T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TERMOFİLİK *GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS* L-ASPARAJİNAZ ENZİMİNİN KLONLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE ANTİTÜMÖR ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

MÜGE DİDEM ORHAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2018

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TERMOFİLİK *GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS* L-ASPARAJİNAZ ENZİMİNİN KLONLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE ANTİTÜMÖR ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

MÜGE DİDEM ORHAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DR. ÖĞRETİM ÜYESİ F. İNCİ ÖZDEMİR

GEBZE
2018

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

CLONING, CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF ANTITUMOR ACTIVITIY OF THERMOPHILIC *GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS* L-ASPARAGINASE

MÜGE DİDEM ORHAN

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC

THESIS SUPERVISOR

ASSIST. PROF. DR. FATMA İNCİ ÖZDEMİR

GEBZE

2018

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20.../.06.../.2018. tarih ve 2018.../..32..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 29.../06.../2018 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Müge Didem ORHAN'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Dr. Öğrt. Üyesi F. İnci ÖZDEMİR

ÜYE : Dr. Öğrt. Üyesi Özlem KİRAN

ÜYE : Doç. Dr. Melek ÖZKAN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

Doç. Dr. Arif Çağdaş AYDINOĞLU
Gebze Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

L-asparajinaz, hücrenin yaşamı ve protein sentezi için gerekli olan L-asparajin amino asidinin hidrolizini katalizleyen bir enzimdir. Normal hücreler, non-esansiyel amino asit olan asparajini üretebilirken; tümör hücrelerinin yaşamı dolaşımdaki kandan sağlanan L-asparajine bağlıdır. L-asparajinaz, kandaki L-asparajini azaltarak tümor hücrelerinin ölümüne sebep olmaktadır. Birçok mikroorganizma L-asparajinazı üretmesine rağmen temel olarak klinik ve törapatik uygulamalarda *Escherichia coli* ve *Erwinia chrysanthemi*'den elde edilen enzimler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu bakterilerden elde edilen L-asparajinazların allerjik tepki ve kısa yaşam ömrü gibi istenmeyen yan etkileri bulunmaktadır. Güncel kullanılan enzimlerden farklı olarak daha etkin anti tümör aktivitesine sahip ve uzun yaşam ömürlü L-asparajinazlara gereksinim duyulmaktadır. Bilgilerimize göre, termostabil asparajinazlar ile yapılan ancak güncel enzimlerin sorunlarını henüz çözmeyen birkaç çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmada, termofilik *Geobacillus kaustophilus* L- asparajinaz geni ilk defa L- asparajinaz geni pET-22b(+) vektöründe klonlanmış ve *E. coli* Rosetta^{TM} 2 (DE3) hücrelerinde ifade edilmiştir. C-terminalinde His6 etiketi içeren rekombinant protein saflaştırılmış ve enzim karakterize edilmiştir. Saflaştırılan GkASNaz'ın moleküler ağırlığı SDS-PAGE, Western Blot ve MALDI-TOF MS analiz ile ~36 kDa olarak belirtilmiştir. L-asparajii etkin şekilde hidrolize eden GkASNaz'ın optimum sıcaklığı 55°C ve pH'sı 8,5 olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi Cu^{2+} Fe^{2+}, EDTA ve EGTA varlığında inhibe olurken ve Mn^{2+}, Mg^{2+} gibi iyonların ve 2-merkaptoetanol, DTT gibi tiol koruyucu ajanlar varlığında artış göstermiştir. GkASNaz antiproliferasyon özelliği xCELLigence sistemi ile yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Enzimin metastatik mezenşim HCC SNU387 hücrelerinde büyümeyi azalttığı gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Asparajinaz, *Geobacillus kaustophilus*, karakterizasyon, Nessler ajanı, xCELLigence.

SUMMARY

L-asparaginase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of L-asparagine which is an amino acid required by cell for synthesis of protein and survival of the cell. L-asparaginase has long been used as a therapeutic agent in ALL and other related blood cancer. Unlike normal cells, L-asparagine cannot be produced by tumor cells. Therefore, the survival of tumor cells is dependent on the exogenous supply of L-asparagine from the blood. L-asparaginase depletes the available L-asparagine in the blood, causing inhibition of tumor cell survival. Although, several microorganisms are found to produce L-asparaginase, mainly *E. coli* and *E. chrysanthemi* orginated L-asparaginases are in use in clinical and therapeutic applications. However, these L-asparaginases have undesirable side effects such as allergic responses and short half-life. To our knowledge, there are also few studies dealing with thermostable asparaginases which do not solve the problems of current enzymes.

In this study, thermopfilic *Geobacillus kaustophilus* L- asparaginase was cloned in pET-22b (+) vector and expressed in *E. coli* Rosetta^{TM} 2(DE3) cells. The recombinant protein contained His6 tag at C-terminus was purified and enzyme characterization was performed. The molecular mass of GkASNase was determined as ~ 36 kDa from SDS-PAGE, Western Blotting and MALDI-TOF MS analysis. The optimum temperature of GkASNaz, which hydrolyzes L-asparagine effectively, is 55 °C and its pH is 8.5. Enzyme activity was inhibited in the presence of Cu^{2+}, Fe^{2+}, EDTA, and EGTA and enhanced in the presence of ions such as Mn^{2+}, Mg^{2+} and thiol protective agents as 2-mercaptoethanol, DTT. The GkASNaz antiproliferation property was determined by studies with the xCELLIgence system. It has been observed that the enzyme efficiently reduces metastatic synergy in HCC SNU387 cells.

