H₂O'ya indirgenir:



Oksijenin ikinci bir önemli kullanım alanı onun aynı zamanda birçok enzim tarafından substrat olarak kullanılmasıdır. Aromatik halkalı zararlı bileşiklerin

yıkılmasından, reaktif oksijen türlerine ve hücredeki birçok diğer doğal metabolik reaksiyonlara kadar birçok enzim oksijeni kullanarak bu bileşiklerin metabolizmasını gerçekleştirir.

Ayrıca hücredeki birçok genin ekspresyonu ortam oksijen seviyesi ile direkt ilişkili olup bunlara “oksijenle regüle olan genler” denilmektedir. Buradaki çalışmanın konusunu oluşturan iki proteinin geni böyle genlerdir. Hem L-asparaginaz geni (*ansB*) ve hem de *Vitreoscilla* hemoglobin geni (*vgb*) oksijenle regüle olan promotörlere sahiptir. Her iki gen de düşük oksijen (< %2-5) ortamlarında indüklenirken atmosferik oksijen seviyeleri onların ekspresyonunu oldukça baskılamaktadır.

Son yıllarda hemoglobinlerin insandan bakteriye tüm canlı gruplarında temsil edildiğinin anlaşılması globinlerin ortak bir atadan geldikleri fikrini güçlendirmiştir. Bu proteinler farklı organizma gruplarında terminal oksidazlara oksijen taşımadan hücredeki çeşitli katalitik reaksiyonlara kadar her ne kadar farklı ek rollere sahiplerse de, hepsinin ortak özelliği organizmanın içinde bulunduğu çevreden oksijeni alıp onun gereksinin duyduğu sistemlere taşınmasıdır. *Vitreoscilla* hemoglobini ise son yıllarda keşfedilen ilk prokaryotik hemoglobin olup, bu proteinin çeşitli endüstriyel proseslerdeki kullanım potansiyeli son yıllarda birçok araştırmacının konusunu oluşturmuştur. Bu bağlamda, özellikle düşük oksijen konsantrasyonlarının negatif etki yarattığı birçok biyoüretim olayında bu proteinin potansiyelinin olabileceği ileri sürülmüştür. Rekombinant protein üretiminden, çeşitli antibiyotiklerin üretimine ve zararlı aromatiklerin parçalanmasına birçok böyle proseste bu proteinin klonlanmış hücrelere önemli avantaj kazandırdığı saptanmıştır. Dolayısı ile son yıllarda literatüre girmiş olan “metabolik mühendislik” terimi kullanıldığında bu protein ilk sırada bahsedilen ajan olarak karşımıza çıkmaktadır.

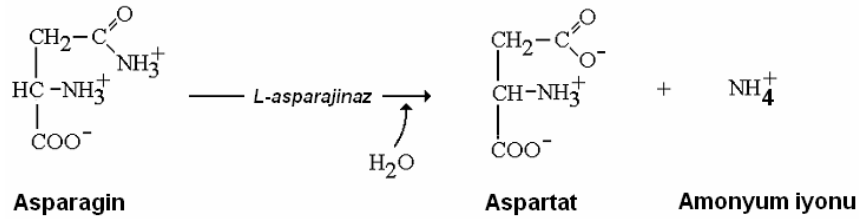
Bu çalışmada ele alınan diğer bir protein L-asparaginaz ise yine geniş bir canlı grubunda bulunmasına rağmen insan hücrelerinde bu enzimin aktivitesine rastlanmamıştır. Dolayısı ile bu enzimin geni (*ansB*)’nin insanlarda ya tamamen ortadan kalktığı ya da enzim kodlamayan bir pseudogene dönüştüğü sanılmaktadır. Bu enzimin önemi onun etkin bir anti-tümör ajanı olmasıdır. L-asparaginaz kanser kemoterapisinde yaygın kullanımı olan bir enzimdir. Bazı bitkilerde, hayvanlarda ve funguslarda bulunmasına rağmen bu çeşit aktiviteye sahip enzim sadece birkaç gram-negatif bakteride bulunmaktadır. Ancak, enzimin üretimi konusunda çok az literatür bilgisi mevcuttur.

Bu çalışmada, L-asparaginaz üretmeleri ile bilinen çeşitli gram-negatif bakterilerin değişik kültür şartları altında bu enzimi üretmelerinin çalışılmasının yanında, hem *vgb* ve hem de *ansB* geni klonlanmış bakterilerde bu enzimin sentezinin nasıl olduğu karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

1.1 L-asparaginaz

Günümüzde kanser kemoterapisinde etkin onkolitik etkisi ile bilinen birkaç enzim içinde L-asparaginaz en yaygın kullanılanıdır. L-asparaginaz enzimi çeşitli bitki, hayvan (özellikle rodentler), fungus ve bakteri türlerinde tespit edilmiş olmasına rağmen, insanlarda bu enzime rastlanmamıştır. Ancak, birçok organizmada belirlenen bu enzimin antitümör aktiviteye sahip olmadığı [1-3], bu tür bir aktiviteye (anti-neoplastik) sahip enzimin sadece birkaç tür gram-negatif bakteride olduğu belirlenmiştir. Bu bakterilerin başlıcaları *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi* [4, 5] *Escherichia coli* [6, 7], *Serratia marcescens* [8, 9], *Enterobacter aerogenes* [10, 11] ve *Pseudomonas aeruginosa*'dır [12, 13].

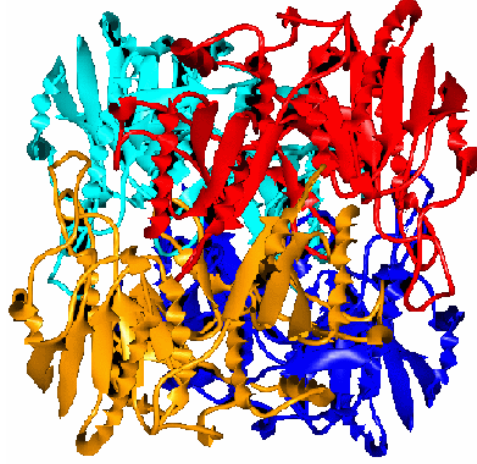
L-asparaginaz, L-asparagin L-aspartik asit ve amonyağa hidrolizini katalizler (Şekil 1.1). Hidrolitik tabiatlı bu reaksiyon sırasında L-asparaginaz, L-asparagin amino asitindeki amid bağına hidroliz etmektedir [10]. Bu reaksiyonun hem substratı (L-asparagin) hem de ürünleri (aspartat ve amonyak) bakterilerden memelilere kadar çoğu organizmada birçok metabolik süreçte önemli roller oynarlar.



Şekil 1.1. L-asparaginaz tarafından katalizlenen reaksiyon.

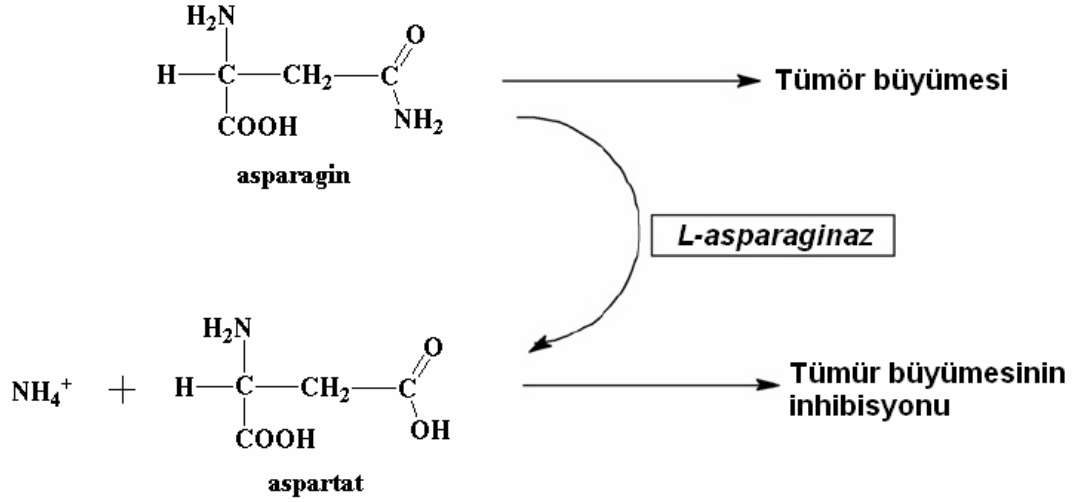
Tüm asparaginazlar genellikle dört alt üniteden meydana gelen ve 222 simetrisine sahip ve oldukça korunmuş bir katlanma ile homotetramerik yapıda olup, moleküler kütleleri 140-150 kDa arasında değişir. A, B, C ve D adı verilen dört adet aynı yapıda zincirden oluşmuş bu tetramer yapıdaki her monomer yaklaşık 330 amino asit uzunluğunda ve yaklaşık 35 kDa büyüklüğünde olup 14 adet β -plakalı tabaka ve 8 adet α -heliksten oluşmuşlardır (Şekil 1.2) [2,14,15,16]. Enzimin aktif konformasyonu tetramerik kuarterner yapı ile kazanılır ve iki çift dimerin “ara yüzü” aktif bölgelerin

oluşumunu sağlar. Her bir “dimer çifti” iki aktif domeyn oluşturduğundan, tetramerik yapıda dört adet aynı yapıda fakat kooperatif olmayan aktif bölge vardır.



Şekil 1.2. 222-simetrik L-asparaginaz II'nin tetramerik yapısı (Protein Data Bank).

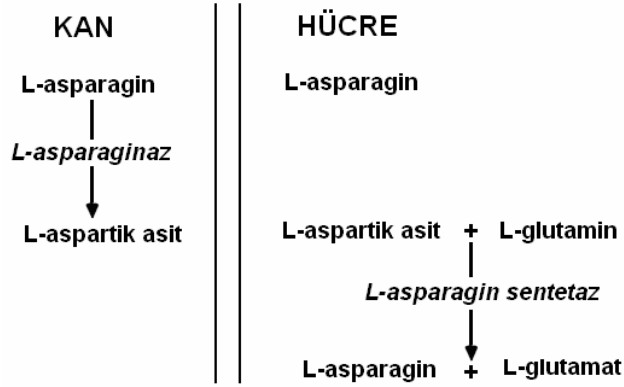
L-asparaginazın kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi bu enzimin L-asparagin amino asiti için oksotrof olan bu hücreleri bu amino asitten yoksun bırakmasına dayanır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Anti-kanserojenik bir ajan olarak L-asparaginazın etki mekanizmasının şematik gösterimi

Normal hücreler etkin bir *L-asparagin sentetaz* enzimine sahip olduklarından L-asparagin için prototrof olup böyle bir uygulamadan etkilenmezler (Şekil 1.4). L-asparagin metabolizması için normal hücreler iki çeşit enzime sahiptir. *L-asparagin sentetaz* amonyak kaynağı olarak glutaminin kullanıldığı bir reaksiyonla L-aspartik asitten L-asparagini yaparken glutamin de glutamata dönüşür. L-asparaginın yıkılması ise *L-asparaginaz* enzimi ile başlar. Ancak, L-asparaginaz sadece bazı bitki, bakteri ve kemiricilerde bulunurken insan dahil birçok memelide bulunmamaktadır. Birçok

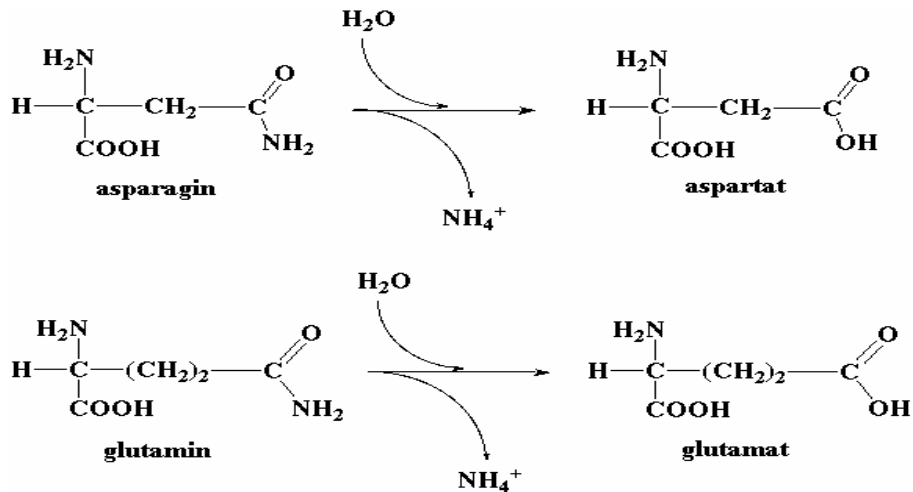
kanser hücresinde *L-asparagin sentetaz* aktivitesinin olmaması, L-asparaginazın etkin bir kanser kemoterapi ajanı olmasında rol oynamıştır.



Şekil 1.4. Normal hücreler için L-asparagin kaynağı. Bu hücrelerin L-asparagin kaynağı eksojen (besinlerden kana verilen) veya endojen (kendileri tarafından yapılan) kaynaklı olabilir. Kanserli hücrelerde L-asparagin sentetaz bulunmadığından bu hücreler tamamen eksojen kaynaklı L-asparagine bağımlıdır.

1.1.1 Enzimin Substratları ve Biyosentezleri

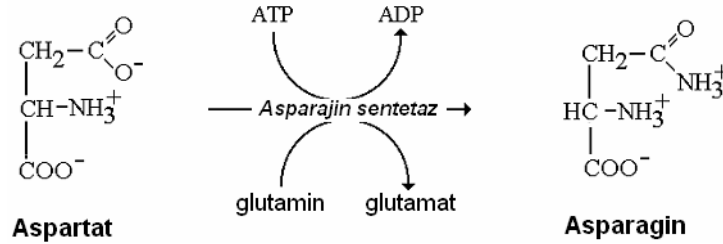
L-asparaginaz hem L-asparagin ve hem de L-glutamini substrat olarak kullanmaktadır (Şekil 1.5). Her iki amino asit de Trikarboksilik Asit (Krebs) döngüsünün ara maddelerinden sentezlenirler. Bitkilerde L-asparagin, protein sentezinde tekrar kullanılan azotun taşınması ve depolanması için en önemli amino asitlerden biri iken, insanda L-aspartat üre döngüsünde ve pürin pürimidin sentezinde önemli bir rol oynar. Enzim L-glutamini de substrat olarak kabul etmesine rağmen, bu amino asite karşı olan affinitesi L-asparagine karşı olandan 100 kat daha düşüktür [10].



Şekil 1.5. L-asparaginazın katalizlediği iki reaksiyon. Esas substratı olan asparagine ilaveten L-asparaginaz glutamini de substrat olarak kullanmaktadır. Ancak, L-asparaginazın glutamine olan ilgisi asparagine göre 100 kat daha düşüktür.

1.1.1.1 Asparagin biyosentezi

Asparagin esansiyel olmayan amino asitlerden olup glutaminin amino grubu sağlayıcısı olduğu bir transaminasyon reaksiyonu ile aspartattan oluşur (Şekil 1.6). Tersinir olmayan bu reaksiyon ATP bağımlı olup *asparagin sentetaz*ın katalitik etkisiyle yürütülür [17].

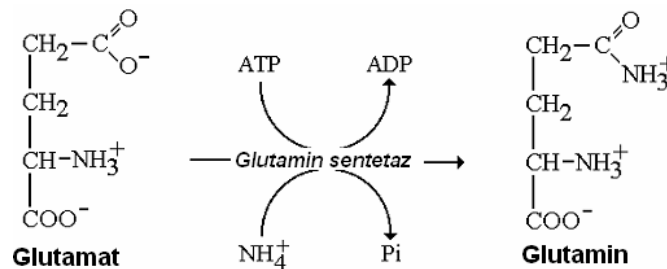


Şekil 1.6. Asparagin biyosentezi.

Kanser hücrelerinde bulunmayan ya da geninin çeşitli mutasyonları biriktirmesine bağlı olarak inaktif olan *asparagin sentetaz*dan dolayı bu hücreler asparagin bakımından oksotrofiktir. Yani kanser hücreleri dışsal bir asparagin kaynağına ihtiyaç duyarlar. Bu kaynak, ya beslenme sonucu kana verilerek bu hücelere ulaşan asparagin ya da asparagin bakımından prototrof olan normal hücrelerdir. Kanser hücrelerinin tersine normal hücreler etkin bir *asparagin sentetaz* aktivitesi gösterirler.

1.1.1.2 Glutamin biyosentezi

Asparagin gibi glutamin de esansiyel olmayan bir amino asit olup, ATP'nin kullanıldığı ve *glutamin sentetaz*'ın katalizlediği bir reaksiyonla glutamat ve amonyaktan oluşur (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Glutamin biyosentezi.

Asparagin ve glutaminin R grupları, su ile hidrojen bağları oluşturan fonksiyonel gruplar içerdiğinden, suda nonpolar amino asitlerden daha fazla çözünürler. Asparagin ve glutamindeki amid grupları bu amino asitlerin birbirleriyle, su ile veya proteine bağlı

diğer polar bileşiklerle hidrojen bağı oluşturmalarını sağlar; hidrofilik olan bu amino asitler, sulu çözeltilerde, globüler proteinlerin su ile etkileşim gösterebildikleri yüzeylerinde bulunurlar [7].

1.1.2 L-asparaginaz geni (*ansB*)

ansB'nin indüksiyonu ve represyonu çeşitli transkripsiyon faktörlerini içeren kompleks mekanizmalar ile kontrol edildiğinden L-asparaginaz sentezi karbon, azot kaynağı ve oksijen gibi besinsel ve çevresel faktörler tarafından regüle edilmektedir [17]. *E. coli* kaynaklı L-asparaginazın, anaerobik global transkripsiyon sinyali olarak davranan fumarat nitrat redüksiyon (FNR) proteini, aerobik respirasyon kontrol (ArcA) ve cAMP reseptör proteini (CRP) ile pozitif regüle olduğu ve dolayısı ile enzimin sentezinin anaerobiosis ile indüklenirken glukoz gibi katabolik baskılanma gösterdiği saptanmıştır [18,19,20]. Bu bağlamda, genin promotörü üzerinde cAMP reseptör proteini (CRP), ArcA ve FNR transkripsiyon aktivatörlerinin bağlanmasını sağlayan nukleotid dizi motifine sahip olduğu belirlenmiştir.

ArcAB bir ikili-komponent sistemi olup bu sistemle hücrenin içinde bulunduğu redoks durumu algılanır. ArcB bir membran proteini olup hücre içindeki redoks potansiyelini belirler. Hücrenin oksitlenmiş ortamı ArcB'nin aktivitesini baskımlarken, redüklenmiş bir ortam aktive eder. İkinci durumda ArcB otofosforile olur ve fosfatını ArcA'ya transfer ederek onu aktive eder. Fosforlanmış ArcA (ArcA-P) bir transkripsiyonel regülatör olarak davranır ve aerobik solunumda görev alan birçok genin kontrolünü sağlar. Hücre düşük bir oksijen seviyesinin bulunduğu ortamda olduğunu algıladığında, ArcA-P Krebs döngüsü genlerini baskımlarken, fermentatif yolların enzimlerini aktive eder. Anaerobiosis'in belirlenmesi FNR transkripsiyonel regülatör (aktivatör veya represör) proteini ile olur. Bu protein oksijen seviyesini, aktif sitesinde bulunan demirin oksidasyon durumuna (Fe^{+2} veya Fe^{+3}) göre belirler. Demir Fe^{+2} durumunda ise protein fonksiyonel olarak aktif, eğer demir Fe^{+3} 'ye oksitlenmiş ise protein inaktif durumda bulunur. Bu metal kofaktörün oksidasyon durumundan direkt olarak oksijen sorumludur. Anerobik solunum aktif bir FNR gerektirir. FNR'nin fonksiyonu ArcAB'ye benzer, fakat FNR düşük oksijen seviyelerinin algılanması ile aktive olur. Bu proteinin aktivasyonu fosforilasyonunu gerektirmez. CRP bölgesi transkripsiyon başlama bölgesinden -91, FNR bağlanma bölgesi ise transkripsiyon başlama bölgesinden -41 nukleotid akış-yukarıda bulunmaktadır. Genel olarak

periplazmik bölgede yoğunlaştığından, amino asit dizi analizleri bu enzimin 22 nukleotid uzunluğunda sinyal peptidine sahip olduğunu ortaya koymuştur. L-asparaginaz üretiminde glukoz tercih edilen bir karbon kaynağı olmasına rağmen, birçok gram-negatif bakteride bu enzimin geni (*ansB*) glukoz bağımlı karbon katabolit represyon göstermektedir. Ancak, karbon katabolit represyonunun varlığının ve seviyesinin bakteriden bakteriye değiştiği rapor edilmiştir [10, 21].

1.1.3 L-asparaginazın bulunduğu organizmalar

Anti-neoplastik L-asparaginazlar sadece *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemii*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa* türleri tarafından sentezlenmektedirler. Bu bakteriler bu enzimin genellikle sitoplazmik (L-asparaginaz I) ve periplazmik (L-asparaginaz II) olan iki farklı izozimine sahiptir. Sitoplazmik L-asparaginaz konstitütif bir enzim iken, periplazmik L-asparaginaz indüklenebilmektedir. Bu nedenle, L-asparaginaz I'in sentezi üreme ortamının koşullarından etkilenmez iken, L-asparaginaz II'nin sentezi ortam koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir [14, 19]. Bu iki izozim arasındaki diğer önemli bir fark, sadece periplazmik formun (L-asparaginaz II) etkin bir antitümör aktivitesine sahip olmasıdır. Bunun nedeninin, bu iki enzimin sahip olduğu farklı yapı ve biyokimyasal karakteristikler (ör. substratına karşı daha yüksek affinite göstermesi) olduğu sanılmaktadır [22].

Hücredeki periplazmik lokasyonu ve indüklenebilirliği ile L-asparaginaz I'den ayrılan L-asparaginaz II aynı zamanda farklı kuaterner yapı ve biyokimyasal karakteristiklere sahiptir. L-asparaginaz I homodimerik bir yapıda iken, L-asparaginaz II dört özdeş alt ünitelerden oluşan homotetramerik bir yapıya sahiptir [23]. Ayrıca, her iki izozime ait genler kromozom üzerinde farklı bölgelerde bulunurlar. L-asparaginaz I geni (*ansA*) ve L-asparaginaz II geni (*ansB*) farklı şekillerde regüle olurlar [18]. L-asparaginaz II aynı zamanda L-asparaginaz I'den farklı olarak glutamini de substrat olarak kullanmaktadır ve daha geniş bir substrat özgüllüğü göstermektedir. Ancak, L-asparaginazın glutamine olan ilgisi (10^{-3} M) L-asparagine (10^{-5} M) göre 100 kat daha düşüktür.

Bu enzim (L-asparaginaz II) literatürde *L-glutaminaz/L-asparaginaz* olarak da bilinmektedir [18, 24]. L-asparaginaz II'nin L-asparaginaz I'e göre 100 kat daha yüksek substrat (L-asparagin) affinitesine sahip olması da başka bir önemli farktır (L-

asparaginaz II için K_m 10^{-5} M iken L-asparaginaz I için bu değer yaklaşık 10^{-3} M'dır) [14, 24-26]. Mikroorganizma kaynaklı L-asparaginazlarla kıyaslandığında, Bitkisel L-asparaginazların daha düşük bir substrat affinitesine sahip oldukları görülür (10^{-2} M) [23]. Bu önemli farklardan dolayı bitki orijinli L-asparaginazlar ve tip I L-asparaginaz klinik farmakolojide kullanım alanı bulamamıştır. Dolayısı ile “kemoterapötik L-asparaginaz” teriminden L-asparaginaz II kastedilmekte olup, aksi ifade edilmedikçe bu çalışma boyunca L-asparaginaz terimi L-asparaginaz II için kullanılmıştır.

L-asparaginazın absorpsiyon sabitesi $E_{278}^{0.1} = 7.1$ ve izoelektrik noktadaki pH değeri 4.9 olup, aktivite gösterdiği pH aralığı 4.0-9.0 arasındadır. pH <4.0 ve > 12 aralığında enzim tamamen inaktif durumda bulunur. L-asparaginaz termostabil bir enzimdir ve optimal aktivite 25-37 °C, maksimum aktivite ise 50-60 °C arasında ve pH 8.6 da gözlenir [2]. Enzim alternatif substrat olan 5-diazo-4-oxo-L-norvalin tarafından kompetatif olarak inhibe edilir [27, 28].

1.1.4 Bakteriyel orijinli diğer onkolitik enzimler

Enzimlerin kanser kemoterapi ajanları olarak kullanılması son yıllarda, teknolojinin gelişmesine paralel olarak uygulanmakta olan bir tedavi seçeneği olmuştur. Enzimler substratlarına karşı yüksek ilgi ve özgüllükleri ve reaksiyonlarını çok hızlı gerçekleştirmeleri ile etkili kemoterapötik ajanlar olarak tercih edilmektedirler [29]. Bir çok enzim, kemoterapi ajanı olarak Gaucher hastalığı, kistik fibrosis, fenilketonuria gibi genetik hastalıklar ve bazı enfektif hastalıkların ve düzensizliklerin tedavisinde kullanılmakta olsa da, kanser kemoterapisinde yaygın kullanılan enzimlerin sayısı bir kaçını geçmemektedir. Bu enzimlerin başlıcaları, hepsi de bakteriyel orijinli olan L-lizin- α -oksidaz (EC 1.4.3.14), metiyonin gama-lyaz (E.C.4.4.1.11), arginin deaminaz (EC 3.5.3.6) ve çalışmaya da konu teşkil eden L-asparaginaz (EC 3.5.1.1)'dir.

1.1.4.1 L-lizin- α -oksidaz

L-lizin- α -oksidaz, esansiyel bir amino asit olan ve vücutta sentezlenmeyen L-lizini süpürebilme yeteneğinde olan bir enzimdir. L-lizin- α -oksidaz, L-lizini amonyak, hidrojen peroksit ve α -ketoaminokaproik asite parçalar [30]. Tümör hücreleri bazı metabolitlerin seviyesine bağlı olarak bu enzime seçici bir şekilde duyarlılık gösterirler.

Bu amino asidi ortamdan süpürebilme yeteneğine sahip olan L-lizin- α -oksidaz enzimi onkolojide terapötik enzim olarak kullanılması hedeflenen bir enzimdir [31].

1.1.4.2 L-metiyonin- γ -liyaz

L-metiyonin γ -liyaz (MGL, EC 4.4.1.11) piridoksal 5'-fosfat bağımlı bir enzim olup L-metiyonin amino asitinin α -ketobutirat, metantiyol ve amonyağa γ -eliminasyonunu katalizler. Son yıllarda bazı primer tümörlerin ve kanser hücre hatlarının metiyonine bağımlılığının keşfi ile bu enzime olan ilgiyi arttırmıştır. Daha sonra enzimin etkin bir anti-tümör ajan olduğu belirlenmiştir [32]. Büyüklüğü 170 kDa olan L-metiyonin gama-liyaz (E.C.4.4.1.11) *Pseudomonas putida*, *Aeromonas* sp., *Citrobacter freundii*, *Entamoeba histolytica*, *Clostridium sporogenes*, *Trichomonas vaginalis* ve *Brevibacterium linens* türlerinde sentezlenen bir enzimdir. Kanser hücrelerinin metiyonin ihtiyacı normal hücrelerle karşılaştırıldığında çok daha yüksektir. Bu enzim tümör hücrelerinin ihtiyaç duyduğu metiyonin amino asitini parçaladığı için kemoterapik bir önem taşımaktadır [33-36].

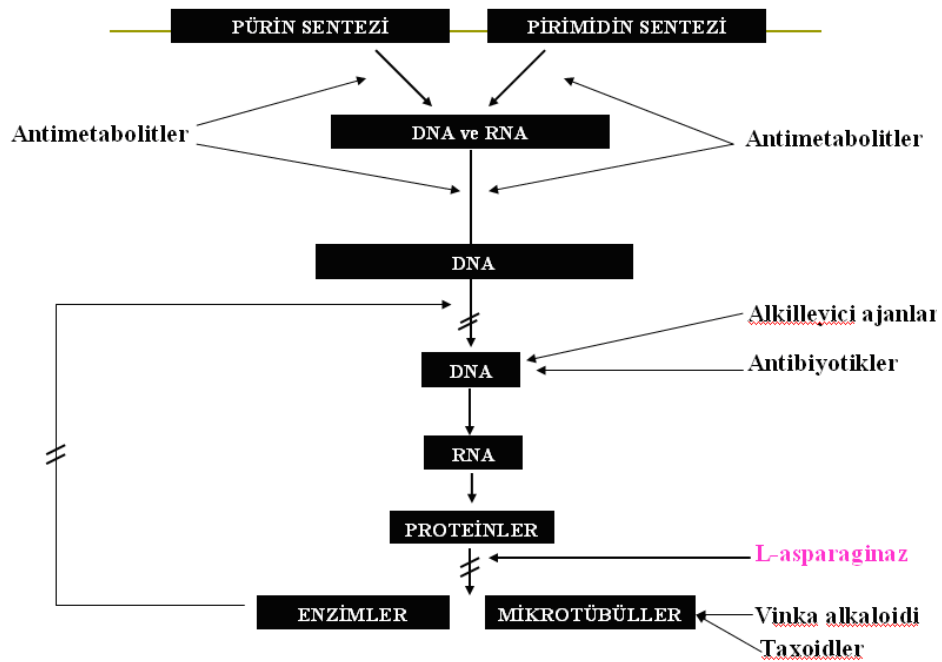
1.1.4.3 Arginin deiminaz

Arginin deiminaz yine bazı gram-negatif bakterilerde bulunan bir enzim olup arginin amino asitinin imin hidrolizini gerçekleştirerek bu amino asiti sitrüllin ve amonyağa çevirir. *Arginin deiminaz* enzimi özellikle üre döngüsündeki argininosüksinat sentetazdan yoksun olmaları sebebiyle arginin için oksotrofik olan insan melanoma ve hepatoselüler karsinoma hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder [37]. İnsanlarda üre döngüsü sonucu sitrüllinden iki basamak sonucu sentezlendiğinden arginin esansiyel bir amino asit değildir. Bir seri farklı tümör hücrelerinin arginini sentezleyememelerinin keşfi ile arginin dönüştürücü enzimin bu amino asiti gerektiren kanserlerde etkili birer inhibitör olabileceği gösterilmiştir [37]. Bu enzimin aynı zamanda etkin bir anti-anjiyojenik ajan olabileceği rapor edilmiştir [38]. Anaerobik transkripsiyonel regülatör olan ANR düşük oksijenli ortamlarda çoğaltılan *Pseudomonas aeruginosa*'da bu enzimi ve denitrifikasyon yolunu indüklemektedir. *E. coli*'nin homolog regülatörü FNR geni (*fnr*), ANR (*anr*) geni bakımından mutant olan *Pseudomonas aeruginosa*'ya klonlandığında FNR proteini bu bakterinin nitrat üzerinde anaerobik büyüme ve

çoğalması için ANR'ye benzer fonksiyon gösterirken, arginin deiminaz enziminin anaerobik indüksiyonunu sağlayamaz [39].

1.1.5 L-asparaginaz ve anti-kanser mekanizması

Antineoplastik ilaçlar kanserin tedavisinde başvurulan üç potansiyel yaklaşımdan biridir. Diğer ikisi *cerrahi müdahale* ve *radyasyon terapisi*dir. Kanser ve çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar doğal veya sentetik orijinli olabilirler (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Genel kemoterapötik ajanların etki mekanizmaları.

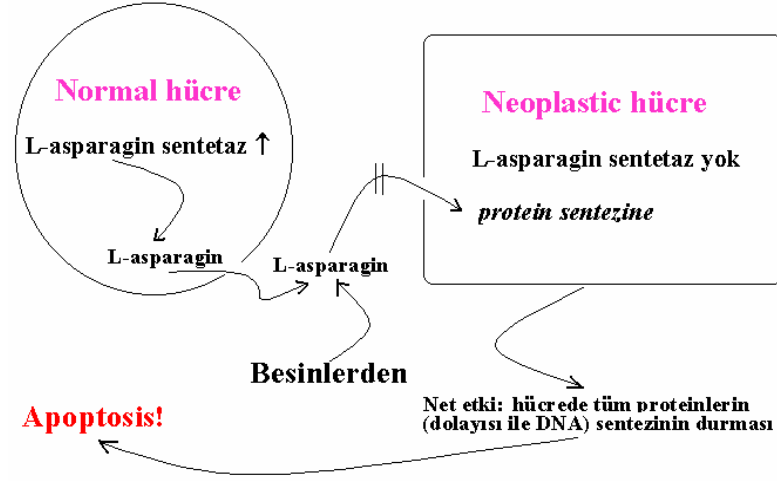
Antimetabolitler (folat antagonistleri ve pürin ve pirimidin analogları) ve alkilleyici (hardal gazı ve siklofosfamid) ajanların çoğu sentetik kimyasallar olup DNA yapıtaşlarının sentezini veya DNA replikasyonunu bloke ederek etki gösterirken, bitki alkaloidleri genellikle mikrotübüllerin oluşumunu, L-asparaginaz ise hücredeki tüm protein ve enzimlerin sentezini bloke eder. Antineoplastikler lösemiler ve yaygın bir metastazın görüldüğü ve dolayısı ile cerrahi ve radyasyon terapisinin tek başına etkin olmadığı kanser durumlarında temel ajanlar olarak kullanılırlar. Yaygın olarak bu ilaçlar cerrahi müdahale ve radyasyon terapisi ile kombine kullanılırlar. Antineoplastiklerin çoğu hücre döngüsünün farklı fazlarında etki gösterirler. Birçoğunun etkisi ise hücre döngüsüne özel değildir. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan 100'ün üzerinde kemoterapi ajanı olup, bunların çoğu doğal olmayan kimyasal maddelerdir. L-

asparaginaz enzimi bu tür etkisi ile bilinen ancak doğal olan bir kaç çeşit enzimden en yaygın kullanılanıdır [40].

Daha önce de belirttiğimiz gibi L-asparaginaz enziminin anti-kanser etkisi sirkülasyonda bulunan L-asparagin amino asidini hızlı bir şekilde yıkmaya dayanır. Bu etkisini sadece kanserli hücrelerde gösterirken normal hücrelerde bu etki görülmez. Normal hücreler kendi asparagin amino asidini aktif şekilde üreten *asparagin sentetaz* enzimine sahiplerdir, ancak, kanserli hücreler ya bu enzimden yoksunlardır ya da normal hücrelerdeki seviyede sentezleyemezler.

Hücre döngüsünün Go fazı dormant faz olup, bu fazda hücreler bir nevi dinlenme (pasif) evresindedir ve kemoterapiye duyarlı değildirler. Hücre döngüsünün post-mitotik fazı olan G1 fazında DNA sentezi için birçok enzim gerekli olduğundan L-asparaginazın en etkin olduğu faz bu fazdır [40, 41]. Bu fazda spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Normal hücrelerin tersine L-asparagin için oksotrof olan kanser hücreleri büyümek ve çoğalmak için dış kaynaklı L-asparagine ihtiyaç duyarlar. Kanser hücrelerinin bu kaynağı L-asparaginazla engellendiğinde hücrelerde protein sentezi olmayacağı için bir sonraki S fazında DNA sentezi de gerçekleşmez ve bunun sonucu hücreler programlı hücre ölümüne (apoptosis) yönelirler. RNA ve spesifik proteinlerin sentezlendiği pre-mitotik G2 fazı L-asparaginazın etkin olduğu diğer bir fazdır. Bu fazda DNA sentezi durur, mitotik iğ ipliklerinin yapısal malzemesi olan mikrotübüller dahil olmak üzere diğer proteinlerin ve RNA'nın sentezi ise devam eder [42]. Enzim, asparagini aspartat ve amonyağa çevirir ve kanserli hücreleri büyümek ve bölünmek için ihtiyaç duydukları bu amino asitten yoksun bırakır. Kanserli hücrelerde, sağlıklı hücrelerin aksine L-asparagin sentezi yeterince yapılamadığından kanserli hücreler dışardan alınan veya sağlıklı hücreler tarafından yapılarak kana verilen asparagine bağımlıdırlar (Şekil 1.9).

Dolaşımda serbest bulunan bu amino asitin, enjekte edilen L-asparaginazla yıkılması sonucu tümör hücresinde protein sentezi ve sonuçta DNA ve RNA sentezi yapılamaz. Böylece, hücre büyümesi durur. Bu uygulama sonunda tümörlerde küçülme gözlenmiş ve hücrelerin belli bir süre sonra normal apoptosis ile ortadan kalktıkları saptanmıştır [43]. L-asparaginazın bu etkisinin özellikle hücre döngüsünde protein sentezinin gerçekleştiği G1 fazında olduğu ve kanserli hücreleri G1 fazında tutuklayıp apoptosise sürüklediği ileri sürülmüştür [41, 42]. G1 fazı metabolizma için gerekli maddelerin sentezlendiği kritik bir aşamadır.



Şekil 1.9. Normal ve kanserli hücrelerin L-asparagin kaynakları.

Bu enzim tipik olarak *Escherichia* veya *Erwinia* cinsine ait bakteri türlerinin kültürü ile üretilmektedir. L-asparaginaz terapötik bir ürün olarak Amerika’da Enzon, İngiltere’de Porton, Almanya’da Bayer ve Japonya’da Kyowa ilaç firmaları tarafından üretilir. Bu firmaların bu enzim için kullandıkları ticari isimler *elspar*, *oncaspar* ve *erwinaz*dır (Çizelge 1.1). Bu amaç için yüksek L-asparaginaz üreten suşların izole edilip seçilmesi için oldukça efor sarfedilmiş fakat en iyi suşların (*E. carotovora* SCR 193, *E. carotovora* 268M, *E. chrysanthemi* NCPB 1066) bile istenen seviyelerde L-asparaginaz üretiminden uzak oldukları saptanmıştır.

Çizelge 1.1. L-asparaginazı üreten başlıca firmalar ve enzim için kullandıkları generik isimleri.

Ticari isimleri	Üretici firma	Kaynağı
Oncaspar ^(R)	Enzon	<i>E. coli</i>
Elspar ^(R)	Merck	<i>E. coli</i>
Crastinin ^(R)	Bayer	<i>E. coli</i>
Kidrolase ^(R)	Rhone-Poulenc	<i>E. coli</i>
Leunase ^(R)	Kyowa	<i>E. coli</i>
Erwinase ^(R)	Speywood	<i>Erwinia chrysanthemi</i>

Kemoterapi ajanları vücudun normal hücreleri üzerinde de belli düzeyde sitotoksik etki gösterirler. Özellikle, tümör hücreleri gibi yüksek çoğalma aktivitelerine sahip mide-bağırsak epitel hücreleri, saç kökü ve kemik iliği hücreleri bu tür uygulamadan en çok etkilenen hücre gruplarıdır. Bu nedenle, kemoterapi görmüş bireylerin çoğunun ortak özelliği mide-bağırsak rahatsızlığı, saç dökülmesi ve bağışıklık sisteminin zayıflamasıdır. Kemoterapi sürecinde sadece L-asparaginazın kullanıldığı hastalarda ise hafif şiddette yan etki gözlenmiştir. Bu nedenlerle L-asparaginaz enzimi onkolitik ajanlar içinde daha çok tercih edilmektedir [44]. Çocukluk çağı akut

lenfoblastik lösemi tedavi protokolleri daima L-asparajinaz enzimini içeren, birçok ilaçtan oluşan kombinasyon kemoterapisi ile tedavi edilir. Bu tedavinin yan etkileri alerji, hiperglisemi, plazma proteinlerinin eksikliği, trombotik ve hemorajik diyatez, lipid anomalileri ve pankreatiti içerir [45]. L-asparaginazın tedavisinde önemli bir avantaj onun kemik iliğini deprese etmemesidir. En sık görülen yan etkisi, pıhtılaşma faktörlerinin ve antitrombotik faktörlerin sentezinin inhibisyonuna bağlı pıhtılaşma bozukluklarıdır (önce tromboz, sonra kanama) [46]. Değişik bakterilerden gelen L-asparaginazın sitotoksitesisi ve yan etki gösterme özelliklerinde farklılık görülmüştür. Bu çalışmalar sonucunda *Escherichia coli* kaynaklı L-asparaginazın özellikle kemoterapinin ilk basamaklarında etkin olduğu *Erwinia* türlerinden elde edilen enzimin ise daha çok alerjik bünyeli hastalar için uygun olduğu belirlenmiştir [3]. L-asparaginazın toksik etkisi, kısmen bu enzimin aynı zamanda bir glutaminaz olarak davranmasından kaynaklanmaktadır. Ancak, L-asparagin amino asidine nazaran bu enzimin glutamine olan ilgisinin oldukça düşük olması bu çeşit bir yan etkinin çoğu zaman düşük seviyede seyretmesi ile sonuçlanır. Özellikle *Erwinia carotovora* kaynaklı L-asparaginazın düşük glutaminaz aktivitesi ile kanser terapisi sürecinde *E. coli* enzimine göre çok daha az yan etki gösterdiği belirlenmiştir [3, 47]. Dolayısı ile L-asparaginaz kullanımındaki en önemli sorun bazı hastalarda çeşitli immünojenik yan etkiler göstermesidir. Ancak, son yıllarda özellikle *polietilen glikol (PEG)* başta olmak üzere çeşitli maddelerin enzime bağlanarak enzim üzerindeki bu immünojenik aktif epitoplara gizlenmesi suretiyle bu tür yan etkilerin önemli ölçüde bertaraf edilebileceği gösterilmiştir [48].

L-asparaginazın plazma yarı ömrü 12-24 saat arasında değişmektedir. Mikrobiyal orijinli bu proteine karşı insanda gelişen immün cevabı ortadan kaldırmak ve hem de enzimin plazma yarı ömrünü arttırmak için son yıllarda enzim PEG ile konjuge edilerek verilmektedir [48]. Asparaginazın bu modifiye haline PEG-asparaginaz denilmektedir ve bu formda enzimin serum yarı ömrü yaklaşık 6 gün olarak bildirilmiştir. Bu şekilde modifiye edilmiş enzimin immünojenitesinin daha az ve uzamış absorpsiyon nedeniyle yarılanma ömrünün konjuge edilmemiş enziminden 3-5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. PEG kullanılarak yapılan modifikasyonun, muhtemelen enzimi serumdaki proteazlardan ve antikorların bağlanmasından koruduğu sanılmaktadır [49].

Günümüzde biyoteknolojik yollarla üretilen ilaçlar hâlihazırda dünya ilaç üretiminin %15'ini oluşturmaktadır. 2007-2008 yıllarında bu oranın %20'ye çıkması beklenmektedir. Piyasaya çıkan her 50 ilaçtan 10-15'i biyoteknolojik yöntemlerle

geliştirilmiş ve üretilmiştir. 1990'ların başından itibaren 100 adet biyoteknolojik yollarla geliştirilmiş ilacın klinik deneylerine başlanmıştır. Mevcut ilaçlarla tedavisi mümkün olmayan bazı ilaçlar için biyoteknolojik yollarla geliştirilmiş 200-300 bileşim tedavide kullanılmaktadır. İlaçlarla ilgili alınan patentlerin %63'ü ABD ve Kanada, %25'i Avrupa, %7'si Japonya'da ve kalan %5'i diğer ülkelerde geliştirilmiş ilaçlara aittir [50].

1.1.6 L-asparaginaz sentezi

Asparaginaz'ın fizyolojik fonksiyonu ve moleküler seviyede regülasyonu tam olarak bilinmemektedir. Karbon katabolit represyon, nitrojen ve oksijenle ileri derecede regüle olan bu enzimin üretimi için farklı karbon, azot ve atmosferik içeriğe sahip ortamlar kullanılmış, farklı bakterilerde ve hatta bir bakterinin aynı türünde bile farklı sonuçlar elde edilmiştir. Glukoz bu enzimin üretiminde en yaygın kullanılan karbon kaynağı olmasına rağmen, özellikle bazı bakterilerde bu karbonhidrat en yüksek katabolit inhibisyon seviyesine sahiptir [11, 13, 17]. Dolayısıyla en azından bazı bakteriler için alternatif karbon kaynakların araştırılması bu enzimin ticari ölçeklerde üretimi için bir gerekliliktir. Aynı durum, farklı azot kaynakları için de söz konusudur [11, 12]. L-asparaginazın oksijenle regülasyonu konusunda da birbiri ile çelişen sonuçlar rapor edilmiştir. Bütün bunların nedeni tam olarak bilinmemektedir. Bu konuda yapılmış olan başlıca çalışmaların birinde *Enterobacter aereogenes*'in L-asparaginaz üretimi için gerekli olan besin ve oksijen koşulları çalışılmış ve bu enzimin üretimi için en uygun karbon ve azot kaynakları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmadaki bulgulara göre, en iyi karbon kaynağı olarak sodyum sitrat, en iyi azot kaynağı olarak da diamonyum hidrojen fosfat belirlenmiştir [17].

E. coli'de L-asparaginaz sentezi üzerine glukozun etkisinin çalışıldığı bir başka çalışmada [51], % 5'lik glukoz içeren büyüme ortamı da enzim sentezinin hemen hemen tamamen baskılandığı saptanmıştır. Burada, L-asparaginaz sentezini inhibe eden tek faktörün, glukozun neden olduğu hücre içi cAMP seviyesindeki azalış olmadığı, ancak, oluşan asit ortamının da bunda etkili olduğu ileri sürülmüştür. Enzim sentezinin azotla regülasyonu konusunda ise, çözünür azot kaynağı olarak L-asparagin, L-glutamin ve L-glutamik asit gibi amino asitler ve üre enzim sentezini stimüle ederken, amonyum bileşiklerinin enzim sentezini baskıladığı saptanmıştır [17, 52]. Yapılan bir araştırmada glukoz ve amonyum iyonlarının ortama eklenmesi ile L-asparaginaz üretiminin

baskılandığı belirlenmiş [53], *Klebsiella aerogens* ile yapılan farklı bir çalışmada ise glukozun bu bakteride L-asparaginaz üretimini inhibe etmediği görülmüştür [21].

Atmosferik içeriğin L-asparaginaz sentezi üzerine olan etkisi konusunda da karbon ve azot kaynakları gibi farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Bazı bakterilerde iyi bir havalandırmanın L-asparaginaz sentezini indüklediği belirtilirken [7], diğerlerinde baskıladığı gözlenmiştir [11, 14]. Örneğin, *E. coli*'de enzim sentezinin anaerobik koşullarda aerobik koşullardakinden 100 ile 1000 kat kadar daha fazla olduğu rapor edilirken [14], aynı bakteri ile yapılan bir başka çalışmada artan çözünmüş oksijen seviyesine paralel olarak L-asparaginaz sentezinin de arttığı gösterilmiştir [54].

L-asparaginaz aktivitesi üzerine çeşitli divalent metal katyonlarının değişik konsantrasyonlarının etkileri üzerine yapılan çalışmalarda Mangan ve çinkonun bütün konsantrasyonları enzimi tamamen inhibe ederken bakırın sadece yüksek konsantrasyonlarda enzim sentezini baskıladığı saptanmıştır [55, 56]. Demirin ise düşük konsantrasyonlarda enzim aktivitesini arttırdığı, yüksek konsantrasyonlarda ise aktiviteyi inhibe ettiği belirlenmiştir. Demir gibi, nikelin de düşük konsantrasyonu enzim aktivitesini indüklerken, yüksek konsantrasyonlarının aktiviteyi inhibe ettiği belirlenmiştir. Kobalt ve magnezyum kullanılan konsantrasyonların hepsinde enzim aktivitesini arttırıcı bir rol aldıkları saptanmıştır [57].

Günümüzde etkin bir kemoterapi ajanı olarak kullanılan L-asparaginazın ilaç sektöründeki kullanımda olan çeşitli formları Oncaspar, pegaspargase, colaspase, elspar...vs. değişik şekilde isimlendirilmiştirler. Toz halinde satılan L-asparaginazın 100gr'lık kutusunun hastaya maliyeti 25 dolar olmaktadır. Asparaginase "Medac" 10000 UI formu ise 128 dolara satın alınabilmektedir [58].

Bu çalışmada, başka bir grup tarafından (Socorro Durán-Vargas) *ansB* geni klonlanmış *Escherichia coli* ve bizim *ansB* geni taşıyan pB-PGA plazmidini klonladığımız *Enterobacter aerogenes* bakterileri ve *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*'in *vgb* klonlanmış rekombinantlarındaki gen (*ansB* geni) regülasyonu ve enzim sentezi çalışılacaktır. Kanser kemoterapisinde antineoplastik bir ajan olarak kullanılan L-asparaginaz enziminin sadece birkaç Gram-negatif bakteri tarafından üretildiği, bu enzimin geninin (*ansB*) oksijenle yüksek derecede regüle olduğu ve genin, aynı zamanda, karbon katabolit represyon gösterdiği daha önce belirtilmişti. VHb sentezleyen rekombinant bakterilerin oldukça farklı oksijen alım yeteneklerinin L-asparaginaz enziminin üretiminde avantaj sağladığı daha önce grubumuzun yaptığı çalışmalarla kanıtlanmıştır [11, 13].

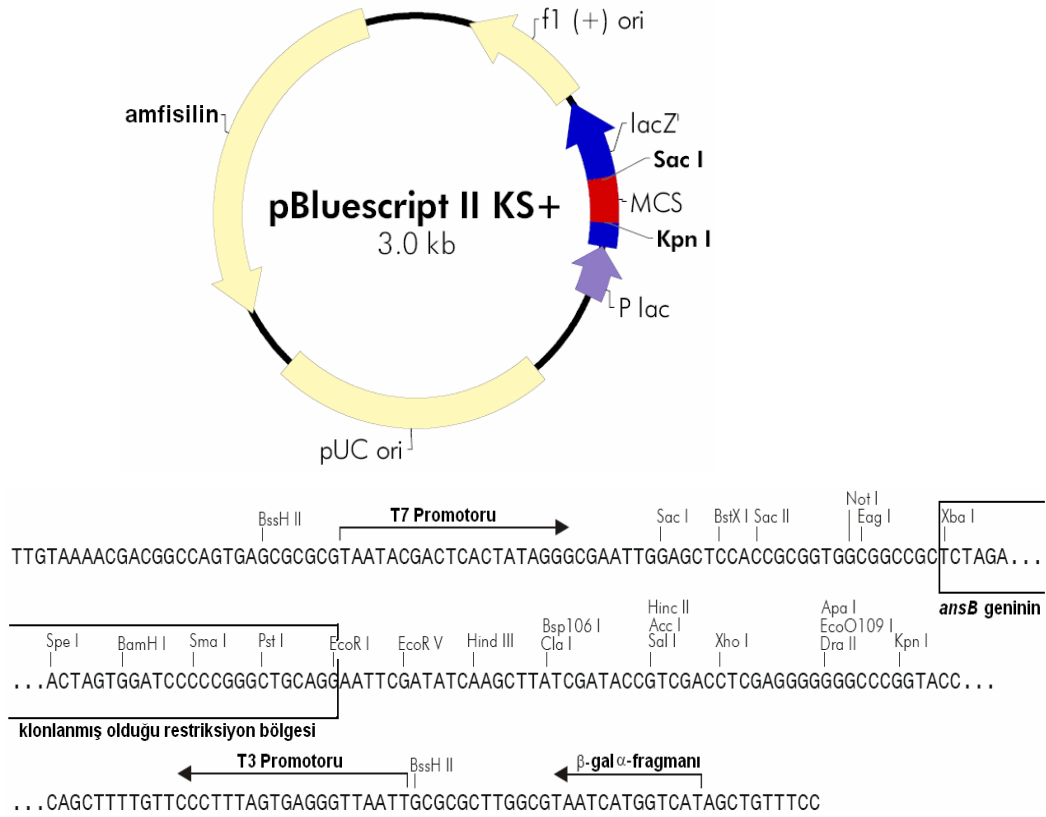
1.1.7 *ansB* klonlama çalışmaları

L-asparaginazın moleküler yapısı, katalitik özellikleri ve klinik yönleri kapsamlı çalışılmalarına rağmen, bu enzimin geninin (*ansB*) klonlandığı ve enzim sentezinin çalışıldığı çalışmalar az sayıdadır. Bu sınırlı sayıdaki çalışmalardan ikisinde (59, 60) kullanılan vektörler bu çalışmada da kullanılmışlardır. Başka iki çalışmada ise *Erwinia carotovora*'ya ait L-asparaginaz geni *E. coli*'ye klonlanarak ekspresyonu yapılmış [15] ve enzimin kinetik özellikleri ve kararlılığı araştırılmıştır.

1.1.8 Bu çalışmada kullanılan *ansB* klonları

Bu çalışmada üzerinde *ansB* geni taşıyan iki çeşit vektör kullanılmıştır. Bu vektörlerden biri faj ve plazmidin özelliklerini bir arada taşıyan bir *fajmid* olup “*pBluescript SK(+)* *fajmid*” olarak adlandırılmıştır (Şekil 1.11). *pBluescript*[®] II fajmidler (bir faj replikasyon orijinini taşıyan plazmidler) gen klonlama ve dizi analizlerinde kolaylık sağlamak için dizayn edilen vektörlerdir. Bu fajmidler 21 farklı restriksiyon enzimi ile kesilebilen multi klonlama bölgesine (MCS) sahiptir. Vektör üzerine RNA'nın *in vitro* sentezini mümkün kılan T7 ve T3 faj RNA polimerazları tarafından tanınan promotorlar yerleştirilmiştir. Hangi promotorun kullanılacağı klonlama bölgesine yerleştirilen genin hangi zincirinin transkripsiyonunun yapılacağına bağlıdır. Bu çalışmada kullanılan ve üzerinde *ansB* geni taşıyan pB-PGA plazmidinin oluşturulmasında kullanılan *pBluescript* II fajmidinin halkasal haritası ve özelliklerinin listesi Şekil 11'de verilmiştir. MCS, T7 ve T3 RNA polimeraz promotor dizileri *lacZ* gen fragmanının N'-ucunda bulunmaktadır. *pBluescript* II fajmidinde β -galaktozidaz kodlayan genin 131 amino asit kodlayan kısmı bulunmaktadır. Ancak bu kodlama bölgesi MCS'nin araya sokulması ile iki parçaya ayrılmıştır (başlangıç metiyonin kodonundan *EcoR* I bölgesine kadar olan ve 36 amino asit kodlayan bölge). MCS bölgesine herhangi bir genin yerleştirilmediği *pBluescript* II fajmidleri aktarıldıkları bakterilerde uygun besi ortamında (100 μ g/ml amfisilin, 80 μ g/ml taze X-gal ve 20 mM IPTG içeren LB agar plakalar) mavi koloniler oluştururken, bu bölgede bir genin yerleştirilmiş olduğu *pBluescript* II fajmidlerinin klonlandığı bakteriler ise beyaz (renksiz, orijinal koloni rengi) koloniler oluştururlar. Bu bakterilerde *lacZ* gen fragmanı ortadan bölündüğünden fonksiyonel bir β -galaktozidaz sentezlenememekte ve dolayısı ile besi ortamında bulunan kromojenik substratlar (IPTG, X-gal) renkli (mavi) ürünlere

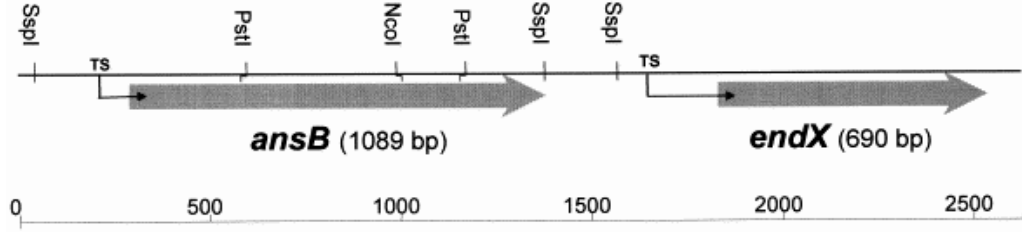
dönüştürülemede, bunun sonucu koloniler normal orijinal renklerinde oluşmaktadır.



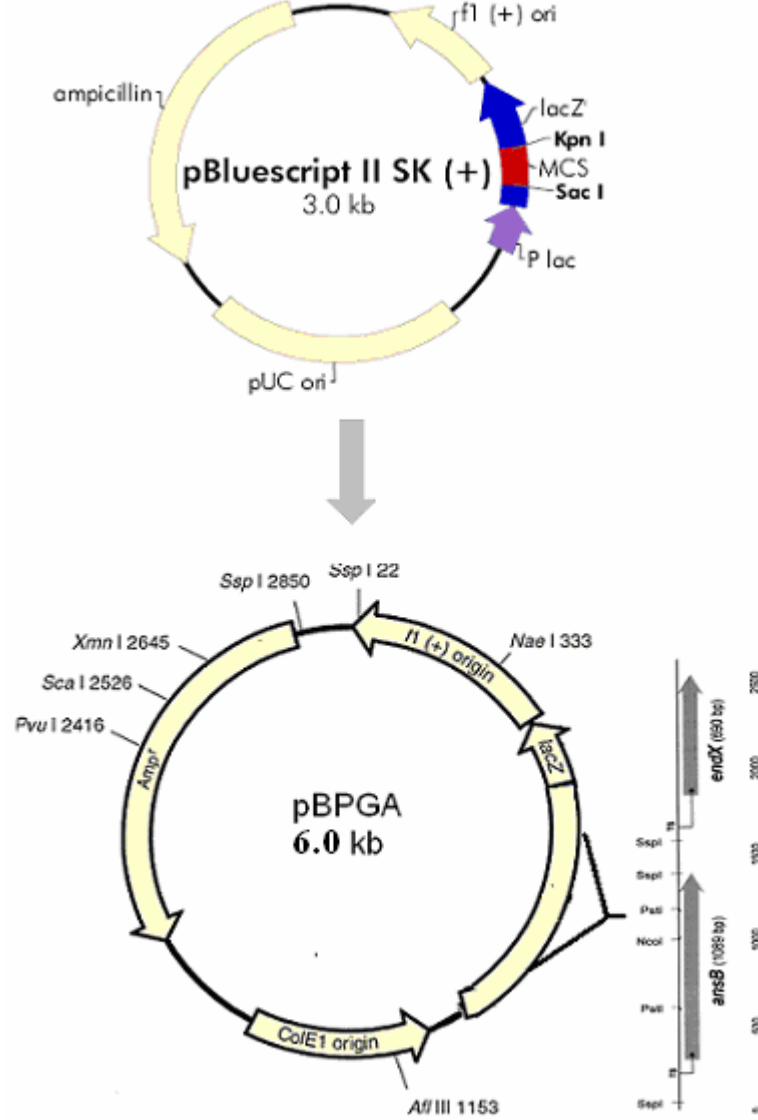
Şekil 1.50. ansB geninin klonlanmasında kullanılan pBluescript II fajmidi.

pBluescript II (+) ve (-)'de MCS iki farklı oryantasyon (yön)'de bulunur. Fajmidin bu formları pBluescript II KS (+/-) ve pBluescript II SK (+/-) olarak adlandırılırlar. KS oryantasyonunda Kpn I restriksiyon bölgesi lacZ promotoruna en yakın, Sac I restriksiyon bölgesi ise en uzak konumda bulunur. SK oryantasyonunda ise Sac I restriksiyon bölgesi lacZ promotoruna en yakın, Kpn I restriksiyon bölgesi ise en uzak konumdadır. pBluescript II (+)'da fl replikasyon orijini saatin ters yönünde iken, pBluescript II (-)'de saat yönünde yerleştirilmiştir (pBluescript® II Phagemid Vectors, Stratagene, Instruction Manual 2003).

pBluescript SK(+)'in MCS'ine klonlamada Pseudomonas fluorescens genomundan izole edilmiş ve üzerinde L-asparaginazı kodlayan 1089 baz çiftinden oluşan gen (ansB) 3-kb'lık bir genomik fragmanla beraber kullanılmıştır. Bu fragman aynı zamanda 690 baz çiftinden oluşan ikinci bir geni (bir endonukleaz, endX) de üzerinde taşımaktadır (Şekil 1.11).



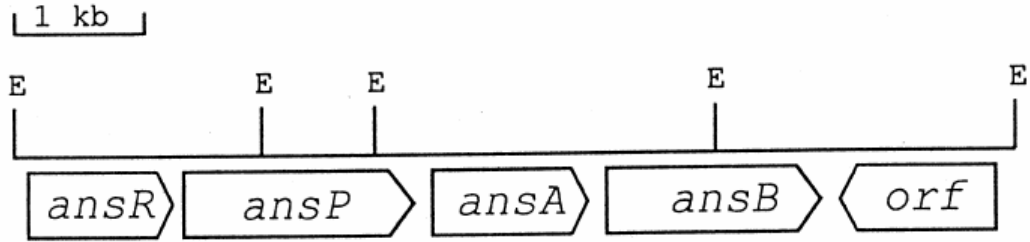
Şekil 1.11. *Pseudomonas fluorescens* genomundan izole edilen ve üzerinde pB-PGA taşıyan 3-kb büyüklüğündeki genomik fragmanın genetik ve fiziki haritası. Bu fragman bir tanesi asparaginaz II geni (*ansB*) diğeri fonksiyonu bilinmeyen bir endonukleaz (*endX*) kodlayan iki adet gen içermektedir [59].



Şekil 1.12. pB-PGA plazmidinin oluşturulması

Toplam yaklaşık 1.7-kb büyüklüğünde ve üzerinde komple *ansB* genini ve regülatör bölgesini içeren *XbaI/EcoRI* fragmanı, pBluescript SK(+)'in multi klonlama bölgesinde (MCS) yer alan aynı restriksiyon enzimleri ile (*XbaI/EcoRI*) kesilmiş bölgesine klonlanmıştır ve toplam 6.0-kb büyüklüğündeki plazmide “pB-PGA” adı verilmiştir (Şekil 1.12) [59].

Bu çalışmada kullanılan ikinci rekombinant sistem [60] ise üzerinde *ansB* geni taşıyan ve pAHZ12 olarak adlandırılan bir vektörün klonlanmış olduğu *E. coli* HB101 ile gerçekleştirilmiştir. Burada *ansB* genini içinde bulunduran 7 kb'lık *Rhizobium etli* genomik fragmanı diğer üç adet gen daha taşıyan bir operondan oluşmaktadır. Diğer bir deyimle bu genomik fragman üzerinde L-asparaginazı kodlayan *ansB* geni, bu genin regülatörünü kodlayan *ansR* geni, aspartazı kodlayan *ansA* geni ve L-asparagin permeazı kodlayan *ansP* bulunur (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. pAHZ12 plazmidinde bulunan ve üzerinde 7-kb'lık komple *ans* operonunun bulunduğu *R. etli*'ye ait genomik fragman [60]. E, *EcoRI*; *ansB*, L-asparaginaz geni; *ansR*, regülatör geni; *ansA*, aspartaz geni; *ansP*, L-asparagin permeaz; *orf*, açık okunma çerçevesi.

R. etli'deki durumun tersine *E. coli*'de asparaginaz ve aspartaz genleri aynı operonda bulunmazlar. Ancak her iki gen de anaerobik koşullar altında koordineli regüle olurlar. Anaerobik transkripsiyonel aktivatör FNR her iki genin de pozitif regülasyonunu sağlar. Dolayısı ile *E. coli*'de her iki enzim asparaginden fumaratın oluşumunda görev alır.

Böylece, fumarat terminal bir elektron alıcısı olarak kullanılabilir. *B. subtilis*'te ise her iki enzimin geni aynı operonda (*ansAB*) bulunmaktadır. Bu operon besi ortamına bağlı olarak aspartatla indüklenirken, NH_4^+ ile baskılanmaktadır. *B. subtilis*'in bu operonu için ileri sürülen model onun L-asparaginaz ve aspartaz arasında bir koordinasyon sağlayarak hücrede aspartat ile asparagin arasında denge sağlamasıdır [60].

1.2 Vitreoscilla Hemoglobini (VHb)

Webster ve ark. tarafından 1986 yılında ilk prokaryotik hemoglobin tanımlanana kadar hemoglobinler ökaryotik orijinli proteinler olarak bilinmiştir. Araştırmacılar, Gram-negatif bir bakteri olan *Vitreoscilla*'nın doğal olarak hemoglobin (VHb) içerdiğini saptamışlardır [61]. *Vitreoscilla* mor bakterilerin beta-alt grubunda *Beggiatoaceae* familyasında bulunmaktadır [62]. *Vitreoscilla* zorunlu bir aerob gram negatif, kemoorganotrof filamentöz bir bakteridir. Zorunlu aerob olmasına rağmen doğal yaşam alanı oksijeni düşük ortamlardır (mikroaerofil) [63]. Muhtemelen bu tür düşük oksijen

şartlarına dayanabilmek için bu bakteri sitoplazmada eriyebilen bir hemoglobin sentezi yolunu seçmiştir. Son yıllarda bu hemoglobin üzerindeki çalışmalar onun çeşitli endüstriyel organizmalarda enerji metabolizmasında uygun bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Diğer hemoglobinlere göre VHb, oksijene karşı düşük affiniteye sahiptir. Bu değer bir çok diğer globinin ayrışma sabitesinden daha büyüktür. Böylece oksijenin VHb'den ayrışma sabitesi oldukça yüksek olup bu durumun önemi oksijenin hızlı salıverilmesinin bir gereklilik olduğu hipoksik şartlarda ortaya çıkmaktadır. Bir hipoteze göre VHb'nin bulunduğu hücreler çevrelerine göre daha oksijene formda bulunurlar [64].

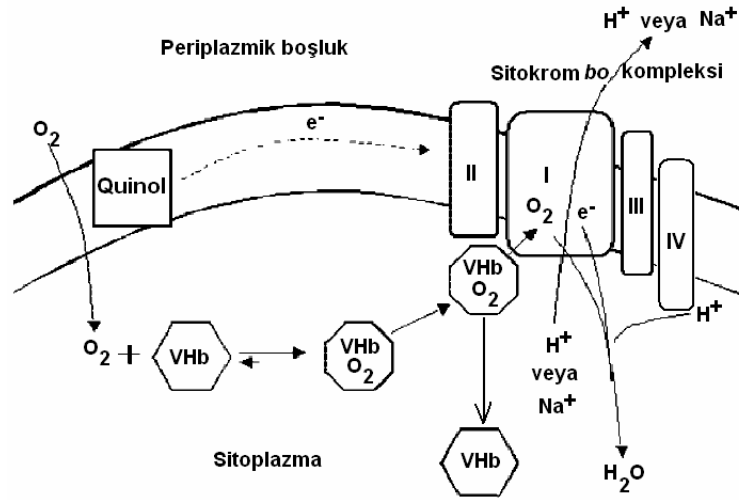
VHb dimerik bir hemoglobin olup amino asit dizisi omurgasız Hb'lerinden çok bitki hemoglobinlerine ve flavoHb'lere benzemektedir. Bu proteinin ekstraksiyonu düşük oksijenli ortamlarda artar ve % 40'ı periplazmik bölgede birikir. Bu hemoglobin kararlı oksijen formunda bulunur ve normal bir oksijen bağlama kinetiği gösterirken, oksijeni salıverme sabitesi bilinen hemoglobinlere göre oldukça yüksektir. Böylece bu protein kolaylaştırılmış difüzyon ile hipoksik şartlar altında terminal oksidazlara oksijen transferinde rol oynayabilir. Sitokrom *o* ve *d* bakımından mutant *E. coli*'de VHb'nin bir terminal oksidaz gibi davrandığı gösterilmiştir. Bu bağlamda FNR anaerobik transkripsiyon faktörü bakımından mutant *E. coli*'de VHb'nin düşük oksijenli ortamlarda indüklenmediği görülmüştür. Ayrıca VHb'nin hipoksik şartlar altında *E. coli*'nin elektron transfer zincirinin aktivesini daha etkin kıldığı gösterilmiştir. Bu çeşit bir etkinin hücre büyümesini ve oksijen alınımını arttırdığı sadece *E. coli*'de değil, diğer bakteri, maya ve transgenik bitkilerde de kaydedilmiştir [65].

Vitreoscilla'nın Sınıflandırması [66]:

Prokaryota
Grotobacteria
Scotobacteria
Nanphotosynthetic
Nanfruitingliding
Beggiotoaceae
Vitreoscilla

Bu protein ilk keşfinde sitokrom *o* tipi bir terminal oksidaz olarak tanımlanmış, ancak spektral karakteristikleri, sitozolde eririliliği ve amino asit dizisinin ökaryotik hemoglobinine % 25'e varan benzerliğinden dolayı, hemoglobin olarak adlandırılmıştır [67]. *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb) en iyi çalışılmış bakteriyel hemoglobindir (*vgb* geni Gen Bankası Erişim Numarası: X13516, VHb amino asit dizisi Gen Bankası Erişim Numarası: CAA31866). Keşfinden beri, bu proteinin geni (*vgb*) başta *E. coli*

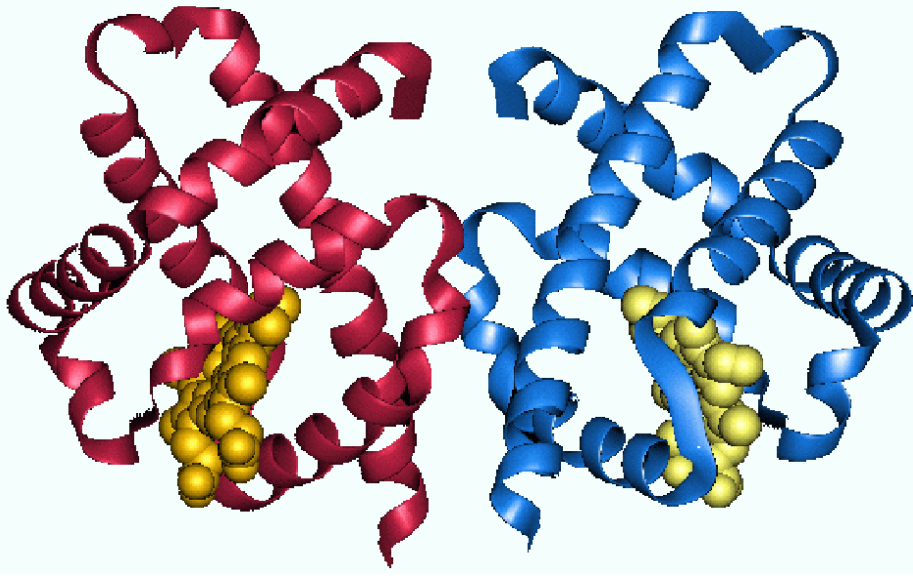
[66] olmak üzere *Enterobacter aerogenes* [67], *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* [68] gibi gram negatif, *Bacillus sp* gibi gram pozitif bakterilere ve fungus ve tütün [69, 70] gibi ökaryotik mikroorganizmaya klonlanmıştır. Çalışmalar, VHb'nin ökaryot orijinli hemoglobinlerin oksijen bağlama ve taşımadaki rollerine ilaveten başka amaçlar için de kullanılabilirliğini göstermiştir. Örneğin, VHb'in bazı redoks reaksiyonları katalizlediği ve doğal konakçısını (*Vitreoscilla*) oksidatif strese koruduğu rapor edilmiştir. Bununla ilişkili olarak, *Vitreoscilla*'nın bu proteini sayesinde sınırlı oksijenli ortamlarda oksijeni depolama ve terminal oksidazlara transfer etme gibi bir rolü olduğu sanılmaktadır [67]. Her ne kadar *Vitreoscilla*'nın sitokrom *bo* terminal oksidazı bir çok yönüyle *E. coli*'ye benzese de, bu kompleks *E. coli*'de H⁺ pompalayarak bir membran proton gradiyentine katkıda bulunurken (kemoozmotik hipotez), *Vitreoscilla*'da Na⁺ pompalamaktadır. Sitokrom *bo* oksidaz I, II, III ve IV olarak adlandırılan 4 alt üiteden oluşmaktadır. En büyük alt ünitesi alt ünite I olup sodyum pompalama da kullanılır ve aynı zamanda VHb'nin hücredeki etkisi ile ilişkilidir (Şekil 1.14).



Şekil 1.64. VHb ve sitokrom *bo* ubiquinol oksidazların I. alt ünitesi 'i arasındaki ilişkinin muhtemel mekanizması [71].

Metabolik akış şemaları *E. coli*'de VHb'nin bulunmasının bu bakterinin fermentatif yollardan çok solunum yollarını tercih etmesini sağladığını göstermiştir. Ayrıca bu bakterilerin yaklaşık 2.5 kat daha düşük NADPH oluşumunu sağladığı görülmüştür. Yine bu bakterilerde ATP birikiminin daha fazla olduğu görülmüştür [72]. VHb'nin yapısı klasik globin katlanmasına uymakta ve ökaryotik hemoglobinleri ile yüksek bir homoloji göstermekte olup klasik 8-helikse (A-H) sahiptir ve globin katlanması göstermektedir (Şekil 1.15). Monomerik VHb'nin 146 amino asit

uzunluğundaki dizisinden hesaplanan moleküler büyüklüğü 15,775 Dalton olarak belirlenmiştir. Molekül ağırlığı 616 Dalton olan hem grubu ($C_{34}H_{32}FeN_4O_4$)'nun yapıya katılması ile toplam moleküler kütle 16,931 Dalton'dur.

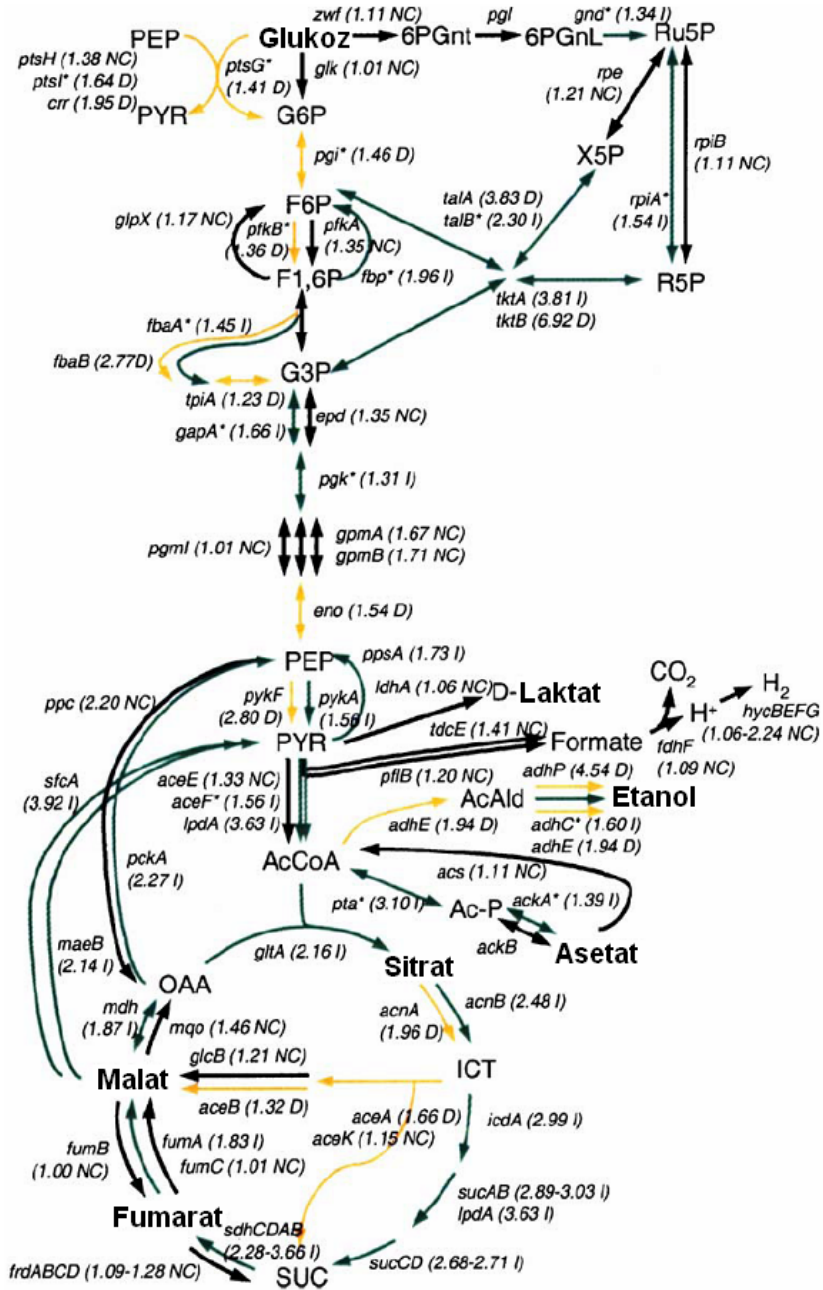


Şekil 1.15. Vhb'nin 3-boyutlu yapısı. Homodimerik yapıda “hem” grubunun lokalize olduğu yer sarı renk ile gösterilmiştir (Protein Data Bank).

Hücrelerde Vhb'nin fonksiyon ve kompozisyon üzerindeki etkisi bir seri çalışmanın konusunu oluşturmuştur. Bu çalışmalarda Vhb'nin daha etkin bir enerji sağlayıcı terminal oksidaz olan sitokrom oksidaz *o*'nun hücre içi seviyelerinde ve aktivitesinde artışa, sitoplazmik membran boyunca pH farkında artışa ve ATP yapım ve kullanımında artışa neden olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca bu proteini bulunduran hücrelerin daha oksitlenmiş durumda bulunmaları, Vhb'nin hücrelerin karbon metabolizması akış şemalarında önemli yeniden düzenlemelere sebep olması ile ilgilidir (Şekil 1.16). Her ne kadar bunun nasıl sağlandığı kesin olarak ortaya konmamışsa da, $NAD^+/NADH$ ve ADP/ATP oranlarında olan önemli değişimlerin esas teşkil ettiği sanılmaktadır. Vhb içeren hücrelerde $NADH$ seviyesinde düşüş ATP miktarında ise artış gözlenir. Dolayısı ile $NAD^+/NADH$ ve ADP/ATP oranlarında meydana gelen önemli değişimler hücrenin karbon bileşiklerini kullanımı yollarında önemli değişime neden olur.

Bu bağlamda Vhb ekspresyonu yapan *E. aerogenes*'de gözlenen % 80 artışın bu tür bir metabolik akış şeması değişikliğinden olabileceği bildirilmiştir [72, 73].



Şekil 1.16. Vhb ekspresyonu yapan *E. coli* ve orijinal konakçı arasında temel metabolik yollara ait genlerin ekspresyonu. Koyu oklar ekspresyon seviyesi değişmeyen genleri ifade ederken, açık oklar ekspresyonu değişmiş genleri ifade etmektedir. PEP, fosfoenolpiruvat; PYR, piruvat; G6P, glukoz-6-fosfat; F6P, fruktoz-6-fosfat; F1,6P, fruktoz-1,6-bifosfat; G3P, gliseraldehit-3-fosfat; 6PGnt, 6-fosfoglukonat; 6PGnL, D-6-fosfoglukono- δ -lakton; Ru5P, ribuloz-5-fosfat; R5P, riboz-5-fosfat, X5P, ksiloz-5-fosfat, AcCoA, asetilCoA; ICT, izositrat; SUC, suksinat; OAA, okzaloasetat; Ac-P, asetilfosat; AcAld, asetaldehit [71].

1.2.1 Bakteriden insana hemogloblinler

Hemoglobin (Hb)'ler O_2 'i tersinir olarak bağlayan proteinlerdir. Bu proteinlerin bakteri, fungus, protozoa, bitki ve hayvanlarda belirlenmiş olmaları, onların canlılar arasında geniş bir dağılımı olduğunu göstermektedir. Hb'lerin bu şekilde biri birinden

oldukça farklı organizmalarda bulunması onların yaklaşık 1.8 milyar yıl önce ortak bir Hb genine sahip olabileceğini düşündürmektedir [74]. Hb'ler O₂, CO ve NO gibi gaz formundaki ligandları bağladıkları gibi, bazı küçük organik molekülleri de bağlayabilirler. Ligand bağlanması tetrapirrol protoporfirin IX ile koordineli bulunan bir demir (Fe) atomu ile olur. Fe- protoporfirin IX (hem grubu) prostetik grubu tüm Hb'lerde globin omurgası ile bire bir molar oranda bulunur. Hem grubundaki demir atomu redoks kimyasına (indirgenme-yükseltgenme) uğrayabilir ve sadece ferrus formu (Fe⁺⁺) O₂ bağlayabilir. Uçları kırılmış küçük hemoglobinler hariç, Hb'lerin üç boyutlu katlanması 3-üzerinde-3-alfa sarmal yapıda olup oldukça korunmuş bu yapıya "globin katlanması" denir [75]. Omurgalı, omurgasız, bitki, bakteri ve diğer tek hücrelilerdeki hemoglobinler hem yapı ve hem de amino asit dizileri bakımından benzerlik gösterirler.

1.2.1.1 Omurgalı hemoglobinleri

Omurgalı hayvanlarda dört çeşit Hb saptanmıştır. En bol bulunanı kırmızı kan hücrelerinde bulunan ve oksijen taşımada rolü olan heteroteramerik bir yapı olan hemoglobindir. İki α ve iki β globin zincirinden oluşan bu Hb oksijeni pH bağımlı biçimde (Bohr etkisi) kooperatif olarak bağlar. Omurgalılar ayrıca kas ve kalp dokusunda bulunan oksijen taşıma ve depolamada görev yapan monomerik yapıda miyoglobin (Mb) taşırlar.

Son yıllarda yapısı Mb'e benzeyen fakat fonksiyonu tam olarak bilinmeyen bir hemoglobin de (*nöroglobin*) beyinde keşfedilmiştir. Yine son yıllarda keşfedilen ve *histoglobin* adı verilen Hb'in de hücredeki rolü tam olarak bilinmemektedir [75]. Hemoglobinin en büyük kısmı protein olup bir hemoglobin (heterotetramer) molekülü 4 demir iyonu ihtiva etmektedir. Hemoglobinin organizmada en önemli fonksiyonu oksijeni akciğerlerden dokulara taşımasıdır. Hemoglobinin diğer önemli bir fonksiyonu da kanın en önemli tamponlarından biri olması ve pH dengesinin korunmasındaki önemli rol almasıdır [76].

1.2.1.2 Omurgasız hemoglobinleri

Omurgalılara nazaran omurgasızlar daha farklı çeşitte Hb'lere sahiptirler. Bu Hb'ler oksijene orta düzeyden yükseğe düzeye varan affinite gösterirler ve diğer birçok hemoglobinde de bulunan 2-üzerinde-2-alfa sarmal globin katlanma gösterirler. Omurgasızlarda hemoglobinler tek alt ünitelerden 144 alt üniteye kadar bir çok farklı

yapıda bulunurlar. Halbuki omurgalılarda daima bunlar tetramer olarak bulunurlar, yani 4 alt üiteden oluşmuşlardır. Bağırsak paraziti bir nematod olan anaerobik *Asgaris'* te hemoglobin bir “deoksijenaz” olarak görev yapar ve NO’yu kullanarak kurtçuk için zehir etkisi yapan oksijeni detoksifiye eder [75]. Bir böcek olan *Chironomus thummi* larvaları oksijence fakir kirli sularda büyür ve buradaki dip çamuru ve bentik alglerle beslenirler. Bu larvaların yapısında oksijen taşınımını ve depolanmasında rol alan 12 farklı tipte hemoglobin tespit edilmiştir [77].

Derin denizlerde yaşayan tüp solucanı *Rifria pachyptila'* nın sahip olduğu hemoglobin hücrede son derece yüksek bir derişimde bulunur. moleküler ağırlığı 2 milyon dalton olan bu hemoglobinin hücredeki düzeyi neredeyse insan kan hücrelerinde bulunan hemoglobinin yarısına yakın bir orandadır. Bu hemoglobin hem oksijeni hemde sülfürü aynı anda bağlayabilecek büyüklüktedir. Oksijen bağlama ve oksijen taşıma kapasitesinin yüksekliği nedeni ile derin denizlerdeki volkanik ağızlardaki suların oksijenini kolaylıkla bağlayabilmektedir [78].

1.2.1.3 Bitki hemoglobinleri

Vasküler olmayan pirimitif bitkilerden angiospermlere kadar Hb’ler bitkiler aleminde geniş bir dağılım gösterirler. Yıllarca sadece simbiyotik Hb’lere sahip olduğu sanılan bitkilerin daha sonra simbiyotik olmayan ve kırılmış yapıya sahip hemoglobinleri de sentezledikleri belirlenmiştir. Protein dizi analizleri simbiyotik olan ve olmayan Hb’lerin birbirine önemli derecede benzediklerini göstermiştir. Her iki tip Hb geni de üç intron ve 4 eksondan oluşmaktadır. Halbuki omurgalı Hb genleri iki introna sahiptir. Ancak, Bu iki intronun bitkilerin birinci ve üçüncü intronları ile aynı pozisyonda olmaları onların ortak bir atadan geldiklerini göstermektedir [75].

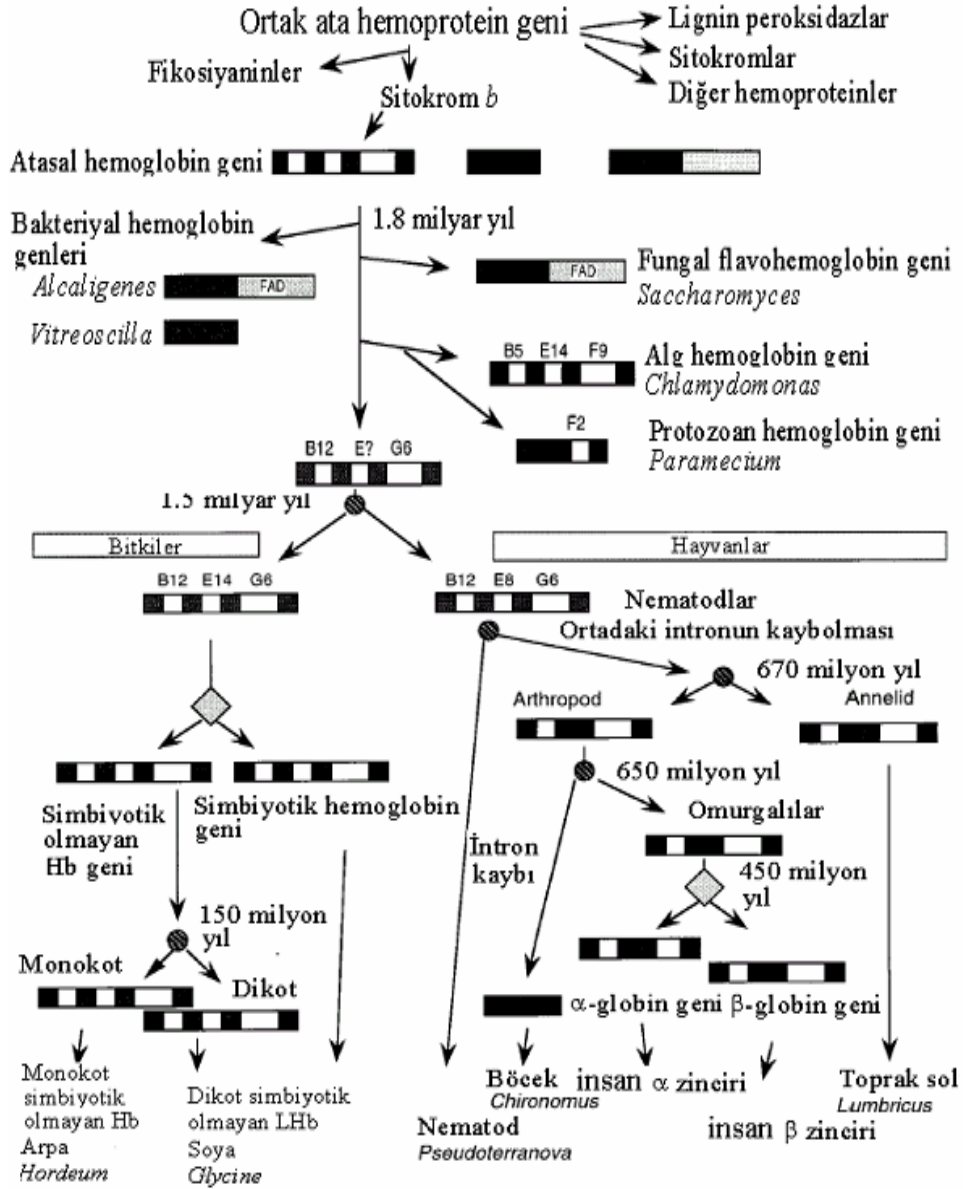
Her ne kadar ilk kez soya fasulyesi kök nodüllerinde gözlenmiş ve ekstraksiyonları yapılmışsa da, tüm bitkilerin üç çeşit Hb’den en az bir çeşidine sahip olduğu belirlenmiştir: kırılmış Hb’ler, simbiyotik ve simbiyotik olmayan hemoglobinler. Alglerin kloroplastlarında bulunan “kırılmış tip Hb”ler, yüksek bitkilerin kök ve sürgün gibi yapılarında sentezlenmekte ve bu bitkilerdeki sub-hücrel lokalizasyonları ve fonksiyonları henüz bilinmemektedir. Bu Hb’ler simbiyotik ve simbiyotik olmayan Hb’lere göre daha küçük bir alfa-sarmal globin katlanması gösterirler. Ayrıca, bu Hb’ler simbiyotik olmayan Hb’lerden daha düşük bir O₂ affinitesi gösterirler [64].

Keşfi yarım yüzyıldan daha öncesine giden simbiyotik hemoglobinler bazı bitki nodüllerinde bulunup simbiyotik azot fiksasyonunda rol oynarlar. Azotu nodüllerindeki bakterilerle girmiş oldukları simbiyotik bir ilişki sonucu bağlayan bitkilerin sahip olduğu bu Hb'lere leg-hemoglobinler adı verilmiştir (*leg, legumonosa*). Ancak, bu hemoglobinlerin baklagiller dışındaki bitki nodüllerinde de bulunmasından dolayı, daha doğru olarak bunlara simbiyotik Hb'ler denmiştir. Yüksek bitkilerin azot fiksasyonu için bu Hb'ler birer gerekliliktir. Soya nodüllerinde konsantrasyonları 3 mM'a varabilen bu Hb'ler yüksek oksijen bağlama ve salma kinetikleri ile nodüllerdeki bakterilerin çoğalmasına ve böylece azot bağlamasına katkıda bulunurlar. Bakterinin azot bağlamasına (ve bitkiye vermesine) bu Hb'lerin katkısı oksijenle inhibe olan bakterideki azot bağlama ve indirgeme sistemi olan *nitrojenaz enzim sistemini* oksijenden koruması ile olur. Bu tip bitki Hb'leri biyokimyasal olarak iyi aydınlatılmıştır ve son çalışmalarla da hücrel mekanizmalarının ve dokuya özel ekspresyonlarının nasıl olduğu yönünde bilgiler sunulmuştur. Bitkiler aleminde fotosentez sonucu salınan moleküler oksijen ayrıca mitokondrideki ETS zincirini de çalıştırır. Hb'ler *in vivo* olarak oksijeni ortamdaki süpürerek oksijene duyarlı simbiyotik azot fiksasyon mekanizmasını oksijenin inhibitif etkisinden korumaktadırlar. Bu Hb'ler nodüllerin içinde yaşamaya adapte olmuş endosimbiyotik bakterilere O₂ taşırlar [64].