Keywords: L-asparaginase, *Geobacillus kaustophilus*, characterization, Nessler's reagent, xCELLigence.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman desteğini üzerimde hissettiğim, bu süreçte bana değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan, anlayışını, sabrını ve güler yüzünü benden hiç esirgemeyen ve değerli bilgi ve görüşlerini benimle paylaşan, sevgili hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi F. İnci Özdemir'e,

Yüksek lisans eğitimim sırasında desteğini ve güler yüzünü esirgememiş olan değerli hocalarım Prof. Dr. Sedef Tunca Gedik'e;

Her konuda desteğini alabildiğim, sabırla karşılandığım ve güler yüzünün esirgenmediğim hocam; aynı zamanda abimiz Arş. Gör. Tuğrul Doruk'a; her türlü yardımlarını, desteklerini, sabırlarını, dostluklarını sakınmayan; yeri geldiğinde kahkahalarını yeri geldiğinde omuzlarını eksik etmeyen; kısaca sadece çalışma alanını değil anımızı birlikte yaşadığımız sevgili ve saygılı arkadaşlarım Arş. Gör. Zeynep Girgin Ersoy, Arş. Gör. Zeynep Demir Öksüz, Arş. Gör. Gamze Şeker, Garip Demir ve Aslı Bayraktar'a;

Gebze Teknik Üniversitesinde tanıştığım ve arkadaşlıklarını saymakla bitiremeyeceğim diğer yardımlarını ve muhabbetlerini eksiltmeyen bütün arkadaşlarıma,

Son olarak, beni yetiştiren, eğitimim boyunca benden hiçbir desteği esirgemeyen, her döneminde yanımda bulunan çok kıymetli babama ve anneme; gizli desteği ve her zaman yanımda olan ablama ve enişteme teşekkürlerin en büyüğünü sunmayı borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tez Çalışmasının Amacı	1
2. ASPARAGİNAZ	3
2.1. Normal ve Kanser Hücrelerinde L-Asparajinazın Rolü	3
2.2. L-Asparajinaz Enzim Tipleri ve Yapısı	5
2.2.1. Asparajinaz Enzim Tipleri	5
2.2.2. L-Asparajinaz Enzim Yapısı	6
2.3. L-Asparajinaz Enzimi ile Yapılan Çalışmalar	6
2.4. L-Asparajinazın Kullanım Alanları	9
2.4.1. Gıda Endüstrisi	9
2.4.2. Amino Asit Mekanizması	10
2.4.3. Biyosensör	10
2.5. Asparajinaz Enzim Kaynakları ve Üretimi	11
2.5.1. Enzimin Elde Edildiği Organizmalar	11
2.5.2. Enzimin Üretim Şekli	11
2.6. L-Asparajinazın Çalışma Mekanizması	12
2.7. L-Asparajinazın Toksisitesi	13
2.8. *Geobacillus kaustophilus* Hücresel Yapı ve Metabolizması	14
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	16
3.1. Gereçler	16
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	16
3.1.2. Kullanılan Enzim ve Tamponlar	16

3.1.3. Kullanılan Kitler 17
3.1.4. Kullanılan Cihazlar 17
3.1.5. Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçler 17
3.1.6. Kullanılan Vektörler 18
3.1.7. Kullanılan Saflaştırma Materyali 19
3.1.8. Kullanılan Bakteri Soyları 19
3.1.9. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler 19
3.2. Yöntemler 23
3.2.1. Geobacillus kaustophilus Kromozomal DNA İzolasyonu 23
3.2.2. Geobacillus kaustophilus Asparajinaz Geninin Restriksiyon Enzim haritasının Çıkartılması 24
3.2.3. Geobacillus kaustophilus Asparajinaz Geninin PCR ile Çoğaltılması 24
3.2.4. Agaroz Jel Sistemi 26
3.2.5. PCR ile Çoğaltılan DNA Fragmanının Klonlanması 26
3.2.6. Rekombinant Kolonilerden Plazmit İzolasyonu 29
3.2.7. Asparajinaz Geninin pET-22b(+)/GkASNaz Plazmitindeki Varlığının İspatlanması 29
3.2.8. Asparajinaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması 31
3.2.9. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi 33
3.2.10. Western Blot Analizi 34
3.2.11. MALDI-TOF Kütle Spektrometre Analizi 35
3.2.12. BCA Yöntemi ile Protein Miktar Tayini 35
3.2.13. Saflaştırılan Geobacillus kaustophilus Asparajinaz Enziminin Biyokarakterizasyonu 35
4. BULGULAR 39
4.1. Asparajinaz Geninin Geobacillus kaustophilus'dan PCR ile Çoğaltılması 39
4.2. PCR Ürününün ve Vektörün Ligasyona Hazırlanması 39
4.2.1. Transformasyon ve Transformantların Seçimi 40
4.2.2. Rekombinant pET-22b(+)/GkASNaz Vektörünün Doğruluğunun Belirlenmesi 41