Nispeten yeni keşfedilen (20 yıl) simbiyotik olmayan hemoglobinler (bazen fitogloblinler olarak da bilinirler) ise hemen bütün bitkilerde bulunurlar. Bu hemoglobinler bitkilerin çeşitli organ ve dokularında (daha çok tohum, kök ve gövde) bulunurlar. Simbiyotik olmayan Hb'ler sitoplazmik olup O₂'e karşı yüksek affinite gösterirler. Bu Hb'ler tohum çimlenmesi sırasında ve vejetatif organlarda sentezlenmelerinin yanında stres altındaki bitkilerde de sentezlenirler [75]. Bitkilerde geniş bir yayılım göstermelerine rağmen fitogloblinlerin bitkilerdeki fonksiyonu tam olarak bilinmemekte, ancak daha çok hipoksik şartlarda görev yaptıkları sanılmaktadır. Hipoksik bitkilerde nitrik oksidin (NO) önemli bir metabolit olması, bu proteinlerin NO seviyesinin ayarlanmasında rolü olabileceğini düşündürmektedir [78]. Şu ana kadar 20 farklı bitki türünde 30'dan fazla fitogloblin keşfedilmiş ve bunların oksijen bağlama kinetiklerinin miyoglobine benzediği belirlenmiştir. ATP sentezini inhibe eden solunum zinciri inhibitörleri'nin fitogloblin sentezinde artışa neden olması, bu proteinlerin sadece oksijen seviyesi ile regüle olmadıklarını ortaya koymaktadır [64].

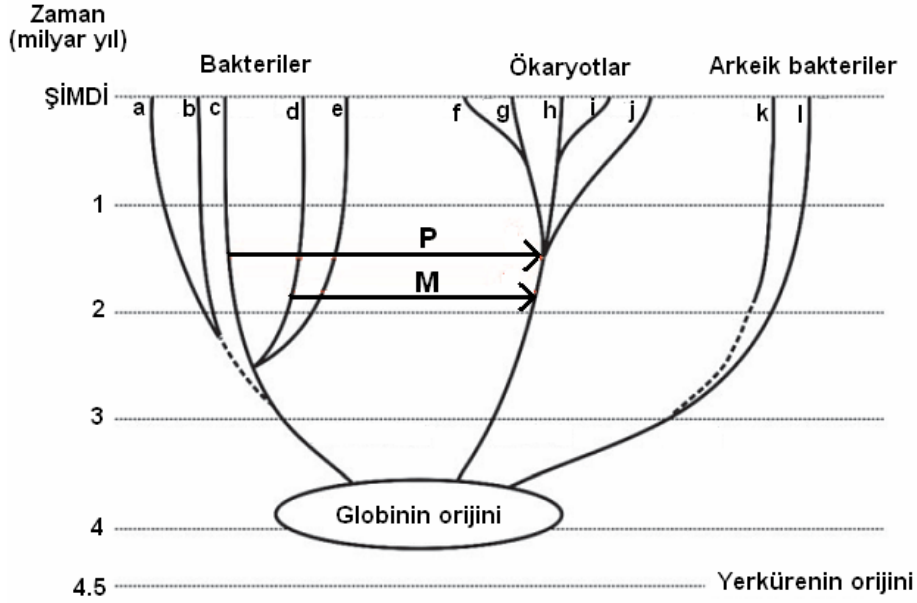
1.2.1.4 Mikroorganizma hemoglobinleri

Son yıllarda bakteri ve funguslarda fonksiyonları oksijen taşıma ve depolamadan hücre içi NO seviyesinin kontrolüne, bakteri ve arkeiklerde ortam oksijen duyarlılığına ve klorlanmış çeşitli materyallerin detoksifikasyonuna kadar geniş bir fonksiyon alanı olan kimerik hemoglobinler keşfedilmiştir [65]. Protozoa, fungus ve bakterilerde bulunan özellikle “kırpılmış tip Hb”lerin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Bu hemoglobinler 2-üzerinde-2-alfa sarmal yapı gösterirler. Bu Hb’ler amino ucundaki A sarmaldan tamamen yoksunken, karboksil ucundaki D sarmalı ise sadece 3 amino asitle temsil edilmektedir. Bu tip Hb’ler normal Hb’lerin basitçe kesilmiş halleri olmayıp özel delesyon ve substitüsyonlarla kararlı bir konformasyonun kazanıldığı Hb’lerdir [75]. Bu hemoglobinler ortak kökene en yakın bulunan hemoglobinler olup, genel olarak üç farklı gruba sokulurlar (Şekil 1.17). İlk grup flavohemoglobinleri içerir. Bir çeşit kimerik yapıya sahip olan bu hemoglobinler bir globin domeyni ve aynı zamanda bir FAD-bağımlı oksido-redükto domeynini’ne sahiptirler. İkinci grup ise “kırpılmış tip zincir” hemoglobinler olup normallerden 20-40 amino asit daha kısırdırlar ve oldukça yüksek oksijen affinitesine sahiptirler. Üçüncü grup ise bu proteinlerin bakteriyel orijinli olanları olup en iyi bilineni *Vitreoscilla* hemoglobindir. Bakteriler genel olarak iki tip hemoglobine sahiptir. Bitki Hb’lerine benzeyen diziyeye sahip Hb’ler ve flavohemoglobinler (FlavoHb). İlk bakteriyal tip Hb buradaki çalışmada da ele alınan *Vitreoscilla* Hb’dir (VHb). Spektral karakteristiklerinin ve aminoasit dizisinin ökaryotik hemoglobinine % 25’ e varan benzerliğinden dolayı, hemoglobin olarak adlandırılmıştır [64]. Hem grubunun etrafındaki grupların özel dizilimi bu proteinlerin yüksek oksijen affinitelerine katkıda bulunur. FlavoHb’ler ise daha yaygın bulunurlar. VHb’nin tersine FlavoHb’ler bir amino terminal globin domeyni ve FAD⁻ ve NADP⁺ bağlanma bölgelerine sahip bir karboksil flavodomeynine sahiptirler. VHb’nin fonksiyonu her ne kadar hala tam olarak bilinmiyorsa da, bu hemoglobinin oksijen taşıma ve depolamada (tamponlamada) rol oynadığı sanılmaktadır. Flavın domeyninde oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarından dolayı FlavoHb’lerin böyle bir fonksiyonunun olmadığı sanılmaktadır. FlavoHb’lerin daha çok NO deoksigenazlar olarak davrandıkları ileri sürülmüştür [75].



Şekil 1.77. Evrimsel süreçte hemoglobin geni [71].

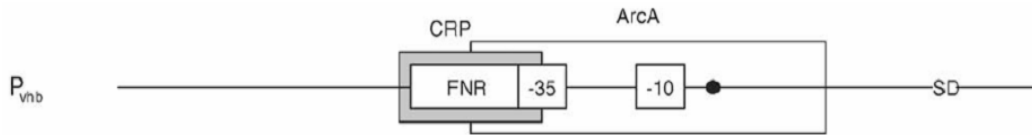
Bakteri ve mayalarda flavohemoglobinlerin “dioksijenaz” olarak davranıp NADH bağımlı aktiviteleri ile toksik NO’yu parçalayarak organizmayı koruduğu sanılmaktadır [74]. Yapılan bir çalışmada *Bacillus subtilisin* flavohemoglobini ile VHb arasında % 56 oranında benzerlik tespit edilmiştir [79]. Bilim dünyasının ortak görüşü, üç canlı aleminde de (bakteriler, ökaryotlar ve arkeik bakteriler) dağılım gösteren bu proteinlerin ortak bir kökenden orijin aldıkları yönündedir. Amino asit dizisi bilinen globinlerin filogenetik ilişkileri araştırıldığında onların muhtemelen 3.5 milyar yıl önce primitif bir arkeik bakteriden köken alabileceğini düşündürmektedir. Ancak, böyle oldukça değişik organizmalarda bu proteinin fonksiyonu önemli farklılıklar göstermektedir (Şekil 1.18).



Şekil 1.18. Canlıların 3 aleminde globin geni. Siyanobakterinin (c) orijini 2.6 milyar yıl, bitki (b), hayvan (h) ve fungusların (i) ayrılımları 1.5 milyar yıl olarak tahmin edilmektedir. Yatay oklar genel kabul görmüş iki endosimbiyotik olayı göstermektedir; 1.8 milyar yıl önce bir α -proteobakteri (d) ile bir ökaryot arasında olup mitokondri (M) ile sonuçlanan ve 1.5 milyar yıl önce bir siyanobakteri ile bir ökaryot arasında gerçekleşip plastidlerin (P) ortaya çıkmasını sağlayan olay. Noktalı çizgiler ayrılımdaki zamanın kesin bilinmediğini ifade etmektedir. a, aquificales; e, diğer bakteriler; f, algler; g, embriyofitler (kara bitkileri); j, diğer ökaryotlar; k, Crenarcheota; l, Euryarcheota [80].

1.2.2 *Vitreoscilla* hemoglobin geni (*vgb*)

Vitreoscilla Hemoglobin Geni (*vgb*) promotor-operatör bölge ve hemoglobini kodlayan bölge ile toplam 648 nükleotidden oluşmaktadır. Genin promotoru oksijene duyarlı bir promotordur ve aynı zamanda katabolit baskılanma gösterir. Promotorun oksijene duyarlı olmasını üzerinde taşıdığı FNR ve ArcAB proteinlerine özgü dizilerden sağlar. Katabolit baskılanmayı ise promotor üzerinde bulunan cAMP-CRP bağlanma bölgesi sağlar [81, 82]. Güçlü bir promotor olan *vgb* promotoru -35 korunmuş dizisi taşımaz. Ancak pribnov kutusundan 20 nükleotid geride katabolit aktivatör protein bağlanma bölgesine benzer bir bölge vardır (Şekil 1.19.) [67, 83].



Şekil 1.19. *E. coli* transkripsiyon sistemi tarafından tanınan *vgb* promotoru. Shine-Dalgarno (SD) bölgesi, transkripsiyon başlama bölgesi (●), -10 ve -35 dizileri, ArcA, CRP ve FNR bağlanma bölgeleri. Yatay çizgi (—) promotorun ATG başlama kodonununun akış-yukarı 150 nükleotidlik fragmanını göstermektedir [20].

1.2.3 VHb'nin sentezi

Vitreoscilla zorunlu aerobik olduğu halde düşük oksijenli çevrelerde yaşamaya uyum sağlamıştır yani mikroaerofiliktir. Atmosferik oksijen miktarının % 10'unu içeren ortamlarda hemoglobin sentezinin 5-10 kat kadar arttığı görülmüştür. Daha kritik oksijen konsantrasyonlarında yani mikroaerofilik şartlarda ise *Vitreoscilla* hemoglobin geni (*vgb*) *ansB* geni gibi oksijenle regüle olan (Fnr ve ArcA/ArcB sistemi) bir gen olarak, maksimum derecede uyarılmakta ve VHb hücre içi konsantrasyonu 40-50 kat artmaktadır. Böyle şartlar altında VHb'nin ortam oksijen değişimlerine karşı bir tampon görevi görerek mikroorganizmanın üreme ve çoğalmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [81, 82]. Birçok mikroorganizma için oksijen konsantrasyonundaki değişimler üreme ve çoğalma için oldukça belirleyicidir. Oksijen konsantrasyonu belli sınırlar altına düştüğü zaman, bütün hücrelerin fizyolojik ve metabolik aktivitelerinde önemli değişimler olur ve çoğu zaman hücre büyümesi durur ve hücre parçalanması olur. Bu şartlar altında, VHb'nin hücrelerin daha iyi çoğalmalarını sağladığı ve metabolik aktivitelerini düzenlediği görülmüştür [54, 84].

1.2.4 VHb'nin klonlandığı organizmalardaki etkisi

VHb geni (*vgb*) *E. coli* [66], *Enterobacter aerogenes* [67], *Saccharomyces* türleri [68] ve tütün bitkisi [69, 70] gibi farklı sistemlere klonlanarak, hemoglobinin bu organizmaların fizyolojik ve metabolik aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. VHb hemen hemen bütün klonlanmış olduğu hücrelere daha iyi bir oksijen alım ve kullanım potansiyeli kazandırırken [67, 85, 86] bu proteinin hücre üreme ve çoğalması üzerine olan etkisi konusunda farklı sonuçlar rapor edilmiştir [74, 87, 88].

1.2.5 VHb'nin metabolik mühendislikteki potansiyeli

VHb sentezinin oksijene duyarlı *vgb* promotörü nedeniyle, doğal konakçılarında ve klonlandığı organizmalarda düşük oksijenli ortamlarda yüksek oranda gerçekleştiği ve VHb senteziyle birlikte organizmaların büyüme ve çoğalmalarının arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca üretimleri belli seviyede oksijen gerektiren çeşitli metabolitler ve rekombinant proteinler de VHb/*vgb* sistemi taşıyan organizmalarda önemli artışlar göstermiştir [78, 104]. Dolayısı ile endüstriyel kullanımda bu proteinin özellikle bazı mikroaerobik fermentasyonlar için etkili bir ajan olarak kullanılabileceği ileri

sürülmüştür. Daha önceki çalışmalar *Vitreoscilla* hemoglobini taşıyan rekombinant bakterilerin kontrol konakçılara göre 10 kata varan daha yüksek oksijen alımı yaptıkları ve hücrelerin daha okside durumda olduklarını göstermiştir [104, 105]. VHB içeren hücrelerin kontrollere göre daha okside durumda olmaları, bu hücrelerin daha etkin bir solunuma sahip olmasına ve TCA gibi metabolik yolları ve solunum zincirini daha etkin kullanmasına bağlanmıştır [105]. Bu bağlamda, VHB içeren bakterilerin kontrollerine göre daha yüksek bir ATP düzeyine sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca bu bakterilerin fermantasyondan çok aerobik solunumu tercih ettikleri tespit edilmiştir [106]. *vgb*'nin bakterilerde önemli bir etkisi de metabolik yol açısından olmuştur. *vgb* taşıyan bakteriler pentoz fosfat yolunu tercih etmektedirler ve yüksek hücre yoğunluğu göstermektedirler. Bunun sonucunda da Embden-Meyerhof-Parnas metabolik yolunu daha az kullanmaktadırlar [107].

VHB'nin konakçılarında sağladığı yüksek oksijen alımı özelliği ile bağlantılı olarak *Pseudomonas*larla yapılan bazı çalışmalar VHB'nin belirli şartlar altında bazı aromatik bileşiklerin yıkımını arttırdığını gösterilmiştir [108]. Yapılan başka bir çalışmada ise *vgb* klonlanmış *Burkholderia sp.*'de dinitrotoluen yıkımında artış sağladığı bildirilmiştir [109]. *vgb* klonlanmış bakterilerde rekombinant protein sentezi artmaktadır. Bu konu ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda *vgb*'nin mayalarda antibiyotik ve etanol üretimini arttırdığı tespit edilmiştir. Diğer bir çalışma ise *vgb*'nin bazı Enterobacteriaceae üyelerinin bütandiol ve asetoin üretimini arttırdığını göstermiştir [110].

Çevre kirliliğine paralel olarak mikrobiyal habitatlara ağır metal salınımı gitgide artmaktadır. Bununla beraber mikroorganizmaların ağır metal stresi ile baş edebilecekleri sistemlerin geliştirilmesi çalışmaları da önem kazanmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada *Enterobacter aerogenes* bakterisinin yabancı tipi ile *vgb* geni klonlanmış Ea [pUC8:16] suşu Cd⁺ içeren besi ortamında üretilmiş ve Cd⁺ alımı, adsorbsiyonu, biyosorbsiyon bakımından karşılaştırıldığında Ea [pUC8:16] suşu daha yüksek biyokütle değeri, daha yüksek Cd⁺ alımı, daha düşük adsorbsiyonu ve daha yüksek biyosorbsiyon değerleri ile dikkat çekmiştir. Çalışma sonucunda bakteriyel hemoglobinin ağır metal detoksifikasyonunun kontrolü için çok uygun bir aday olduğu bildirilmiştir [111].

Çizelge 1.2. Vitreoscilla hemoglobinin çeşitli heterolog organizmalardaki etkisi

ORGANİZMA	ETKİSİ	ÇALIŞMA
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10 kata varan yüksek oksijen kullanımı, yüksek L-asparaginaz sentezi	Bu çalışma
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4 kata kadar yüksek L-asparaginaz sentezi	Bu çalışma
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Asetoin ve 2,3-bütandiol üretiminde % 80 artış, hücrelerin böyle bir ortamda daha uzun süre canlı kalmaları	[73]
<i>Acremonium chrysogenum</i>	Sefalosporin C üretiminde 3.2 kat artış	[89]
<i>Bacillus subtilis</i>	% 30 proteaz artışı, α -amilaz aktivitesinde % 7-15 artış ve protein salınımında 1.5 kat artış	[90]
<i>Burkholderia sp.</i>	Biyomasta % 15, DNT parçalanmasında 2 kat artış	[91]
Çin hamster'i ovaryum hücreleri	Doku plazminojen aktivatör proteini üretiminde % 40-100 artış	[92]
<i>Escherichia coli</i>	L-laktamaz aktivitesinde % 61 artış	[93]
<i>Escherichia coli</i>	Toplam hücre proteininde % 30, CAT aktivitesinde % 80, L-galaktozidaz aktivitesinde 40% artış	[74]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	L-lizin üretiminde % 24 artış	[94]
<i>Escherichia coli</i>	α -amilaz aktivitesinde 3.3 kat artış	[95]
<i>Escherichia coli</i>	Ferritin üretiminde 1.8 kat artış	[96]
<i>Nicotiana tabacum</i>	% 50 daha hızlı çimlenme, artan büyüme, % 80-100 daha fazla kuru ağırlık, % 30-40 daha fazla klorofil ve % 34 daha fazla nikotin	[77]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Canlı hücre sayısında % 11 artış ve 2-5 kat daha fazla oksijen alımı	[85]
<i>Rhizobium etli</i>	Bakla nodüllerinde nitrojenaz aktivitesinde % 68 artış ve % 53 daha fazla azot içeriği	[97]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hücre yoğunluğunda 3 kat artış	[98]
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Eritromaysin üretiminde % 70 artış	[99,100]
<i>Serratia marcescens</i>	Hücre büyüklüğünde artış	[87]
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Aktinorodin üretiminde 10 kat artış	[68]
<i>Streptomyces lividans</i>	Kültür sonu hücre yoğunluğunda % 50 artış	[68]
<i>Streptomyces rimosus</i>	Oksitetrasiklin üretiminde 2.2 kat artış	[101]
<i>Xantomonas maltophila</i>	Canlı hücre sayısında % 15 artış, benzoik asitin yıkımında artış	[102]
<i>Escherichia coli</i>	Poli (β -hidroksi butirat) üretiminde % 20-80 artış	[103]

Bu çalışmada ayrıca çeşitli endüstriyel atık ortamlarında kullanılan bakterilerin ve rekombinantlarının çoğalma karakteristikleri ve L-asparaginaz sentez seviyeleri çalışılmıştır. Yapılan çeşitli bilimsel çalışmalarda Endüstriyel Atıkların değişik şekillerde değerlendirilerek kullanıldığı rapor edilmiştir. Ancak bir anti-kanser enziminin elde edilmesinde ortam olarak kullanılmaları literatürde bir ilktir. Çalışmamız bu yönüyle öncü ve sonraki çalışmalar için bir yol gösterici olma niteliği taşımaktadır. Çevre kirliliğini oluşturan temel unsurlar evsel ve endüstriyel artıklardır. Atıkların çevre kirliliği oluşturmayacak şekilde başka yerlerde değerlendirilmesi ya da parçalanarak doğaya verilmesi ile çevre kirlenmesi en aza iner ve bu denli küçük bir kirliliği doğal süreçler zaten temizleyebilir. Çevre kirliliğine bir bütün olarak bakıldığında kirliliğin ortadan kaldırılması yerine kirlenmenin önlenmesi en akılcı çözüm olarak ortaya çıkmaktadır. Bu konuda son yıllarda atıkların ekonomik yönden değerlendirilmeleri ön planda olmaya başlamış, çeşitli değerlendirme şekilleri önem kazanmıştır. Son zamanlarda atık maddelerin geri dönüşümü çevre dostu teknolojilerin temel hedefi durumuna gelmiştir [112].

Endüstride hammaddeler belli bir amaca göre işlenirken geriye kullanılmayan atık maddeler ortaya çıkmaktadır. Bunlara bu çalışmada kullandığımız melas, vinas, peynir altı suyu ve zeytinyağı fabrikası atık suyu örnek verilebilir.

Melas şeker elde etmek için şeker pancarının işlenmesi sırasında ortaya çıkan koyu kahve renkli kolloidal bir atık maddedir. Şeker fabrikasında işlenen her 100 kg şeker pancarında 4 kg kadar melas oluşmaktadır. İçeriğinde kompleks polisakkaritler, invert şekerler, karbonhidrat olmayan bileşikler, koyu kahve renkli azot içeren polimerik bileşikler, inorganik iyonlar, malik asit, laktik asit, formik asit, asetik asit, propiyonik asit gibi organik asitler bulunmaktadır. Melas, ispirto ve maya üretiminde aynı zamanda kepek, saman ve kuru küspelere eklenerek hayvan yemlerinde de kullanılmaktadır [113].

Vinas, melastan fermantasyon yoluyla alkol üreten fabrikalarda ortaya çıkan kötü kokulu koyu kahve renkli sıvımsı bir atık maddedir. Üretilen her bir litre alkol için yaklaşık oniki litre vinas oluşmaktadır. Yoğun organik yükü nedeniyle doğrudan doğruya alıcı ortamlara verilmesi sakıncalar doğurmaktadır. Genellikle potasyum kaynağı, sıvı gübre ve hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Melas ve vinas şeker fabrikalarının atık maddelerinden olup, bu atık maddelerin üretimini yapan fabrikalarda tekrar değerlendirilmesi ve çevre kirlilik yükünün azaltılması oldukça önemlidir[113].

Herhangi bir hayvanın sütünün peynir yapılmasından sonra geride kalan sıvıya

peynir altı suyu denir. Peynir sütün pıhtılaşmasıyla yapılır. Pıhtılaşmadan sonra oluşan katı kısım'dan (lor) ayrılan sıvı peynir altı suyudur. Bu su protein, vitamin ve minerallerin yanısıra yaklaşık olarak sütün laktozunun %50 sini de içermektedir. İçinde bulunan protein genellikle saflaştırılarak marketlerde peynir altı suyu proteini olarak satılmaktadır. Kurutulan bu su, peynir altı suyu tozu olarak bilinir. Sert, yarı-sert veya yumuşak peynir ve rennet kazeini üreten işletmelerden yan ürün olarak elde edilen peynir altı suyu tatlı peynir altı suyu olarak bilinir ve pH'sı 5.9 – 6.6 arasındadır. Mineral-asit yoluyla çökeltilmiş kazein üretiminden elde edilen peynir altı suyu asitli bir peyniraltı suyudur ve pH'sı 4.3 ile 4.6 arasındadır [114].

Zeytinyağı fabrikası atığı polifenoller gibi toksik maddeler içerdiği gibi, şekerler, azotlu bileşikler, organik asitler ve atık yağ gibi ticari öneme sahip organik maddeleride içeren bir atıktır [115]. Bu nedenle günümüz fermentasyon teknolojisi içinde Zeytinyağı fabrikası atığı önemli bir hammadde olma özelliğini sürdürmektedir. Özellikle, tek hücre proteini üretimi, pektik enzimlerin biyosentezi ve anaerobik koşullarda enerji eldesi gibi fermentasyon prosesleri bu teknolojinin en önemli uygulamalarıdır [116].

2 KAYNAK ÖZETLERİ

Kemoterapötik ilaçların çoğu dört grup içinde ele alınır: *alkilleyici ajanlar*, *antimetabolitler*, *bitki alkaloidleri* ve *antitümör antibiyotikler*. Alkilleyici ajanlar yapı olarak hardal gazına benzerler ve fonksiyonlarını DNA'ya bağlanarak onun açılmasını ve dolayısı ile replikasyonu engelleyerek yaparlar. Hücrenin bölünmesini durduran bu olay sonucu hücreler apoptozise sürüklenir ve ölürlür. Antimetabolitler (ör. 5-flurourasil, aminopterin, 5-azasitidin ve metotreksat) DNA'nın yapı taşları veya diğer önemli hücre metabolitlerini taklit ederler. Böylece DNA'nın normal replikasyonunu inhibe ederler. Bitki alkaloidleri (ör. vinblastin ve kolşisin) mitoz sırasında oluşan mikrotübüllerin oluşumunu inhibe ederek hücre bölünmesini engellerler. Antitümör antibiyotikler (ör. doksorubisin, bleomaysin, mitomaysin ve sisplatin) alkilleyici ajanların etki mekanizmasında olduğu gibi DNA'ya bağlanarak onun açılmasını ve replikasyonunu engellerler. Bu maddelerin bazıları DNA sentezinde rol alan enzimleri inhibe ederler. Yukarıdaki dört gruba girmeyen ancak etkin anti-kanser mekanizmaları olan kimyasal ajanlar ise bir kaç *enzim* ve *hormondur*. Tamoksifen kimyasal yapı olarak birçok meme kanseri türünün ortaya çıkması için bir gereksinim olan östrojen hormonuna benzemektedir. Tamoksifen tümör hücrelerini öldürmediğinden diğer birçok sitotoksik ilacın sebep olduğu yan etkilere de sebep olmaz. Bu hormonun etki mekanizması östrojen reseptörlerini bloke etmesi ile olur.

Literatürde ilk rastlanılan L-asparaginaz araştırması 1922'de Clementi tarafından yapılmıştır ve bu çalışmada kobay (Gine Domuzu) serumunun anti-kanser etkisine değinilmiştir [117]. 1953'de yayınlanan Kidd'in fareler ve sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmalarda bu hayvanların serumlarının lenf kanserinin ilerlemesini durdurduğu ve geriletği rapor edilmiştir [118, 119]. Kidd'in çalışmasında bahsettiği anti kanser etkisinin esas sebebinin bu serumlarda mevcut olan bir enzim olduğunu Broome tespit etmiş ve makalesinde enzimin deaminasyon mekanizmasını yayınlamıştır. Daha sonraki yıllarda yayınlanan değişik çalışmalarda Kidd'in çalışmaları refere edilmiştir [120-123].

Kobay (Gine Domuzu) serumundan yeterli miktarda L-asparaginazın elde edilme sürecinin zahmetli ve maliyetli olması [124], L-asparaginazı araştıran bilim adamlarını bu enzimin elde edilebileceği diğer kaynakları araştırmaya yöneltmiştir. Alternatif kaynak olarak mikroorganizmaları kullanmayı düşünen Mashburn&Wriston 1964'de *E. coli*'den L- asparaginazı saflaştırmayı başarmış ve kobay serumundan elde edilen L-

asparaginazla benzer etki gösterdiğini yani anti tümör etkisi olduğunu kanıtlamışlardır [124, 125]. 1966'da Yellin ve Wriston kobay serumundan L- asparaginazın iki izoformunu saflaştırmayı başarmışlardır [126]. Aynı ekip daha sonra bulunan iki izoformdan sadece bir tanesinin antikanser etkisine sahip olduğunu bildirmiştir [127].

Oettgen ve ark. ise 1967'de L- asparaginazdan insan lösemisinin tedavisi sürecinde etkili bir anti kanser ajanı olarak bahsettiler [128]. Daha sonraki çalışmalarda doğal L-asparaginaz olarak tanımlanan bu enzimin insan immün sisteminde olumsuz bir etki oluşturduğu tespit edilmiştir [129]. İlacın antineoplastik özelliği bozulmadan immünogenetik yapısı farklılaştırılarak enzimin "coupling" formu oluşturulmuştur. Bu modifiye form polietilenglikol (PEG) L-asparaginaz olarak isimlendirilmiştir [130, 131]. Hayvanlarda yapılan uygulamalarda ilacın doğal ve modifiye formu karşılaştırıldığında antikör oluşturma özelliğinde bir artış gözlenmiştir [132]. Ayrıca başka bir çalışma (PEG) L-asparaginazın deaminasyon süresinin belirgin şekilde uzadığını rapor etmiştir [133]. Daha sonraki zamanlarda L-asparagin uygulamaları için en uygun doz tespitine ilişkin çeşitli çalışmalar bildirilmiştir [134-136].

L-asparaginaz enziminin moleküler yapısı [2, 6, 19, 24, 25, 137], geni (*ansB*)'nin bulunduğu regülon [8, 10, 19, 137-139] ve enzimin anti-lösemik ve anti-neoplastik klinik uygulamaları [2, 140, 141] hakkında bir çok çalışma bulunmasına rağmen, bu enzimin üretimi konusunda çok az sayıda çalışma olup, bunlar da genellikle başta *E. coli* olmak üzere birkaç bakteri ile sınırlıdır. Enzimin bakterilerde optimal üretimi için kimyasal ve fiziksel şartların tam olarak çalışılmamış olması ve buna bağlı olarak az miktarlardaki üretimi, bu enzimin marketteki pahalı değerinin en önemli sebeplerindendir [12]. Bu da oldukça etkin bir onkolitik ajan olan enzimin yaygın bir şekilde kullanımını mümkün kılmamaktadır. Karbon katabolit represyon, azot ve oksijenle ileri derecede regüle olan bu enzimin üretimi için farklı karbon, azot ve atmosferik içeriğe sahip ortamlar kullanılmış, farklı bakterilerde ve hatta bir bakterinin aynı türünde bile farklı sonuçlar elde edilmiştir [10, 11, 13]. Glukoz bu enzimin üretiminde en yaygın kullanılan karbon kaynağı olmasına rağmen, bazı bakterilerde yüksek katabolit inhibisyon seviyesine sahiptir [10, 11, 13]. Bu nedenle uygun karbon ve azot kaynaklarını tespit etmeye yönelik çalışmalar sınırlı sayıda bakteri türü ile yapılsa bile, bu enzimin ticari ölçeklerde üretimi için bir gerekliliktir [10, 12]. L-asparaginazın oksijenle regülasyonu konusunda da tutarlı sayılamayacak sonuçlar rapor edilmiştir [11]. Ancak bunların nedeni tam olarak tespit edilememiştir. Bu konuda yapılmış olan bir çalışmada *Enterobacter aerogenes*'in L-asparaginaz üretimi için

gerekli olan besin ve oksijen koşulları çalışılmış ve bu enzimin üretimi için en uygun karbon ve azot kaynakları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmadaki bulgulara göre, en iyi karbon kaynağı olarak sodyum sitrat, en iyi azot kaynağı olarak da diamonyum hidrojen fosfat belirlenmiştir ve bu bakteride L-asparaginaz üretimine yönelik nitrojen katabolit baskısının olmadığı saptanmıştır [10].

L-asparaginaz geni (*ansB*)'nin indüksiyonu ve represyonu çeşitli transkripsiyon faktörlerini içeren kompleks mekanizmalar ile kontrol edilmektedir; Buna bağlı olarak da L-asparaginaz sentezi karbon, azot kaynağı ve oksijen gibi besinsel ve çevresel faktörler tarafından düzenlenmektedir [142, 143]. *E. coli*'den elde edilen L-asparaginazın (FNR) proteini, (ArcA) ve (CRP) ile pozitif regüle olduğu ve dolayısı ile enzimin sentezinin anaerobiosis ile indüklenirken glukoz gibi katabolik represörle baskılandığı saptanmıştır [19, 20, 143]. Glukozun bir çok gram-negatif bakteride *ansB* geni üzerinde karbon katabolit represyon gösterdiği ve karbon katabolit represyon seviyesinin bakteriden bakteriye farkı olduğu ve bazı bakterilerde bu çeşit represyonun olmadığı da rapor edilmiştir [10, 22]. Benzer durum enzim sentezinin oksijenle regülasyonu için de rapor edilmiş, bazı çalışmalarda aynı bakteride oksijen enzim sentezini indüklerken diğer çalışmalarda baskılandığı belirtilmiştir [10, 138, 139].

E. coli'de L-asparaginaz sentezi üzerine glukozun etkisinin çalışıldığı bir başka çalışmada [53], % 5'lik glukoz içeren büyüme ortamında enzim sentezinin hemen hemen tamamen baskılandığı saptanmıştır. Burada, L-asparaginaz sentezini inhibe eden tek faktörün, glukozun neden olduğu hücre içi cAMP seviyesindeki azalış olmadığı, oluşan asit ortamının da bunda etkili olduğu ileri sürülmüştür. Enzim sentezinin azotla regülasyonu konusunda ise, çözünür azot kaynağı olarak L-asparagin, L-glutamin ve L-glutamik asit gibi amino asitler ve üre enzim sentezini stimüle ederken, amonyum bileşiklerinin enzim sentezini baskılandığı tespit edilmiştir [85, 143, 144]. Bu konuda farklı çalışmalarda bildirilmiştir [145]. Bu bağlamda, bir çalışmada glukoz ve amonyum iyonlarının ortama eklenmesi ile L-asparaginaz üretiminin baskılandığı belirlenirken [54], *Klebsiella aerogens* ile yapılan benzer bir çalışmada ise glukozun bu bakteride L-asparaginaz üretimini inhibe etmediği görülmüştür [22].

Atmosferik oksijen içeriğinin L-asparaginaz sentezi üzerine olan etkisi konusunda da karbon ve azot kaynakları gibi farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Bazı bakterilerde iyi bir havalandırma L-asparaginaz sentezini indüklerken [10], diğer bakterilerde baskılandığı gözlenmiştir [9, 11, 14, 146]. Örneğin, *E. coli*'de enzim sentezinin anaerobik koşullarda aerobik koşullardakinden 100 ile 1000 kat kadar daha fazla olduğu rapor

edilirken [14], aynı bakteri ile yapılan bir başka çalışmada artan erimiş oksijen seviyesine paralel olarak L-asparaginaz sentezinin de arttığı gösterilmiştir [56].

Bu çalışmada çalışılmış olan L-asparaginaz kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan başlıca enzimdir. Sadece bazı gram-negatif bakterilerde bu aktivitesi ile bulunan enzimin etki mekanizması L-asparagin bakımından oksotrof olan kanser hücrelerinin eksojen kaynaklı bu amino asitten yoksun bırakılmasına dayanır. Etkin bir L-asparagin sentetaz enzimine sahip olduklarından bu amino asit bakımından prototrof olan normal hücreler böyle bir uygulamadan etkilenmezler.

Bu çalışmada endüstriyel önemi büyük olan L-asparaginazın aynı gruba giren farklı bakteriler tarafından üretiminin optimizasyonu için gerekli fiziksel ve kimyasal koşullar araştırılmıştır. Bunun için *vgb* klonlanmış ve bu enzimi üretme yetenekleri ile bilinen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter aerogenes* ve ayrıca *ansB* geni klonlanmış ve bizim klonlamış olduğumuz *E. coli* HB101 [pAHZ12] ve *Enterobacter aerogenes* [pB-PGA] bakterileri kullanılmıştır. Özellikle, enzimin oksijen ve karbon katabolit represyonu konusunda çok farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Örneğin, birbirine yakın bakteri türleri üzerinde yapılan bazı çalışmalarda oksijenin bu enzimin üretimini baskıladığı rapor edilirken, diğerlerinde oksijenin enzim üretimini arttırdığı yönünde bulgular vardır. Etkin bir oksijen alım sistemi ile donatılmış rekombinant bakterilerin böyle tartışmalı bir konuya açıklık kazandıracağı şüphesizdir. Bu çalışmada, bakterilerin çeşitli karbon ve azot kaynakları içeren fakir ve zengin besi ortamlarında, değişik pH ve sıcaklık koşullarında kültürasyonları yapılarak, enzim üretiminin regülasyonu çalışılmıştır. Ayrıca, rekombinant bakterilerde bu regülasyonun nasıl olduğu da karşılaştırmalı biçimde araştırılmıştır.

3 MATERYAL ve METODLAR

3.1 Kimyasal ve Ayıraçlar

Bu çalışmada besiyeri hazırlamasında kullanılan kimyasallar, plazmid izolasyonu, agaroz jel elektroforezi uygulamalarında kullanılan kimyasallar ve trikloroasetik asit, sodyum dihidrojen fosfat, amonyum klorid, potasyum fosfat (KPi), tris-HCl, fosforik asit, Nessler Ayırıcı kimyasalları olan HgI₂, KI ve NaOH analitik saflık derecesinde olup Sigma şirketinden temin edildi.

3.2 Kullanılan Bakteriler, Stok kültürleri ve Besi Ortamları

Bu çalışmada L-asparaginaz enzimi üretmeleri ile bilinen çeşitli gram negatif bakteriler (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*) ve bu bakterilerin *Vitreoscilla* hemoglobin geni (*vgb*) veya L-asparaginaz geni (*ansB*) taşıyan rekombinant suşları kullanıldı. Bu bakterilerden *E. coli*-JM103 suşu ve yine bu bakterinin *ansB* geni içeren HB101 suşu kullanıldı. Bu rekombinant suş ekibimize Prof. Socorro-Duran Vargas (Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autonoma de Mexico) tarafından sağlandı ve detaylı özellikleri aşağıda (3.3. Kullanılan Klonlar) belirtildi. *E. aerogenes* (NRRL B-427) ve *P. aeruginosa* (NRRL B-771) Amerikan Tarım Bakanlığı (USDA Culture Collection, Peoria, Illinois, USA) kültür koleksiyonundan sağlanmışlardır. *E. aerogenes*'in *vgb*⁻ ve *vgb*⁺ suşları kendi laboratuvarımızda elde edilen rekombinantlar olup sırası ile Ea[pUC8] Ea[pUC8:15] olarak bilinmektedir [147].

P. aeruginosa'nın transpozon dayalı *vgb*⁺ suşu (PaJC) Prof. Benjamin C. Stark tarafından sağlanmıştır (Illinois Institute of Technology, Chicago Il, USA). Her iki bakterinin rekombinant suşlarının detaylı karakteristikleri aşağıda (3.3. Kullanılan Klonlar) verilmiştir. *E. aerogenes*'e *ansB* geni klonlamada kullanılan pB-PGA plazmidi Prof. Klaus-Heinrich Röhm (Philipps-Universität, Institut für Physiologische Chemie, Marburg, Germany) tarafından sağlanmış ve bu vektörün detaylı tanımı takip eden iki alt konuda yapılmıştır.

Ea[pUC8:15] suşu 665 baz çiftine sahip pUC8 plazmidinin multi klonlama bölgesindeki Hind III restriksiyon bölgesine yaklaşık 2.3-Kb'lık promotörü ile beraber *vgb* geni taşıyan *Vitreoscilla* genomik fragmanı klonlanması ile oluşturulmuş bir rekombinant bakteri suşudur. [pUC8:15] plazmidinin büyüklüğü yaklaşık 5-Kb'dır.

3.2.1. Çalışmada kullanılan besi ortamlarının hazırlanması

Bu çalışmada zengin besi yeri olarak LB, TB, SOB, melas, vinas, zeytinyağı fabrikası atığı, peynir altı suyu ve sınırlı bir besinsel değeri olan yarı sentetik (MMY) besi ortamları kullanıldı (Çizelgeler 3.1.-3.5). Bu besi ortamlarının içeriği ileriki sayfalarda tablo halinde verilmiştir. Besi ortamlarının pH'ları yaklaşık olarak 7.0 ayarlandı ve 125 ml kapasiteli erlenlerde 20 ml besi ortamı olacak şekilde 25 dakika süresince otoklavda 120 °C'de 1 atm basınçta otoklav edildi.

Çizelge 3.1. Kullanılan besi ortamları ve içerikleri (g L⁻¹)

Lauria Broth (pH 7.5)	
Pepton	10
NaCl	10
Maya özütü	5
Terrific Broth (pH 7.5)	
Tripton	12
Maya özütü	24
K ₂ HPO ₄	2
KH ₂ PO ₄	9.4
SOB Besiyeri (pH)	
Bakto-tripton	12
NaCl	10
Pepton	10
Maya özütü	5
MMY Besiyeri (pH)	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01
KCl	0.5
K ₂ HPO ₄	1.0
Maya özütü	0.5

Çizelge 3.2. Melasın İçeriği (g L⁻¹)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5
Na ₂ SO ₄	4.13
KH ₂ PO ₄	25.993
CaCl ₂	2.8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.7
FeSO ₄ .H ₂ O	0.040
MnSO ₄ .H ₂ O	0.017
ZnSO ₄ .H ₂ O	0.021
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00152
Pepton	2.67
H ₃ BO ₃	0.01
Pantotenik asit	0.0010
İnosit	0.125
Pridoksin	0.006
Biotin	0.00025

Çizelge 3.3 Vinasın içeriği (g L⁻¹)

Süksinik Asit	0.5
Laktik asit	10.0
Bütirik asit	0.0
Propiyonik asit	0.0
Asetik asit	2.8
Gliserol	5.2
Etanol	5.0
Sülfat	2.9
Toplam azot	3.9
Askıda katı	6.4
Toplam katı	98.4
BOİ	60
KOİ	70
Renk	Koyu
PH	4.89

Çizelge 3.4 Zeytinyağı atığının içeriği (g L⁻¹)

Bileşenler	
Kuru madde (%)	12.0
Organik maddeler (%)	10.5
Mineraller (%)	2.5
Organik bileşenler (%)	
Seker	5.0
Protein	1.2
Organik asitler	0.7
Polialkoller	1.8
Pektinler,tanenler	1.0
Polifenoller	1.0
Lipidler	0.1
Mineral bileşenler (ppm)	
P	500
K	3000
Ca	350
Mg	200
Na	450
Fe	35
pH	4.5-5
K.O.I.	90-100

Çizelge 3.5. Peynir altı suyunun içeriği (g L⁻¹)

Kuru madde (%)	3.695
Su (%)	96.30
Yağ (%)	0.1
Yağsız Kuru madde (%)	3.595
Asitlik (%)	0.334
pH (%)	5.10
Protein (%)	0.880
Kül (%)	0.469
Laktoz (%)	3.60
N (%)	0.137
P (ppm)	36.30
Fe (ppm)	0.820
Zn (ppm)	4.316
Mn (ppm)	0.70
Mg (ppm)	41.75
K (ppm)	948.5
Ca (ppm)	280.4
Na (ppm)	233.8

3.2.2. Bakteri stoklarının hazırlanması

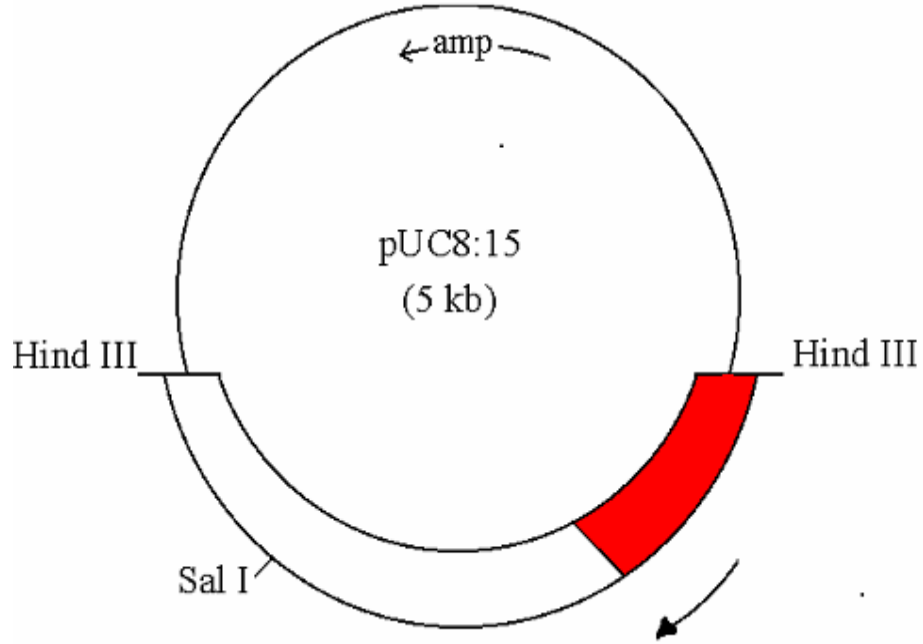
Çalışmada kullanılan bakterilerin uzun süreli stokları % 20 gliserol (v/v) içeren sıvı Lauria-Berteni (LB) besi ortamı içinde hazırlandı. Bunun için konakçı bakteriler (*E. coli*, *E. aerogenes* ve *P. aeruginosa*) sıvı LB, bunların rekombinantları olan Ea[pUC8:15], Ea[pB-GA], *E. coli*[pAHZ12] 100 µg/ml amfisilin ve PaJC ise 500 µg/ml kloramfenikol içeren LB ortamına ekim yapıldı ve gece boyu (15 saat kadar) 37 °C, çalkalamalı koşullarda (200-rpm) su banyosunda inkübe edildi. Bu kültürlerden 1 ml alınarak eppendorf tüplerine transfer edildi ve 10,000-rpm'de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj edilerek peletlere 800 µl LB ve 200 µl gliserol eklenerek hafifçe vortekslendi.

Bu şekilde hazırlanmış olan hücre süspansiyonları -20 °C'de muhafaza edildiler. Bu şekilde hazırlanan stoklarda hücrelerin 2 yıl kadar canlılıklarını korudukları belirlenmiştir. Ancak, her çalışmada kullanılan bakteriler bu stok kültürlerden değil, LB ve rekombinantlar için LB amp + antibiyotik içeren agar plakalar üzerine ekilen + 4 °C'de muhafaza edilen ve 1 ayı geçmeyen hücrelerden taze pasajlar alınarak yapıldı. L-asparaginaz sentezinin çalışıldığı hücre kültürleri de bu pasajlardan alındı.