4.2.3. Klonlanan Asparajinaz Geninin Nükleotit Dizininin Belirlenmesi 42
4.3. *Geobacillus kaustophilus* Asparajinaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması 45
4.4. Saflaştırılan Geobacillus kaustophilus Asparajinazın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi 47
4.5. Saflaştırılan Geobacillus kaustophilus L-Asparajinazın Biyokarakterizasyonu 49
4.5.1. Asparajinaz Enziminin Aktivite Tayini 49
4.5.2. Sıcaklığın Asparajinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi 49
4.5.3. pH'ın Asparajinaz Aktivitesine Etkisi 50
4.5.4. Substrat Konsantrasyonunun Asparajinaz Aktivitesine Etkisi 52
4.5.5. Asparajinaz'ın Kinetik Analizi 53
4.5.6. Çeşitli Metal İyonlarının Asparajinaz Aktivitesine Etkisi 54
4.5.7. Çeşitli Deterjan ve Ajanların Asparajinaz Aktivasyonu Üzerine Etkisi 55
4.5.8. Asparajinaz'ın Antiproliferasyon Etkisi 56
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 59

KAYNAKLAR 65
ÖZGEÇMİŞ 70
EKLER 71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar	**Açıklamalar**
~	: Yaklaşık
α	: Alfa
β	: Beta
μ	: Mikron
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
ALL	: Akut Limfoblastik Lösemi
Amp	: Ampisilin
APS	: Amonyum Persülfat
Arg	: Arjinin
Asp	: Aspartat / Aspartik Asit
Asn	: Asparajin
Asnaz	: Asparajinaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
*Bam*HI-HF	: *Bacillus amyloliquenfaciens H* Endonükleaz
Bç	: Baz Çifti
CLL	: Kronik Limfositik Lösemi
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DTT	: Ditiyotreitol
E. coli	: *Escherichia coli*
EDTA	: N, N, N', N', -Tetrametiletildienamin
EwA	: *Escherichia coli* Asparajinaz
ErA	: *Erwinia crysanthemi* Asparajinaz
EwA	: *Erwinia carotovora* Asparajinaz
Gk	: *Geobacillus kaustophilus*
GkASNaz	: *Geobacillus kaustophilus* Asparajinaz
Gly	: Glisin
G-	: Gram Negatif
G+	: Gram Pozitif

HCl : Hidroklorik Asit

His : Histidin

IPTG : İzopropil-Beta-D-Tiyo-Galaktopiranozid

K : Potasyum

kDa : Kilodalton

L : Litre

LB : Luria Broth

Lys : Lizin

M : Molar

Mg^{2+} : Magnezyum Katyonu

$MgCl_2$: Magnezyum Klorür

mL : Mililitre

mM : Milimolar

NaCl : Sodyum Klorür

*Nde*I : *Neisseria denitrificans I* Endonükleaz

nm : Nanometre

NaOH : Sodyum Hidroksit

Ni : Nikel

NR : Nessler Ajanı

PAGE : Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Phe : Fenilalanin

pmol : Pikomol

PMSF : Fenilmetansülfanilflorit

Rpm : Dakika Başı Dönüş

SDS : Sodyum Dodesilsülfat Salt

SOB : Süperoptimal Brot

SOC : Süperoptimal Brot (Katabolik Baskılama)

SmF : Submerged Fermentasyon

TCA : Triklor Asetik Asit

TEMED : Tetrametiletilendiamin

TSS : Toplam Katı Solüsyonu

UI : Ünite

V : Volt

Zn^{2+} : Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
2.1:	L-asparajinaz enziminin katalizlediği reaksiyonun şematik gösterimi.	3
2.2:	L-asparajin amino asidinin transaminaz ve asparajin sentetaz enzim yolakları.	4
2.3:	L-asparajinazın normal hücrelerde ve tümor hücrelerindeki mekanizması.	5
2.4:	Millard reaksiyon sonucu açığa çıkan akrilamidin oluşumunun şekillendirilmesi.	10
2.5:	Akt/mTOR ve ERK sinyal yolakları K562 CML hücreleri üzerinde asparajinaz ile başlatılan otofajda yer alırlar.	13
2.6:	*Geobacillus kaustophilus*'un *Geobacillus* cinsinin diğer türlere göre filogenetik yeri.	15
3.1:	GkASNaz geninin restriksiyon enzim haritası.	24
4.1:	PCR ile çoğaltılan asparajinaz geninin %1'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.	39
4.2:	Ligasyon için hazırlan insert ve vektörün %1'lik agaroz jel görüntüsü.	40
4.3:	Koloni PCR sonuçlarının %1'lik agaroz jelde görüntüsü.	41
4.4:	Rekombinant plazmitin restriksiyon enzim kesim analizi.	42
4.5:	Gk DSM 7263'ye ait rekombinant L-asparajinaz gen dizisi ile Gk HTA 426 L-asparajinaz gen dizisinin karşılaştırılması.	43
4.6:	Gk DSM 7263'ye ait rekombinant L-asparajinaz gen dizisi ile Gk HTA 426 L-asparajinaz gen dizisinin karşılaştırılması.	44
4.7:	GkASNaz ekspresyonunun SDS-PAGE analizi.	45
4.8:	Saflaştırma için rekombinant E. coli RosettaTM 2 (DE3) hücrelerinden hazırlanan hücre özütlerinin SDS-PAGE analizi.	46
4.9:	Afinite kromatografisi elüsyon fraksiyonlarının SDS-PAGE analizi.	46
4.10:	Saflaştırılmış proteinin SDS-PAGE analizi.	47