3.2.3. Kullanılan *vgb* klonları

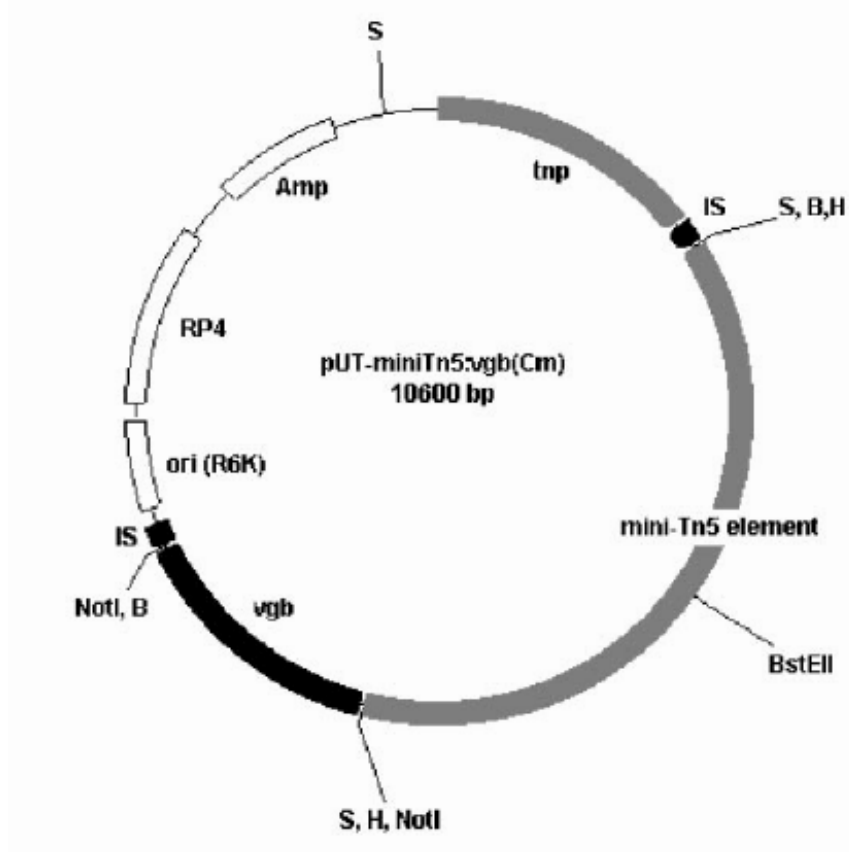
Bu çalışmada kullanılan *E. aerogenes*'in *vgb* rekombinant bu geni bir pUC plazmidini üzerinde taşıırken (Şekil 3.1), *P. aeruginosada* ise aynı gen transpozon bağımlı

bir rekombinasyonla (Şekil 3.2) bakterinin kromozomuna entegre edilmiştir. *E. aerogenes*'in *vgb*⁺ rekombinantı “Ea[pUC8:15]” olarak adlandırılmaktadır [147]. Ea[pUC8:15] suşu 665 baz çiftine sahip pUC8 plazmidinin multi klonlama bölgesindeki Hind III restriksiyon bölgesine yaklaşık 2.3-Kb'lık promotörü ile beraber *vgb* geni taşıyan *Vitreoscilla* genomik fragmanı klonlanması ile oluşturulmuş bir rekombinant bakteri suşudur. [pUC8:15] plazmidinin büyüklüğü yaklaşık 5-Kb'dır.



Şekil 3.1. pUC8:15 plazmidinin oluşturulması [146].

PaJC olarak adlandırılan *vgb*⁺ suşu *P. aeruginosa*'nın kromozomuna homolog rekombinasyon yolu ile tek kopya halinde *vgb* entegre edilerek oluşturulmuş bir rekombinant bakteri suşudur [148]. pUC8:16 plazmidindeki 1.4-kb uzunluğundaki *Vitreoscilla* fragmenti HindIII and BamHI R.E ile kesilip pUC18 plazmidinin NotI bölgesine yerleştirilmiş ve bu fragment daha sonra NotI Restriksiyon enzimi ile pUT-miniTn5(Cm)'in aynı NotI bölgesine yeniden transfer edilerek pUT-mini Tn5:*vgb*-Cm Transpozon / Transpozaz sistemi oluşturularak *P. aeruginosa*'nın kromozomuna *vgb*'nin entegrasyonu sağlanmıştır.



Şekil 3.2. Transpozon / Transpozaz sistemi (pUT-mini Tn5:vgb-Cm) [148].

3.2.4. Endüstriyel atıklardan L-asparaginaz üretimi

Çalışmanın bu kısmında çeşitli endüstriyel atıkların besi ortamı olarak kullanıldığı ortamların L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi çalışıldı. Bu besi ortamları başlıca melas, vinas, zeytinyağı fabrikası atığı (ZYFA) ve peynir altı suyu (PAS)'dur. Ön çalışmalarımızdan bakterilerin bu atıkların hangi konsantrasyonlarında çoğalabildikleri araştırıldı ve bunun sonucunda melas % 1, vinas % 5, ZYFA %5 ve PAS % 10'luk olacak şekilde hazırlandı. Bakterilerin bu ortamlarda kültürü yukarıda azot ve karbon kaynaklarının kullanıldığı MMY ortamında olduğu gibi yapıldı ve 24 saat inkübasyon periyodunun sonunda kültürlerin enzim aktiviteleri, biyokütleleri, kültür pH değişimi ve kültür ortamına salınan amonyak miktarı ölçüldü.

3.3 Klonlama Çalışmaları

L-asparaginaz sentezinin değişik kimyasal ve fiziksel şartlar altında nasıl etkilendiği bu enzimi üretmeleri ile bilinen bakteriler ve *ansB* rekombinantları kullanılarak yapıldı. Ayrıca, klonlanmış olduğu bakterilere etkin bir oksijen alım ve

kullanım potansiyeli kazandırdığı bilinen *Vitreoscilla* hemoglobinin varlığında bu enzimin aynı şartlar altında nasıl regüle olduğu araştırıldı. Bu çalışmada iki çeşit *ansB* klonu kullanıldı. Birincisinde *ansB* geni içeren bir vektör tarafımızdan *E. aerogenes*'e klonlandı ve bu rekombinantın (Ea[pB-PGA]) L-asparaginaz üretim kapasitesi karşılaştırmalı olarak çalışıldı. İkinci *ansB* rekombinant sisteminde ise çalışmalar bu geni yine bir vektör (pAHZ12) aracılığı ile içinde bulunduran *E. coli* ile yapıldı.

3.3.1 Plazmid transformasyonu ve rekombinantların seçilimi

E. aerogenes'e *ansB* geni klonlanması tarafımıza Prof. Klaus-Heinrich Röhm (Philipps-Universität, Institut für Physiologische Chemie, Karl-Von-Frisch-Straße, D-35033 Marburg, Germany) tarafından gönderilen ve bu geni üzerinde taşıyan pB-PGA plazmidi (Şekil 1.13) ile yapıldı. Plazmid bir membran filtreye emdirilip steril bir filmle kaplanarak posta ile tarafımıza sağlanmıştır. Membran steril bir ortamda parçalara kesilerek 200 µl TE tamponu içeren bir eppendorf tüpüne konuldu ve narin bir çalkalama ile emdirilmiş DNA'nın solüsyona geçmesi sağlandı ve transformasyon bu solüsyondan 1-10 µl alınarak gerçekleştirildi. Klonlama yapılmış bakterilerin uygun vektörü taşıdıkları hem antibiyotik (amfisilin) seçim ve hem de plazmid izolasyonunu takiben gerçekleştirilen plazmid restriksiyon haritası ile kanıtlandı. Oluşturulmuş olan ve pB-PGA plazmidi taşıyan rekombinant suş "Ea[pB-PGA]" olarak adlandırıldı.

3.3.1.1 Kompetan hücre oluşturulması

Kompetan hücre oluşturulması (hücrenin eksojen kaynaklı bir DNA molekülünü içine alması için yapılan işlem) standart CaCl₂ yöntemi [149] ile aşağıdaki protokol çerçevesinde gerçekleştirildi.

1. Gece boyunca (15-18 saat) 37 °C 200 rpm'de kültürü yapılan hücrelerden 100 µl örnek (inokulum) alınarak 20 ml LB içeren erlenlere ekim yapıldı ve bu kültürler yine çalkalamalı şartlarda (200 rpm) ve 37 °C'de A₆₀₀ değeri yaklaşık 0.4-0.5 olana kadar inkübe edildi.
2. Yukarıdaki optik yoğunluğa ulaşan erlenler bir buz kabına gömülerek 10 dk. bekletildikten sonra, soğutmalı (4 °C) santrifüjde 14,000 rpm'de 4 dk. santrifüj edilerek pelletler muhafaza edildi.

3. Toplanan pelete 10 ml soğuk 0.1 M CaCl₂ eklenerek 30 dk. buz üstünde tutulduktan sonra 4 °C, 14.000 rpm’de yine 4 dk. santrifüj edildi ve yine pelet muhafaza edildi.
4. Toplanan pelet 2 ml soğuk 0.1 M CaCl₂ içinde süspansiyon edilerek transformasyon için hemen kullanıldı ya da 18 saati geçmeyen bir süre için 4 °C’de saklandı.

3.3.1.2 Hücrelerin transformasyonu

Yukarıdaki şekilde elde edilen kompetan hücelere *ansB* geni taşıyan pB-PGA plazmidinin aktarımı (transformasyonu) literatürdeki standart “ısı şoku” protokolüne göre aşağıdaki şekilde yapıldı[148].

1. Yukarıda elde edilen hücre ve CaCl₂ süspansiyonundan 200 µl eppendorf tüplerine alınarak buz üstünde 5 dk. inkübe edildi.
2. Süspansiyonun üzerine 0.1-1 µg DNA içeren 1-10 µl DNA solüsyonu eklendi ve buzda 30 dk. bekletildi.
3. Tüpler 42 °C’deki bir su banyosuna alınarak 50 sn. tutulduktan sonra tekrar buza gömülerek 2 dk. bekletildi.
4. Tüpler 800 µl LB eklenerek hafifçe çalkalandıktan sonra 37 °C’de 30-90 dk. inkübe edildiler.
5. Hücreler amfisilin (100 µg/ml) içeren agar petri kaplarına 100 µl olarak transfer edilerek cam çubukla yayıldıktan sonra inkübatöre kaldırılarak en az 24 saat süre ile inkübe edildiler.

3.3.1.3 Rekombinant klonların seçilimi

Etrafında satellit (uydu) koloniler taşıyan rekombinant kolonilerin bu uydu kolonilerle gözle görülebilir bir büyüklüğe ulaşmalarının en az 18 saatlik bir inkübasyonu gerektirdiği belirlenmiştir. Rekombinant kolonilerin sahte rekombinantlardan ayrılmasını onların antibiyotik ortamda satellit oluşturmaları ile belirlenir. Etraflarında kendi büyüklüğünün 1/10-1/100 kadar daha küçük koloniler içeren ortadaki ana koloni iğne öze ile alınarak 20 ml LB-amp (100 µg/ml amfisilin içeren LB ortamı) ortamına ekim yapıldıktan sonra çalkalamalı koşullarda (200-rpm) 37 °C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı ve bu kültürlerden plazmid izolasyonu yapıldı.

3.3.1.4 Plazmid izolasyonu (miniprepler)

Yukarıdaki şekilde seçilimi ve çoğaltılması yapılan rekombinant kolonilerden plazmid izolasyonu standart alkali lizis yöntemi kullanılarak yapıldı [143]. Yaklaşık 30 yıl önce geliştirilen bu yöntemle 1 µg plazmid DNA'sı ile 5×10^6 - 2×10^7 transformant elde edilebildiği bildirilmektedir. Hücrelerden plazmid izolasyonu için Çizelge 3.6'de verilen çözeltiler kullanıldı.

1. Gece boyunca inkübasyonu yapılan kültürlerden 1.5 ml bir eppendorf tüpe aktararak 13,000-rpm' de 30 sn. santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve pelet plazmid izolasyonu için kullanıldı.
2. Pelet 100 ml soğuk *Çözelti I* ile sulandırılıp 30 sn. vortekslendikten sonra üzerine 200 ml *Çözelti II* (160 ml NaOH+ 40 ml SDS) eklenip tüp alt-üst edildikten sonra 10 dk. buz içinde bekletildi.
3. Karışıma 150 ml soğuk *Çözelti III* eklenerek tekrar vortekslendi ve buzda 15 dk. bekletildi.
4. Karışım 13,000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı.
5. Süpernatanta eşit hacimde fenol:kloroform eklenerek vortekslendikten sonra 2 dk. 13,000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant temiz bir tüpe alındı.
6. Süpernatant üzerine iki hacim saf alkol eklenerek buz üzerinde 15 dk. bekletildikten sonra karışım 13,000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek DNA (plazmid) çöktürüldü.
7. Eppendorfları ağız 5 dk. açık bırakılarak kurutulma işlemi yapıldıktan sonra pelete %70'lik soğuk etanol eklenerek yıkandı ve tekrar 13,000-rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek plazmid DNA'sı çöktürüldü.
8. Süpernatant uzaklaştırıp pelet (DNA) kurutuldu.
9. Pelet 10 µl steril TE tamponu eklenerek çözüldü. Bu DNA solüsyonu restriksiyon haritalama için kullanıldı.

Çizelge 3.6. Alkali Lizis Yöntemi ile hücrelerin parçalanmasında kullanılan çözeltiler [149]

1. Çözelti I	2. Çözelti II	3. Çözelti III
50 mM Glukoz	0.2 N NaOH	60 ml 5 M Potasyum asetat
25 mM Tris.HCl (pH 8.0)	% 1 SDS	11.5 ml Glasiyel asetik asit
10 mM EDTA (pH 8.0)		28.5 ml H ₂ O

3.3.1.5 Agaroz jel elektroforezi

Uygun restriksiyon enzimleri ile muamele görmüş yukarıdaki plazmid (pG-BGA) için agaroz jel elektroforezi standart metotlar kullanılarak yapılmıştır [148]. Jel hazırlama ve yürütme tamponu 5X stok TBE tamponunun 1X'e dilüe edilmiş halinden oluşmaktadır (1 litre 5X stok TBE tamponu: 54 g Tris baz (pH 8.3), 27.5 g borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)). Jellerin hazırlanması ve yürütülmesi genel olarak aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

1. Jeller için 50 ml 1X TBE tamponuna % 1.5 (w/v) agaroz ilave edildi ve mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyip solüsyon berraklaşınca kadar kaynatıldı. Solüsyon ısı 60-70 °C düşünce 10 mg/ml etidyum bromid stok solüsyonundan 30 µl eklenerek hava kabarcığı veya köpürme olmayacak şekilde hafifçe karışması sağlandı.
2. Temiz ve kuru bir jel döküm kalıbına (15 x 15 cm, Biorad) tarak dişlerini kapatacak kalınlıkta yukarıdaki jel solüsyonundan dökülerek yaklaşık 20 dk. beklendi.
3. Jel, döküm kalıbı ile beraber jel yürütme tankı içine alınarak taraklar çıkarıldı ve jeli yaklaşık 0.5 cm kapatacak miktarda jel yürütme tamponu tanka dolduruldu.
4. Restriksiyon enzimi ile muamele görmüş plazmid DNA'sı ve yine uygun restriksiyon enzimleri ile önceden kesilmiş lambda (λ) DNA'sı uygun kuyucuklara eklenerek sabit voltaj (40-50 Volt) ve akımda (20-25 mA) jel elektroforeze tabi tutuldu.
5. Jelin yürütülmesi bromfenol mavisi uygun uzaklığa ilerleyene kadar (genellikle 4-5 saat) sürdürüldü.
6. Jeldeki DNA bantlaşma motifi UV ışıkta floresan ışık yayan Etidyum bromür ile belirlendi. Bu boyanın DNA'ya bağlanarak (interkalasyon) 300 nm UV ışık

altında emisyonu (ışık yayması) DNA bantlarının buldukları pozisyonlarda görünmelerini ve fotoğraflanmalarını mümkün kılar.

7. Boyama işleminden sonra jel yüzeyi çok koyu boyandığı takdirde, bantları net olarak görebilmek için jel bir plastik kap içindeki suya daldırıldı ve fazla boyadan arındırıldı [148].
8. Yukarıdaki şekilde hazırlanan jelin fotoğrafları çekilerek, jel üzerindeki plazmid DNA fragmanları (bantları)nın büyüklükleri (baz çifti sayısı veya kilobaz olarak), restriksiyon fragman büyüklüğü bilinen λ DNA'sı standart eğrisinden bulundu.

3.4 Bakterilerin kültürü

Bakteri kültürleri taze pasajlardan alınan kolonilerden yapıldı. Bunun için, pasajlardan bir koloninin bir kısmı öze ile alınarak 20 ml LB içeren 125 ml kapasiteli erlenlere ekim yapıldı ve gece boyunca çalkalamalı koşullarda (200-rpm) 37 °C'de inkübe edildi. Bu gece kültürlerinden yeni besi ortamlarına 1/100 inokulum (ör., 20 ml LB içeren erlenlere 200 µl gece kültürü) transfer edilerek, enzim sentezi çalışmaları için değişik kültür koşulları altında inkübasyona bırakıldı.

3.4.1 Biyokütle ölçümü

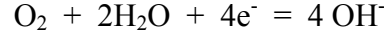
Hücre kültürlerinde çoğalma indikatörü olarak toplam ortam türbiditesinin optik densitesi (A_{600}) kullanıldı. $A_{600} > 0.5$ olduğunda kültürler uygun şekilde (1/5 veya 1/10) dilüsyon yapılarak A_{600} değerleri kaydedildi.

3.4.2 Bakterilerin oksijen alımı

Oksijen ölçüm deneyleri YSI 5331 standart oksijen probu ile yapıldı. Bu sistem Su Banyosu- Polografik Probu taşıyan cam örnek haznesi (küvet) ve Oksijen Monitörü olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Prob Clark Tip bir oksijen probu olup komple polarografik bir özellik gösterir. Probun ucuna sarılı ince bir membran elektrotları buldukları çevreden ayırmaktadır. Membran gazlara geçirgen olup probun yüzeyi ile temas halindedir. Uygun bir voltaj elektrotlara uygulandığı zaman oksijen katod ile reaksiyona girer ve bir akım oluşur. Akımın oranı membrandan geçen oksijen miktarı ile ilişkilidir. Dolayısı ile prob esasen oksijen basıncını ölçer. Oksijen katodda hızlıca tüketilirse membran içindeki oksijen basıncının sıfır olduğu kabul edilir. Böylece

oksijen basıncı arttığı zaman daha çok oksijen membrandan difüze olur ve elektrotlardan daha çok akım geçer. Düşük basınç ise düşük akıma sebep olur.

Poligrafik probun oksijeni tüketmesi aşağıdaki reaksiyona göre olur:



Prob tarafından tespit edilen oksijen harcanım oranı elektrotlar tarafından üretilen akımla direkt ilişkilidir. Bir mikro amperlik prob akımı prob tarafından tüketilen 8.3×10^{-11} gr O_2/sn oksijene denk gelir. Bu standart oksijen probu 37°C 'de ve havada $0.33 \mu\text{amper}$ akım sağlar. Probun kalibrasyonu oksijen içeriği bilinen bir tampon sistemi (0.1 M potasyum fosfat, pH 7.6) ile yapıldı. Bu tampon bir manyetik karıştırıcı aracılığı ile yaklaşık 400-rpm hızda gece boyunca karıştırılarak oksijene doyuruldu. Oksijen monitörü hücrelerin bulunduğu küvetlerin etrafını saran bir su banyosu ile desteklendi. Değişik bakteriler için su banyosunun ısı ölçümler öncesi kalibre edildi. Bakteri süspansiyonları ve kalibrasyon tamponunun bulunduğu küvetlerdeki ısı bu küvetlerin etrafında sirkülasyon yapan suyun ısı ile aynı oluncaya kadar bu küvetlerin içindeki manyetik karıştırıcılarla karıştırıldı. Bakterilerin oksijen tüketim hesapları 4 ml havaya doyurulmuş potasyum fosfat tamponunun bulunduğu küvete göre yapıldı. Bu küvette oksijen seviyesi % 100 kabul edilmektedir ve bakterilerin eklendikleri ortamda sebep oldukları % oksijen düşüşü onların oksijen alım güçleri olarak ifade edilmektedir.

Hücrelerin oksijen kullanımlarının tespitinde kullanılan bu yöntem uygulanırken inokülasyonun 6., 9. ve 12. saatlerinde örneklerden 5'er ml hücre kültürü alındı ve oda ısısında 5000 rpm 'de 5 dk. santrifüj edildi. Daha sonra peletler A_{600} değerlerine bakılarak eşit OD'de gece boyunca oksijene doyurulmuş 0.1 M potasyum fosfat tamponunda yeniden süspansiyon edildi. Bu süspansiyondan 1 ml alınarak probun küvetine konmuş olan 3 ml havaya doyurulmuş potasyum fosfat tamponuna eklendi. Kalibrasyon probuna (4 ml potasyum fosfatın bulunduğu küvette bulunan prob) göre, örneklerin yani bakteri süspansiyonlarının bulunduğu küvetteki belli zaman aralığındaki (genellikle 5 dak) % oksijen azalması kaydedildi ve bakterilerin oksijen alım oranları hesaplandı. Havaya doyurulmuş yukarıdaki potasyum fosfat tamponunun oksijen konsantrasyonu 25°C 'de $250 \mu\text{mol/L}$, 32°C 'de $233 \mu\text{mol/L}$, 37°C 'de $218 \mu\text{mol/L}$ 'dir. Bakterilerin oksijen alım yetenekleri *E. coli* için 25°C , *E. aerogenes* için 37°C ve *P. aeruginosa* içinse 32°C 'de aşağıdaki formüle göre belirlendi [152].

$$R = N \mu\text{mol} / \text{Litre} \times (4/1000)\text{L} \times D/VT$$

Burada;

R= Bakteri başına tüketilen oksijen miktarını

N= Bakteriye özgü sıcaklık derecesinde tamponun içerdiği oksijen konsantrasyonunu

D= % Oksijen azalma oranını

V= Canlı hücre sayısını

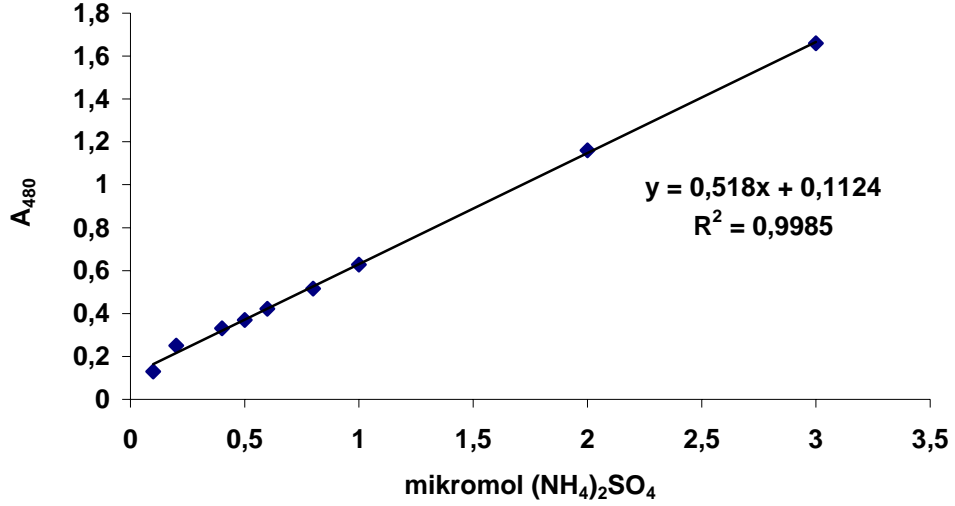
T= D'deki oksijen oranının tüketilmesi için geçen zamanı ifade etmektedir.

3.4.3 Kültürlerin asit üretimi

Kültürlerin asit üretimi pH değeri olarak kaydedildi. Bunun için kültür ortamlarının başlangıç pH değerinin (genellikle pH 7.2) kültür süresi sonunda nasıl değiştiği belirlendi.

3.4.4 Kültür ortamı amonyak konsantrasyonunun belirlenmesi

Bakterilerin kültür ortamına salmış oldukları amonyak tayini için kültürler oda sıcaklığında 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra hücre peletleri elde edildi. Bu peletler daha sonraki enzim (L-asparaginaz) tayinleri için muhafaza edilirken, supernatantlar ortama salınmış serbest amonyak içerikleri bakımından analiz edildiler. Bunun için 100 µl supernatant alınarak içinde 4.65 ml distile su bulunan tüplerine eklendi, bu karışımın üzerine 0.25 ml Nessler ayırıcı eklenerek vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında tutulduktan sonra OD₄₈₀ değerleri kaydedildi. Bu değerler, amonyum sülfat kullanılarak oluşturulan standart eğriye göre değerlendirilerek ortam amonyak konsantrasyonu belirlendi (Şekil 2.3). Standart eğriler her deneyle paralel yapılmakta olup 50 mM Tris-HCl (pH 8.6) içinde hazırlandı 0.5 ml 10 mM L-asparagin, 1 µmol/ml stok amonyum sülfat solüsyonundan 0.2-0.8 ml ve 0.25 Nessler ayırıcı eklenmeden önce toplam hacim 2.5 ml olacak şekilde dH₂O eklendi ve tüpler karıştırılarak 10 dk. oda sıcaklığında bekletildi ve köre karşı 480 nm'de okumaları yapıldı.



Şekil 3.3. L-asparaginaz aktivitesinin değerlendirilmesi ve kültür ortamına salınan amonyak miktarının belirlenmesi için kullanılan tipik bir amonyum sülfat standart eğrisi.

3.4.5 L-asparaginaz aktivitesinin ölçülmesi

Enzim aktivitesinin ölçülebilmesi için ilk yapılan işlem periplazmik L-asparaginaz'ın salınımı için potasyum fosfat-hekzan sulu faz sistemi ile membran permeabilizasyonudur. Bu metotta hücreler permeabilize edilerek, ortama salınan L-asparaginaz aktivitesi ölçülmektedir [29]. Bu yöntem, çalışmamızda farklı kültür koşullarında *E. coli*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa* ve onların rekombinant suşlarında L-asparaginaz sentezi için uygulandı. L-asparaginaz üretimi için üretilen hücreler, oda sıcaklığında santrifügasyon (10.000 rpm ve 5 dak) aracılığıyla elde edildikten sonra 0.05 M potasyum fosfat (KPi) tamponu (pH 8.6) ile bir kez yıkandı ve %1 hekzan içeren aynı tamponda, $A_{600} = 5.0$ olacak şekilde yeniden süspansiyon edildi. Bu süspansiyon oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı ve her 10 dakikada bir vorteks ile karıştırıldı. Süre bitiminde tüpler ağzı açık bir şekilde 5 dakika havalandırılarak L-asparaginaz aktivite analizine geçildi.

L-asparaginaz aktivitesi, çalışmamızda bu enzim tarafından L-asparagin'in aspartik asite ve amonyağa yıkılmasından açığa çıkan amonyağın belirlenmesine dayanan ve yaygın olarak kullanılan Nessler reaksiyonu ile belirlenmektedir. Toplam 2 ml olan reaksiyon karışımı 1.8 ml 0.05 M Tris-HCl (pH 8.6) içinde taze olarak hazırlanmaktadır. 0.01 M L-asparagin ve 0.2 ml hücre ekstraktı (veya permeabilize edilmiş hücre süpernatantı) içermektedir. Her bir örnek için paralel hazırlanmış körlere

ekstrakt konulmadan önce 0.1 ml 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) konuldu ve sonra örnekler ve kendi körleri 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı süre bitiminde reaksiyonu durdurmak için örnek tüplerine 0.1 ml 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) eklendi. Reaksiyon karışımı daha sonra 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 1 ml süpernatant ve 3.5 ml distile su içeren tüplere transfer edildi. Bu karışıma 0.5 ml Nessler ayırıcı eklenerek tüpler vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu ve A_{480} değerleri körlerine karşı okundu. Bir L-asparaginaz ünitesi (U), 37°C'de 1 dakikada 1 μmol amonyak açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı. Spesifik aktivite ise miligram toplam hücre proteininde bulunan enzim ünitesi olarak ifade edildi ($\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein). Örneklerdeki amonyak konsantrasyonu, daha önce amonyum sülfatla hazırlanmış olan standart eğri yardımı ile hesaplandı. Bu metotla amonyak belirleme sınırı yaklaşık 10 μM olarak belirlendi. Örneklerdeki total protein miktarı, sığır serum albümin (BSA) standart eğrisi kullanılarak Lowry (1951) metoduna göre yapıldı [150].

4 ARAŞTIRMA BULGULARI

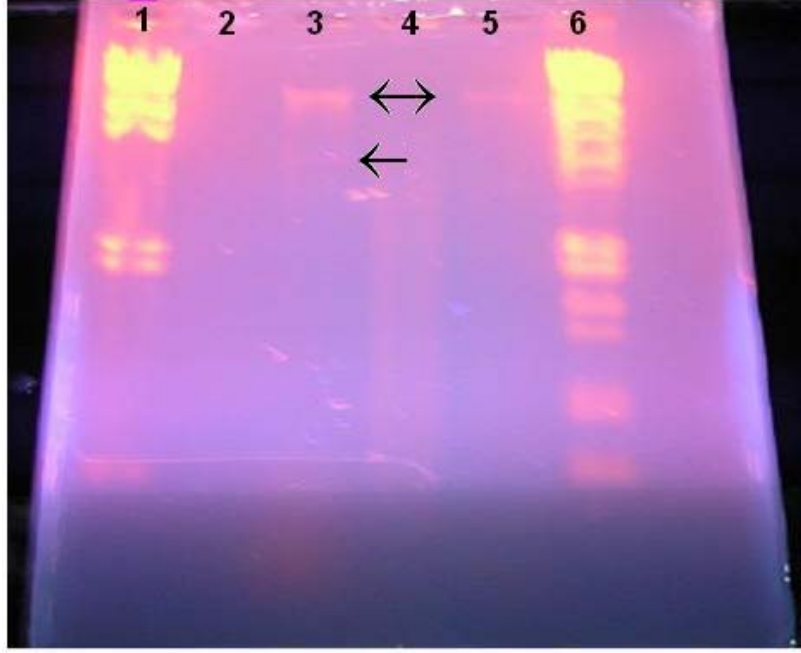
Çocuk lösemisi başta olmak üzere çeşitli kanserlerde yaygın bir kemoterapötik ajan olarak kullanılan *L-asparaginazın* sentezinin oksijenle önemli ölçüde regüle olduğu konusunda yeterince literatür bilgisi bulunmaktadır. Bu enzimin geni (*ansB*) aynı zamanda karbon katabolit represyon ve enzimin sentezi azot bağımlı bir regülasyon göstermektedir. Benzer şekilde, keşfedilmiş olan yegâne bakteriyel hemoglobin olan *Vitreoscilla* hemoglobin de oksijenle regüle olan ve karbon katabolit represyona maruz kalan bir genle (*vgb*) ifade edilmektedir. Her iki gen de düşük oksijen ortamlarında oldukça indüklenirken, atmosferdeki oksijen seviyelerinde veya tamamen anerobik (anoksik) ortamlarda her iki genin ekspresyonu neredeyse tamamen baskılanmaktadır.

Bu çalışmada L-asparaginazın besinsel olarak fakir ortamlardan çeşitli zengin ortamlara ve endüstriyel atıkların kullanıldığı çeşitli ortamlara değişik kültür ortamlarındaki sentezi araştırıldı. Bu amaç için çalışma boyunca bu enzimi üretmeleri ile bilinen 3 çeşit gram-negatif bakteri (*E. coli*, *E. aerogenes* ve *P. aeruginosa*) ve onların tarafımızdan oluşturulan ve tarafımıza sağlanan *vgb* ve *ansB* rekombinantları kullanıldı.

Çalışmada *ansB* geni taşıyan ve pB-PGA olarak adlandırılan bir vektör [59] *E. aerogenes*'e başarılı bir şekilde klonlandı ve klonlar antibiyotik (amfisilin) içeren besi ortamlarında oluşturdukları satellit koloni morfolojisinden seçilip saflaştırılarak plazmid izolasyonu yapıldı ve agaroz jel elektroforezi sonucu elde edilen restriksiyon haritası ile plazmidin varlığı gösterildi. Ayrıca, başka bir araştırmacı grubu [60] tarafından bize sağlanmış olan ve başka bir *ansB* vektörü (pAHZ12) taşıyan *E. coli*'den de benzer şekilde antibiyotik seçilimi, plazmid izolasyonu yapılarak bu plazmidin varlığı da belirlendi (Şekil 4.1).

4.1 Farklı Azot-Karbon Kaynaklarının ve Besi Ortamlarının L-Asparaginaz Sentezi Üzerine Etkisi

Çalışmanın bu bölümünde bakterilerin ve rekombinantlarının L-asparaginaz seviyeleri değişik ortamlarda karşılaştırmalı olarak çalışıldı.



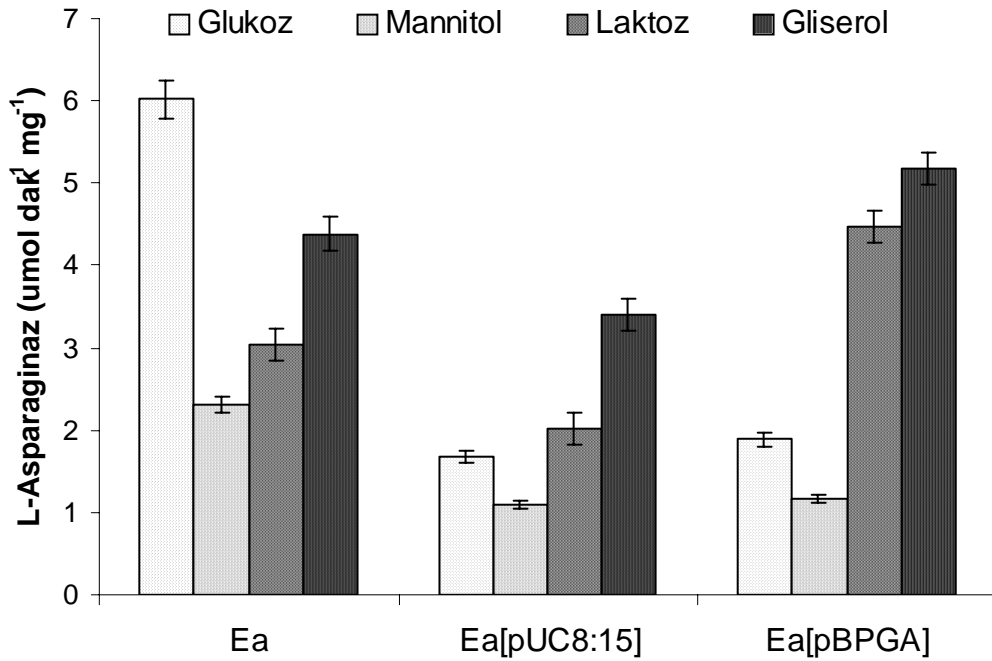
Şekil 4.1. Ea[pB-PGA] ve *E. coli*[pAHZ12] rekombinant bakterilerinden izole edilen plazmidlerin agaroz jeldeki restriksiyon motifleri. **1** λ DNA/*HindIII* (23.1-9.4-6.6-4.4-2.3-2.0 kb), **2** konakçı hücre, **3** Ea[pB-PGA]/*EcoRI*, **4** Konakçı hücre, **5** *E. coli*[pAHZ12]/*EcoRI*, **6** λ DNA/ *EcoRI*(21.2-7.4-5.8-5.6-4.9-3.5 kb).

4.1.1 L-Asparaginaz aktivitesine çeşitli karbon kaynaklarının etkisi

L-asparaginaz aktivitesindeki değişimin kullanılan karbon ve azot kaynağına bağlı olup olmadığının anlaşılması, ortamda ilgili kaynağın yegâne besinsel madde olarak kullanılması ile mümkündür. Bu amaçla standart minimal besi ortamı (MM) kullanıldı. Ancak, sadece MM kullanılmasının ortamda oldukça sınırlı bir biyokütle oluşumunu desteklemesi ve bunun da ölçülebilir bir enzim aktivitesini sağlamaması nedeniyle bu ortam % 0.05 maya özütü ile kısmen zenginleştirildi ve MMY olarak adlandırıldı. Her üç bakteri türü ve onların *vgb* ve *ansB* rekombinantlarının MMY besiyeri ortamında enzim aktivitesi üzerine karbon kaynağı olarak seçilen *glukoz*, *mannitol*, *laktoz* ve *gliserolün* etkisinin çalışılması için bu bakterilerin gece kültürlerinden uygun inokulumlar alınarak yukarıdaki C-kaynaklarından herhangi birini içeren MMY içinde takip eden bütün çalışmalarda çalkalamalı (200-rpm), koşullarda 37 °C'de 24 saatlik inkübasyona tabi tutuldular. Otoklavda karemelizasyonu önlemek için yukarıdaki C-kaynakları bunların uygun stok solüsyonlarından otoklav sonrası MMY ortamına son konsantrasyon % 0.01 olacak şekilde eklendi. Ayrıca bu kültürlerin pH değişimi, biyokütle üretim indikatörü olarak A_{600} değerleri ve ortama saldıkları amonyak miktarları onların L-asparaginaz aktivitesine paralel olarak belirlendi.

4.1.1.1 *E. aerogenes* ve onun *vgb* ve *ansB* rekombinantları

Yukarıda verilmiş olan dört karbon kaynağı (glukoz, mannitol, laktoz ve gliserol) ile desteklenmiş MMY ortamında üç suşun L-asparaginaz aktivitesine bakıldığında (Şekil 4.2) en yüksek aktivitenin *E. aerogenes*'de ve bunun glukozla sağlandığı görülmektedir.



Şekil 4.2. *E. aerogenes* ve bu bakterinin *vgb* (Ea[pUC8:15]) ve *ansB* (Ea[pB-PGA]) rekombinantlarının değişik karbon kaynakları içeren MMY ortamında L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Tersine, bu karbonhidrat *vgb* ve *ansB* rekombinantlarında L-asparaginaz sentezi için mannitolden sonra en elverişsiz karbon kaynağı olarak görülmektedir. Her iki rekombinant da en yüksek enzim aktivitesini gliserolle göstermişlerdir. Bu C-kaynağını içeren ortamdaki rekombinantlarda glukozla göre 2.1-2.8 kat daha fazla L-asparaginaz aktivitesi görülmüştür. Daha da ilginç olan laktozun bile bu rekombinantlarda glukozdan daha etkin bir C-kaynağı olarak belirlenmiş olmasıdır.

ansB geni klonlamış olduğumuz bakteride (Ea[pB-PGA]) hem gliserol ve hem de laktoz diğer iki suşa göre enzim seviyesinde belirgin bir artış sağlamıştır. Bu *ansB* rekombinantı gliserol ortamında *vgb* suşuna göre % 50, yabancı konakçıya göre ise % 20 daha fazla L-asparaginaz aktivitesi göstermiştir. Benzer şekilde laktoz ortamında *ansB* suşu *vgb* suşundan 2.2 kat, *E. aerogenes*'den ise % 50 daha yüksek enzim aktivitesi göstermiştir. Her üç suş için de enzim sentezini en baskılayıcı C-kaynağının genel olarak fakir bir C-kaynağı olarak bilinen mannitol olduğu gözlenmiştir.

Her üç suşun bu karbon kaynakları ile verdiği pH değişimleri genel olarak benzer bir eğilim göstermiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *E. aerogenes* ve *vgb* ve *ansB* rekombinantlarının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

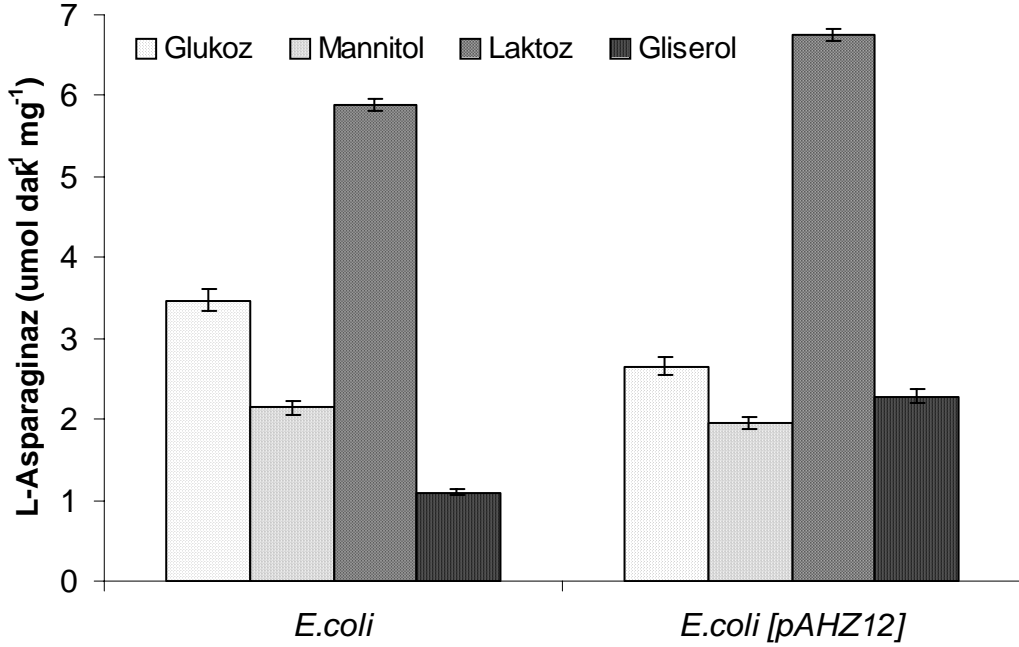
	pH Değerleri			
	Glukoz	Mannitol	Laktoz	Gliserol
<i>E. aerogenes</i>	8.63±0.07	8.34±0.07	8.83±0.21	9.05±0.01
Ea[pUC8:15]	8.23±0.02	8.30±0.19	8.81±0.03	8.96±0.14
Ea[pB-PGA]	8.41±0.01	8.35±0.06	9.05±0.02	9.15±0.04
	A ₆₀₀ Değerleri			
<i>E. aerogenes</i>	1.56±0.02	0.45±0.01	1.78±0.05	3.20±0.20
Ea[pUC8:15]	1.32±0.01	0.21±0.02	1.75±0.07	3.09±0.21
Ea[pB-PGA]	1.35±0.03	0.37±0.03	1.90±0.30	3.12±0.20
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
<i>E. aerogenes</i>	0.096±0.04	0.11±0.02	0.25±0.01	0.603±0.02
Ea[pUC8:15]	0.036±0.02	0.12±0.01	0.29±0.01	0.603±0.04
Ea[pB-PGA]	0.11±0.140	0.11±0.01	0.30±0.05	0.550±0.07

Kültürlerin pH değerlerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda başlangıç pH değerine (pH 7.2) göre en fazla yaklaşık +2 birimlik bir pH değişimi olduğu saptanmıştır. Bu değişim değeri laktoz ve gliserol içeren MMY ortamında gözlenmiştir. Glukoz ve mannitolde ise pH artışı genellikle her üç suş için de 1.5 pH biriminin altında olmuştur. Kültürlerin çoğalma indikatörü olarak kaydedilen A₆₀₀ değerlerinden MMY ortamında farklı karbon kaynaklarının oldukça farklı biyokütle üretimine katkıda bulunduğu görülmektedir.

Genel olarak ana konakçı bakteri (*E. aerogenes*) tüm karbon kaynakları ile rekombinantlarından az da olsa daha yüksek bir biyokütle oluşturmuştur. Her üç suş için de en iyi biyokütlenin gliserol içeren MMY ortamında olduğu görülmektedir. Bu ortamda biyokütle oluşumu glukoz ve laktoz ortamına göre neredeyse 2 kat, mannitol ortamına göre ise 7-15 kat kadar daha fazla olmuştur. Aynı kültürlerde kültür supernatanından Nessler reaksiyonu ile ortama salınan amonyak miktarı tayin edilmiştir. A₄₈₀ değerleri olarak kaydedilen amonyak miktarı Çizelge 4.1.'de görülmektedir. En yüksek amonyak salınımının her üç suş için gliserol içeren ortamda olduğu kaydedilmiştir. Bu ortamda çoğalan bakterilerden kültür ortamına salınan amonyak diğer üç C-kaynağına göre 2 ila yaklaşık 17 kat arasında değişen değerlerde yüksek olmuştur. L-asparaginaz sentezi ve biyokütle oluşumu için oldukça elverişsiz bir C-kaynağı olarak tespit edilmiş mannitol ortamında ise tersine glukozu göre daha yüksek bir amonyak salınımı kaydedilmiştir.

4.1.1.2 *E. coli* ve *ansB* rekombinantı

Kullanılmış olan 4 önemli C-kaynağı ile MMY ortamında hem *E. coli*'de ve hem de onun *ansB* klonlanmış suşunda benzer L-asparaginaz aktivitesi kaydedilmiştir (Şekil 4.3). Her iki suşta da en yüksek aktivite laktoz ile sağlanırken, bu karbohidratı glukoz takip etmiştir. Ancak, laktoz rekombinant suşta glukozdan yaklaşık 3 kat, yabancı konakçıda ise yaklaşık 2 kat aktivite artışı ile kaydedilmiştir. Gliserol ve mannitol her iki bakteri de de en düşük enzim aktivitesine neden olan C-kaynakları olmuştur. Laktoza göre bu iki karbohidrat ortamında enzim aktivitesi her iki bakteride de 2-5 kat kadar düşük kaydedilmiştir.