4.11: GkASNaz'ın moleküler ağırlığının MALDI-TOF kütle spektrometresi ile analizi. 48
4.12: Western Blot analizi. 48
4.13: Sıcaklığın GkASNaz aktivitesi üzerine etkisi. 50
4.14: pH'nın GkASNaz aktivitesi üzerine etkisi. 51
4.15: GkASNaz aktivitesinin pH kararlılığı. 51
4.16: 50 mM Tris-HCl tamponunda GkASNaz'ın optimal pH ve stabilitesi. 52
4.17: Substrat konsantrasyonunun GkASNaz aktivitesine etkisi. 53
4.18: GkASNaz 'ın Lineweaver-Burk grafiği. 53
4.19: Metal iyonlarının GkASNaz aktivitesi üzerine etkisi. 54
4.20: Deterjanların ve ajanların GkASNaz aktivitesi üzerine etkisi. 55
4.21: Hep3B malignant hücreleri üzerinde uygulanan GkASNaz rekombinant enziminin etkisini gösteren grafik. 57
4.22: SNU387 malignant hücreleri üzerinde uygulanan GkASNaz rekombinant enziminin etkisini gösteren grafik. 58

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa
3.1:	GkASNaz'nı çoğaltmak için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri.	25
3.2:	GkASNaz PCR fragmanı için hazırlanan restriksiyon endonükleaz reaksiyon bileşenleri.	27
3.3:	pET-22b(+) vektörü için hazırlanan restriksiyon endonükleaz reaksiyon bileşenleri.	27
3.4:	Rekombinant plazmitler için hazırlanan PCR reaksiyonu.	30
4.1:	GkASNaz'ın saflaştırılma tablosu.	49

1. GİRİŞ

İlaçla tedavi etme anlamına gelen kemoterapi, 1900'lü yılların başında alman kimyacı Paul Ehrlich tarafından hastalıkları kimyasal kullanarak tedavi etmek olarak tanımlanmıştır. Ayrıca Ehrilich, kanseri tedavi eden ilaçlar araştırmalarıyla ilgilenerek günümüze uzanan kanser ve kemoterapi çalışmalarının başlangıcını oluşturmuştur. [DeVita et al., 2008].

Kanser, günümüzde ölüme neden olan başlıca hastalıklardan biri olmuştur. Geçtiğimiz yüzyıldan bu yana kanser ameliyat, kemoterapi veya radyoterapi ile tedavi edilebilmiştir. Bu tedavi yöntemlerinin çalışma prensipleri kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engellemeğe dayanmaktadır. Ameliyat ve radyoterapinin yanı sıra, kemoterapi kanser tedavisinde en sık kullanılan tedavi yöntemi olmaktadır.

Kemik iliğinde veya beyaz kan hücrelerinde kötü huylu kanser çeşidi olan akut limfoblastik lösemi (ALL) günümüzde en yaygın kanser çeşitlerinden biridir. Olgunlaşmamış veya malignan beyaz kan hücrelerinin kemik iliğinde haddinden fazla birikmesi ile oluşan ALL, çoğunlukla çocukları etkilemektedir [El- Naggar, et al., 2014]. Güncel kemotöropik tedaviler, kemoterapide kullanılan ilaçların kombinasyonu ile oluşmaktadır. ALL tedavisinde kullanılan kemoterapik ajanların arasında en etkili olanı L-asparajinaz enzimi olmaktadır. Anti tümör ajanı olarak L-asparajinaz, kandaki L-asparajin seviyesini azaltarak tümor hücrelerinin ölümüne sebep olmaktadır.

1.1. Tez Çalışmasının Amacı

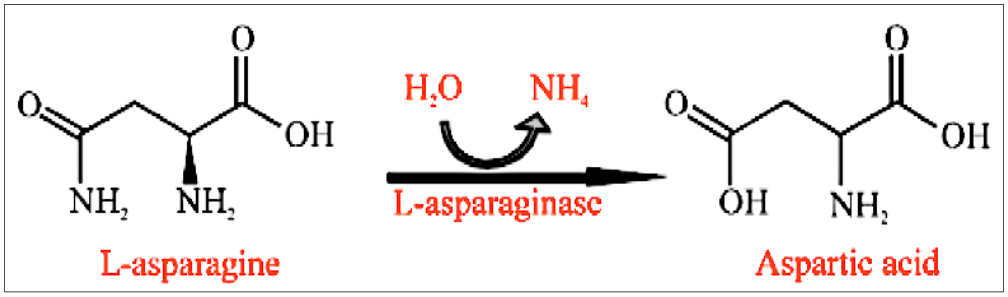
L-asparajinaz enzimi, son yıllarda kanser kemoterapide, özellikle ALL tedavisinde, potansiyel ajanlar olarak kullanılan en yaygın enzimlerden biridir. Tümör inhibitörü olarak kullanılan L-asparajinazlar bakteriyel kaynakların çoğundan izole edilebilmektedir, fakat klinik olarak kullanılan enzimin bakteriyel kaynakları *E. coli* ve *E. caratowara* organizmalarıdır. Enzimin uzun süre kullanımı hastalar üzerinde hipersensitivite ve alerjik reaksiyon gibi ciddi yan etkilere sebep olmaktadır. Günümüzde TipI I L-asparajinaz enziminin geliştirilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar arasında enzimi daha az maliyete ve daha gelişmiş L-asparajinaz olarak nasıl elde edilmesi gerektiği, yan etkilerinin azaltmak için farklı kaynak arayışları, hastaların direnç gelişiminin engellenmesi için enzim çalışmaları

bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, 972 bç uzunluğundaki L-asparajinaz geninin termofilik bir kaynak olan *G. kaustophilus'*tan klonlanması planlanmış, gen fragmanının pET-22b(+) vektörüne aktarılarak *E. coli* Rosetta^{TM} 2(DE3) hücrelerinde eksprese edilmesi, oluşan 6xHis-ASN proteininin His-Trap FF kolonu ile saflaştırılması, elde edilen ürünün karakterize edilmesi ve anti tümör aktivitesinin SNU387 ve Hep3B kanser hücreleri üzerindeki etkisi gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

2. ASPARAGİNAZ

2.1. Normal ve Kanser Hücrelerinde L-Asparajinazın Rolü

L-asparajinaz (EC 3.5.1.1, L-asparajin amidohidrolaz), L-asparajin amino asidindeki amid bağın hidrolizini katalizleyerek L-aspartik asit ve amonyak oluşumunu sağlayan bir enzimdir [Cantor et al., 2009] (Şekil 2.1).



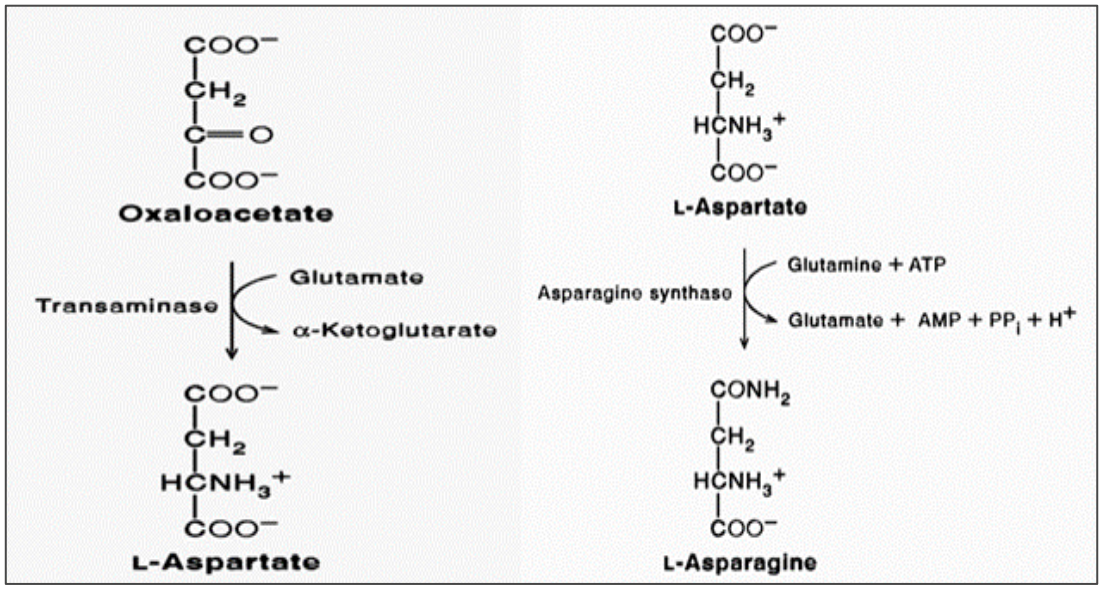
Şekil 2. 1: L-asparajinaz enziminin katalizlediği reaksiyonun şematik gösterimi.

Hücre protein üretebilmek için L-asparajin aminoasidine ihtiyaç duymaktadır. Çoğu hücre asparajin sentetaz enzimi ile kendi amino asidini üretmektedir. Asparajin sentezinin ilk basamağında transaminaz enzimi oksaloasetatı, glutamattaki amino grubunu α-ketoglutamata transfer ederek ara ürün olan aspartatı oluşturmaktadır. Sentezin ikici basamağında ise açığa çıkan aspartat, asparajin sentetaz enzimi tarafından asparajine dönüştürülmektedir [Batool et al., 2016].