Şekil 4.3. *E. coli* ve bu bakterinin *ansB* klonlanmış suşunun (*E. coli*[pAHZ12]) değişik karbon kaynakları içeren MMY ortamında L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Kültürlerin pH değerlerinde 24 saat inkübasyonun sonunda genel olarak bir artış gözlenmiştir. Başlangıç ortam pH değeri olan pH 7.2 bu sürenin sonunda 4 C-kaynağı için 7.78 ila 8.88 arasında değişmiştir. Bu artan pH değerlerine istisna olarak yegâne pH düşüşü mannitol içeren MMY ortamındaki *ansB* rekombinant suşu için kaydedilmiştir. Bu suşun kültür ortam pH değeri inkübasyon süresinin sonunda 5.87 (\pm 0.38) olarak belirlenmiştir.

Yukarıdaki kültürlerin belirli bir süre (24 saat) inkübasyondan sonra toplam biyokütleleri incelendiğinde (A_{600}), en yüksek biyokütle oluşumunun her iki suş için de gliserol ve laktozla sağlandığı görülmektedir (Çizelge 2). Ancak, *E. coli* en yüksek biyokütleyle gliserol ortamında ulaşırken, *ansB* rekombinant suşu laktoz içeren ortamda ulaşmıştır. Glukoz ise gliserol ve laktoza göre yaklaşık 2 kat daha az biyokütle oluşumunu desteklemiştir. Bu bağlamda, mannitol en elverişsiz C-kaynağı olarak kaydedilmiştir. Mannitole diğer C-kaynaklarına göre 8 kata varan oranlarda daha düşük biyokütle oluşumu olmuştur.

Değişik C-kaynaklı MMY ortamındaki amonyak değerleri bakımından her iki suş karşılaştırıldığında, yabancı konakçının (*E. coli*) genel olarak daha yüksek bir amonyak salınımı gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). C-kaynakları bakımından en yüksek amonyak salınımının her iki suş için de gliserolle olduğu, bunu glukoz ve laktozun takip ettiği görülmüştür. Mannitol ortamı en düşük amonyak salınımının olduğu ortam olarak kaydedilmiştir.

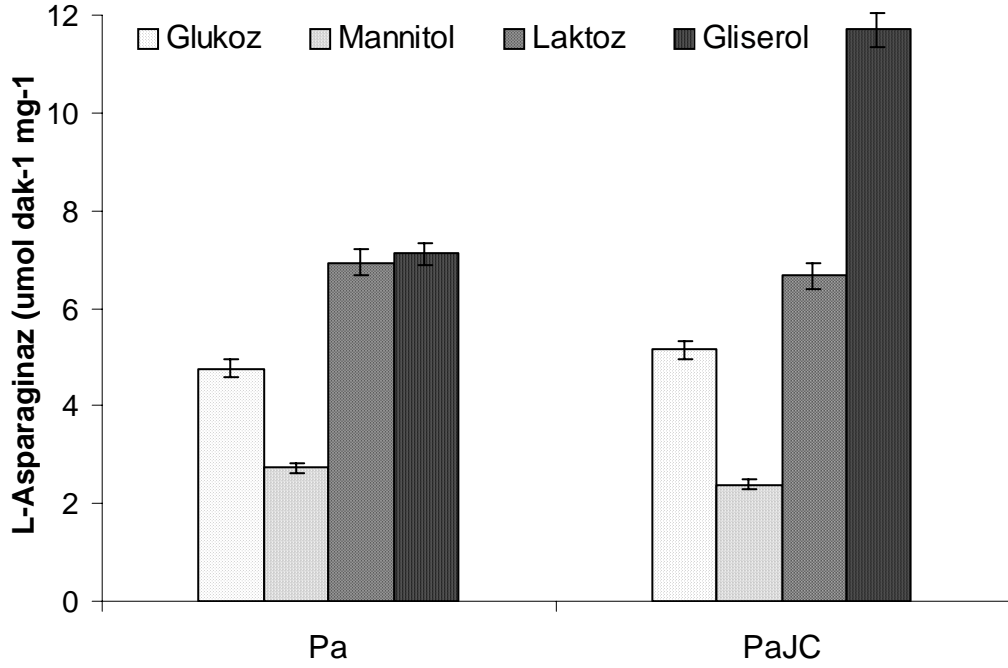
Çizelge 4.2 . *E. coli* ve *ansB* rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri			
	Glukoz	Mannitol	Laktoz	Gliserol
<i>E. coli</i>	8.20 \pm 0.01	7.84 \pm 0.09	8.55 \pm 0.03	8.88 \pm 0.09
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	8.14 \pm 0.06	5.87 \pm 0.38	8.00 \pm 0.07	7.78 \pm 0.07
	A_{600} Değerleri			
<i>E. coli</i>	1.04 \pm 0.05	0.32 \pm 0.02	1.56 \pm 0.02	2.50 \pm 0.20
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	0.66 \pm 0.06	0.29 \pm 0.01	1.64 \pm 0.14	1.30 \pm 0.10
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
<i>E. coli</i>	0.69 \pm 0.040	0.11 \pm 0.014	0.31 \pm 0.004	0.69 \pm 0.070
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	0.31 \pm 0.020	0.02 \pm 0.002	0.24 \pm 0.024	0.57 \pm 0.040

4.1.1.3 *P. aeruginosa* ve *vgb*⁺ Rekombinantı

P. aeruginosa ve onun *vgb* rekombinantında kullanılmış olan 4 C-kaynağı arasında en yüksek L-asparaginaz aktivitesi gliserolle görülmüştür (Şekil 4.4). Bu durum özellikle rekombinant suşta daha açıktır.

Bu suş konakçı hücreye göre gliserolle yaklaşık 2 kat daha fazla enzim aktivitesi göstermiştir. Bunun dışında her iki suş da diğer C-kaynakları içeren MMY ortamında benzer enzim aktivitelerine sahiptir. Gliserolden sonra en yüksek aktivite laktozla görülürken, bunu glukoz takip etmiştir. En düşük seviyede L-asparaginaz aktivitesi ise her iki suş için de mannitol içeren ortamda gözlenmiştir.



Şekil 4.4. *P.aeruginosa* ve *vgb* suşunun (*PaJC*) değişik karbon kaynakları içeren MMY ortamında L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Kültür ortamı pH değişimi incelendiğinde 4 C-kaynağı ile MMY ortamında başlangıç kültür pH değerine göre 1 ila 2.25 pH ünitelik artışlar gözlenmiştir (Çizelge 4. 3). Her iki suş da benzer pH değişimleri göstermiştir. En yüksek pH değişimi laktoz ortamında görülürken, bunu laktoz ve glukoz izlemektedir. En düşük pH değişimi ise mannitol ortamında kaydedilmiştir.

Çizelge 4. 3. *P. aeruginosa* ve *vgb* rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri			
	Glukoz	Mannitol	Laktoz	Gliserol
<i>P. aeruginosa</i>	8.81 \pm 0.09	8.39 \pm 0.10	9.12 \pm 0.01	8.91 \pm 0.02
<i>PaJC</i>	8.75 \pm 0.03	8.29 \pm 0.10	9.45 \pm 0.01	8.89 \pm 0.12
	A ₆₀₀ Değerleri			
<i>P. aeruginosa</i>	1.12 \pm 0.07	0.38 \pm 0.01	1.96 \pm 0.13	3.56 \pm 0.1
<i>PaJC</i>	1.02 \pm 0.02	0.32 \pm 0.11	0.75 \pm 0.40	3.65 \pm 0.3
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
<i>P. aeruginosa</i>	0.108 \pm 0.02	0.24 \pm 0.04	0.32 \pm 0.01	0.52 \pm 0.04
<i>PaJC</i>	0.100 \pm 0.03	0.20 \pm 0.02	0.28 \pm 0.05	0.56 \pm 0.44

Kültürlerin biyokütle indikatörü olarak kullanılmış olan A₆₀₀ değerleri laktoz ortamı hariç diğer C-kaynakları ile iki suş için benzer kaydedilmiştir. Her iki suş için gliserol ortamı en yüksek biyokütle oluşumunu desteklerken mannitol bu bağlamda en elverişsiz C-kaynağı olmuştur.

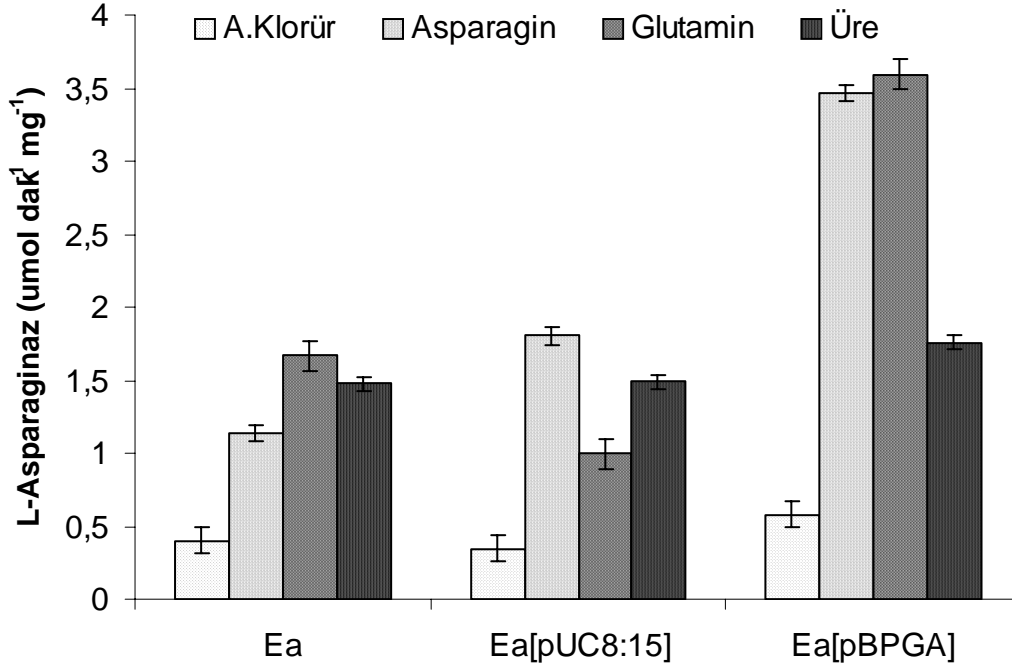
P. aeruginosa için gliserol içeren ortam laktoz, gliserol ve mannitol içeren ortamlara göre sırasıyla 1.8, 3.1 ve 9.3 kat daha yüksek biyokütle oluşumu desteklerken, *vgb* rekombinatı için bu değerler aynı sırada 4.8, 3.5 ve 11 kat olarak belirlenmiştir. Ortam amonyak miktarı da her iki suş için en yüksek oranda gliserol içeren ortamda kaydedilmiştir. Bunu laktoz, mannitol ve glukoz takip etmektedir.

4.1.2 L-Asparaginaz sentezine çeşitli azot kaynaklarının etkileri

Değişik karbon kaynakları ile yapılan çalışma gibi, değişik azot kaynaklarının da MMY ortamında L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi her üç bakteri türünde ve bunların rekombinantlarında karşılaştırmalı olarak çalışıldı. Kültür süresi ve koşulları yukarıda C-kaynakları için çalışılanlarla aynıdır. Azot kaynağı olarak dört temel bileşik kullanıldı; *amonyum klorür*, *asparagin*, *glutamin* ve *üre*. Asparagin ve glutamin L-asparaginaz için doğal substratlar iken, amonyum klorür ve üre ise bakteriler tarafından kullanılan elverişli azot kaynaklarıdır. İnorganik bir bileşik olan amonyum klorür hariç, diğer üç karbon kaynağı (asparagin, glutamin ve üre) aynı zamanda birer karbon kaynağıdır. N-kaynakları uygun konsantrasyonda stok solüsyonlar olarak hazırlandı ve otoklav sonrası MMY ortamına son konsantrasyon % 0.01 olacak şekilde eklediler.

4.1.2.1 *E. aerogenes* ve onun *vgb* ve *ansB* rekombinantları

Azot kaynaklarının bu bakteri ve onun *vgb* ve *ansB* rekombinantlarında L-asparaginaz sentezi üzerine etkisine bakıldığında aynı zamanda enzimin substratları olan asparagin ve glutaminin sadece *ansB* geni klonlamış olduğumuz suşta bariz biçimde farklı enzim sentezine neden oldukları görülmektedir (Şekil 4.5). Bu suş her iki azot kaynağı ile *E. aerogenes* (Ea) ve onun *vgb* suşu (Ea[pUC8:15])'na göre 2 kat kadar daha fazla L-asparaginaz aktivitesi göstermiştir. Amonyum klorür her üç suşta da bu amaç için en elverişsiz N-kaynağı olarak kaydedilmiştir. Üre ile her üç suşta da benzer enzim seviyeleri belirlenmiştir. Başlangıç kültür pH değerine (pH 7.2) göre kültürlerin bu 4 N-kaynağından her hangi birini içeren ortamdaki 24 saat inkübasyon sonundaki pH değerleri genel olarak az da olsa artış göstermiş ve en düşük 6.89 en yüksek 8.35 olarak ölçülmüştür (çizelge 4.4). Genel olarak her üç suşun pH değişiminde de benzer bir eğilim kaydedilmiştir.



Şekil 4.5. *E. aerogenes* ve bu bakterinin *vgb* (Ea[pUC8:15]) ve *ansB* (Ea[pB-PGA]) rekombinantlarının değişik azot kaynakları içeren MMY ortamında L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Her üç suşun üre, glutamin ve asparagin ortamında benzer biyokütle oluşturdıkları onların benzer A_{600} değerlerinden anlaşılmaktadır. Ancak, inorganik bir azot kaynağı olan amonyum klorür ortamında bu değerler organik birer azot kaynağı (ve aynı zamanda karbon kaynağı) olan diğer 3 N-kaynağına göre 3 ila 7 kat arasında değişen oranlarda daha düşük kaydedilmiştir.

Çizelge 4.4. *E. aerogenes* ve *vgb* ve *ansB* rekombinantlarının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

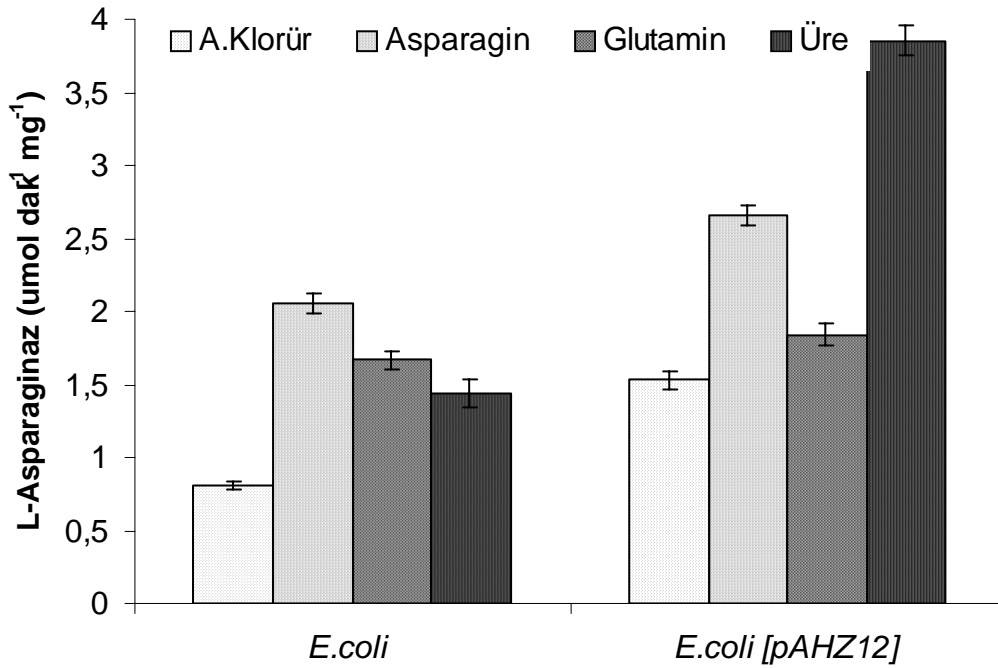
	pH Değerleri			
	A. Klorür	Asparagin	Glutamin	Üre
<i>E. aerogenes</i>	7.35 \pm 0.01	8.55 \pm 0.14	6.89 \pm 0.01	7.99 \pm 0.04
E.a [puc 8:15]	7.40 \pm 0.02	8.33 \pm 0.12	7.05 \pm 0.07	7.79 \pm 0.04
E.a [pB-PGA]	7.42 \pm 0.01	8.35 \pm 0.09	7.05 \pm 0.007	7.81 \pm 0.01
	A_{600} Değerleri			
<i>E. aerogenes</i>	0.55 \pm 0.1	1.55 \pm 0.1	1.28 \pm 0.3	1.55 \pm 0.1
E.a [puc 8:15]	0.23 \pm 0.1	1.35 \pm 0.1	1.32 \pm 0.1	1.47 \pm 0.2
E.a [pB-PGA]	0.61 \pm 0.3	1.64 \pm 0.3	1.22 \pm 0.2	1.49 \pm 0.3
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
<i>E. aerogenes</i>	0.46 \pm 0.01	0.96 \pm 0.04	0.33 \pm 0.02	0.17 \pm 0.01
E.a [puc 8:15]	0.52 \pm 0.02	0.36 \pm 0.02	0.39 \pm 0.04	0.16 \pm 0.03
E.a [pB-PGA]	0.53 \pm 0.05	1.11 \pm 0.14	0.35 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01

Kültürlerin en yüksek amonyak salınımı *vgb* suşu hariç diğer iki suş için aynı zamanda enzimin ana substratı olan L-asparagin içeren ortamda olmuştur. Bu ortamda

amonyak salınımı diğer üç N-ortamına göre 3 ila yaklaşık 8 kat arasında daha fazla gözlenmiştir. Ancak, *vgb* rekombinantı *E. aerogenes* ve *ansB* rekombinantı ile kıyaslandığında, aynı ortamda oldukça (3 kata varan) düşük amonyak salınımı göstermiştir. L-asparaginazın ikincil derecede çevirdiği bir substrat olan L-glutamin içeren ortamdaki amonyak salınımı ise tersine amonyum klorür ortamındakinden bile az olmuştur. Her üç suş için de en düşük amonyum salınımı üre ortamında görülmüştür.

4.1.2.2 *E. coli* ve *ansB* rekombinantı

Azot kaynaklarının MMY ortamında *E. coli* ve onun *ansB* rekombinantında L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.6.'da görülmektedir. Bariz olarak en yüksek enzim aktivitesi *ansB* rekombinantında üre ilave edilmiş olan ortamda görülmektedir. Bu suş bu ortamda *E. coli*'ye göre yaklaşık 2.7 kat daha fazla enzim aktivitesi göstermiştir.



Şekil 4.6. *E. coli* ve bu bakterinin *ansB* klonlanmış suşunun (*E. coli*[pAHZ12]) değişik azot kaynakları içeren MMY ortamında L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Tersine *E. coli*'de bu N-kaynağı (üre) amonyum klorür hariç en düşük enzim aktivitesine neden olmuştur. Bu suşta en yüksek L-asparaginaz aktivitesi L-asparagin

bulunan ortamda gözlenmiştir. Her iki suşta da en düşük enzim seviyeleri amonyum klorürü içeren ortamda olmuştur.

E. coli ve *ansB* rekombinantının pH değişimleri N-kaynağına bağlı olarak başlangıç pH değerine göre düşük veya yüksek bulunmuşlardır (Çizelge 4.5). Asparagin ortamında her iki suşun pH değerinde yaklaşık 1 pH ünitelik artış gözlenirken, glutamin ortamında ise *E. coli* için yaklaşık 2.5, *ansB* suşu için ise yaklaşık 1.75 pH ünitelik düşüş görülmüştür. Amonyum klorürü ortamında *E. coli* için pH'sında bir değişim gözlenmezken, *ansB* klonunda 1.2 pH'lık bir düşüş kaydedilmiştir. Benzer şekilde üre ortamında *E. coli* pH'sında artış (≈ 1 ünite pH) görülürken, *ansB* rekombinantında az bir düşüş görülmüştür.

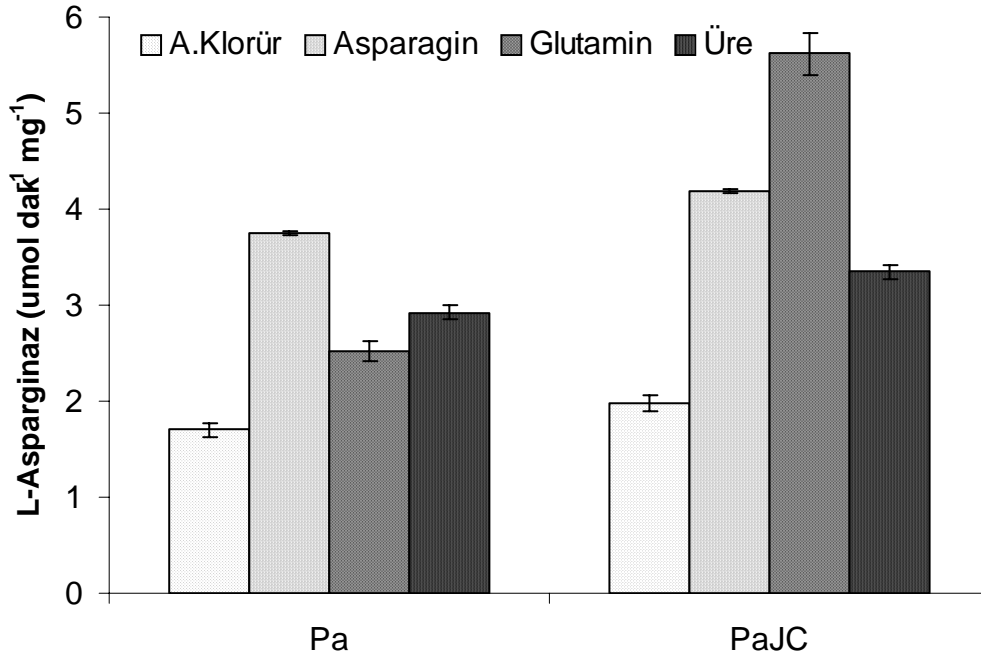
Çizelge 4.5. *E. coli* ve *ansB* rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri			
	A. Klorür	Asparagin	Glutamin	Üre
<i>E. coli</i>	7.4 \pm 0.01	8.31 \pm 0.10	4.64 \pm 0.01	8.37 \pm 0.04
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	6.0 \pm 0.03	8.13 \pm 0.08	5.43 \pm 0.01	6.86 \pm 0.07
	A ₆₀₀ Değerleri			
<i>E. coli</i>	0.33 \pm 0.13	0.98 \pm 0.24	0.67 \pm 0.10	1.32 \pm 0.10
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	0.28 \pm 0.10	0.64 \pm 0.15	0.81 \pm 0.10	1.45 \pm 0.20
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
<i>E. coli</i>	0.49 \pm 0.02	0.69 \pm 0.04	0.47 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	0.46 \pm 0.03	0.31 \pm 0.02	0.45 \pm 0.03	0.27 \pm 0.01

Üre içeren ortam her iki bakteride de benzer ve en yüksek biyokütle oluşumunu desteklerken, bunu ikinci sırada *E. coli* için asparagin, *ansB* klonu içinse glutamin sağlamıştır. En düşük biyokütle oluşumu ise her iki suş için amonyum klorürle olmuştur. Amonyak salınımı *E. coli* için asparagin, *ansB* suşu için ise amonyum klorür ve glutaminli ortamında olmuştur. Üre her iki suşta da en düşük düzeyde amonyak salınımına neden olan N-kaynağı olarak belirlenmiştir.

4.1.2.3 *P. aeruginosa* ve *vgb* rekombinantı

Azot kaynaklarının *P. aeruginosa* ve onun *vgb* suşunda (PaJC) enzim sentezi üzerine etkisi benzer olmuştur (Şekil 4.7). Buna tek istisna glutaminin PaJC suşunda, *P. aeruginosa*'ya göre 2 kat daha fazla L-asparaginaz aktivitesine neden olduğunun belirlenmesidir. Her iki suş için de en düşük enzim seviyesi amonyum klorürle olmuştur.



Şekil 4.7. *P.aeruginosa* ve *vgb* suşunun (*PaJC*) değişik azot kaynakları içeren MMY ortamında L-asparginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Ortam pH değeri her iki suşta da tüm N-kaynakları ile artış göstermiştir (Çizelge 4.6). En yüksek pH artışı her iki suş için de glutamin ve üre içeren ortamlarda olmuştur. Bunları asparagin ve amonyum klorür izlemiştir.

Kültürlerde en yüksek biyokütle her iki suş için de glutamin içeren ortamda olmuştur. *P. aeruginosa* için bu ortamda asparagin, üre ve amonyum klorür içeren ortamlarla karşılaştırıldığında sırasıyla 1.38, 1.5 ve 3.4 kat daha yüksek değerlerde biyokütle oluştuğu kaydedilmiştir. *PaJC* suşu içinde bu artış aynı sırada 1.29, 1.37 ve 3.3 kat olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. *P. aeruginosa* ve *vgb* rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri			
	A. Klorür	Asparagin	Glutamin	Üre
<i>P. aeruginosa</i>	7.71 \pm 0.01	8.81 \pm 0.09	9.11 \pm 0.08	9.6 \pm 0.01
<i>PaJC</i>	7.52 \pm 0.01	7.98 \pm 0.01	9.08 \pm 0.06	8.76 \pm 0.32
	A_{600} Değerleri			
	A. Klorür	Asparagin	Glutamin	Üre
<i>P. aeruginosa</i>	0.68 \pm 0.1	1.67 \pm 0.1	2.32 \pm 0.8	1.50 \pm 0.2
<i>PaJC</i>	0.60 \pm 0.1	1.54 \pm 0.1	2.00 \pm 0.2	1.45 \pm 0.1
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
	A. Klorür	Asparagin	Glutamin	Üre
<i>P. aeruginosa</i>	0.54 \pm 0.01	1.085 \pm 0.02	0.52 \pm 0.02	0.706 \pm 0.04
<i>PaJC</i>	0.45 \pm 0.02	0.945 \pm 0.01	0.39 \pm 0.03	0.249 \pm 0.01

En yüksek amonyak salınımı her iki suşta da asparagin içeren ortamda görülmüştür. Ancak, diğer N-kaynaklarının yabancı tip ve onun rekombinantının

amonyak salınımına etkisi farklılıklar göstermiştir. *P. aeruginosa*'da ikinci en yüksek amonyum salınımı üre ile gözlenirken, bu N-kaynağının PaJC'de bu yöndeki (amonyak salınımına) etkisi tüm azot kaynakları içinde en düşük seviyede olanı olarak kaydedilmiştir.

4.1.3 Çeşitli atık ortamlarında L-asparaginaz sentezi

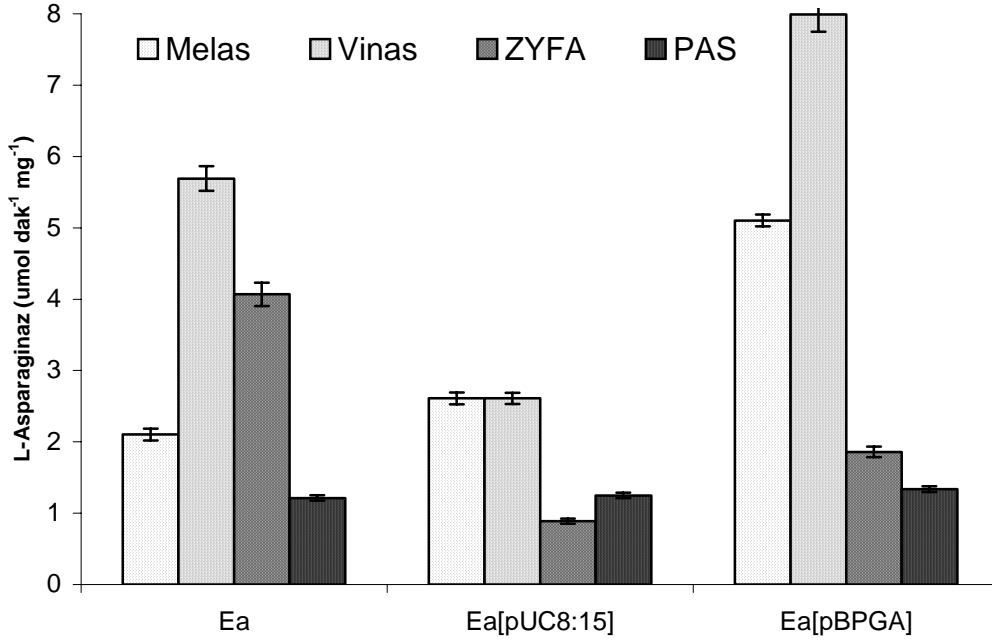
Bu çalışmada endüstriyel atıklardan olan melas, vinas, peynir altı suyu ve zeytinyağı fabrikası atığının L-asparaginaz üreten bakterilerde yegane besi ortamı olarak kullanılabilirliği ilk defa araştırılmıştır. Kültür süresi ve koşulları C ve N kaynakları için çalışılanlarla aynıdır. Kullanılan atıklar uygun konsantrasyonda hazırlanmış ve enzim sentezine ve ölçülen diğer parametrelere etkileri rekombinant bakteriler ile konakçıları arasında karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Atıklar konsantrasyonları melas % 1, vinas % 5, ZYFA % 5 ve PAS % 10'luk olacak şekilde hazırlanmışlardır.

4.1.3.1 *E. aerogenes* ve onun *vgb*⁺ ve *ansB*⁺ rekombinantları

E. aerogenes ve bu bakterinin *vgb* (Ea[puc 8:15]) ve *ansB* (E.a [pB-PGA]) klonlanmış rekombinantlarının L-asparaginaz sentezine atıkların etkileri incelendiğinde en yüksek enzim aktivitesinin her üç bakteride de vinas ortamında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8). Her üç suş arasında *ansB* geni klonlanan suş melas ve vinas ortamlarında diğer iki suşa göre önemli derecede yüksek enzim aktivitesi göstermiştir. Bu suş melas ortamında yabancı konakçıya göre yaklaşık 3 kat, *vgb* suşuna göre ise yaklaşık 2 kat daha fazla L-asparaginaz aktivitesi göstermiştir. Tüm ortamlarda en düşük enzim seviyesi genel olarak *vgb* taşıyan suşda kaydedilmiştir. En düşük L-asparaginaz aktivitesi ise *E. aerogenes* ve Ea[pB-PGA]'da PAS'da, Ea[pUC8:15]'te ise ZYFA' da gözlenmiştir.

Ortam pH değişimi her üç suşta da benzer bir eğilim göstermiş ve başlangıç pH değeri (pH 7.2)'ine göre melas ve vinasda 1.2-1.5 birimlik artış olurken, ZYFA ve PAS ise 1.2-2.5 birimlik azalış tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Kültürlerde en yüksek biyokütle her üç suş için de ZYFA ortamında olmuştur. Bunu vinas ve melas takip etmiştir. En düşük biyokütle oluşumu peynir altı suyunda gözlenmiştir.



Şekil 4.8. *E. aerogenes* ve bu bakterinin *vgb* (Ea[pUC8:15]) ve *ansB* (Ea[pB-PGA]) rekombinantlarının değişik endüstriyel atıkları içeren ortamlarda L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

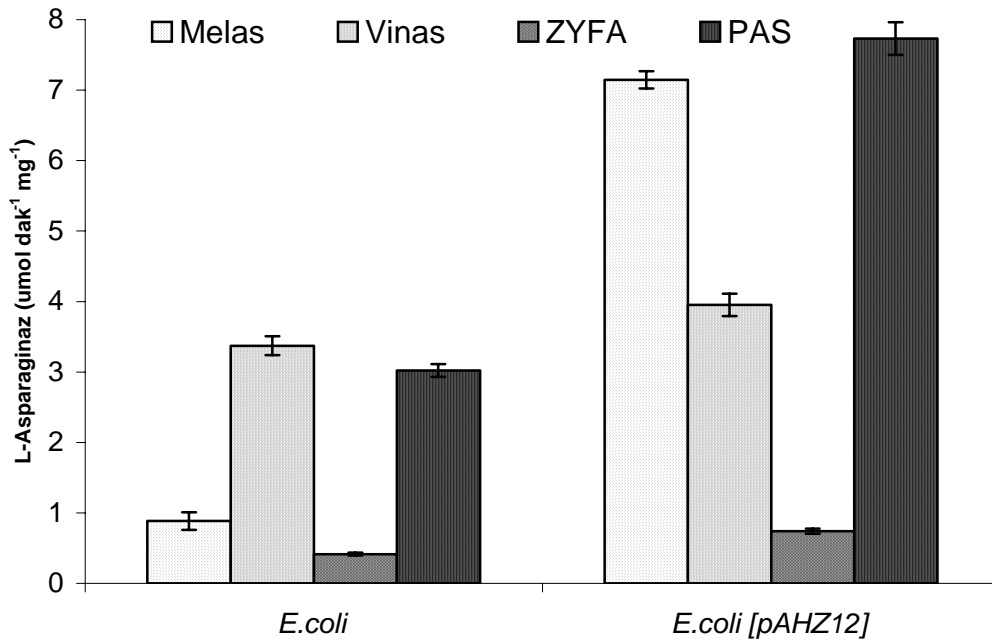
Ortama salınan en yüksek amonyak seviyesi vinas ortamında gözlenmiştir. Melas ve ZYFA ortamlarındaki amonyak seviyeleri nispeten benzer kaydedilmiştir. Peynir altı suyunda ise ortam amonyak seviyesi diğer üç ortama göre 2 ila 17 kat arasında düşük gözlenmiştir.

Çizelge 4.7. *E. aerogenes* ve *vgb* ve *ansB* rekombinantlarının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri			
	Melas	Vinas	ZYFA	PAS
<i>E. aerogenes</i>	8.74 \pm 0.005	8.41 \pm 0.020	6.25 \pm 0.020	5.17 \pm 0.007
Ea [puc8:15]	8.62 \pm 0.040	8.41 \pm 0.160	6.24 \pm 0.020	4.48 \pm 0.160
Ea [pB-GA]	8.58 \pm 0.007	8.46 \pm 0.010	6.26 \pm 0.007	5.83 \pm 0.007
	A ₆₀₀ Değerleri			
<i>E. aerogenes</i>	0.57 \pm 0.04	1.14 \pm 0.01	1.17 \pm 0.08	0.28 \pm 0.13
Ea [puc :15]	0.24 \pm 0.12	0.72 \pm 0.01	1.11 \pm 0.05	0.20 \pm 0.20
Ea [pB-GA]	0.33 \pm 0.07	0.95 \pm 0.04	1.10 \pm 0.06	0.27 \pm 0.02
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
<i>E. aerogenes</i>	0.32 \pm 0.010	0.37 \pm 0.010	0.18 \pm 0.01	0.09 \pm 0.020
Ea [puc8:15]	0.15 \pm 0.040	0.85 \pm 0.021	0.22 \pm 0.002	0.05 \pm 0.030
Ea [pB-GA]	0.32 \pm 0.070	0.45 \pm 0.001	0.22 \pm 0.01	0.09 \pm 0.040

4.1.3.2 *E. coli* ve *ansB* rekombinantı

En yüksek L-asparaginaz seviyesi *ansB* klonunda melas ve P.A.S ortamında gözlenmiştir (Şekil 4.9). Bu suş orijinal konakçısına göre melas ortamında yaklaşık 7, PAS ortamında ise yaklaşık 2 kat daha fazla enzim aktivitesi göstermiştir. Vinas ve ZYFA ortamlarında ise her iki suş genel olarak benzer enzim aktivitesi göstermişlerdir. *E. coli* vinas ortamında melastan 4.2 kat, ZYFA'dan 8.2 kat daha yüksek L-asparaginaz aktivitesi göstermiştir. PAS ortamında ise vinasla benzer aktivite kaydedilmiştir. *E. coli*[pAHZ12] ise PAS ortamında ZYFA'dan 10 kat, vinasla ise 1.9 kat daha yüksek aktivite enzim aktivitesi göstermiştir. Bu suşun melasla elde edilen enzim aktivitesi ise PAS ile elde edilmiş olana benzer bulunmuştur. Her üç suşta en düşük L-asparaginaz aktivitesinin belirlendiği ortam diğer ortamlara göre çok düşük değerler veren ZYFA olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.9. *E. coli* ve bu bakterinin *ansB* klonlanmış suşunun (*E. coli*[pAHZ12]) değişik endüstriyel atık ortamlarında L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Ortamlardaki pH değişimi her iki suşta da melas, vinas ve PAS'da 1-2 pH birimlik artışlar şeklinde gözlenirken sadece ZYFA ortamında pH değerinde başlangıç pH değeri olan 7.2'den 1 ünitelik pH düşüşü görülmüştür (Şekil 4.8).

Her iki suş için de en yüksek biyokütle oluşumunun vinasla desteklendiği kaydedilmiştir.

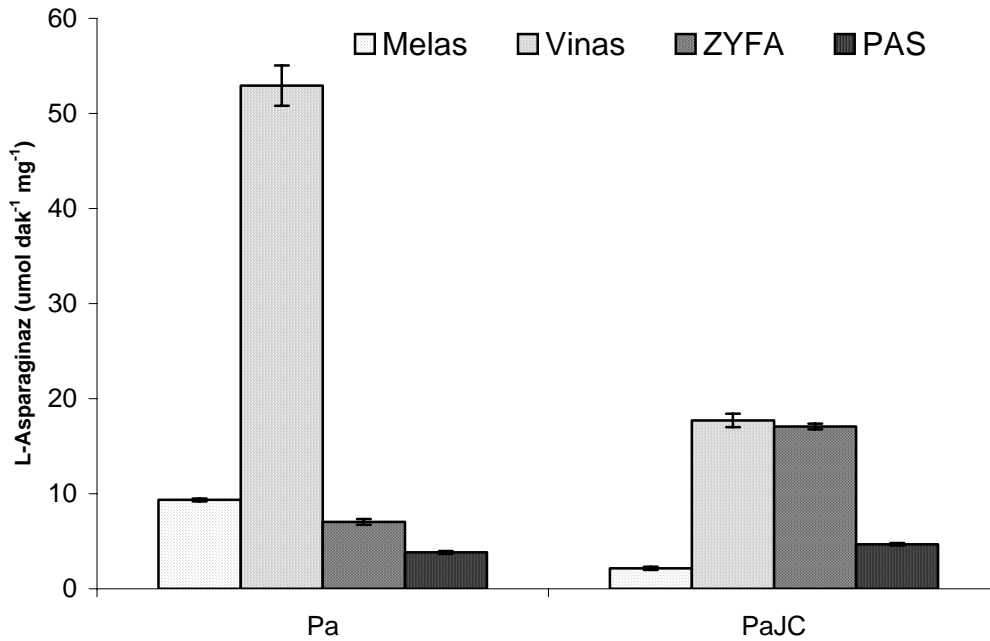
Çizelge 4.8. *E. coli* ve *ansB* rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri			
	Melas	Vinas	ZYFA	PAS
<i>E. coli</i>	8.51 \pm 0.03	7.37 \pm 0.03	6.25 \pm 0.02	8.25 \pm 0.007
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	7.67 \pm 0.07	8.24 \pm 0.1	6.21 \pm 0.01	7.84 \pm 0.14
	A_{600} Değerleri			
	Melas	Vinas	ZYFA	PAS
<i>E. coli</i>	1.03 \pm 0.07	1.13 \pm 0.19	0.76 \pm 0.16	0.32 \pm 0.30
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	0.12 \pm 0.04	0.93 \pm 0.02	0.55 \pm 0.28	0.20 \pm 0.01
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
	Melas	Vinas	ZYFA	PAS
<i>E. coli</i>	0.20 \pm 0.01	0.305 \pm 0.01	0.18 \pm 0.02	0.097 \pm 0.01
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	0.27 \pm 0.03	0.345 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01

Melas *E. coli* için ikinci en yüksek biyokütle oluşumunu sağlayan ortam iken, aynı ortam bu bakterinin *ansB* klonu için oldukça elverişsiz olmuştur. Amonyak salınımının en yüksek olduğu ortam vinas olmuştur. Bunu melas, ZYFA ve PAS'ın takip ettiği belirlenmiştir.

4.1.3.3 *P. aeruginosa* ve *vgb* rekombinantı

Atık besi ortamında üretilen *P. aeruginosa* ve PaJC'nin L-asparaginaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu ortam vinas olmuştur. Melas ve PAS ise oldukça elverişsiz ortamlar olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.20. *P. aeruginosa* ve *vgb* suşunun (PaJC) değişik endüstriyel atık ortamlarında L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Ayrıca, *P. aeruginosa*'da ölçülen bu değer tez kapsamında kullanılan tüm ortamlar içinde ölçülmüş olan en yüksek değer olması sebebi ile de ayrı bir önem taşımaktadır. Bu ortamda *P. aeruginosa* melastan 5.6 kat, ZYFA'dan 7.5 kat ve PAS'dan ise yaklaşık 14 kat daha yüksek L-asparaginaz aktivitesi göstermiştir. Bu bakterinin *vgb* suşunda ise vinas ve ZYFA ortamında L-asparaginaz aktivitesi benzer kaydedilmiş ve ZYFA ortamında enzim aktivitesinin aynı ortamdaki *P. aeruginosa* dan 2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

P. aeruginosa ve PaJC suşlarının kültür ortamları pH değişiminde 0.8-1.8 birimlik artışlar olmuştur (Çizelge 4.9). En yüksek pH artışı melas ortamında, en düşük pH artışı ise PAS ortamında olmuştur. Suşlar arasında en önemli pH farkı ise vinas ortamında olmuştur. Bu ortamda PaJC konakçıya göre 0.6 pH ünitelik artış göstermiştir.

Çizelge 4.9. *P. aeruginosa* ve *vgb* rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri			
	Melas	Vinas	ZYFA	P.A.S.
<i>P. aeruginosa</i>	8.88 \pm 0.07	8.11 \pm 0.12	8.13 \pm 0.02	8.05 \pm 0.11
<i>PaJC</i>	9.01 \pm 0.01	8.50 \pm 0.02	8.21 \pm 0.02	8.18 \pm 0.01
	A ₆₀₀ Değerleri			
<i>P. aeruginosa</i>	0.25 \pm 0.04	3.20 \pm 0.07	0.24 \pm 0.30	0.35 \pm 0.01
<i>PaJC</i>	0.20 \pm 0.04	1.05 \pm 0.20	0.29 \pm 0.02	0.29 \pm 0.01
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
<i>P. aeruginosa</i>	0.370 \pm 0.01	0.730 \pm 0.01	0.22 \pm 0.06	0.136 \pm 0.05
<i>PaJC</i>	0.092 \pm 0.01	0.350 \pm 0.01	0.140 \pm 0.03	0.380 \pm 0.01

Toplam biyomas üretiminin en yüksek olduğu ortam vinas olarak kaydedilmiştir. Ancak, bu ortamda yabancı suş PaJC rekombinantının 3 katı daha fazla bir biyomas üretmiştir. Diğer üç ortamda ise biyokütle seviyesi benzer olup vinas göre genel olarak 3 ila 13 kat arasında üzerinde daha düşük olmuştur.

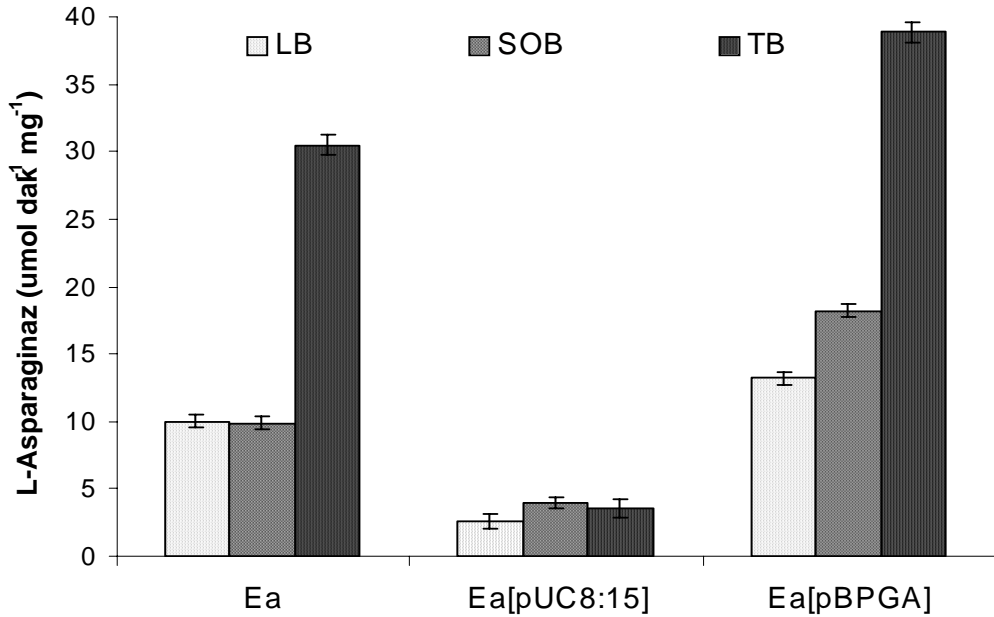
Farklı miktarlarda da olsa her iki suş için bu ortamlar arasında en yüksek amonyak birikiminin olduğu ortam vinas olmuştur. Bu ortamda *P. aeruginosa*'da PaJC suşundan 2 katın üzerinde daha fazla amonyak salınımı olmuştur. *P. aeruginosa* için ikinci en yüksek amonyak salınımı melas ortamında olurken, PaJC için bu P.A.S ile olmuştur. PaJC suşu en düşük amonyak seviyesini melas ortamında verirken, *P. aeruginosa*'da bu PAS ortamında olmuştur.

4.1.4 Zengin besi ortamlarında L-asparaginaz sentezi

Bakterilerin L-asparaginaz sentezi üzerine çeşitli kaynakların etkisini saptamak için değişik karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı minimal ortamlar ve yine çeşitli endüstriyel atıkların kullanıldığı ortamlara ilaveten bakterilerin çeşitli zengin ortamlarda da kültürü yapıldı. Bu amaçla kullanılan başlıca besi ortamları yüksek oranda biyokütle oluşturmaları ile bilinen Lauria Broth (LB), Terrific Broth (TB) ve SOB ortamlarıdır. Bakterilerin bu ortamlarda kültürü yukarıda azot ve karbon kaynaklarının kullanıldığı MMY ortamı ve endüstriyel atıklardaki gibi yapıldı ve 24 saat inkübasyon periyodunu sonunda kültürlerin L-asparaginaz aktiviteleri, biyokütleleri, kültür pH değişimi ve kültür ortamına salınan amonyak miktarı ölçüldü. Bu zengin besi ortamlarında en önemli ve dikkat çekici nokta L-asparaginaz sentezinin bundan önceki minimal ve endüstriyel ortamlara göre 10 katlara varan oranlarda yüksek olmasıdır. Ayrıca, biyokütle oluşumunun ve amonyak salınımının da bu ortamlarda büyük boyutlarda olduğu belirlendi.

4.1.4.1. *E. aerogenes* ve onun *vgb* ve *ansB* rekombinantları

Kullanılmış olan üç zengin besi ortamı arasında *vgb* suşu hariç diğer iki suşta (*E. aerogenes* ve onun *ansB* rekombinantı) L-asparaginaz sentezi TB ortamında belirgin derecede yüksek olmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.31. *E. aerogenes* ve bu bakterinin *vgb* (Ea[pUC8:15]) ve *ansB* (Ea[pB-PGA]) rekombinantlarının değişik zengin besi ortamlarında L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Her üç ortamda da *vgb* suşunda benzer ve oldukça düşük enzim seviyeleri kaydedilmiştir. Bu suş diğer iki suşa göre bu ortamlarda 10 kata varan daha düşük seviyelerde enzim aktivitesi göstermiştir. *ansB* geni klonlanmış olduğumuz suş üç ortamda da diğer suşlardan daha fazla L-asparaginaz aktivitesi göstermiştir. Bu suşun enzim aktivitesi orijinal konakçıdan 1.5-2 kat, *vgb* suşundan ise 10 kat daha fazla olmuştur.

Üç suş için de en yüksek pH artışı SOB ortamında kaydedilmiştir. Bu ortamda başlangıç pH değeri (pH 7.2)'ne göre yaklaşık 2 pH ünitelik bir artış kaydedilmiştir (Çizelge 4.10). LB ve TB ortamlarında yaklaşık 1 birimlik artış gözlenmiştir. Kültürlerin biyokütle seviyelerinin besi ortamı ve suşa bağlı olarak değişiklik arz ettiği görülmüştür. *E. aerogenes* en yüksek biyokütleyle LB ortamında ulaşırken ve bunu TB takip ederken, *vgb* suşunda tersine en yüksek biyokütleyle TB ortamında olmuş ve bunu LB takip etmiştir. *ansB* geni klonlanan suş ise en yüksek biyokütleyle LB ve TB'de ulaşmıştır. Bu iki ortamda *ansB* klonu benzer biyokütle oluşturmuştur.

Çizelge 4.10. *E. aerogenes* ve *vgb* ve *ansB* rekombinantlarının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

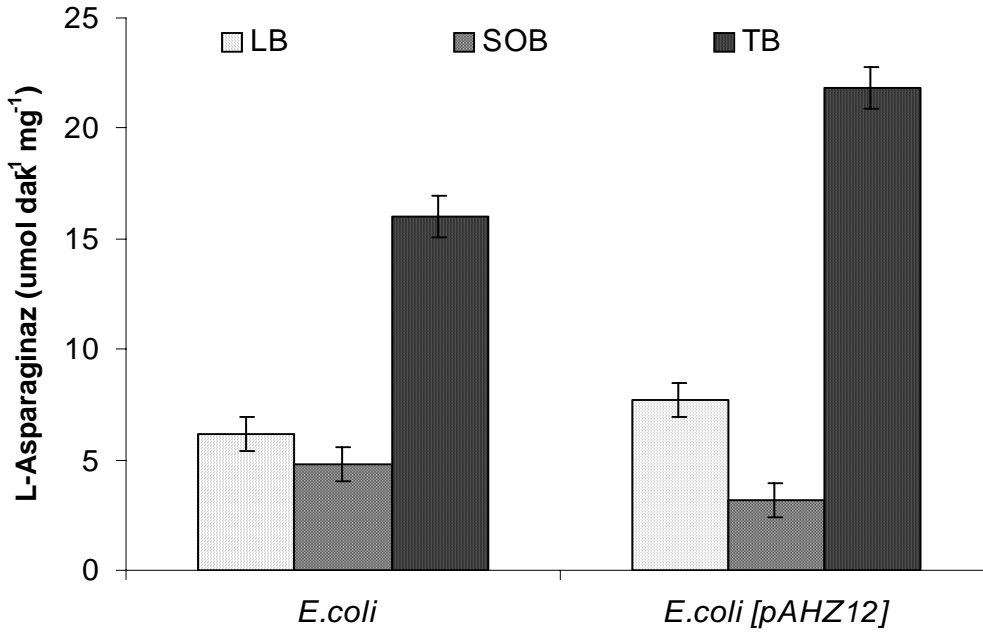
	pH Değerleri		
	LB	SOB	TB
<i>E. aerogenes</i>	7.98±0.02	9.16±0.08	8.40±0.25
Ea[pUC8:15]	8.50±0.01	9.06±0.08	8.29±0.39
Ea[pB-PGA]	8.01±0.06	9.07±0.09	8.22±0.01
	A ₆₀₀ Değerleri		
<i>E. aerogenes</i>	4.90±0.1	2.93±0.1	4.10±0.2
Ea[pUC8:15]	3.17±0.1	2.46±0.2	3.80±0.2
Ea[pB-PGA]	3.92±0.2	3.07±0.1	4.00±0.1
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak		
<i>E. aerogenes</i>	0.567±0.03	0.340±0.08	0.807±0.14
Ea[pUC8:15]	0.345±0.01	0.320±0.08	0.698±0.20
Ea[pB-PGA]	0.601±0.01	0.330±0.05	0.950±0.34

Üç ortam içinde en yüksek amonyak salınımının her üç suş için de TB ortamında olduğu belirlenmiştir. Bu ortamı LB takip ederken, her iki ortamda da *ansB* geni klonlanmış suşun diğer iki suşa göre belirgin bir yüksek amonyak birikimine neden olduğu görülmüştür.

4.1.4.2. *E. coli* ve *ansB* rekombinantı

Her üç besi ortamının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi iki suşta da benzer eğilim göstermiştir. Farklı seviyelerde olmalarına rağmen her iki suşta da en yüksek

enzim aktivitesi TB ortamında kaydedilmiştir (Şekil 4.12). Ancak, *ansB* klonunun bu ortamdaki enzim aktivitesi konakçı hücreye göre % 40 fazla olmuştur. *ansB* suşunun bu ortamdaki enzim seviyesi LB ortamına göre yaklaşık 3 kat, SOB ortamına göre ise yaklaşık 7 kat fazla olmuştur. *E. coli*'de de benzer şekilde TB ortamdaki enzim aktivitesi LB ortamından yaklaşık 2.5 kat, SOB ortamından ise 3.4 kat fazla enzim seviyesine sahip olduğu kaydedilmiştir.



Şekil 4.42. *E. coli* ve bu bakterinin *ansB* klonlanmış suşunun (*E. coli*[pAHZ12]) çeşitli zengin besi ortamlarında L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

En önemli pH değişimi her iki suş için de SOB ortamında olmuştur. Bu ortamda pH değişimi yaklaşık 1.75 pH ünitelik bir artışla kendini gösterirken, LB ve TB ortamlarında benzer bir eğilim olmuştur (Çizelge 4.11). Bu son iki ortamda pH değişimi 0.8-1.0 pH ünitelik artışlar şeklinde kaydedilmiştir.

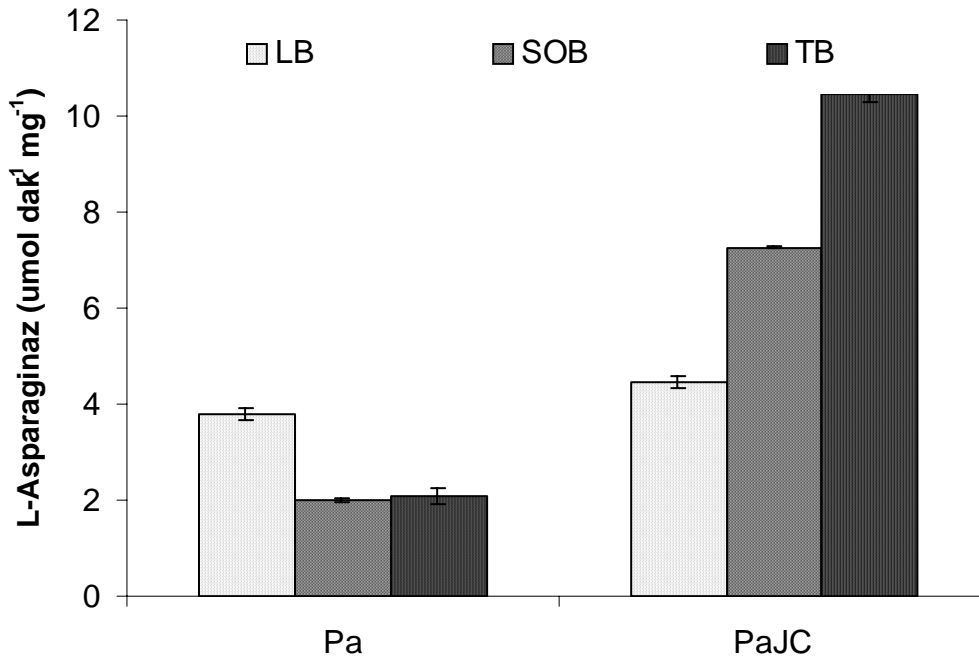
Çizelge 4.11. *E. coli* ve *ansB* rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri		
	LB	SOB	TB
<i>E. coli</i>	7.8 \pm 0.01	8.91 \pm 0.09	8.17 \pm 0.17
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	8.1 \pm 0.04	9.01 \pm 0.09	7.99 \pm 0.13
	A ₆₀₀ Değerleri		
<i>E. coli</i>	3.38 \pm 0.4	2.98 \pm 0.2	4.12 \pm 0.8
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	3.16 \pm 0.1	2.92 \pm 0.1	3.60 \pm 0.2
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak		
<i>E. coli</i>	0.59 \pm 0.01	0.39 \pm 0.08	0.82 \pm 0.05
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	0.62 \pm 0.07	0.37 \pm 0.01	0.77 \pm 0.01

En yüksek biyokütle oluşumunu destekleyen ortam TB ortamı olarak belirlenmiştir. Bu ortamı LB ve SOB takip ederken, amonyak birikiminin de en yüksek TB ortamında olduğu belirlenmiştir.

4.1.4.3. *P. aeruginosa* ve *vgb* Rekombinantı

Çalışılan her üç zengin besi yeri ortamında da en yüksek enzim aktivitesi her iki suş için de TB ortamında gözlenmiştir (Şekil 4.13). Tüm ortamlarda *P. aeruginosa*'nın *Vitreoscilla* hemoglobini geni taşıyan rekombinantı (PaJC), konakçı bakteriye göre önemli seviyede yüksek L-asparaginaz aktivitesi göstermiştir. PaJC suşu, konakçı hücreye göre TB ortamında yaklaşık 2.8 kat, SOB ortamında yaklaşık 4 kat, LB ortamında ise 2 katın üzerinde enzim aktivitesi göstermiştir.



Şekil 4.53. *P.aeruginosa* ve *vgb* suşunun (PaJC) çeşitli zengin besi ortamlarında L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Ortam pH değişiminde en yüksek artış her iki suş için de SOB ortamında kaydedilmiştir (Çizelge 4.12). Bu ortamda ortam pH'sı başlangıç kültür pH değerine göre 1.5 ünitelik bir artış göstermiştir. Lauria Broth ve TB ortamında ise pH artışı nispeten benzer olmuştur. Bu ortamlarda yaklaşık 1 ünitelik pH artışı gözlenmiştir.

Çizelge 4.12. *P.aeruginosa* ve *vgb* rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri		
	LB	SOB	TB
<i>P. aeruginosa</i>	8.01 \pm 0.01	8.73 \pm 0.01	8.17 \pm 0.34
<i>PaJC</i>	8.11 \pm 0.01	8.74 \pm 0.11	8.28 \pm 0.04
A ₆₀₀ Değerleri			
<i>P. aeruginosa</i>	4.70 \pm 0.7	5.22 \pm 0.4	4.14 \pm 0.2
<i>PaJC</i>	4.76 \pm 0.2	4.60 \pm 0.6	4.02 \pm 0.2
Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
<i>P. aeruginosa</i>	0.59 \pm 0.01	0.68 \pm 0.05	0.97 \pm 0.03
<i>PaJC</i>	0.55 \pm 0.03	0.62 \pm 0.02	0.99 \pm 0.01

Ortamlarda biyokütle oluşumu *P. aeruginosa* için en yüksek SOB ortamında ve PaJC suşu için LB ortamında olmakla beraber, her üç ortamda da her iki suş için nispeten benzer biyokütle üretimi gözlenmiştir. Amonyak salınımı her iki bakteri suşu için de en yüksek düzeyde TB ortamında görülmüştür. Bu ortamı SOB ve LB takip etmiştir. LB ortamına salınan amonyak TB ortamındakinden hemen hemen 2 kat daha düşük kaydedilmiştir.

4.2 Ortam Optimizasyonu Çalışmaları

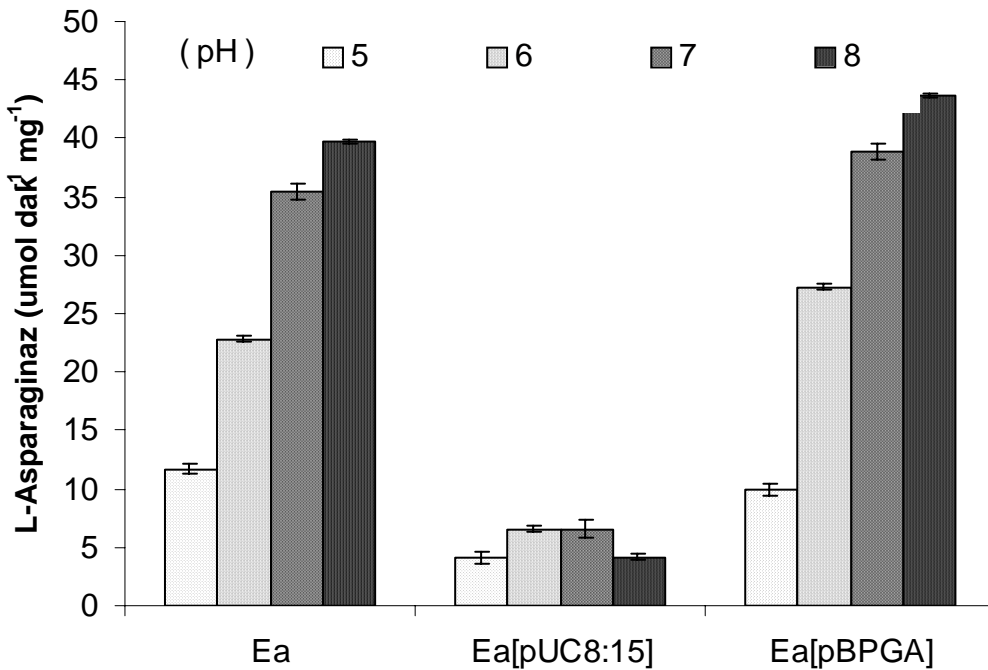
L-asparaginaz sentezinin ortam pH'sı ve ısısı başta olmak üzere çeşitli fiziksel şartlardan önemli derecede etkilendiği bilinmektedir. Çalışmanın bu bölümünde, çalışma boyunca kullanılan standart ortam pH (7.2) ve sıcaklık (37 °C) derecelerinin altındaki ve üstündeki pH ve sıcaklık değerlerinin L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi çalışıldı. Kültür ortamı olarak tüm çalışılmış parametreler için genel olarak en elverişli sonuçları veren (yüksek L-asparaginaz aktivitesi, yüksek biyokütle oluşumu, yüksek amonyak salınımı, nispeten daha az pH değişimi) TB ortamı kullanıldı.

4.2.1 pH etkisi

L-asparaginaz sentezi genel olarak nötr ve nötre yakın ortam pH'larında olduğundan, enzim sentezinin pH değişiminden nasıl etkilendiği birer pH ünitelik artışla dört ayrı pH'da gerçekleştirildi (pH 5.0-8.0). Kültür ortamı olarak TB ortamı kullanıldı.

4.2.1.1 *E. aerogenes* ve onun *vgb*⁺ ve *ansB*⁺ rekombinantları

E. aerogenes'in *vgb* suşu hariç diğer iki suşunda (*E. aerogenes* ve onun *ansB* geni klonlanmış suşu), pH 5.0'dan pH 8.0'e doğru enzim sentezinde önemli yükseliş gözlenmiştir (Şekil 4.14). En düşük enzim aktivitesinin görüldüğü pH 5.0 ila en yüksek enzim sentezinin belirlendiği pH 8.0 arasında 4 katın üzerinde fark görülmüştür. *Vitreoscilla* hemoglobini sentezleyen suşta ise tersine pH'nın enzim sentezi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca bu suşta enzim sentezi diğer iki suşa göre 10 kata varan seviyelerde düşük olmuştur.



Şekil 4.64. Değişik pH'ya sahip TB ortamında kültürü yapılan *E. aerogenes* ve bu bakterinin *vgb* (Ea[pUC8:15]) ve *ansB* (Ea[pB-PGA]) rekombinantlarının L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Dört farklı başlangıç pH değeri (pH 5.0, pH 6.0 , pH 7.0 , pH 8.0) ile başlanan TB kültür ortamlarında 24 saat inkübasyon periyodunun sonunda ortam pH'larında genel olarak bir artış gözlenmiştir (Çizelge 4.13). En yüksek pH artışı başlangıç pH değeri 5.0 olan ortamda (yaklaşık 2 ünitelik pH artışı) görülürken, en düşük pH artışı ise başlangıç pH değeri 8.0 olan ortamda (yaklaşık 0.5 ünitelik pH artışı) kaydedilmiştir.

En yüksek biyokütle oluşumu ise pH 7.0 ortamında gözlenmiş, bunu pH 5.0 ortamı izlemiştir. Ortam amonyak salınımının da en yüksek oranda yine pH 7.0 ortamında olduğu ve bunu pH 8.0 ortamının takip ettiği belirlenmiştir. Ortam pH değeri

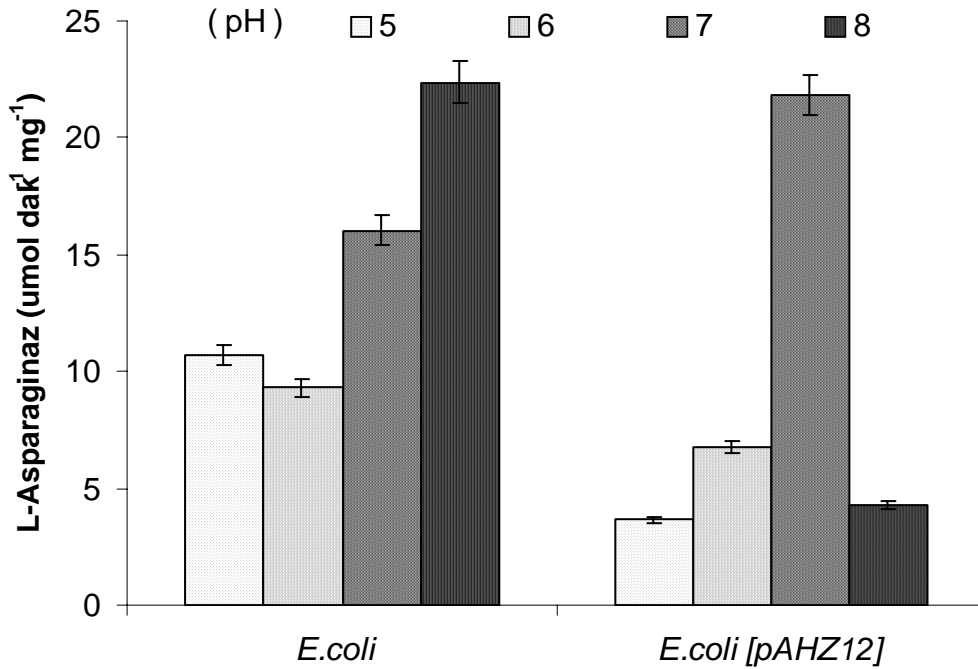
5.0 ve 6.0 olan kültür ortamlarında ise nispeten benzer ve daha düşük seviyede amonyak salınımı gözlenmiştir.

Çizelge 4.13. *E. aerogenes* ve *vgb* ve *ansB* rekombinantlarının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri			
	pH 5.0	PH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
<i>E. aerogenes</i>	6.95 \pm 0.13	7.17 \pm 0.07	7.95 \pm 0.09	8.50 \pm 0.45
Ea[pUC8:15]	6.87 \pm 0.10	7.14 \pm 0.09	7.71 \pm 0.01	8.76 \pm 0.33
Ea[pB-PGA]	6.99 \pm 0.07	7.09 \pm 0.28	8.01 \pm 0.04	8.66 \pm 0.35
	A ₆₀₀ Değerleri			
<i>E. aerogenes</i>	3.87 \pm 0.2	3.81 \pm 0.2	4.10 \pm 0.1	2.90 \pm 0.4
Ea[pUC8:15]	3.57 \pm 0.2	3.20 \pm 0.1	3.80 \pm 0.2	3.29 \pm 0.9
Ea[pB-PGA]	3.85 \pm 0.3	4.05 \pm 0.1	4.00 \pm 0.1	2.46 \pm 0.8
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
<i>E. aerogenes</i>	0.79 \pm 0.04	0.77 \pm 0.02	1.041 \pm 0.02	0.912 \pm 0.07
Ea[pUC8:15]	0.72 \pm 0.04	0.74 \pm 0.06	0.932 \pm 0.01	0.937 \pm 0.03
Ea[pB-PGA]	0.78 \pm 0.04	0.76 \pm 0.02	1.014 \pm 0.04	0.855 \pm 0.02

4.2.1.2 *E. coli* ve *ansB* rekombinantı

Ortam pH'sının bu iki suşta L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi oldukça farklı bulunmuştur. Yabancıl tip bakteride en yüksek enzim aktivitesi pH 8.0 de görülürken, benzer seviyedeki enzim aktivitesi *ansB* suşu için pH 7.0'de belirlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.75. *E. coli* ve bu bakterinin *ansB* klonlanmış suşunun (*E. coli*[pAHZ12]) değişik pH'ya yarlanmış TB ortamında L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

İlginç olan bu suşta (*ansB*) 1 ünitelik pH artışının veya düşüşünün bile enzim sentezi üzerinde kendini önemli etki ile ortaya koymasındır. En yüksek L-asparaginaz aktivitesinin belirlendiği pH 7.0 ile pH 6.0 arasında yaklaşık 3 kat, pH 8.0 arasında ise yaklaşık 5 kat fark bulunmaktadır.

E. aerogenes ve rekombinantlarında olduğu gibi bu iki bakteri suşunda da en yüksek pH artışı başlangıç pH değeri 5.0 olan ortamda gözlenirken, en düşük pH değişimi pH 8.0 ortamında kaydedilmiştir (Çizelge 4.14).

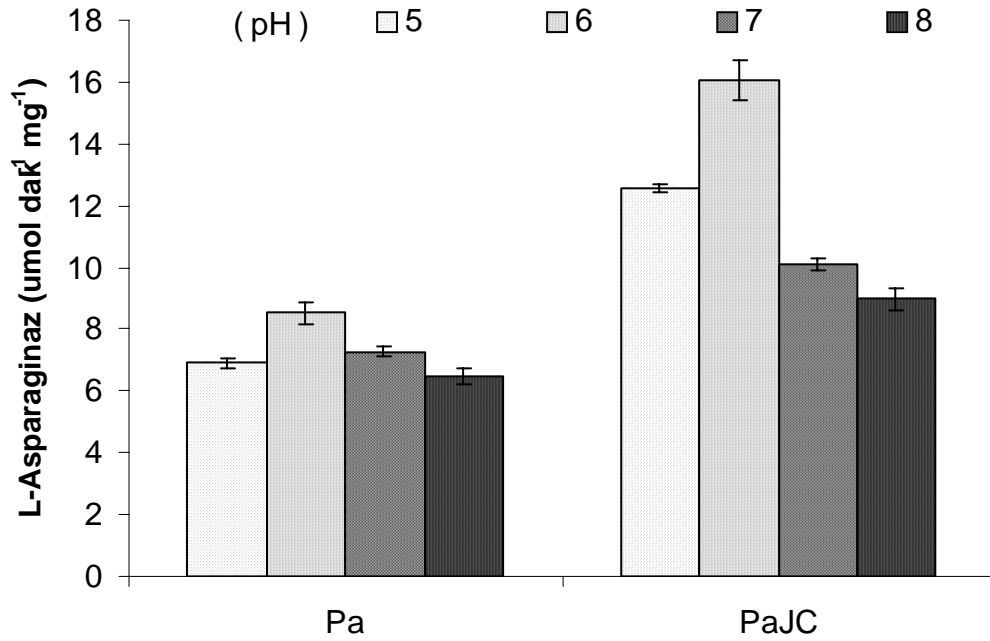
Çizelge 4.14. *E. coli* ve *ansB* rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri			
	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
<i>E. coli</i>	6.82 \pm 0.04	7.09 \pm 0.07	8.03 \pm 0.06	8.65 \pm 0.26
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	6.74 \pm 0.02	7.05 \pm 0.01	7.69 \pm 0.02	8.53 \pm 0.04
	A ₆₀₀ Değerleri			
<i>E. coli</i>	4.23 \pm 0.2	3.81 \pm 0.1	4.12 \pm 0.2	3.60 \pm 0.3
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	3.99 \pm 0.5	3.71 \pm 0.2	3.60 \pm 0.1	3.12 \pm 0.3
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
<i>E. coli</i>	0.71 \pm 0.03	0.688 \pm 0.03	1.022 \pm 0.01	0.975 \pm 0.02
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	0.57 \pm 0.02	0.621 \pm 0.02	0.854 \pm 0.01	0.807 \pm 0.01

Ancak, en yüksek biyokütle oluşumunun başlangıç pH değeri 5.0 olan TB ortamında olduğu kaydedilmiştir. Genel olarak yabancıl tip bakteri (*E. coli*), rekombinant suş (pAHZ12)'a göre az da olsa daha yüksek biyokütle oluşumu göstermiştir. En yüksek amonyak salınımı ise her iki suş için pH 7.0 ortamında kaydedilmiştir. Ortam başlangıç pH değeri 5.0 olan TB ise en düşük düzeyde amonyak birikiminin olduğu ortam olarak belirlenmiştir.

4.2.1.3 *P. aeruginosa* ve *vgb*⁺ rekombinantı

Ortam pH farkının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi bu iki suşta oldukça farklı olmuştur. Tüm pH aralıklarında rekombinant suş (PaJC) konakçı hücre (*P. aeruginosa*)'ye göre önemli oranda yüksek enzim aktivitesi göstermiştir (Şekil 4.16). En yüksek enzim aktivitesi PaJC suşu için pH 6.0'da gözlenirken, bunu pH 5.0 takip etmiştir. İlginç olan bu suşun hem pH 7.0 ve hem de özellikle pH 8.0 ortamında oldukça düşük enzim seviyesi göstermesi olmuştur. Ortam pH değeri 6.0 ile karşılaştırıldığında bu suş pH 8.0'de 2 kat düşük enzim aktivitesi göstermiştir



Şekil 4.86. Farklı pH'ya ayarlanmış TB ortamında *P.aeruginosa* ve *vgb* suşunun (*PaJC*) L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Ortam pH değişimi düşük pH ortamında (pH 5.0) en yüksek derecede olurken, yüksek pH'lı ortamda (pH 8.0) en düşük seviyede olmuştur (Çizelge 4.15). Başlangıç pH değeri 5.0 olan ortamda pH değişim 2 ünitenin üzerinde olurken, pH 6.0 ortamında yaklaşık 1.5, pH 7.0 ortamında yaklaşık 1.0 ve pH 8.0 ortamında yaklaşık 0.75 ünitelik artışlar şeklinde kaydedilmiştir.

Çizelge 4.15. *P.aeruginosa* ve *vgb* rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri			
	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
<i>P. aeruginosa</i>	7.22 \pm 0.05	7.42 \pm 0.08	7.94 \pm 0.19	8.76 \pm 0.09
<i>PaJC</i>	7.22 \pm 0.02	7.48 \pm 0.05	8.27 \pm 0.03	8.81 \pm 0.04
	A_{600} Değerleri			
<i>P. aeruginosa</i>	4.48 \pm 0.3	3.67 \pm 0.3	4.14 \pm 0.1	4.56 \pm 0.1
<i>PaJC</i>	4.07 \pm 0.1	4.08 \pm 0.1	4.02 \pm 0.2	4.36 \pm 0.1
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
<i>P. aeruginosa</i>	1.19 \pm 0.48	1.08 \pm 0.03	1.070 \pm 0.16	1.31 \pm 0.04
<i>PaJC</i>	1.20 \pm 0.06	1.18 \pm 0.12	1.1.43 \pm 0.20	1.30 \pm 0.14

Kültürlerin en yüksek oranda biyokütle oluşturduğu ortam pH 8.0 olarak belirlenmiştir. Her üç suş da diğer pH değerlerinde benzer biyokütleler oluşturmuşlardır.

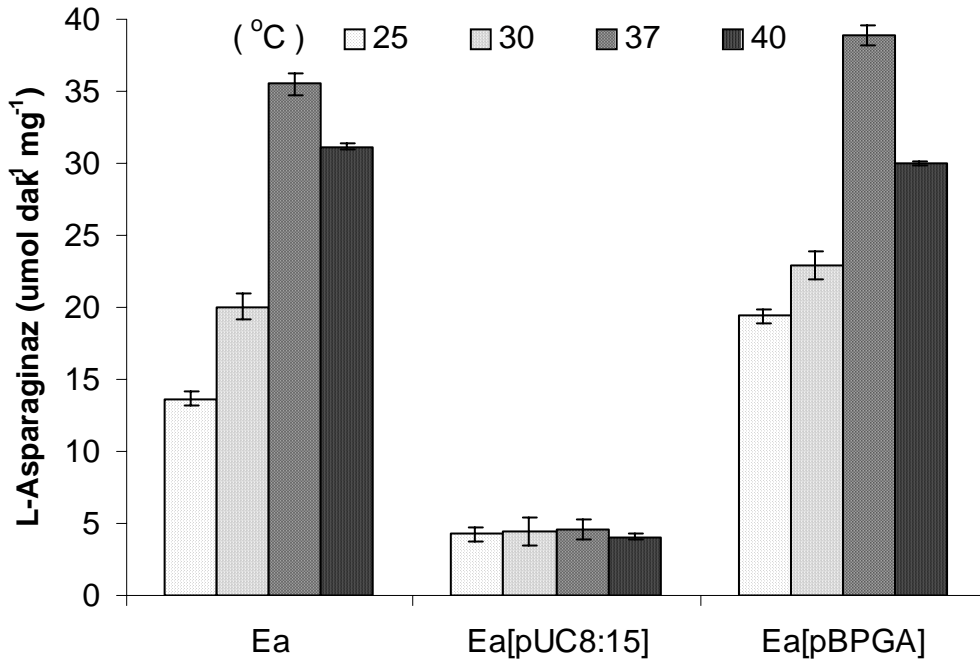
Amonyak birikimi ise yine en yüksek ölçekte pH 8.0 ortamında kaydedilirken, bunu pH 5.0 ortamı takip etmiştir.

4.2.2 Sıcaklık

Bakterilerin istenen ölçülerde çoğalması için besin kaynakları ve ortam pH'sının yanında ortam sıcaklığı da önemli bir dış etkidir. Değişik bakteriler değişik sıcaklıklarda çoğalma eğilimi gösterirler. Hatta burada çalışılmış ve hepsi gram-negatif olan bakterilerin bile farklı sıcaklık aralıklarında optimum çoğalma gösterdikleri bilinmektedir. Bu nedenle, araştırma boyunca çalışılmış olan 37°C'ye ilaveten her üç bakterinin ve onların rekombinantlarının 25 °C, 30 °C ve 40 °C'de çoğalma karakteristikleri de çalışıldı. Ortam besi yeri olarak yine en elverişli besi ortamı olarak belirlenmiş olan TB seçildi.

4.2.2.1 *E. aerogenes* ve onun *vgb*⁺ ve *ansB*⁺ rekombinantları

E. aerogenes ve rekombinantlarında L-asparaginaz sentezi üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 4. 17'de görülmektedir. Burada ilginç olarak *vgb* taşıyan suş diğer iki suşla karşılaştırıldığında tüm sıcaklıklarda en düşük aktivite gösteren suş olarak dikkat çekmektedir.



Şekil 4.97. TB ortamında değişik ısılarda kültürü yapılan *E. aerogenes* ve bu bakterinin *vgb* (Ea[pUC8:15]) ve *ansB* (Ea[pB-PGA]) rekombinantlarının L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Bu suş tüm çalışılan sıcaklıklarda benzer enzim aktivitesi göstermiş ve bu aktivite diğer iki suştan benzer 3-10 kat arasında düşük kaydedilmiştir. *E. aerogenes* ve *ansB* klonu ise tüm sıcaklıklarda benzer aktiviteler göstermiştir. Bu iki suşta en yüksek aktivite 37 °C’de görülürken, bunu 40 °C takip etmiştir. Bu iki suşun en düşük enzim aktivitesi 25 °C’de gözlenmiştir. Bu ısıda her iki bakteri suşu 37 °C ile kıyaslandığında 2 kata varan düşük enzim aktiviteleri ile kaydedilmişlerdir.

Bu kültürler içinde pH değişiminin başlangıç pH değeri olan 7.2’den en büyük ölçüde değişmiş olan 40 °C’deki kültürler olmuştur (Çizelge 4.16). Bu sıcaklıkta pH değişiminde yaklaşık 1 ünitelik artış kaydedilmiştir. Benzer şekilde her üç suş için en yüksek biyomass da bu kültürlerde (40 °C) olmuştur.

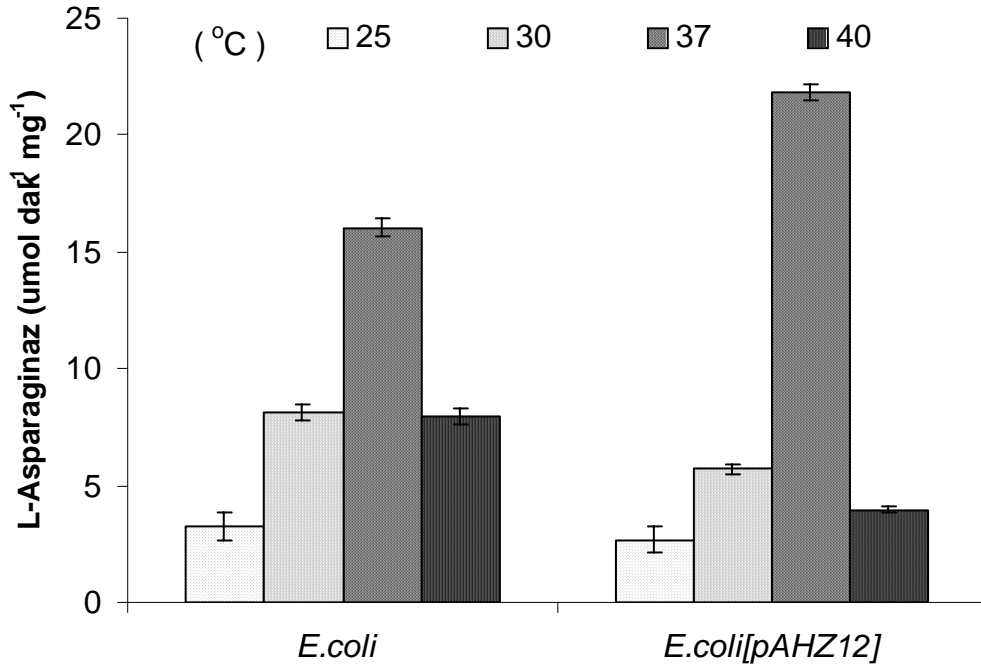
Çizelge 4.16. *E. aerogenes* ve *vgb* ve *ansB* rekombinantlarının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri			
	25 °C	30 °C	37 °C	40 °C
<i>E. aerogenes</i>	8.01 \pm 0.09	8.09 \pm 0.02	7.95 \pm 0.11	8.39 \pm 0.31
Ea[pUC8:15]	7.93 \pm 0.24	8.24 \pm 0.80	7.71 \pm 0.02	8.27 \pm 0.17
Ea[pB-PGA]	7.93 \pm 0.14	7.76 \pm 0.07	8.01 \pm 0.02	8.07 \pm 0.06
	A ₆₀₀ Değerleri			
<i>E. aerogenes</i>	6.06 \pm 0.1	6.86 \pm 0.1	7.12 \pm 0.1	8.00 \pm 0.2
Ea[pUC8:15]	7.27 \pm 0.2	6.86 \pm 0.6	7.80 \pm 0.2	7.93 \pm 0.1
Ea[pB-PGA]	6.44 \pm 0.5	5.67 \pm 0.5	7.00 \pm 0.1	7.38 \pm 0.20
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
<i>E. aerogenes</i>	1.360 \pm 0.06	1.220 \pm 0.06	1.041 \pm 0.02	1.840 \pm 0.08
Ea[pUC8:15]	0.950 \pm 0.09	0.950 \pm 0.09	0.932 \pm 0.01	1.920 \pm 0.03
Ea[pB-PGA]	1.040 \pm 0.04	1.040 \pm 0.04	1.014 \pm 0.04	1.700 \pm 0.01

Ortam sıcaklığı düştükçe her üç suşun biyokütle üretiminde de düşüş kaydedilmiştir. Ortama salınan amonyak miktarı da en yüksek düzeyde 40 °C’deki kültürlerde belirlenmiştir. Bu ortamdaki amonyak konsantrasyonunun diğer sıcaklıklardakinin 2 katına ulaştığı belirlenmiştir.

4.2.2.2 *E. coli* ve *ansB* rekombinantı

E. coli ve *ansB* klonunda en yüksek L-asparaginaz sentezinin 37 °C’de olduğu bulunmuştur (Şekil 4.18). Ancak, bu sıcaklıkta rekombinant suş konakçı hücreye göre % 50’nin üzerinde daha fazla enzim aktivitesi göstermiştir. Bu sıcaklıkta her iki suş diğer sıcaklıklardakinden 2 ila 8 kat daha fazla enzim aktivitesi göstermişlerdir. En düşük enzim aktivitesi her iki suş için de 25 °C’de kaydedilmiştir.



Şekil 4.108. TB ortamında değişik sıcaklıklarda kültürü yapılmış *E. coli* ve *ansB* klonlanmış suşunun (*E. coli*[pAHZ12]) L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

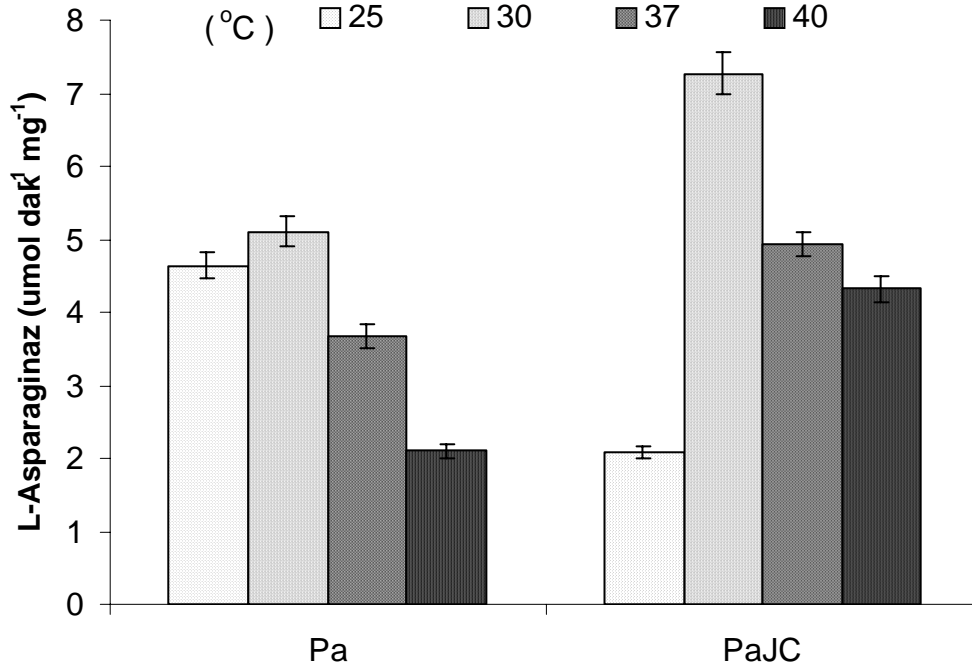
Her iki suş için de en yüksek pH değişimi 40 °C’de gözlenmiştir. Bu sıcaklıkta başlangıç pH değeri (pH 7.2)’ne göre yaklaşık 2 ünitelik pH artışı kaydedilmiştir (Çizelge 4.17). Diğer sıcaklıklarda genel olarak 0.5-0.8 ünitelik artışlar gözlenmiştir. Kültürler en yüksek biyokütleyle 40 °C’de ulaşırken, sıcaklık aralığındaki azalışla biyokütle oluşumunda da genel bir azalış kaydedilmiştir. Ortama salınan amonyak miktarı ise 37 °C kültürleri hariç, diğer 3 sıcaklık derecesinde benzer olmuştur. En düşük amonyak birikimi 37 °C kültürlerinde kaydedilmiştir.

Çizelge 4.17. *E. coli* ve *ansB* rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri			
	25 °C	30 °C	37 °C	40 °C
<i>E. coli</i>	7.83 \pm 0.05	7.84 \pm 0.06	8.03 \pm 0.06	8.19 \pm 0.07
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	8.00 \pm 0.04	7.93 \pm 0.07	7.69 \pm 0.02	7.94 \pm 0.01
	A_{600} Değerleri			
	25 °C	30 °C	37 °C	40 °C
<i>E. coli</i>	5.19 \pm 0.2	6.26 \pm 0.1	7.00 \pm 0.1	7.37 \pm 0.3
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	6.25 \pm 0.1	7.18 \pm 0.5	7.09 \pm 0.02	7.28 \pm 0.1
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
	25 °C	30 °C	37 °C	40 °C
<i>E. coli</i>	1.35 \pm 0.15	1.35 \pm 0.15	1.022 \pm 0.22	1.35 \pm 0.06
<i>E. coli</i> [pAHZ12]	1.18 \pm 0.01	1.23 \pm 0.08	0.854 \pm 0.01	1.30 \pm 0.25

4.2.2.3 *P. aeruginosa* ve *vgb*⁺ rekombinantı

P. aeruginosa ve bu bakterinin *vgb* rekombinantında en yüksek L-asparaginaz sentezi 30 °C'deki kültürlerde kaydedilmiştir. Ancak, rekombinant suş bu ortamda konakçı hücreden 1.5 kat daha fazla enzim aktivitesi göstermiştir.



Şekil 4.119. TB ortamında farklı sıcaklıklarda kültürü yapılmış olan *P.aeruginosa* ve *vgb* suşunun (*PaJC*) L-asparaginaz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, \pm standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerinin üzerinde belirtilmiştir.

Konakçı hücre için 25 °C ikinci en yüksek enzim aktivitesini verirken, rekombinant suş bu sıcaklıkta en düşük enzim aktivitesi göstermiştir. Bu sıcaklıkta rekombinant suşun 37 °C'dekine göre yaklaşık 4 kat düşük enzim seviyesine sahip olduğu belirlenmiştir. Konakçı hücrede ise en düşük aktivite 40 °C'de gözlenmiştir.

P. aeruginosa ve onun *vgb* klonu tüm sıcaklık aralıklarında benzer (0.7- 1.0) pH artışları göstermişlerdir (Çizelge 4.18).

En yüksek biyokütle oluşumu her iki suş için de 40 °C'de gözlenirken, bunu 37 °C'deki kültürler takip etmiştir. Diğer sıcaklıklarda (25 °C ve 30 °C) ise benzer biyokütle oluşumu gözlenmiştir. En yüksek amonyak birikimi de 40 °C'de görülürken, bunu 25 °C ve 30 °C takip etmiştir.