Asparajin, aspartate amidasyonunun bir ürünüdür ve sentezi glutamine bağımlıdır. Glutamin amonyak kaynağı olmasının yanında birçok biyosentetik ürünün oluşumunda amino grubu (nitrojen) donörü olarak görev yapmaktadır. Amino asit sınıflandırmasında asparajin "non-essential amino asit" grubuna girmektedir. Çoğu hücre "L-asparajin sentetaz" enzimi ile kendi asparjinlerini sentezlemekte ve böylece bu amino asidi dışardan alma ihtiyacı duymamaktadır.

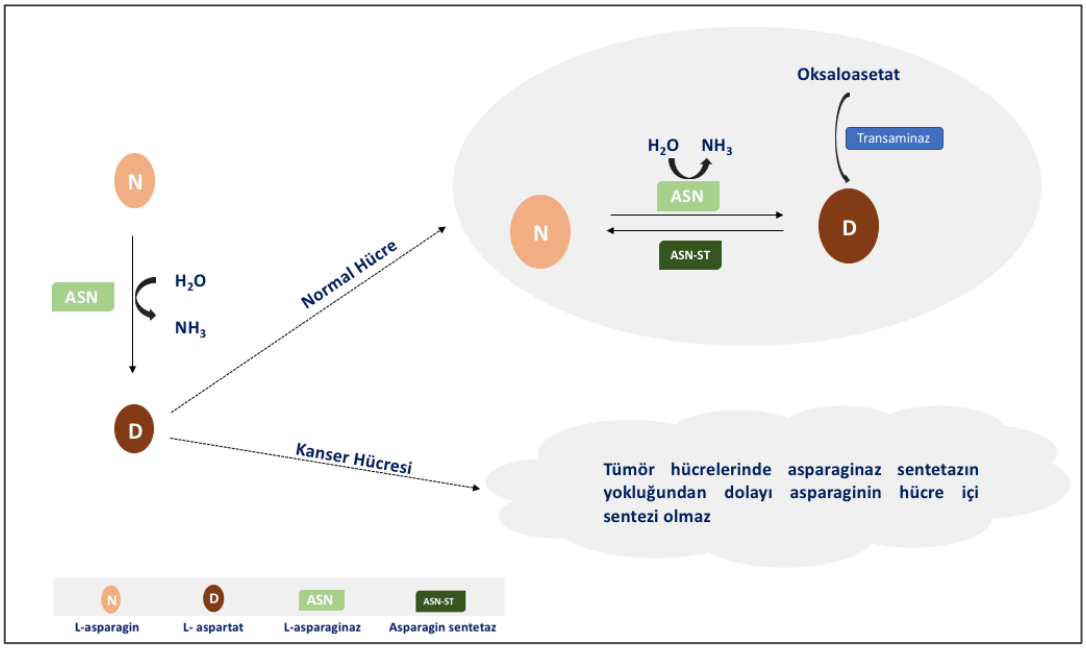
L-asparajinin, L-asparajinaz ile yıkımı sonucu açığa çıkan aspartat, hem üre döngüsünde ornitinin öncü maddesi olarak hem de glukoz oluşum yolağında oksaloasetat oluşturan transaminasyon reaksiyonunda rol oynamaktadır [El- Naggar et al., 2014]. L-asparajin sentetaz enzimi asparatata amin ekleyerek asparajinin

karakteristik amid grubunu oluşturmaktadır (Şekil 2.2). L-asparajinaz ise zıt reaksiyon sergileyerek; L-asparajinden amini çıkartarak L-aspartat ile amonyağı açığa çıkartmaktadır [El- Naggar et al., 2014].



Şekil 2.2: L-asparajin amino asidinin transaminaz ve asparajin sentetaz enzim yolakları.

Asparajin hücrelerde aminoasit taşınması, amino asit metabolizması, nükleik asit baz sentezi ve protein biyosentezi gibi birçok yaşamsal yolaklarda rol oynamaktadır [Yang et al., 2014]. Normal hücrelerden farklı olarak, tümör hücreleri asparajin amino asidini sentezleyemediklerinden dolayı kan dolaşımda bulunan L-asparajine ihtiyaç duymakta ve besin yoluyla ihtiyaçlarını karşılamaktadır. Kemoterapi ilacı olarak L-asparajinaz, besin yoluyla alınan asparajini, aspartat ve amonyağa dönüştürerek tümör hücreleri tarafından ihtiyaç duyulan asparajini yok etmektedir. Oluşan amino asit açlığı ALL ve benzer hematopatik kanser hücrelerinde DNA, RNA ve protein sentezini engellemektedir [Husain et al., 2016] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: L-asparajinazın normal hücrelerde ve tümor hücrelerindeki mekanizması.