Çizelge 4.18. *P. auroginosa* ve *vgb* rekombinantının kültürlerinde pH değişimi, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (σ_{n-1}) \pm değerler olarak belirtilmiştir.

	pH Değerleri			
	25 °C	30 °C	37 °C	40 °C
<i>P. aeruginosa</i>	8.06 \pm 0.02	7.98 \pm 0.04	7.94 \pm 0.19	8.08 \pm 0.15
<i>PaJC</i>	8.26 \pm 0.19	8.16 \pm 0.25	8.27 \pm 0.03	8.05 \pm 0.07
	A ₆₀₀ Değerleri			
<i>P. aeruginosa</i>	6.92 \pm 0.1	6.76 \pm 0.1	7.40 \pm 0.2	8.4 \pm 0.1
<i>PaJC</i>	6.94 \pm 0.1	7.17 \pm 0.2	7.20 \pm 0.2	8.7 \pm 0.1
	Kültür Ortamına Salınan Amonyak			
<i>P. aeruginosa</i>	1.33 \pm 0.09	1.33 \pm 0.09	1,070 \pm 0.16	1.925 \pm 0.03
<i>PaJC</i>	1.39 \pm 0.20	1.37 \pm 0.17	1,143 \pm 0.20	1.945 \pm 0.06

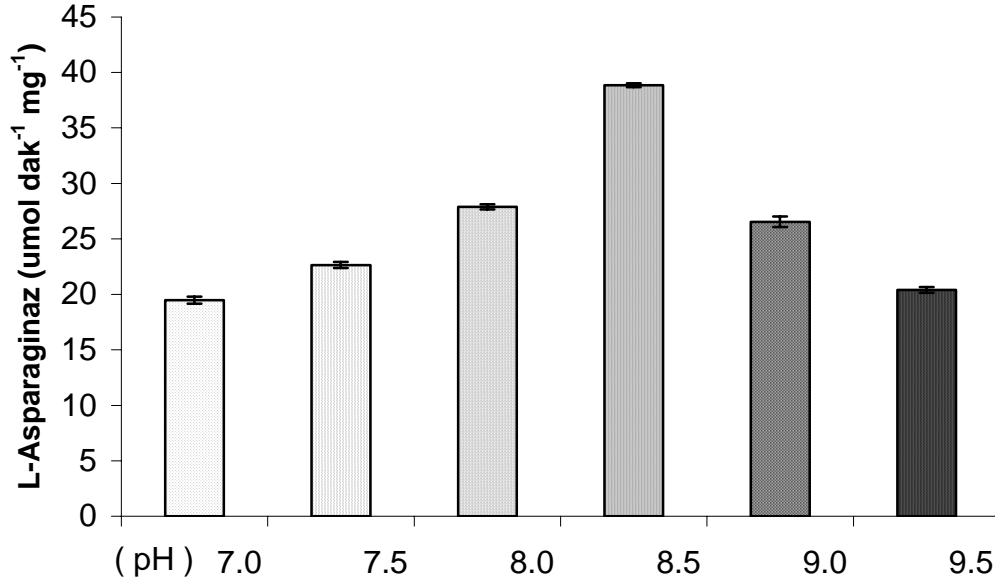
4.3 Optimal L-asparaginaz aktivitesi

Bu bölümde L-asparaginaz sentezinin en yüksek olduğu bakteri suşu ve yine enzim aktivitesinin en yüksek belirlendiği kültür ortamı kullanılarak hücrelerde enzim ekstraksiyonu yapıldı ve reaksiyon ortamında değişik pH ve sıcaklık aralıklarında bu enzimin sentezinin nasıl etkilendiği araştırıldı. Bu amaçla L-asparaginaz sentezinin en yüksek bulunduğu ve tarafımızdan oluşturulmuş olan *E. aerogenes ansB* rekombinantı (Ea[pB-PGA]) ve ortam olarak da TB kullanıldı. Kültürler yukarıda çeşitli besi ortamlarında olduğu gibi yapıldı ve 24 saat inkübasyon sonrası enzim ekstraksiyonu yapılarak, değişik reaksiyon pH ve sıcaklıklarda enzimin katalitik aktivitesinin nasıl etkilendiği araştırıldı.

4.3.1 pH optimizasyonu

L-Asparaginaz aktivitesi tayininde toplam 2 ml olan reaksiyon karışımı 0.05 M Tris-HCl, 0.01 M L-asparagin ve belli hacimde hücre ekstraktı içermektedir. Enzim aktivitesi amonyum sülfat standart eğrisinden yukarıda materyal ve metod kısmında bahsedildiği gibi gerçekleştirildi. Ancak, enzimin değişik pH'larda nasıl reaksiyon kinetiği verdiği tampon pH'sında yapılmış olan değişikliklerle saptandı. Diğer bir deyimle, hücreden özütlenmiş (ekstrakt) enzimin katalitik aktivitesi üzerine farklı pH'ların etkisi araştırıldı. Bunun için tüm bakteriler içinde en yüksek L-asparaginaz aktivitesinin görüldüğü Ea[pB-PGA] rekombinantından 24 saat inkübasyon sonrasında enzim ekstraksiyonu yapıldı ve bu enzimin katalitik gücü pH 7.0, pH 7.5, pH 8.0, pH 8.6, pH 9.0 ve pH 9.5'da belirlendi.

Enzim aktivitesinin pH artışı ile orantılı biçimde arttığı ve en yüksek aktivitenin pH 8.6'da olduğu görülmüştür (Şekil 4.20). Daha ileri pH'larda (pH 9.0 ve pH 9.5) ise enzim aktivitesinin düştüğü ve düşük pH ortamındakilere (pH 7.0 ve pH 8.0) benzer düzeye indiği belirlenmiştir.

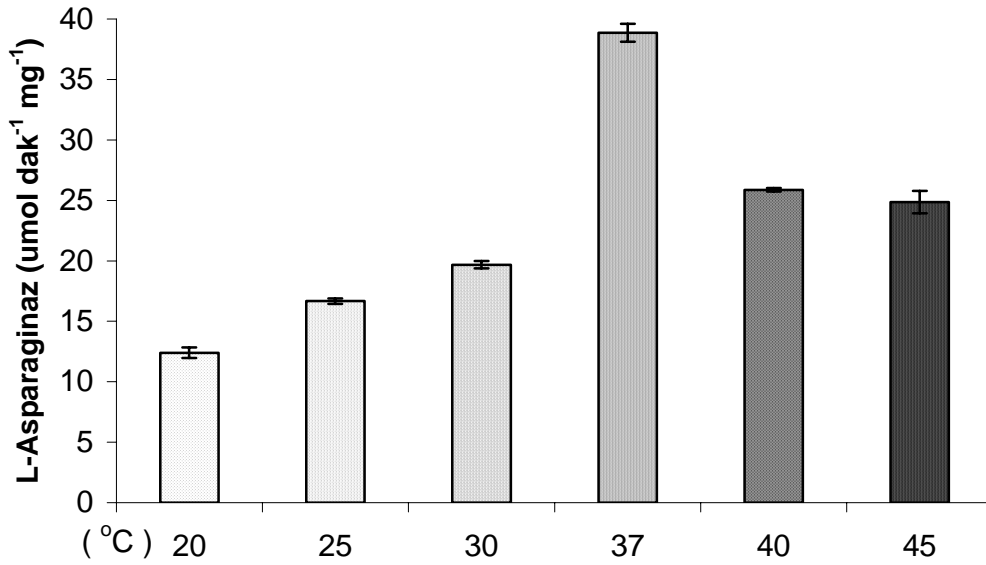


Şekil 4.20. L-Asparaginaz Enziminin Aktivitesine farklı pH derecelerinin etkileri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır ve Standart sapmaları hata çubukları (σ_{n-1}) ile ifade edilmiştir.

4.3.2 Sıcaklık Optimizasyonu

L-asparaginaz geni klonlamış olduğumuz *E. aerogenes* (Ea[pB-PGA])'den ekstrate edilmiş olan enzimin katalitik aktivitesinin sıcaklık ile nasıl etkilendiğini anlamak için, enzimin verdiği reaksiyon (L-asparagini L-aspartik asite ve amonyağa çevirmesi) değişik sıcaklıklarda çalışıldı. Bunun için reaksiyon ortam sıcaklığı olarak 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C ve 45 °C 'lerde çalışıldı.

Enzimin en yüksek katalitik aktivitesi 37 °C'de gözlenirken, daha düşük sıcaklıklarda enzim aktivitesi derece derece düşüş göstermektedir (Şekil 4.21). Daha yüksek derecelerde (40 ve 45 °C) ise enzim aktivitesi 37 °C'ye göre düşük olmakla beraber, bu sıcaklığın altındaki (20 °C, 25 °C, 30 °C) derecelerden daha yüksek kaydedilmiştir. Enzim 37 °C'de en düşük sıcaklık olan 20 °C'ye göre yaklaşık 4 kat daha fazla katalitik aktivite göstermiştir.



Şekil 4.212. L-Asparaginaz Enziminin Aktivitesine farklı sıcaklık derecelerinin etkileri. Her bir veri üç bağımsız tekrarın ortalamasıdır ve Standart sapmaları hata çubukları (σ_{n-1}) ile ifade edilmiştir.

4.4 Bakterilerin oksijen tüketim karakteristikleri

Hücrelerin oksijen kullanım karakteristikleri onların belli sayısının ortamdaki oksijeni ne kadar sürede ve ne oranda tükettiklerinin ölçülmesi ile belirlendi. Bunu için kullanılan her fazdaki kültür canlı hücre sayısı, kültürlerin uygun dilüsyonlarının LB agar plakalar üzerine ekilmesi ve bunlar üzerindeki kolonilerin sayılarak kullanılan dilüsyon faktörü ile çarpılması ve böylece ortamların 1 ml'sindeki canlı hücre sayısının belirlenmesi ile gerçekleştirildi.

Kültürler TB ortamında (37 °C, 200-rpm) yapılarak ve inkübasyonun 6., 9. ve 12. saatlerinde kültürden örnekler alınarak A_{600} değerleri ölçüldü ve sonra santrifüj edildi, belirlenen absorbans değerlerine göre kültürler eşit OD'de olacak şekilde havaya doyurulmuş 0.1 M, pH 7.6 fosfat tamponunda süspanse edildiler. Daha sonra hücrelerin oksijen tüketimi materyal ve metot kısmında belirtildiği gibi yapılarak ve her bir bakteri hücresinin birim zamanda ne kadar oksijen tükettiği belirlendi.

Kullanılmış olan tüm bakterilerin oksijen tüketim karakterleri Çizelge 4.19'da gösterilmektedir. Özellikle kültürlerin erken logaritmik fazlarında (6. saat) *Vitreoscilla* hemoglobini sentezleyen bakterilerin bariz biçimde daha fazla oksijen tükettikleri görülmektedir. Tüm bakterilerde genel olarak rekombinant hücrelerin konakçalarına göre daha fazla oksijen tükettikleri görülmektedir.

Çizelge 4.19. Kullanılan bakterilerin ve rekombinantlarının değişik kültür fazlarında oksijen tüketimi. Her veri noktası 3 bağımsız deneyin ortalaması olup parantez içindeki değerler \pm standart sapmaları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.

6. saat oksijen tüketimi						
	(picomol/bakteri/dakika)		Canlı Hücre Sayısı/ml		A_{600}	
Ea	1.08 10^5	(0.007)	8.10 10^9	(0.070)	2.540	0
Ea puc 8:15	9.88 10^5	(1.300)	7.05 10^9	(0.140)	2.295	(0.007)
Ea pB-PGA	3.63 10^5	(0.060)	3.45 10^9	(0.071)	2.595	(0.100)
<i>E. coli</i>	3.53 10^5	(0.060)	2.96 10^9	(0.060)	1.240	(0.010)
<i>E. coli</i> pAHZ12	4.89 10^5	(0.240)	2.47 10^9	(0.030)	1.030	(0.040)
Pa	3.37 10^5	(0.200)	6.65 10^9	(0.210)	1.270	(0.010)
PaJC	4.01 10^5	(0.260)	8.01 10^9	(0.120)	1.470	(0.150)
9. saat oksijen tüketimi						
Ea	3.15 10^5	(0.37)	12.00 10^9	(0.67)	3.51	(0.15)
Ea puc 8:15	4.62 10^5	(0.75)	22.45 10^9	(0.07)	3.32	(0.05)
Ea pB-PGA	2.16 10^5	(0.09)	20.10 10^9	(0.42)	3.54	(0.07)
<i>E. coli</i>	1.04 10^5	(0.12)	45.35 10^9	(3.04)	2.47	(0.02)
<i>E. coli</i> pAHZ12	1.33 10^5	(0.02)	47.85 10^9	(2.61)	2.46	(0.14)
Pa	4.63 10^5	(0.23)	191.50 10^9	(2.12)	2.57	(0.03)
PaJC	0.52 10^5	(0.02)	225.50 10^9	(2.12)	2.68	(0.01)
12. saat oksijen tüketimi						
E.a	0.52 10^5	(0.03)	27.25 10^9	(1.90)	3.76	(0.05)
E.a puc 8:15	0.61 10^5	(0.11)	27.90 10^9	(5.79)	3.73	(0.40)
E.a pB-PGA	0.94 10^5	(0.07)	25.80 10^9	(0.84)	3.89	(0.13)
<i>E. coli</i>	0.51 10^5	(0.05)	36.25 10^9	(3.60)	3.46	(0.08)
<i>E. coli</i> pAHZ12	0.55 10^5	(0.03)	38.40 10^9	(2.26)	3.33	(0.07)
Pa	0.41 10^5	(0.07)	133.50 10^9	(3.53)	3.01	(0.11)
PaJC	0.37 10^5	(0.02)	138.50 10^9	(0.70)	3.50	(0.12)

Bu fazda (6. saat) *E. aerogenes*'in *vgb* rekombinantı konakçı hücreden neredeyse 10 kat, *ansB* geni klonlanmış olan *E. aerogenes*'den ise yaklaşık 3 kat daha fazla oksijen tükettiği görülmektedir. Bu bakterinin *ansB* geni klonladığımız suşu ise hem *vgb* suşuna ve hem de konakçı bakteriye göre 2 kattan daha düşük hücre yoğunluğu göstermiştir. Kültür fazındaki uzama (9. ve 12. saat) ile birlikte *E. aerogenes* ve rekombinantlarının oksijen kullanımında azalma olmuş ve her üç suş benzer oksijen tüketim değerleri göstermeye başlamışlardır. Buna tek istisna *E. aerogenes*' de en yüksek oksijen tüketiminin 9. saatte olmasıdır. Ortam canlı hücre sayısında ise 6. saatte konakçı hücrenin en yüksek hücre yoğunluğuna ulaştığı kaydedilmiştir.

E. coli ve bu bakterinin *ansB* klonlanmış rekombinantının oksijen kullanım karakteristikleri karşılaştırıldığında, rekombinantın konakçı hücreye göre az da olsa üç kültür fazında da daha fazla oksijen tükettiği görülmektedir. Her iki suş için en yüksek oksijen alımının olduğu 6. saatten 9. ve 12. saate gidildiğinde azalma olmuştur. Suşların 12. saatteki oksijen tüketimi 6. saate göre yaklaşık 9 kat düşük kaydedilmiştir.

E. aerogenes için *Vitreoscilla* hemoglobininin kaynaklanan yüksek oksijen kullanımının *P. aeruginosa* için geçerli olmadığı saptanmıştır. Erken logaritmik kültürleri (6. saat) hariç, bu bakterinin ve *vgb* rekombinantının tüm kültür fazlarındaki oksijen alım özelliklerinin neredeyse benzer oldukları kaydedilmiştir. Erken logaritmik fazda ise *vgb* klonu az da olsa daha fazla oksijen kullanmaktadır.

5 TARTIŞMA

Diğer canlılarda olduğu gibi hem yüksek oksijende ve hem de düşük oksijen ortamlarında bakteriler strese maruz kalırlar ve bu tür istenmeyen durumları atlama için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bitki ve hayvanlardan farklı olarak, bazı bakteriler bu tür olumsuz şartlar altında yaşamaya devam etmekle kalmaz, aynı zamanda daha da iyi çoğalmaya başlarlar. Anaerobik şartlar altında yaşamak bakterinin oksijene alternatif oksitleyici ajanlar bulup kullanması ile ilgilidir. Ortam oksijen seviyesi normal seviyelerde iken *E. coli*'deki esas sitokrom oksidaz sitokrom *o* iken, oksijen azaldıkça sitokrom *d* dominant oksidaz olur. Oksijen kısıtlaması ile beraber hücre fizyolojisinde diğer birçok ayarlamalar yapılır. TCA ve lipit oksidasyonu için gerekli genlerin aktivitesinde düşüşe gidilirken, anaerobik transfer reaksiyonları için gerekli genlerin aktivitesinde artış olur. Oksijenle regüle olan genler iki genel sınıf altında toplanabilir: *arc*, aerobik respirasyon kontrolü ile ilgili iken, *fnr* (fumarat ve nitrat redüksiyonu) anaerobik respirasyon kontrolü ile ilgilidir. ArcA bir seri aerobik fonksiyon için bir anaerobik represör olarak davranır. Hem ArcA ve hem de FNR transkripsiyonel faktörlerdir. Bu faktörlerin DNA'ya bağlanma aktiviteleri anaerobik hücrede aktive olur. Her iki protein de sitokrom *o*'yu baskılamak, sitokrom *d*'yi aktive ederler. Sit *o* aerobik şartlarda dominant formken, Sit *d* anaerobik veya mikroaerobik şartlar altındaki *E. coli*'de dominant formdur. FNR hem yapı ve hem de fonksiyon olarak CRP (cAMP bağlayan protein)'e benzer TCA ve lipit oksidasyonu için gerekli genlerin aktivitesinde düşüş ArcAB sistemi ile olurken, anaerobik transfer reaksiyonları için gerekli genlerin aktivitesinde artış FNR ve CRP faktörleri ile olur. Anaerobik şartlar altında bakterilerin çoğalması için oksijene alternatif en iyi elektron alıcısı nitrattır. Eğer böyle şartlar altında nitrat, nitrit veya fumarat gibi alternatif elektron alıcılar yoksa, birçok bakteri fermentasyon reaksiyonlarını devreye sokarak ATP'sini substrat seviyesinde fosforilasyondan sağlar. Format muhtemelen *E. coli*'nin en önemli fermentasyon ürünü olup, metabolizması FNR ile düzenlenir [151].

E. coli'de 200'den fazla genin ortam oksijen seviyesi ile direkt ilişkili olarak regüle oldukları sanılmaktadır. Bu çalışmanın konusunu oluşturan iki gen, *vgb* ve *ansB*, benzer şekilde oksijenle regüle olan genlerdir. Her iki genin promotorunun optimal aktivasyonu için FNR ile CRP'nin koordineli olarak promotor bölgedeki kendilerine özel DNA motifine bağlanmaları gerekir. Her iki gen de anaerobiosis şartları altında maksimum düzeyde indüklenmekle beraber, komple anaerobik ve aerobik ortamlarda

her iki genin ekspresyonu da baskılanmaktadır. Dolayısı ile L-asparaginazda olduğu gibi, çeşitli biyoüretimlerde oksijen konsantrasyonunun belli kritik seviyelerin altına düşmesi en önemli belirleyici olup, böyle sistemlerde hücrelere etkin bir oksijen alım ve tampon özelliği kazandıran *Vitreoscilla* hemoglobininin kullanılmasının önemli avantaj sağlayacağı düşünülmüştür. Ancak, sonuçlar VHB'nin farklı bakterilerde oldukça farklı L-asparaginaz sentezine neden olduğunu, bazı bakterilerde beklendiği gibi enzim seviyesinde önemli artış gözlenirken bazı bakterilerde enzimin neredeyse tamamen inhibe olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmanın konusunu oluşturan her iki genin (*ansB* ve *vgb*) indüksiyonunun ve represyonunun yukarıda bahsedilen global transkripsiyon regülatörleri (ArcAB, FNR ve CRP) başta olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerini içeren karışık mekanizmalar ile kontrol edildiği ve buna bağlı olarak bu genlerin ürünü olan L- asparaginaz ve VHB sentezinin karbon, azot ve oksijen gibi besinsel ve çevresel faktörler tarafından regüle edildiği bilinmektedir [14]. Buradan hareketle bu çalışmada *ansB* geni ve *vgb* geni klonlanmış transformantlarda ve onların doğal konakçılarında farklı karbon ve azot kaynaklarının L-asparaginaz sentezine etkileri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Bu amaçla çalışma gram-negatif bakteriler olan *E. coli* ve onun *ansB* geni klonlanmış rekombinant suşu (*E. coli*-pAHZ12), *Pseudomonas aeruginosa* ve bu bakterinin *Vitreoscilla* hemoglobini klonlanmış rekombinant suşu (PaJC) ve *Enterobacter aerogenes* ve onun *vgb*⁺ rekombinantı ([pUC8:15]) ve ayrıca *ansB* geni taşıyan bir vektörle (pB-PGA) klonladığımız *Enterobacter aerogenes* rekombinantı (Ea[pB-PGA]) kullanılmıştır.

Karbon kaynaklarının L-asparaginaz enziminin aktivitesine etkilerinin araştırılması çalışmaları çerçevesinde glukoz, laktoz, gliserol ve mannitol kullanılmıştır. Çalışmada kullanılmış olan bu dört karbon kaynağının bakterilerde ve rekombinantlarında L-asparaginaz sentezini oldukça farklı düzeyde etkiledikleri saptanmıştır. Bu farkın aynı zamanda bu bakterilerin biyokütle oluşturmalarına ve amonyak salınımlarına genel olarak yansıdığı görülmektedir. Genel olarak yüksek biyokütle oluşturulan ortamlarda enzim sentezinin de yüksek olduğu belirlenmiştir. Örneğin kültür ortamında biyokütle oluşturması bakımından her üç bakteride (ve onların rekombinantlarında) de en elverişsiz C-kaynağı olarak belirlenen mannitolün genel olarak enzim sentezini en düşük düzeyde destekleyen bir karbonhidrat olduğu belirlenmiştir. Mannitolün bakteri kültürleri için genel olarak fakir bir karbon ve enerji kaynağı olduğunu gösteren çalışmalar [152] da bu sonuçları desteklemektedir. Ayrıca,

buradaki çalışmalar bir bakteri türünde L-asparaginaz sentezi veya biyokütle oluşturma için oldukça elverişli olarak belirlenen bir C-kaynağı başka bir bakteri için tamamen elverişsiz olabileceğini göstermiştir. İlginç olan bu durumun aynı bakterinin yabanıl tipi ile rekombinant suşları arasında da görülmesidir.

Glukoz, *E. aerogenes*'de enzim sentezini en yüksek düzeyde destekleyen C-kaynağı iken, aynı karbonhidrat bu bakterinin *vgb* ve *ansB* rekombinantlarında mannitolden sonra en elverişsiz karbon kaynağı olarak kaydedilmiştir. Daha da ilginç olan ise glukozla beraber bulunduğu bir ortamda genellikle tercih edilmeyen laktozun bile bu rekombinantlarda L-asparaginaz sentezi için glukozdan daha etkin bir C-kaynağı olarak belirlenmiş olmasıdır. Ancak, yabanıl tip *E. aerogenes*'de laktoz bu amaç için (L-asparaginaz sentezi) mannitolden sonra en uygun olmayan C-kaynağı görünümündedir. Bu bakteri ile yapılan çalışmalarda L-asparaginaz genini klonlamış olduğumuz suş (Ea[pB-PGA])'un hem gliserol ve laktoz ortamında yabanıl tipten ve *vgb* suşundan oldukça yüksek (2.2 kata kadar) L-asparaginaz seviyesine sahip olması bu yeni oluşturulan suşun daha ileri çalışmalar için potansiyelinin olabileceğini göstermektedir. Bu suşa *ansB* geninin komple operonunun yerleştirilmesinin bir sonucu olarak bu enzimin rekombinant bakteride doğal konakçısından daha çok ifade edilmesi beklenen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Glukozun yabanıl suştaki etkisi hariç, kültür ortamına salınan amonyak miktarı ile suşların L-asparaginaz seviyeleri arasında bir ilişki vardır. Her üç suş için de en düşük enzim seviyesinin kaydedildiği mannitol ortamı aynı zamanda en düşük düzeyde amonyak salınımının olduğu ortam olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan, genel olarak en yüksek enzim seviyelerinin açığa çıkmasını sağlayan gliserol ve laktoz ortamında, amonyak salınımının da en yüksek düzeyde olduğu kaydedilmiştir. Enzim üretimi ile ilgili tüm biyoproseslerde ortam hücre yoğunluğunun enzim sentezi ile doğru orantılı olduğu bilinmektedir [154]. Bu bağlamda, yine glukoz hariç, *E. aerogenes* ve rekombinantlarında en yüksek enzim seviyesinin en yüksek biyokütle oluşumunu destekleyen ortamlarda (ör. gliserol ve laktoz ortamlarında) olduğu saptanmıştır. Diğer bir ifadeyle, bu bakteri ve suşları için amonyak salınımının ve biyokütle oluşumunun en yüksek olduğu ortamda bakterilerin L-asparaginaz seviyelerinin de en yüksek düzeyde olduğu kaydedilmiştir. Glukoz bu enzimin üretiminde en yaygın kullanılan karbon kaynağı olmasına rağmen, özellikle bazı bakterilerde bu karbonhidratın yüksek bir katabolit inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir [7, 11, 13]. Ancak bunun tersinin rapor edildiği bir çalışmada glukozun *Serratia marcescens*'de L-asparaginaz sentezini arttırdığı bildirilmiştir [87]. Başka bir

çalışma da ise glukozla L-asparaginaz sentezinin glukozun kullanılan konsantrasyonu ile ilgili olduğu, yüksek konsantrasyonda glukozun (% 1) enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiği, düşük konsantrasyondaki (% 0.1) ise nispeten indükleyici bir etki yaptığı rapor edilmiştir [152]. Böyle bir etkinin nedeni glukozun yüksek konsantrasyonunda hücrelerin fermantasyon yapmasına ve böylece ortama asetat, format ve laktat gibi fermantasyon ürünleri salarak ortam pH'sını düşürmesine bağlanabilir. Tersine ortamdaki düşük konsantrasyondaki glukoz genel olarak bu kaynağın enerjistik amaçlar için tamamen oksidasyonuna ve dolayısı ile daha az fermentatif ürün oluşarak ortam pH'sının kararlı kalmasına ya da az da olsa artışını sağlayarak L-asparaginaz sentezine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Yüksek glukozlu ortamlarda L-asparaginaz sentezinin inhibisyonunun sadece glukozun katabolit represyonundan kaynaklanmadığı, aynı zamanda glukozun metabolizması sonucu ortam pH'sının düşmesinin dolaylı olarak enzim sentezini negatif etkilediği rapor edilmiştir [10]. Bu bağlamda *Enterobacter cloacae* ile yapılan bir çalışmada L-asparaginaz sentezinin ortam pH'sının düşmesiyle (pH<6.0) inhibe olduğu rapor edilmiştir. Tersine enzim sentezinin nötr veya alkali pH'lar da (pH 6.5-9.5) yüksek olduğu kaydedilmiştir [55]. Ortam pH değerinin 7.0'den daha düşük olmasının ortama salınan amonyağın iyonize (NH₄⁺) formda birikmesine ve böylece ortam pH değerinin daha da düşmesine neden olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar, ortam pH'sını düşüren iyonların L-asparaginaz sentezini inhibe ettiği sonuçlarıyla bağdaşmaktadır [53]. Çalışmamız boyunca ortam pH değerleri nadiren 7.0'nin altına düşmüştür. Buna bağlı olarak da bu ortamlarda düşük enzim seviyeleri gözlenmiştir.

E. aerogenes için tüm karbon kaynaklarında *vgb*⁺ suşunun diğer iki bakteri suşuna göre daha düşük enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada Vhb' nin *E. aerogenes* de bulunduğu L-Asparaginaz sentezini olumsuz etkilediği belirlenmiştir [11]. Bu sonuçlar ile çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar örtüşmektedir. Ea[pUC8:15]'in daha yüksek oksijen alım sistemine sahip olması, bu suşun *E. aerogenes*'den daha düşük L-asparaginaz sentezine sahip olmasına neden olabilir. Çünkü L-asparaginaz sentezi yüksek oksijen koşulları altında baskılanmaktadır [10]. Hem Vhb hem de L-asparaginaz'ın sentezinin düşük oksijenli şartlar altında global regülatör faktörler olan Fnr (fumarat nitrat redüksiyon) ve cAMP reseptör protein (CRP) aracılığı ile indüklendiği bilinmektedir [10, 81, 82]. Dolayısı ile bu 24 saat kültürlerinde indüklenmiş olan Vhb'in klonlanmış bakteride L-asparaginaz sentezini baskıladığı düşünülmektedir.

E. coli'de ve onun *ansB* klonlanmış suşunda (*E. coli*[pAHZ12]) C-kaynaklarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi *E. aerogenes*'den oldukça farklı olmuştur. Sonrakinde oldukça elverişli bir C-kaynağı olarak kaydedilen gliserol, *E. coli* ve *E. coli*[pAHZ12]'da L-asparaginaz sentezi için mannitole beraber en uygun olmayan C-kaynağı olarak belirlenmiştir. Ancak, düşük bir enzim seviyesi sağlaması ile beraber, rekombinantla konakçı hücre arasında L-asparaginaz seviyesindeki tek fark gliserolle olmuştur. Bu C-kaynağını içeren ortamda *E. coli*[pAHZ12] konakçı hücreden 2 kattan fazla enzim aktivitesi göstermiştir. Diğer üç ortamda ise konakçı ve rekombinant suşun enzim seviyeleri benzerlik göstermiştir. Her iki suşta en yüksek enzim seviyeleri ise laktozla sağlanmıştır. Her iki suşta da kısmi glukoz baskılaması görülmüştür. *E. coli*'de L-asparaginaz sentezi üzerine glukozun etkisinin çalışıldığı bir başka çalışmada [51], % 5'lik glukoz içeren büyüme ortamında enzim sentezinin hemen hemen tamamen baskılandığı saptanmış ve L-asparaginaz sentezini inhibe eden faktörlerin başında glukozun neden olduğu hücre içi cAMP seviyesindeki azalışa ve ortam asiditesindeki artışa bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Glukozun gösterdiği katabolit represyon aslında bu maddenin hücre içine taşınımı ile ilişkilendirilebilir. Bu şeker *E. coli* ve *E. aerogenes* bakterileri ve rekombinantlarında hücre içine, bir grup translokasyonu tipi taşınım örneği olan fosfotransferaz sistemi ile alınmaktadır. Bu sistem bir seri taşıyıcı protein ile fosfoenol pürivattan fosfat grubunun membrana kadar taşınıp glukoz molekülünün fosforillenerek hücre içine alınması prensibi ile çalışmaktadır. Bu sistemin son fosfat taşıyıcısı aynı zamanda hücre içinde ATP'den cAMP 'ın oluşumunu sağlayan adenilat siklaz enziminin de aktivatörüdür. Dolayısı ile hücre içine glukozun fosfotransferaz sistemi ile alındığı bakterilerde adenilat siklaz yeterince aktive edilemediği için hücre içi cAMP seviyesi düşmektedir. Bu durum cAMP ile regüle olan *ansB* promotorunun yeterince çalışmamasına ve dolayısıyla L-asparaginazın düşük oranında sentezlenmesine sebep olmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız *E. coli* ve *E. aerogenes* bakterileri, laktozun parçalanması ile oluşan glukozda ise herhangi bir katabolit baskılamaya maruz kalmamışlardır çünkü bu bakterilerde laktoz hücre içine aktif taşıma ile alınmaktadır. Bu şekilde madde alınımının ise adenilat siklaz enziminin aktivitesi ve dolayısı ile hücre içi cAMP seviyesine bir olumsuz etkisi olmamakta ve L-asparaginaz sentezini etkilememektedir. *P. aeruginosa*'da ise madde alınımında fosfotransferaz sistemi kullanılmadığı için bu tür bir durumdan söz edilemeyecektir.

C-kaynakları ile *E. aerogenes* ve rekombinantları için L-asparaginaz sentezi, biyokütle oluşumu ve kültür ortamına salınan amonyak miktarları arasındaki doğru ilişki mannitol hariç, *E. coli* ve *E. coli*[pAHZ12]'da gözlemlenmiştir.

P. aeruginosa ve onun *vgb* rekombinantı (PaJC) genel olarak tüm C-kaynakları ile diğer iki bakteri (*E. aerogenes* ve *E. coli*)'ye ve suşlarına göre daha yüksek L-asparaginaz aktivitesi göstermiştir. Bu fark özellikle PaJC için gliserol ortamında daha barizdir. Tüm bakteriler içinde en yüksek L-asparaginaz seviyesi bu suşta ve gliserolle kaydedilmiştir. Bu ortamda PaJC suşu konakçısından 2 kat diğer bakterilerden ise 6 kata varan yüksek enzim seviyeleri göstermiştir. Bu bağlamda bu bakterinin ve suşunun diğer bakterilere göre genel olarak daha yüksek biyokütle oluşturduğu belirlenmiştir. Diğer önemli bir fark ise *E. aerogenes* (Ea[pUC8:15])'de Vhb'nin L-asparaginaz sentezi üzerine gösterdiği baskılanmanın PaJC'da görülmemiş olması, aksine uygulanan tüm C-kaynakları ile bu suşun konakçısına göre daha yüksek enzim aktivitesi göstermiş olmasıdır. Yapılan bir çalışmaya göre [152] mannitollü besi ortamında *E. aerogenes* ve *P. aeruginosa* L-asparaginaz sentezlemeleri bakımından farklı seviyelerde etkilenmişlerdir. Yani enzim sentezi bakımından zayıf bir C-kaynağı olan mannitolden her iki bakterinin farklı derecelerde etkilendiği gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonucunda bu bakterilerde glukozun L-asparaginaz sentezi üzerine yapmış olduğu katabolit represyonun mannitolda görülmediği belirtilmiştir. Ayrıca mannitolün L-asparaginaz sentezi için zayıf bir karbon kaynağı olduğu ispatlanmıştır. Bu çalışma da yukarıdaki çalışmaya paralel bulgular elde edilmiş ve mannitolün kullanılan diğer tüm karbon kaynakları içinde enzim aktivitesi ve A₆₀₀ değerleri bakımından en zayıf karbon kaynağı olduğu tespit edilmiştir.

Çalışılmış olan üç bakteri türünün de gram-negatif ve yakın bakteriler olmalarına rağmen, aynı C-ortamındaki enzim regülasyonları arasındaki bu derece farklı olmalarının onların farklı metabolik özelliğe sahip olmaları ile açıklanabilir. *E. coli* ve *E. aerogenes* fakültatif anaerob olmalarına rağmen, birincisinin karışık asit fermantasyonu ikincisinin ise daha nötr ürünler olan bütandiol ve asetoin fermantasyonu yaptığı bilinmektedir. *P. aeruginosa* ise zorunlu aerob olup, yine kendine özgü metabolik aktiviteleri olan bir bakteridir. Dolayısı ile, bu üç bakteri metabolik aktivite açısından gram-negatif bakterilerin önemli bir kesimini etmektedir. Global regülatörler *E. aerogenes* ve *P. aeruginosa*'da farklı şekillerde düzenlenmektedir. *E. aerogenes* 'de Fnr ve *P. aeruginosa*'da Fnr'nin homoloğu olan Anr oksijenin sınırlı olduğu koşullarda aktiftirler. Fnr ve Anr kendi promotorları için

farklı bağlanma özgülüklerine sahip olmalarından dolayı *E. aerogenes* ve *P. aeruginosa*'da farklı seviyelerde L-asparaginaz sentezinin görüldüğü belirtilmektedir. [39, 86]. Bu çalışmadaki sonuçlar göstermiştir ki, bu farklılık sadece burada kullanılan üç bakteri türü ile sınırlı olmayıp, aynı türün farklı suşları (konakçı bakteri ile *ansB* veya *vgb* rekombinantları) arasında da L-asparaginaz seviyeleri arasında önemli farklar vardır. Dolayısı ile bir bakterinin yüksek L-asparaginaz sentezi için gerekli koşullar diğer bakteriye uygulanamayacağı gibi, bir bakterinin farklı suşları arasında da bu koşullar farklı olabilir. Dolayısı ile L-asparaginaz üretiminde her bakterinin veya suşunun yüksek enzim sentezi için ayrı ayrı ele alınıp ortam ve çevre koşullarının o bakteri veya suşa özgü biçimde optimize edilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür.

Amonyum klorür, asparagin, glutamin ve ürenin temel azot kaynağı olarak kullanıldığı çalışmalarda da karbon kaynakları ile yapılan çalışma sonuçlarına benzer olarak en yüksek L-asparaginaz seviyeleri üç bakteri türü arasında *P. aeruginosa*'da kaydedilmiştir. Özellikle bu bakterinin *vgb* suşu (PaJC) kendi konakçısı dâhil tüm bakteriler ve suşları arasında en yüksek enzim seviyesine sahip olanı olarak belirlenmiştir. *E. aerogens* ve bu bakterinin *vgb* suşu (Ea[pUC8:15]) genel olarak aynı N-kaynağı ortamında benzer L-asparaginaz aktiviteleri ölçülürken, *ansB* geni klonladığımız suşta özellikle asparagin ve glutamin ortamında kaydedilen enzim seviyeleri bu bakterinin diğer iki suşundan önemli derecede (4 kata varan oranda) yüksek kaydedilmiştir. Bu sonuç, karbon kaynaklarında da olduğu gibi yeni oluşturmuş olduğumuz bu *ansB* suşunun yüksek L-asparaginaz sentezi çalışmaları için umut verici olduğunu göstermektedir. *E. coli*'de en yüksek enzim seviyesi asparagin ile sağlanırken, bu bakterinin *ansB* rekombinantında (pAHZ12) bu üre ile sağlanmıştır. Bu suş bu ortamda *E. coli*'ye göre yaklaşık 2.7 kat daha fazla enzim aktivitesi göstermiştir. Tersine *E. coli*'de bu N-kaynağı (üre) amonyum klorür hariç en düşük enzim aktivitesine neden olmuştur. Bu suşta en yüksek L-asparaginaz aktivitesi L-asparagin bulunan ortamda gözlenmiştir. Üre içeren ortam her iki bakteride de benzer ve en yüksek biyokütle oluşumunu desteklerken, bunu ikinci sırada *E. coli* için asparagin, *ansB* klonu içinse glutamin sağlamıştır. Kullanılan N-kaynakları arasında her üç bakteri türünde de en düşük enzim düzeyi amonyum klorürle kaydedilmiştir. Bu sonuç, N-kaynakları arasında sadece amonyum klorürün inorganik bir N-kaynağı olması ile açıklanabilir. Diğer üç N- kaynağı (asparagin, glutamin ve üre) ise organik maddeler olup, azota ilaveten taşıdıkları karbon iskeleti ile hücrelerin karbon ihtiyaçları için de kullanılabilirler. Bu bağlamda en düşük düzeyde biyokütle oluşumu amonyum klorürü

içeren ortamda kaydedilmiş ve yine en düşük düzeyde ortam amonyak birikimi bu kültürlerde belirlenmiştir. Benzer çalışmalarda L-asparagin, L-glutamin ve L-glutamik asit gibi çözüner azot kaynağı olan amino asitlerin ve ürenin enzim sentezini uyarırken, amonyum bileşiklerinin enzim sentezini baskıladıkları rapor edilmiştir [17, 52]. Bulgularımıza paralelik gösteren bir başka çalışmada glukoz ve amonyum iyonlarının ortama eklenmesi ile L-asparaginaz üretiminin baskılandığı rapor edilmiştir [53]. Farklı C-kaynakları ile olduğu gibi, farklı N-kaynakları ile farklı bakterilerde ve hatta bir bakterinin farklı suşları arasında bile farklı sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir [7, 11, 13]. Dolayısı ile her bakteri türü ve hatta kullanılacak suş için uygun N-kaynaklarının belirlenmesi ve gerekirse alternatif alternatif karbon ve azot kaynakların araştırılması bu enzimin ticari anlamda üretilebilmesi için bir gerekliliktir. Örneğin, ilgili bir çalışmada *E. aereogenes*'de L-asparaginaz üretimi için en iyi karbon kaynağının sodyum sitrat, en iyi azot kaynağının ise diamonyum hidrojen fosfat olduğu rapor edilmiştir [7]. Çalışmamızda elde ettiğimiz ilginç bir sonuçta *E. aerogenes* ve *ansB* rekombinantında, ayrıca *P. aeruginosa*'nın rekombinant suşunda enzimin aktivitesi açısından, glutaminin asparaginden daha elverişli bir N-kaynağı görünümünde olmasıdır. Bu durum 1. bölümdeki şekil 1.6'daki reaksiyonla kolayca açıklanabilir. Asparagin, aspartat ve glutaminden oluşmaktadır. Ortamda glutamin olduğunda enzim önce hücre içindeki asparagini parçalayacak ve bu parçalanma ile oluşan aspartat ortamdaki glutaminden amino grubu transferi ile yeniden asparagini oluşturacaktır. Bu durum ortama sürekli substrat ilavesi olarak da düşünülebilir. Bu durum *E. coli*'nin *ansB* rekombinantında gözlenememiştir. *E. coli*'nin *ansB* rekombinantının taşıdığı vektör üzerindeki aspartaz geni, asparagin oluşumu ile açığa çıkan aspartatın fumarat ve amonyağa dönüşümünü katalizlediği için bu suşta glutamin varlığının asparagin oluşumu için bir avantaj oluşturmadığını düşünmekteyiz.

Burada çalışılmış olan bakterilerin çoğalması ve onların L-asparaginaz sentezi için endüstriyel atıkların uygun ortamlar olup olmadıkları vinas, melas, ZYFA ve PAS kullanılarak araştırılmıştır. C ve N-kaynakları ile elde edilmiş olan çalışmalarda olduğu gibi genel olarak en yüksek enzim aktivitesi üç bakteri türü içinde *P. aeruginosa*'da kaydedilmiştir. Özellikle bu bakterinin yabancıl tipi vinas ortamında bu çalışma boyunca elde edilen en yüksek L-asparaginaz seviyesi ($\approx 53 \mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein) ile kendini göstermiştir. Bu ortamda L-asparaginaz seviyesi diğer tüm ortamlarla karşılaştırıldığında, 2 ila 100 kata varan oranlarda yüksek bulunmuştur. Bu bakteri diğer atıklarda 5 katın üzerinde düşük aktivite göstermiştir. Toplam biyomas

üretiminin en yüksek olduğu ortam da vinas olarak kaydedilmiştir. Ancak, bu ortamda yabancı suş PaJC rekombinantından 3 katı daha fazla bir biyomas üretmiştir. Diğer üç ortamda ise biyokütle seviyesi benzer enzim seviyeleri ile orantılı olup vinası göre genel olarak 3 ila 13 kat arasında üzerinde daha düşük olmuştur. *E. aerogenes* ve bu bakterinin *vgb* (Ea[pUC8:15]) ve *ansB* (E.a [pB-PGA]) klonlanmış rekombinantlarında L-asparaginaz sentezine atıkların etkileri incelendiğinde en yüksek enzim aktivitesinin her üç bakteride de vinasda olduğu belirlenmiştir. Bağlantılı olarak ortama salınan amonyak seviyesi en yüksek vinas ortamında gözlenmiştir. Esasen, *ansB* geni taşıyan *E. coli* (pAHZ12) hariç, diğer tüm bakteri ve suşlarda da en yüksek enzim seviyeleri vinasla sağlanmıştır. pAHZ12 suşu diğer bakterilerde genel olarak bu amaç (L-asparaginaz sentezi) için en elverişsiz ortam olan PAS ortamında en yüksek enzim aktivitesini göstermiştir. Bu bağlamda ortam amonyak seviyesi en düşük (2-17 kata varan oranlarda) PAS'da gözlenmiştir. Kültürler genel olarak vinas ve ZYFA ortamında en yüksek biyokütlelere ulaşırken, enzim seviyesi ile biyokütle arasında C- ve N-destekli ortamlar gibi direkt bir ilişki görülmemiştir. ZYFA'nın sahip olduğu organik bileşenler ve toksik içeriği ile mikrobiyal üremeyi sınırlayıcı bir özelliğe sahip olduğu rapor edilmişse de [116], burada çalışılan organizmaların hepsinin bu atıkta oldukça iyi çoğalma sağladıkları saptanmıştır. Genel olarak en düşük enzim seviyelerinin (pAHZ12 hariç) tespit edildiği PAS ortamında tüm bakterilerin biyokütle oluşturma seviyeleri de oldukça düşük kalmıştır. Diğer atıklardan daha yüksek besin değeri ile bilinen PAS için bu beklenilmeyen bir sonuç olmuştur. Bu durum kullanılan ortamların inkübasyon boyunca ulaştıkları ortam asitliği ile ilgili olabilir. Çalışma boyunca başlangıç pH değeri 7.2'ye ayarlanmış atıklardan inkübasyon periyodu sonunda sadece PAS ortamında *E. aerogenes* ve rekombinantlarının kültür pH değerleri 6.0'nın altına inmiştir. Böyle düşük pH dereceleri de doğal olarak bakteri çoğalmasını ve enzim sentezini sınırlandırmış olabilir. PAS yapısında laktoz bulunduran bir maddedir. *E. aerogenes*'de laktozu metabolize ederken asit açığa çıkarır [152]. Dolayısı ile bu ortamdaki pH düşüşü bununla ilişkilendirilebilir. En yüksek enzim aktivitesinin görüldüğü vinas ise yoğun organik yüke sahiptir ve melasın fermantasyon ürünüdür. Kültür periyodu sonunda genel olarak başlangıç pH (7.2) değerine göre nispeten artış görülen ortam pH'ları L-asparaginaz sentezini destekleyen aralıklarda (8.0-8.5) olmuştur. Birçok çalışmada L-asparaginaz sentezinin nötral ve alkali ortamlarda indüklendiği (pH 7.0-8.6) rapor edilmiştir [2]. L-Asparaginaz aktivitesi üzerine çeşitli divalent metal katyonlarının etkileri üzerine yapılan çalışmalarda mangan ve çinkonun

bütün konsantrasyonları enzimi tamamen inhibe ederken, bakırın sadece yüksek konsantrasyonlarda enzimin sentezini baskıladığı saptanmıştır [55, 56]. Demir, kobalt, magnezyum ve nikelin ise düşük konsantrasyonlarda enzim aktivitesini arttırdıkları, yüksek konsantrasyonlarda ise inhibe ettikleri belirlenmiştir [57]. Bu çalışmada kullanılmış olduğumuz atıklar bu elementler bakımından karşılaştırıldığında birçok çalışmada farklı konsantrasyonların rapor edildiği görülmektedir. Bu durum bu atıkların üretildiği endüstriyel komplekslerin farklı çalışma özelliklerinin bir sonucu olabilir. Kullanılmış olan endüstriyel atıkların elementel analizi bu çalışmada yapılmadığından, L-asparaginaz sentezi ve biyokütle oluşumunun ortamlarda bulunan metal katyonları ile ilişkisinin muhtemel açıklaması başka bir çalışmanın konusudur.

Özellikle yüksek biyokütle oluşumunun sağlanması arzu edilen biyoproseslerde yaygın olarak zengin besi ortamları kullanılır. Çalışmada bu ortamlardan olan Lauria Broth (LB), Terrific Broth (TB) ve SOB ortamlarının L-asparaginaz sentezi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu zengin besi ortamlarındaki en dikkat çekici nokta L-asparaginaz sentezinin bundan önceki değişik C- ve N-kaynaklı minimal ortamlara göre 10 katlara varan büyüklüklerde artış göstermiş olmasıdır. Ayrıca, biyokütle oluşumu ve amonyak salınımı da bu ortamlarda daha yüksek düzeylerde gerçekleşmiştir. Bakterilerin genelinde hem biyokütle değerlerinin hem de L-asparaginaz seviyesinin TB ortamında belirgin şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu besiyerinin hem yüksek besinsel içeriğe hem de ortam pH'sını dengede tutabilen tamponlayıcı bileşiklere sahip olması nedeniyle bu sonuçlar şaşırtıcı değildir. Benzer bir çalışmada TB ortamında kültürü yapılan *E. coli*'nin LB besiyerine göre yaklaşık 4 kat daha fazla L-asparaginaz aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir [154].

L-asparaginaz sentezinin ortam pH ve sıcaklığı başta olmak üzere çeşitli fiziksel şartlardan etkilendiği bilinmektedir. Çalışma boyunca kullanılan standart ortam pH (7.2) ve sıcaklık (37 °C) derecelerinde yüksek L-asparaginaz aktivitesi, yüksek biyokütle oluşumu, yüksek amonyak salınımı ve nispeten daha az ortam pH değişimi TB ortamında görülmüştür. Bu nedenle bu ortamdaki kültürlerin standart pH (7.2) ve sıcaklık (37 °C) derecelerinin altındaki ve üzerindeki koşullarda nasıl etkilendiği de araştırılmıştır. *E. aerogenes* ve bu bakterinin tarafımızdan oluşturulan *ansB* geni klonlanmış suşunda pH 5.0'dan pH 8.0'e doğru enzim sentezinde kademeli bir yükseliş gözlenmiştir. En düşük enzim aktivitesinin görüldüğü pH 5.0 ile en yüksek enzim sentezinin kaydedildiği pH 8.0 arasında 4 katın üzerinde fark görülmüştür. Bu bakterinin *Vitreoscilla* hemoglobini sentezleyen suşunda ise, diğer iki suşa göre 10 kata

varan daha düşük enzim seviyelerinin ortam pH farklılığından etkilenmediği belirlenmiştir. Ortam pH farkının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi *P. aeruginosa* ve onun *vgb* rekombinantında (PaJC) oldukça farklı olmuştur. PaJC suşu tüm pH aralıklarında konakçı hücreye göre önemli oranda yüksek enzim aktivitesi göstermiştir. Benzer biçimde *E. coli* ve onun *ansB* rekombinantı olan pAHZ12’de de ortam pH’sının L-asparaginaz sentezi üzerine etkisi oldukça farklı bulunmuştur. Yabani tip bakteride en yüksek enzim aktivitesi pH 8.0 de görülürken, benzer seviyedeki enzim aktivitesi pAHZ12 suşu için pH 7.0 de belirlenmiştir. Ortam sıcaklığı bakımından da bakteriler arasında L-asparaginaz seviyeleri bakımından farklılık olduğu gibi, bir bakteri ile rekombinantları arasında da önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir. *E. aerogenes* ve rekombinantlarında L-asparaginaz sentezi üzerine sıcaklığının etkisine bakıldığında *vgb* taşıyan suşun tüm çalışılan sıcaklıklarda benzer ve diğer iki suşa göre 3-10 kat arasında düşük enzim aktivitesi gösterdiği kaydedilmiştir. Bu bakteri ve *E. coli* ve bunların rekombinantlarında genel olarak en düşük enzim seviyeleri en düşük sıcaklıkta (25 °C) kaydedilmiştir. Tersine *P. aeruginosa* ve bu bakterinin *vgb* rekombinantında en yüksek L-asparaginaz sentezi 30 °C’deki kültürlerde belirlenmiştir. Bu sonuçların bakterilerin doğal yaşama alanlarından kaynaklandığı düşünülebilir. Çalışmamızda kullanılan bakterilerin mezofilik oldukları yani 20-40 °C arasındaki sıcaklıklara uyumlu oldukları zaten bilinmektedir. Bu aralıklardaki sıcaklıklarda yaşayan bu mikroorganizmaların optimum üreme noktalarının birbirinden farklı olması beklenen bir durumdur. Dolayısı ile en yüksek enzim aktivitesi gösterdikleri sıcaklık derecelerinin farklı olması da normal karşılanabilir.

Bakterilerden izole edilen ekstrakt ortamındaki L-asparaginazın farklı ortam reaksiyon ısısı ve reaksiyon pH’sından nasıl etkilendiğinin araştırılması enzimin katalitik aktivitesinin pH artışı ile orantılı biçimde arttığını ve enzim en yüksek katalitik aktiviteye pH 8.6’da ulaştığını göstermektedir. Daha bazı pH’larda ise enzim aktivitesi düşmekte ve düşük pH’lı reaksiyon ortamlarına benzer bir seyir izlemektedir. Bu sonuç, bu yönde rapor edilmiş bir çok çalışma ile benzerlik göstermektedir. Enzimin katalitik aktivitesinin ise 37 °C reaksiyon ortamında en yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sıcaklığın altındaki ve üzerindeki sıcaklıklarda enzimin katalitik aktivitesinde önemli düşüş görülmüştür. Farklı organizmalarla yapılan bu tür çalışmalarda farklı bakterilerden gelen L-asparaginazların katalitik aktivitesi için farklı sıcaklık ve pH dereceleri rapor edilmiştir [2, 46].

Atmosferik içeriğin (oksijenin) L-asparaginaz sentezi üzerine olan etkisi konusunda da farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Bazı bakterilerde iyi bir havalandırmanın L-asparaginaz sentezini indüklediği [7], diğerlerinde ise baskıladığı bildirilmiştir [11, 14]. Çalışmamızda özellikle kültürlerin erken logaritmik fazda *Vitreoscilla* hemoglobini ile daha yüksek bir oksijen alımı gerçekleştirdikleri kaydedilmiştir. Ayrıca, tüm bakterilerde genel olarak rekombinant hücrelerin konakçılarına göre daha fazla (3-10 kat) oksijen tükettikleri görülmüştür. Bu durum, bakterilere plazmid tarafından yüklenmiş olan ekstra metabolik yük ile ilgili olabilir. *E. coli*'de enzim sentezinin anaerobiosis ile yüksek aerobik koşullara göre 100 ile 1000 kat kadar fazla olduğu rapor edilirken [14], aynı bakteri ile yapılan bir başka çalışmada artan çözünmüş oksijen seviyesine paralel olarak L-asparaginaz sentezinin de arttığı gösterilmiştir [54]. Bu çalışma sonuçları, aktarılmış olduğu hücrelere etkin bir oksijen alım yeteneği kazandıran *Vitreoscilla* hemoglobininin *E. aerogenes*'de L-asparaginaz sentezini neredeyse tamamen inhibe ettiğini, *P. aeruginosa*'da ise indüklediğini göstermektedir. Dolayısı ile bu iki bakteride L-asparaginaz sentezi için gereksinim duyulan oksijen miktarları farklı olmalıdır. VHB ile sağlanan oksijen birinci bakteride enzim sentezi için bir dezavantaj yaratıp enzim sentezini baskımlarken, ikinci bakteride bu sistemle sağlanan oksijen daha yüksek bir L-asparaginaz sentezini desteklemektedir. Katabolit represyon altındaki *E. aerogenes* ve *P. aeruginosa*'da L-asparaginaz sentezinin farklı şekillerde regüle edilmesi, bu iki bakteride karbon akışının regülasyonunun ve indükleyici kontrolün farklı olmasından kaynaklanabilir. Çünkü bu bakteriler glukoz metabolizması için alternatif glikolitik yolları kullanırlar. *E. aerogenes* glukozu, Embden-Meyerhof-Parnas yolunu kullanarak metabolize eder. Bu metabolik yol sonunda format, asetat, laktat gibi asitler ve asetoin, bütandiol gibi fermantasyon ürünleri oluşur. *P. aeruginosa* ise daha çok Entner-Doudoroff yolunu kullanarak glukozu nötr bir ürün olan glukonata dönüştürür.

Bilindiği gibi hem VHB hem de L-asparaginaz de oksijenin sınırlı olduğu koşullar altında daha çok sentezlenirken, tamamen oksijensiz koşullarda bu sentez durmaktadır. *E. aerogenes* ve *P. aeruginosa*'nın bu enzimi sentezleyebilmeleri için kritik seviyede bir oksijene gereksinim duydukları yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır [86]. Çünkü bu koşullarda, bu proteinlerin genlerini (*vgb* ve *ansB*) regüle eden global regülatör faktörler olan FNR ve cAMP reseptör protein (CRP) indüklenmektedir. Bu global regülatörler *E. aerogenes* ve *P. aeruginosa*'da farklı şekillerde opere edilmektedir. *E. aerogenes*'de FNR ve *P. aeruginosa*'da FNR'nin homoloğu olan ANR

oksijenin sınırlı olduğu koşullarda aktif hale geçen (pozitif) transkripsiyon regülatörleridir. FNR ve ANR'nin kendi promotorları için farklı bağlanma özgülüklerine sahip olmalarından dolayı *E. aerogenes* ve *P. aeruginosa*'da farklı seviyelerde L-asparaginaz sentezinin görüldüğü belirtilmektedir [39, 86]. Farklı havalandırma ve çalkalama koşullarında en yüksek enzim aktivitesinin düşük havalandırma ve çalkalama koşullarında olduğu görülmüştür [152]. Diğer bir çalışmada ise *E. aerogenes*'de çözünmüş oksijen seviyesinin L-asparaginaz sentezi için sınırlayıcı bir faktör olduğu ve çözünmüş oksijenin varlığında L-asparaginaz sentezinin önemli derecede arttığı bildirilmiştir [10].

Bütün bu sonuçlardan yola çıkarak L-asparaginaz sentezleyen çeşitli bakterilerin biyokimyasal karakteristiklerinin oldukça farklı olmasının, onların aynı ortamlarda farklı L-asparaginaz sentezlemelerine neden olduğu düşünülmektedir. Dolayısı ile bir bakteri için geçerli optimum enzim sentez koşullarının (kimyasal veya fiziksel) ona oldukça yakın olan diğer bir bakteriye uygulanamayabileceği görülmüştür. Buradaki çalışmada bu şartların sadece farklı bakterilerde farklı enzim seviyelerin ortaya çıkmasını sağlamadığı, aynı zamanda bir bakterinin farklı suşlarında bile aynı ortam koşullarında oldukça farklı L-asparaginaz seviyelerine neden olduğu belirlenmiştir. Dolayısı ile bu enzimin sentezi veya üretimi çalışmalarında, optimal koşulların belirlenmesi her bakteri ve hatta her rekombinant için ayrı ayrı yapılmalıdır. Bu çalışmada oluşturulmuş olan *E. aerogenes*'in *ansB* geni taşıyan suşu (Ea[pB-PGA]) başta olmak üzere, kullanılan diğer *vgb* ve *ansB* rekombinantlarının konakçalarına göre çeşitli ortamlarda oldukça yüksek miktarda L-asparaginaz sentezi yapmalarının bu enzimin sentezi ve üretimi çalışmaları için umut verdiği ifade edilebilir.

6 KAYNAKLAR

- [1] J. Kurtzberg, B. Asselin and D. Poplack *Antibodies to asparaginase alter Pharmacokinetics and decrease enzyme activity in patients on asparaginase therapy. Proceed. Am. Assoc. Cancer Res.*; 34(1993)304.
- [2] A.L. Stecher, de Deus PM, I. Polikarpov and J. Abrahao-Neto, *Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment, Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 74(1999)1–9.
- [3] M. Duval, S. Suciuc and A. Ferster , *Comparison of Escherichia coli-asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies, Blood*, 99(2002) 2734-2739.
- [4] J. Ottena, N. Philippeb, S. Suciuc, C. Be' hard, A. Babin-Boilletote, A. Thyssf, A. Fersterg and E. Vilmerh, *on behalf of the EORTC Children Leukemia Group The Children Leukemia Group: 30 years of research and achievement, Eur.Journal of Cancer*, 38 (2002) S44–S49
- [5] C. Lanvers, J. P. V. Pinheiro, G. Hempel, G. Wuerthwein, and J. Boos, *Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum, Analytical Biochemistry* 309 (2002) 117–126
- [6] W.R Barnes, G.L. Dorn and G.R. Vela, *Effect of culture conditions on synthesis of L-asparaginase by Escherichia coli A-1, Appl. Environ. Microbiol.*, 33(1977) 257-61.
- [7] D.Z. Wei and H. Liu, *Promotion of L-asparaginase production by using n-dodecane. Biotechnol. Tech.*, 12(1998) 129–131.
- [8] B. Heinemann and A. J. Howard, *Production of tumor-inhibitory Lasparaginase by submerged growth of Serratia marscences, Appl. Microbiol.*, 18 (1969) 550–554.
- [9] J.W. Boyd and Arthur W. Phillips, *Purification and Properties of L-Asparaginase from Serratia marcescens, J Bacteriol.*, 106(2):(1971)578-587

- [10] J. Mukherjee, S. Majumdar and T. Scheper, *Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by Enterobacter aerogenes*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 53 (2000) 180-184.
- [11] H. Geckil, S. Gencer, *Production of L-asparaginase in Enterobacter aerogenes expressing Vitreoscilla hemoglobin for efficient oxygen uptake*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 63 (2004) 691–697.
- [12] Y.R. Abdel-Fattah and Z.A. Olama, *L-asparaginase production by culture conditions Pseudomonas aeruginosa in solid-state culture: evaluation and optimization of using factorial designs*, **Process Biochem.**, 38(2002) 115–122.
- [13] H. Geckil, S.Gencer and 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. Micro. Technol.**, 35 (2004)182-189.
- [14] H. Cedar and J.H. Schwartz, *Production of L-Asparaginase II by Escherichia coli*, **J. Bacteriol.**, 96(1968) 2043-2048.
- [15] G.A. Kotzia and N.E. Labrou, *L-Asparaginase from Erwinia Chrysanthemi 3937: Cloning, expression and characterization*, **J. Biotechnol.**, 127(2007) 657-669.
- [16] G.A. Kotzia and N.E. Labrou, *Cloning, expression and characterisation of Erwinia carotovora l-asparaginase*, **J. Biotechnol.**, 119(2005) 309-323.
- [17] K.J. Golden and R.W. Bernlohr, *Nitrogen Catabolite Repression of the L-Asparaginase of Bacillus licheniformis*, **J. Bacteriol.**, 164(1985) 938-940.
- [18] A. Sonawane, U. Klöppner, Christian Derst, Klaus-Heinrich Röhm, *Utilization of acidic amino acids and their amides by pseudomonads: role of periplasmic glutaminase-asparaginase*, *Archives of Microbiology*, 179:3(2003)151-159
- [19] S. Iuchi and E.C.C Lin, *Adaptation of Escherichia coli to respiratory conditions: regulation of gene expression*. **Cell**, 66(1991) 5-7.
- [20] T. Koskenkorva, A.D. Frey and P.T. Kallio, *Characterization of heterologous hemoglobin and flavohemoglobin promoter regulation in Escherichia coli*, **J. Biotechnol.**,122 (2006) 161–175.
- [21] A.D. Resnick and B.Magasanik, *L-Asparaginase of Klebsiella aerogenes: activation of its synthesis by glutamine synthetase*, **J. Biol. Chem.**, 251(1976) 2722–2728.

- [22] L.H. Sobin and J. G. A Kidd, *Metabolic Difference Between Two Lines of Lymphoma 6C3HED Cell in Relation to Asparagine*. **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.**, 119(1965)325-327,.
- [23] D. Borek and M. Jaskólski, *Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity*, **Acta Biochimica Polonica**, 48(2001) 893-902.
- [24] J. Broome, *Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects*, **Nature**, 191(1961)1114–1115.
- [25] J. Broome, *L-asparaginase: discovery and development as a tumor-inhibitory agent*.**Cancer Treat Rep**; 65(1981)111-114.
- [26] C. P. Cornea, I. Lupescu, I. Vatafu, V.G.Savoiu and GH. Campeanu, *Isolation and Characterization of Some L-Asparaginase Producing Recombinant Escherichia coli Strains*, **Roum Biotechnol. Lett.**, 5(2000) 471-478.
- [27] J.C. Jr. Wriston and T.O.Yellin, *L-asparaginase: a review*. **Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.** 39(1973)185-248.
- [28] R.C.Willis and C.A.Woolpolk, *Asparagine Utilization in Escherichia coli*, **J. Bacteriol.**, 118(1974) 231-241.
- [29] H. Geckil, B. Ateş, S.Gencer, M.Uckun and İ. Yılmaz, *Membrane permeabilization of gram-negative bacteria with a potassium phosphate/hexane aqueous phase system for the release of L-asparaginase: an enzyme used in cancer therapy*, **Process Biochem.**, 40(2) (2005) 573-579.
- [30] H.M. Treshalina, E.V. Lukasheva, L.A. Sedakova, G.A. Firsova, G.K. Guerassimova, N.V. Gogichaeva, and Temir T. Berezov, *Anticancer Enzyme L-Lysine α -Oxidase*, **Appl. Biochem. Biotechn.**, 88 (2000) 267-273.
- [31] E. V. Lukasheva and T. T. Berezov, *L-Lysine α -Oxidase: Physicochemical and Biological Properties*, **Biochem.** ,67 (2002) 1394-1402.
- [32] B.Dias and B.Weimer, *Purification and Characterization of L-Methionine g-Lyase from Brevibacterium linens*, **Appl. Environ.Microbiol.**, 64 (1998)3327–3331.
- [33] Y. Tan, M. Xu, X. Tan, X.. Wang, Y. Saikawa,T. Nagahama, X.. Sun, M. Lenz, and R. M. Hoffman, *Overexpression And Large-Scale Production Of Recombinant L-Methionine-A-Deamin-mercaptomethane-Lyase For Novel Anticancer Therapy*, **Protein Express. Purif.** 9 (1997) 233–245.
- [34] I. V. Manukhov, D.V. Mamaeva, S.M. Rastorguev, N.G. Faleev, E. A. Morozova, T. V. Demidkina, and G. B. Zavilgelsky. *A Gene Encoding L-Methionine α -Lyase*

- Is Present in Enterobacteriaceae Family Genomes: Identification and Characterization of Citrobacter freundii L-Methionine γ -Lyase.* **J. Bacteriol.**, 187(2005) 3889–3893.
- [35] M. Tokoro, T. Asai, S. Kobayashi, T. Takeuchi and T. Nozaki, *Identification And Characterization Of Two Isoenzymes Of Methionine-Lyase From Entamoeba Histolytica* **The J. Biol. Chem.**, 278(2003) 42717– 42727.
- [36] I.V. Manukhov , D. V. Mamaeva, E. A. Morozova, S. M. Rastorguev, N. G. Faleev, T. V. Demidkina, and G. B. Zavlilgelsky *L-Methionine γ -Lyase from Citrobacter freundii: Cloning of the Gene and Kinetic Parameters of the Enzyme,* **Biochem.**,71: (4) (2006) 361-391.
- [37] C. M. Ensor, Frederick W. Holtsberg, John S. Bomalaski and Mike A. Clark, *Pegylated Arginine Deiminase (Adi-Ss Peg20,000 Mw) Inhibits Human Melanomas And Hepatocellular Carcinomas In Vitro and In Vivo,* **Cancer Research** 62(2002) 5443–5450.
- [38] K. Beloussow, L. Wang, J.Wu, D. Ann and W. Shen, *Recombinant arginine deiminase as a etkinial anti-angiogenic agent ,* **Can. Letters** 183(2002) 155–162.
- [39] H.V. Winteler and D. Haas, *The homologous regulators ANR of Pseudomonas aeruginosa and FNR of Escherichia coli have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters ,* **Microbiology**, 142(1996) 685-693.
- [40] T. Ueno, K. Ohtawa, K. Mitsui, Y. Kodera, M. Hiroto, A. Matsushima, Y. Inada and H. Nishimura, *Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase,* **Leukemia**, 11(1997)1858-61.
- [41] V.I. Avramis and R. Kwock, *Synergistic antiviral effect of PEG-asparaginase (Oncaspar), with protease inhibitor alone and in combinationwith RT inhibitors against HIV-1 infected T-cells: a model of HIV-1-induced T-cell lymphoma,* **In Vivo** 15(2001)1-9.
- [42] Leather H, Lynch J, and Reddy S, Hematology/Oncology Handbook.
- [43] <http://www.cancer.org>
- [44] U. K. Narta, S. S. Kanwar and W. Azmi, *Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginas the treatment of leukemia,* **Crit Rev Oncol Hematol.**, 61:3(2006):208-221.

- [45] S. Akarsu, E. Yılmaz, A.D. Aygün ve S. Gözdaşoğlu, *Akut lenfoblastik lösemili çocuklarda L-asparajinaz tedavisi ve komplikasyonları*, **Türk Pediatri Arşivi** 39(2004) 162- 70.
- [46] L.D. Cripe, *Adult acute leukemia* , **Curr. Prob. Cancer**, 21(1997) 1-64.
- [47] P. Metrokos, L. Rosenberg and W.P.Dugoid, *Friend Prophlactic sandostatin etkiniates acute pancreatitis*, **Surg. Forum**, 41(1990)160-161.
- [48] B. Asselin , R. Gelber and S. Sallan, *Relative Toxicity of E. coli Asparaginase and PEGasparaginase in Newly Diagnosed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia* , **Med.Pediatr. Oncol.**,21(1993) 556.
- [49] J.L. Ettinger, A.G. Ettinger, V.I.Avrakis and P.S.Gaynon, *Acute Lymphoblastic Leukemia a guide to Asparaginase and PEGasparaginase therapy*, **BioDrugs**, 7(1997) 30-39.
- [50] www.turkkanservakfi.org.tr
- [51] M.M. Garaev and E.I. Golub, *Mechanism of action of glucose on L-asparajinase synthesis by Escherichia coli bacteria*, **Mikrobiol.**, 46 (1977) 433-9.
- [52] L. Kang, M.L. Keller, P.C. Dunlop and R.J. Roon, *Nitrogen catabolite Repression in a Glutamate Auxotroph of Saccharomyces cerevisiae*, **J. Bacteriol.**, 151 (1982) 29-35.
- [53] T. Tosa, R. Sano, K. Yamamoto, M. Nakamura, K. Ando and I. Chibata, *L-Asparajinase from Proteus vulgaris*, **Appl. Microbiol.**, 22 (1971) 387-392.
- [54] J. Roberts, G. Burson and J. M. Hil, *New Procedures for Purification of L-Asparajinase with High Yield from Escherichia coli*, **J. Bacteriol.**, 95(1968) 2117-2123.
- [55] M.S. Nawaz, D. Zhang, A.A. Khan and C.E. Cerniglia, *Isolation and characterization of Enterobacter cloacae capable of metabolizing asparajine*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 50:(1998) 568-572.
- [56] M.S. Nawaz, A.A. Khan, J.E. Seng, J.E. Leakey, P.H. Siitonen and C.E. Cerniglia, *Purification and characterization of an amidase from an acrylamide-degrading Rhodococcus sp.*, **Appl. Environ.Microbiol.** 60(1994) 3343-3348.
- [57] M. Dixon and E.C. Webb, *Enzyme inhibitors*. **Enzymes**, London, (1964) 365-393.
- [58] www.all-drugs.online.com

- [59] A. Hüser, U. Kloppner, and K.H. Röhm, *Cloning, sequence analysis, and expression of ansB from Pseudomonas fluorescens, encoding periplasmic glutaminase/asparaginase*, **FEMS Microbiology Letters**, 178(1999) 327-335.
- [60] H.Z. Alesandra, O.O. Leobardo, G. Dupond, S.D. Vargas, A. Loret, H. Merchant and J. Caldero, *Isolation and Characterization of Rhizobium etli Mutants Altered in Degradation of Asparagine*, **J. Bacteriology**, 179 (1997) 2068-2072.
- [61] S. Wakabayashi, H. Matsubara and D.A. Webster, *Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from Vitreoscilla*, **Nature**, 322(1986) 481-483.
- [62] C.R. Woese, W.G. Weisburg, B.J. Paster, C.M. Hahn, R.S. Tanner, N.R. Kreig, H.P. Koops, H. Harms and E. Stackebrandt, *The phylogeny of purple bacteria: the beta sub division*. **System. Appl. Microbiol.**, 5: (1984). 327-336.
- [63] A.D. Frey and P.T. Kallio, *Bacterial hemoglobins and Favohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology*, **FEMS Microbiology Reviews** 789 (2003).
- [64] L. Bülow, N. Holmberg, G. Lilius and J.E. Bailey, *The metabolic effects of native and transgenic hemoglobins on plants*. **Trends Biotechnol.**, 17(1999)21-24.
- [65] R.E Weber and S.N. Vinogradov, *Nonvertebrate hemoglobins: Functions and molecular applications*, **Physiological Reviews**, 81(2001)569-611.
- [66] 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.
- [67] K.L. Dikshit, D. Spaulding, A. Braun and D.A. Webster, *Oxygen inhibition of globin gene transcription and bacterial hemoglobin synthesis in Vitreoscilla*. **J. Gen. Microbiol.**, 135:(1989) 2601-2610.
- [68] S.K. Magnolo, D.L. Leenutaphong, J.A. De Modena, J.E. Curtis, J.E. Bailey, J.L. Galazzo and D.E. Hughes, *Actinorhodin production by Streptomyces coelicolor and growth of Streptomyces lividans are improved by the expression of a bacterial hemoglobin*, **Biotechnology (NY)**, 5(1991) 473-476.
- [69] N. Holmberg, G. Lilius, J.E. Bailey and L. Bulow, *Transgenic tobacco expressing Vitreoscilla hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production*, **Nat. Biotechnol.**, 3(1997) 244-247.
- [70] J. Farres and P.T. Kallio, *Improved cell growth in tobacco suspension cultures expressing Vitreoscilla hemoglobindagger*. **Biotechnol. Prog.**, 2 (2002) 229-233.

- [71] K.W. Park, K.J. Kim, A.J. Howard, B.C. Stark and D.A. Webster, *Vitreoscilla Hemoglobin Binds to Subunit I of Cytochrome bo Ubiquinol Oxidases*, **J. Biol. Chem.**, 277(2002)33334-33337.
- [72] V. Roos, C.I.J. Andersson and L Bülow, *Gene expression profiling of Escherichia coli expressing double Vitreoscilla hemoglobin*, **J. Biotechnol.**, 114(2004)107–120.
- [73] H. Geckil, Z. Barak , D.M. Chipman, S.O. Erenler, D.A. Webster and B.C. Stark, *Enhanced production of acetoin and butanediol in recombinant Enterobacter aerogenes carrying Vitreoscilla hemoglobin gene*, **Biopro. Biosys. Engineering**, 26 : (5) (2004)325-330.
- [74] R. Hardison, *Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different of patterns of gene expression*, **J.Exp. Biol.**, 201(1998) 1099-1117.
- [75] E.J.H. Ross “Plant nonsymbiotic hemoglobins: hexacoordinated hemoglobins involved in hormonally-regulated cell differentiation”. PhD thesis, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska. (2002).
- [76] A. Noyan, Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, Fizyoloji Ders Kitabı
- [77] M. Bolognesi, D. Bordo, M. Rizzi, C. Tarricone, P. Ascenzi, *Nonvertebrate Hemoglobin: structural bases for reactivity*, **Prog. Biophys. Molec.Biol.**, 68:(1997).
- [78] J.L. Gould, Olağandışı yaşamlar, TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, Ankara (1999)61-74.
- [79] S.Aydın, N.Kılıç *Bakteriyel Hemoglobin, Vitreoscilla Hemoglobin. Türk Biyokimya Dergisi* (2000) cilt: 25, sayı: 4.
- [80] S. N. Vinogradov, D. Hoogewijs, X. Bailly, R. Arrendondo-Peter, M.. Guertin, J. Gough, S. Dewilde, L. Moensand and J. R.. Vanfleteren, *Three globin lineages belonging to two structural classes in genomes from the three kingdoms of life*, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102 : (32) (2005)11385-11389.
- [81] R.L Boerman and D.A. Webster, *Control of heme content in Vitreoscilla by oxygen*, **J. G. Appl. Microbiol.**, 28(1982) 35-43.
- [82] C.D. Georgiou and D.A. Webster, *Identification of b,c, and d cytochromes in the membrane of Vitreoscilla*, **Arch. Microbiology**, 148:(1987) 328-333.
- [83] C. Khosla and J.E. Bailey, *Evidence for partial export of Vitreoscilla hemoglobin into the periplasmic space in E. coli*, **J. Mol. Biology**, 210:(1989) 79-89.

- [84] L. Kang, M.L. Keller, P.C. Dunlop and R.J. Roon, *Nitrogen catabolite Repression in a Glutamate Auxotroph of Saccharomyces cerevisiae*, **J. Bacteriol.**, 151:(1982)29-35.
- [85] H. Geckil, B.C. Stark and D.A. Webster, *Cell growth and oxygen uptake of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa are differently effected by the genetically engineered Vitreoscilla hemoglobin gene*, **J. Biotechnol.**, 85(2001) 57-66.
- [86] 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.
- [87] M.L. Wei , D.A. Webster and B.C. Stark., *Genetic engineering of Serratia marcescens with bacterial hemoglobin gene: effects on growth, oxygen utilization, and cell size*, **Biotechnol Bioeng.**, 57(1998) 477-483.
- [88] S.C. Liu , D.A. Webster and B.C. Stark., *Cloning and expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene in pseudomonads: Effects on cell growth*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 44(1995) 419-424.
- [89] J.A. De Modena, S. Gutierrez, J.Velasco, F.J. Fernandez, R.A. Fachini, J.L. Galazzo, D.E. Hughes and J.F. Martin, *The production of cephalosporin C by Acremonium chrysogenum is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin*. **Bio-Technology** 11(1993) 926-929.
- [90] P.T. Kallio and J.E. Bailey, *Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin (VHb) enhances total protein secretion and improves the production of K-amylase and neutral protease in Bacillus subtilis*. **Biotechnol. Prog.**, 12(1996) 31-39.
- [91] M.A. Nasr, K.W. Hwang, M. Akbas, D.A Webster. and B.C. Stark, *Effects of culture conditions on enhancement of 2,4- dinitrotoluene degradation by Burkholderia engineered with the Vitreoscilla hemoglobin gene*. **Biotechnol. Prog.**, 17(2001) 359-361.
- [92] G.J. Pendse and J.E. Bailey, *Effect of Vitreoscilla hemoglobin expression on growth and specific tissue plasminogen activator productivity in recombinant Chinese hamster ovary cell*, **Biotechnol. Bioeng.**, 44 (1994) 1367-1370.
- [93] M. Nilsson, P.T. Kallio, J.E. Bailey, L.Bülow and K.G. Wahlund, *Expression of Vitreoscilla hemoglobin in Escherichia coli enhances ribosome and tRNA levels : A flow feld-flow fractionation study*. **Biotechnol. Prog.**, 15(1999) 158-163.

- [94] F.C. Sander, R.A. Fachini, D.E. Hughes, J.L. Galazzo and J.E. Bailey, *Expression of Vitreoscilla hemoglobin in Corynebacterium glutamicum increases final concentration and yield of lysine*. **Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology**, (1994) 607-610.
- [95] M. Khosravi , D.A. Webster and B.C. Stark , *Presence of the bacterial hemoglobin gene improves alpha-amylase production of a recombinant Escherichia coli strain*, **Plasmid** 24:(1990) 190-194.
- [96] Y.J. Chung, K.S. Kim, E.S. Jeon, K.I. Park and C.U. Park, *Effects of the Vitreoscilla hemoglobin gene on the expression of the ferritin gene in Escherichia coli*, **J. Biochem. Mol. Biol.** 31(1998) 503-507.
- [97] M. Ramirez, B.Valderrama, R. Arrendondo-Peter, M.. Soberon, J. Mora and G. Hernandez, *Rhizobium etli genetically engineered for the heterologous expression of Vitreoscilla sp. hemoglobin Effect on free-living and symbiosis*. **Mol. Plant Microbe Interact.** 12: (1999) 1008-1015.
- [98] W.Chen, D.E. Hughes and J.E. Bailey, *Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin alters the aerobic metabolism of Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Prog.** 10(1994) 308-313.
- [99] P. Brünker, W. Minas, P.T. Kallio and J.E. Bailey, *Genetic engineering of an industrial strain of Saccharopolyspora erythraea for stable expression of the Vitreoscilla haemoglobin gene (vhb)*. **Microbiology** 144(1998) 2441-2448.
- [100] W. Minas, P. Brünker, P.T. Kallio and J.E. Bailey *Improved erythromycin production in a genetically engineered industrial strain of Saccharopolyspora erythraea*. **Biotechnol. Prog.** 14(1998) 561-566.
- [101] M.L. Wei, D.A. Webster and B.C. Stark, *Metabolic engineering of Serratia marcescens with the bacterial hemoglobin gene: Alterations in fermentation pathways*. **Biotechnol. Bioeng.** 59:(1998) 640-646.
- [102] J.E. Bailey , A.Sburlati, V. Hatzimanikatis, K.Lee, W.A. Renner and P.S. Tsai, *Inverse metabolic engineering: A strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes*. **Biotechnol. Bioeng.** 52 (1996) 109-121.
- [103] S.C. Liu, D.A. Webster, M.L. Wei and B.C. Stark, *Genetic engineering to contain the Vitreoscilla hemoglobin gene enhances degradation of benzoic acid by Xanthomonas maltophilia*. **Biotechnol. Bioeng.** 49(1996) 101-105.

- [104] H.Yu, Y. Shi, Y. Zhang, S. Yang and Z. Shen, *Effect of Vitreoscilla hemoglobin biosynthesis in Escherichia coli on production of poly(β -hydroxybutyrate) and fermentative parameters*, **FEMS Microbiology Letters** 214 (2002) 223-227.
- [105] P.S. Tsai, M. Nageli and 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.
- [106] P.S. Tsai, G. Rao and 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.
- [107] C.J. T. Bollinger, J. E. Bailey, and P. T. Kallio, *Novel hemoglobins to enhance microaerobic growth and substrate utilization in Escherichia coli*, **Biotechnol Prog.** 17: (2001) 798-808.
- [108] C.C. Somerville, S.F. Nishino and J.C. Spain, *Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from Pseudomonas pseudoalcaligenes JS45*, **J. Bacteriol.**, 177(1995) 3837-3842.
- [109] S.M. Patel, B.C. Stark, K. Hwang, K.L. Dikshit and D.A. Webster, *Cloning and expression of Vitreoscilla hemoglobin gene in Burkholderia sp. Strain DNT for enhancement of 2,4-dinitrotoluene degradation*, **Biotechnol. Prog.**, 16(2000) 26-30.
- [110] W. Chen, D.E. Hughes and J.E. Bailey, *Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin alters the aerobic metabolism of Saccharomyces cerevisiae*, **Biotechnol. Prog.**, 10(1994)308-313.
- [111] K.M. Khleifat, M.M. Abboud and A.H. Al-Mustafa, *Effect of Vitreoscilla hemoglobin gene (vgh) and metabolic inhibitors on cadmium uptake by the heterologous host Enterobacter aerogenes*, **Process Biochem.**, 41(2006) 930-934.
- [112] A.K. Halkman, M. Atamer and H. Ertaş, *Endüstri Ve Çevre İlişkileri*. www.zmo.org.tr/
- [113] M. Kahyaoğlu ve V. Konar, *Şeker Fabrikası Atık Maddeleri Kullanılarak Pseudomonas aeruginosa'dan Ramnolipit Biyosümfektanı Elde Edilmesi*, **Fırat Ün. Fen ve Müh. Bilim. Dergisi** 18(2006)493-498.
- [114] E. Özrenk, S. Demir and Ş. Tüfenkçi, *Peyniraltı Suyu Uygulaması İle Glomus Intraradices Ve Rhizobium Cicer İnokulasyonlarının Nohut Bitkisinde Bazı Gelişim Parametrelerine Etkileri*, **Yüzüncü Yıl Ün., Ziraat Fak., Tarım Bilim. Dergisi (J. Agric. Sci.)**, 13(2): (2003)127-132.

- [115] Ö. Yeşilada, *Zeytin Yağı Fabrikası Atıksuyunun Değerlendirilmesi ve Arıtımı* **Biyoteknoloji (Kükem Dergisi)** 24(2000), 69-81.
- [116] U. Sıdal, N. Kolankaya and C.Kurtonur, *Pseudomonas sp. ile Zeytinyağı Fabrikası Atığından Biosülfektan Eldesi* **Turk J Biol** 24(2000) 611–625.
- [117] A. Clementi, *La desamidation enzymatique de l-asparagine chez les differentes especes animales et la signification physiologique de sa presence dans l'organisma.* **Arch. Int. Physiol.** 19(1922)369–76.
- [118] J.G. Kidd, *Regression of transplanted lymphoma induced in vivo by means of normal guinea pig serum I.* **J Exp Med** 98(1953) 565–82.
- [119] J.G. Kidd, *Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal Guinea pig serum II.* **J. Exp. Med.** ,98 (1953)583– 606.
- [120] R.E. Neuman and T.A. McCoy, *Dual requirement of Walker carcinosarcoma 256 in vitro for l- asparagine and glutamine,* **Science**, 124(1956)124–31.
- [121] J.D. Broome, *Evidence that the L-asparaginase activity in guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects.* **Nature**,191: (1961)1114–5.
- [122] J.D. Broome, *Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects I.* **J. Exp. Med.** ,118: (1963) 99–120.
- [123] J.D. Broome, *Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects II.* **J. Exp. Med.** , 118: (1963) 121–48.
- [124] H. Campbell and L. Mashburn, *L-Asparaginase EC-2 from Escherchia coli some substrate specificity characterstics.* **Biochemistry** 9 (1969) 3768–75.
- [125] L. Mashburn and J.C. Wriston, *Tumor inhibitory effects of L-asparaginase from Escherchia coli,* **Arch. Biochem. Biophys.**, 105(1964) 450–2.
- [126] T.Y. Yellin and J.C. Wriston, *Purification and properties of guinea pig serum L-asparaginase.* **Biochemistry**, 5(1966)1605–12.
- [127] T.Y. Yellin and J.C. Wriston, *Antagonism of purified asparaginase from guinea pig serum towards lymphoma.,* **Science**,151(1966) 998–1004.
- [128] R.F. Oettgen, J.L. Old and E.A. Boyse, *Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase.* **Cancer Res** , 27(1967) 2619–31.
- [129] T. Ohnuma, J.F. Holland and P. Meyer, *Erwinia carotovora l-asparaginase in patients with prior anaphylaxis to l-asparaginase from E. coli,* **Cancer** , 30 (1972) 376–81.

- [130] A. Abuchowski, T. Van Es and N.C. Palczuk, *Treatment of L5178Y tumor bearing BDF mice with a non-immunogenic l-glutaminase-asparaginase*, **Cancer Treat Rep**, 63(1979) 1127–9.
- [131] T. Yashimoto, H. Nishimura and 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) 1264–71.
- [132] Y. Ashihara, T. Kono, S. Yamazaki and Y. Inada, *Modification of E. Coli l-asparaginase with polyethylene glycol: disappearance of binding ability to anti-l-asparaginase serum*. **Biochem Biophys Res Commun** 83(1978) 385–91.
- [133] B.L. Asselin, J.C. Whitin and D.J. Coppola *Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations*. **J Clin Oncol** ,11(1993) 1780-6.
- [134] F.F. Becker and J.D. Broome *L-asparaginase: inhibition of early mitosis in regenerating rat liver*, **Science**, 156(1967) 1602-1603.
- [135] C.W. Taylor, R.T. Dorr and P. Fanta, *A phase I and pharmacodynamic evaluation of polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase in patients with advanced solid tumors*, **Cancer Chemother Pharmacol.**, 47(2001) 83-88.
- [136] A. Aguayo, J. Cortes and D. Thomas, *Combination therapy with methotrexate, vincristine, polyethylene-glycol conjugated-asparaginase, and prednisone in the treatment of patients with refractory or recurrent acute lymphoblastic leukemia*. **Cancer**,86 (1999) 1203-1209.
- [137] E. Kelo, T. Noronkoski, I.B. Stoineva, D.D. Petkov and I. Mononen, *L-Aspartylpeptides as substrates of L-asparajinases from Escherichia coli and Erwinia chrysanthemi*, **FEBS Letters**, 528 (2002) 130-132 .
- [138] A.A. Khan, S.P. Pal, S.R.V Raghavan and P.K. Bhattacharyya, *Studies on Serratia marscences L-asparajinase*, **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 41 (1970) 525–533.
- [139] M.L. Graham, *Pegasparajinase: a review of clinical studies*, **Advenced Drug Delivery Reviews**, 55(2003) 1293-1302.
- [140] Y. Fishman and N. Citri, *L-asparajinase entarpped in liposomes: preparation and properties*, **FEBS Letters**, 60(1975) 17-20.
- [141] K.J. Golden and R.W. Bernlohr, *Nitrogen Catabolite Repression of the L-Asparajinase of Bacillus licheniformis*, **J. Bacteriol.**, 164(1985) 938-940.
- [142] M.H. Saier and T.M. Ramseier, *The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria*, **J. Bacteriol.**, 178(1996) 3411-3417.

- [143] E. Albanese and D. Kafkewitz, *Effect of Medium Composition on the Growth and Asparaginase Production of Vibrio succinogenes*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 36(1978) 25-30.
- [144] J.Q. Kamerud and R.J. Roon, *Asparaginase II of Saccharomyces cerevisiae: Selection of Four Mutations That Cause Derepressed Enzyme Synthesis*, **J. Bacteriol.**, 165 (1986) 293-296.
- [145] H.J. Müller and J. Boos *Use of L-asparaginase in childhood ALL*. **Crit. Rev. Oncol. Hemat.**, 28(1998) 97-113.
- [146] S.O. Erenler, S. Gencer, H. Geckil, B.C. Stark and D.A. Webster, *Cloning and expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene in Enterobacter aerogenes: effect on cell growth and oxygen uptake*. **Appl. Biochem. Microbiol.**, 40(2004) 241-248.
- [147] J.W. Chung, D.A. Webster, K.R. Pagilla and B.C. Stark, *Chromosomal integration of the Vitreoscilla hemoglobin gene in Burkholderia and Pseudomonas for the purpose of producing stable engineered strains with enhanced bioremediating ability*, **J. Indust. Microbiol. Biotechnol.** 27(2001) 27-33
- [148] T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.
- [149] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. **J. Biol. Chem.** 193(1951)265.275.
- [150] MP Jennings and IR Beacham., *Co-dependent positive regulation of the ansB promoter of Escherichia coli by CRP and the FNR protein: a molecular analysis*, **Mol. Microbiol.** 9: (1993) 155–164.
- [151] S. Gencer “*Vitreoscilla hemoglobin geni klonlanmış Enterobacter aerogenes: bazı endüstriyel uygulamalar.*” Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2004
- [152] Ş.O. Erenler “*VHb Klonlanmış Enterobacter aerogenesin Metabolik ve Fizyolojik aktiviteleri üzerine etkileri.*” Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2001
- [153] A. Khushoo, Y. Pal, B. N., Singh and K.J. Mukherjee, *Extracellular expression and single step purification of recombinant Escherichia coli L-asparaginase II*, **Pro.Express. and Purific.**, 38(2004) 29–36.
- [154] H. Geckil, “*Effect of bacterial hemoglobin on microorganisms and butanediol production by Enterobacter aerogenes*” PhD Thesis, Illinois Institute of Technology USA, May 1995.

ÖZGEÇMİŞ

Malatya-Merkez ilçede 27.07.1976 yılında doğdu. İlk ve orta öğrenimini Malatya’da tamamladı. Lisans eğitimini İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünde 1996 yılında tamamladı. Aynı yıl Milli Eğitim Bakanlığına bağlı olarak Biyoloji Öğretmeni olarak göreve başladı ve aynı zamanda İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans eğitime başladı. 1997 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ne araştırma görevlisi olarak atandı. 2000 yılında “VHb Klonlanmış *Enterobacter aerogenes*’in Metabolik ve Fizyolojik Aktiviteleri Üzerine Etkileri.” başlıklı tez çalışmasını başarıyla tamamlayarak, 2001 yılında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde doktora eğitimine başladı. Evli ve bir çocuk sahibi olan Şebnem ÖZALP ERENLER halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.