2.2. L-Asparajinaz Enzim Tipleri ve Yapısı

2.2.1. Asparajinaz Enzim Tipleri

Asparajinaz aktivitesine sahip enzimler gen dizilerine ve yapısal homolojilerine dayanarak tip I ve tip II olarak adlandırılan bakteriyel ve tip III olarak adlandırılan bitki kökenli olmak üzere iki aileden oluşmaktadır [Michalska and Jaskolski, 2006]. Tip I asparajinazlar belli oranda sürekli olarak sentezlenen sitoplazmik enzimlerdir, tip II asparajinazlar ise bakterinin büyüme şartlarına bağlı olarak periplazmaya salgılanan enzimlerdir [El-Naggar, 2014; Borek and Jaskólski, 2001]. Tip I ve tip II asparajinazlar L-asparajin ve L-glutamin enzimatik aktivite ile karakterize edilmektedirler. Bununla birlikte, tip II asparajinaz L-asparajine karşı yüksek özgül afinite göstermektedir. Bir antineoplastik aktivitesine sahip olan tip II L-asparajinazlar, kandaki L-asparajin seviyesini seçici olarak indirgeyerek kanserli hücrelerin çoğalmasını azaltmaktadır [Avramidis et al., 2006]. Tip II asparajinazlar başta akut limfoblastik lösemi olmak üzere insan kanser tedavisinde kemoterapik ajan olarak kullanılmaktadır [Kozak et al., 2002, Kotzia and Labrou, 2007].

2.2.2. L-Asparajinaz Enzim Yapısı

L-asparajinaz enzimi homotetramer yapıdadır ve moleküler ağırlığı 140-150 kDa arasında bulunmaktadır. A, B, C ve D olarak isimlendirilen 4 özdeş alt birimi vardır ve her bir monomer 330 amino asit içermektedir. Bu monomerler, 14 β strands ve 8 α-heliks olarak yapılanmaktadır. Enzimatik aktivitesi serin proteazların iki basamaklı ping-pong mekanizmasına benzemektedir [Swain et al., 1993, Lubkowski et al., 1996].

Enzimin aktifleşebilmesi için dimer yapıda olmasında gerekmesine rağmen, L-asparajin substrat olarak enzimin monomerine bağlanabilmekte ve enzim-substrat etkileşimini oluşturabilmektedir. Bu etkileşim alt ünitelerde bulunan iki Thr residu ile oluşmaktadır. Her iki Thr amino asidi aktivite için gerekmekte fakat hangi rezidünün amid bağındaki C atomuna –OH nükleofilik atağı yaptığı tartışılmaktadır. Bu özellik substratın enzime tamamıyla bağlanmasına sebep olmaktadır [Michaska et al., 2006].

2.3. L-Asparajinaz Enzimi ile Yapılan Çalışmalar

Günümüzde enzimin geliştirilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar arasında enzimi daha az maliyete ve daha gelişmiş L-asparajinaz olarak nasıl elde edilmesi gerektiği, yan etkilerinin azaltmak için farklı kaynak arayışları, hastaların direnç gelişiminin engellenmesi ve Tip III asparajinaz enzim çalışmaları bulunmaktadır. Son yıllarda farklı araştırmacılar tarafından yapılan literatür çalışmalarından bazıları şöyledir:

Hymavathi ve arkadaşları (2009), zirai atıklar kullanarak SSF (Katı fermnetasyon tekniği) ile *Bacillus circulans* (MTCC 8574)' dan L-asparajinazı üretmişlerdir. Üretim işlemi sırasında inkübasyon sıcaklığı, nem içeriği, glukoz ve L-asparajine miktarı gibi parametrelerin ekonomik olarak enzim üretiminde önemli bir role sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Ghasemi ve arkadaşları (2008), *E. coli* den L-asparajinaz Tip II'yi elde etmişler ve akut lösemi ve diğer malin neoplazmanın kemoterapisinde çalışarak *E. coli'* deki L-asparajinaz II geninin (ansB) ekspresyonu için bazı koşulların gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmalarında modifiye M9 besiyerinde farklı karbon kaynaklarını

farklı konsantrasyonlarda kullanarak bu enzimin identifikasyonu ve ekspresyonu için gerekli optimum koşullarını test etmişlerdir.

Jois ve arkadaşları (2013), çalışmalarında gram negatif bakteri olan *E. coli* ve *Pseudomonas aeroginosa*'yı seçerek, L-asparajinaz üretimi ve bu enzim için gerekli kültür koşullarını araştırmışlardır. *Pseudomonas* 'ın modifiye M9 besi yerinde 52 saat boyunca üretilmesi sonucunda çok yüksek miktarlarda L-asparajnaz ürettiğini, maksimum enzim aktivitesi ve özellikli aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Shukla ve Mandal (2013), katı fermentasyon tekniği kullanarak ekstra sellular bir enzim olan L-asparajinazın saflaştırılması ve üretimini çalışmışlardır. Çalışmalarında topraktan elde ettikleri örneklerden izolasyon yapmışlardır. Bir izolat seçilerek, bu izolatı kimyasal testlere tabi tutmuşlar ve *Bacillus subtilis* olarak tanımlamışlardır. *Bacillus subtilis*' den elde edilen L-asparajinazı 110,2 kat saflaştırarak spesifik aktivitesini 1785.7 IU ve optimum sıcaklığını 50°C, pH' sını ise 9,0 olarak bulmuşlardır. Yüksek katalitik aktiviteye sahip olması, geniş pH ve sıcaklık aralıklarında çalışması, önemli bir şekilde kararlı olması gibi özelliklerinin, anti kanser ajanı ve sağlık endüstrisindeki uygulamalarda kullanılabilir olabileceğini belirtmişlerdir.

Borah ve arkadaşları (2012), limfoblastik lösemi tedavisinde anti kanser ajanı olarak kullanılan L-asparajinazlarla çalışmışlardır. Kanalizasyon sularından *E. coli* izolasyonu yaparak bu bakteriden elde ettikleri L-asparajinazın karakterizasyonuna, saflaştırılmasına, üretilmesine ve enzim üretimi üzerine sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu, inhibitör, aktivatör konsantrasyonlarının etkilerine bakmışlardır.

Basha ve arkadaşları (2009), deniz aktinomisetlerinin izolasyonunu yapmışlardır. İzolasyonu yapılan örneklerde, L-asparajinaz aktivitesine bakarak enzimin karakteristik özelliklerini araştırmışlardır. Sonuç olarak deniz aktinomisetlerinin anti lösemi ajanı olarak kullanılabilecek yüksek ürün potansiyeline sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre *E. coli* ve *E. carotovora*'dan elde edilen L-asparajinazlar özellikle akut lemfoblastik lösemi tedavisinde anti tümör ajanı olarak kullanılmaktadır. Fakat anaflaktik şok ve ilacın nötralizasyonu gibi yan etkilere sahip olabilmektedir. Bu yüzden Jain ve arkadaşları (2012), farklı serolojik özelliklere sahip yeni L-asparajinazları araştırmışlardır.

Vidya ve arkadaşları (2011), *E. coli* MTCC 739 *ansB* genini *E. coli* 'de klonlayarak ekspresyonunu yapmışlardır. Ekspresyonu yapılan proteini saflaştırarak

kullanılabilirlik özelliklerini araştırmışlardır. Enzimin termostabilite ve substrat özellikleri gibi faktörlerinin geliştirilebilmesi ile tedavi ile ilgili uygulamalarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Yu ve arkadaşları (2012), ovaryum kanserlerinde kullanılan ajanların, tümör ve tümör etrafındaki bölge ile arasındaki iletişime olan etkisini araştırmayı amaçlamaktadır. L-asparajinazların, mikrovaskülar ECs, ovaryum kanser hücreleri ve ECM bileşikleri arasında, iletişimde önemli bir alternanif olacağını ve sonuçta ovaryum kanser hücrelerinin tedavisinde de kullanılalabileceğini yaptıkları çalışma ile belirtmişlerdir.

Pokrovskaya ve arkadaşları (2012), *Yersinia pseudotuberculosis*'den elde ettikleri yeni bir L-asparajinazın biyokimyasal ve antikanser özelliklerini keşfetmişler ve bu enzimin medikal pareparat olarak kullanılabilmesi için hızlı ve basit bir şekilde saflaştırılabilmesini sağlamışlardır.

Hong ve arkadaşları (2013), *T. kodakarensis* L-asparajinaz genini *E. coli'* de kolonlayarak bu genin izolasyonunu, ekspresyonunu ve karaktarizasyonunu yapmışlardır. Ayrıca bu enzimin farklı sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonlarında aktivite ve stabilitesine bakmışlardır. Enzimin istikrarlı ve uzun süre aktiviteye sahip olma özelliğinin bulunması ile TkAsn'nin tıpta ve endüstride önemli olabileceğini belirtmişlerdir.

Huang ve arkadaşları (2014), *Rhizomucor miehei* 'den L-asparajinaz (RmAsnaz) genini *E. coli* 'de klonlamışlardır. RmAsnazın optimum aktiviteyi pH 7.0' de ve 45 ^{o}C da gösterdiğini ve aynı sıcaklıkta 30 dakika stabil kaldığını belirtmişlerdir. Yapmış oldukları çalışmanın sonucu olarak RmAsnazın lösemi tedavisinde kullanılan kemoterapiler için dikkate değer bir potansiyel oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Mohamed ve arkadaşları (2015), *Phaseolus vulgaris* tohumlarından L-asparajinazı saflaştırarak, karakterizasyonunu yapmışlar ve kanser tedavisinde ilaçların yan etkilerini azaltabileceğini belirtmişlerdir.

El-Naggar ve arkadaşları (2014), asparajinazların akut lenfoblastik lösemi tedavi protokollerinde önemli olduğunu savunmuşlardır. Bu enzimin klinikte ki etkisi L-asparajin üretimini azaltmasıdır; çünkü tümör hücreleri bu aminoasidi sentezleme yeteneğine sahip olmadığından L-asparajin eksikliğinde ölürler. Bununla birlikte asparajinazların yan etkilerinin olmasından dolayı farklı L-asparajinaz kaynakları araştırılmıştır. Yeni keşfettikleri bu enzimin farklı serolojik özelliklere sahip olduğunu

bulmuşlar ve böylece bu L-asparajinazların daha az yan etkiye sahip olabileceğini yaptıkları çalışma ile açıklamışlardır.

Bhat ve arkadaşları (2015), *Salinicoccus sp.* KJ997975 suşundan elde edilen L-asparajinazın Jurkat ve HeLa olarak adlandırılan iki insan kanser hücresinde invitro sitotoksik etkisini araştırmışlar ve bu iki hücrede de sitotoksik etkinin olduğunu fakat Jurkat hücrelerinde daha güçlü bir inhibitör etkisinin görüldüğünü belirtmişlerdir.

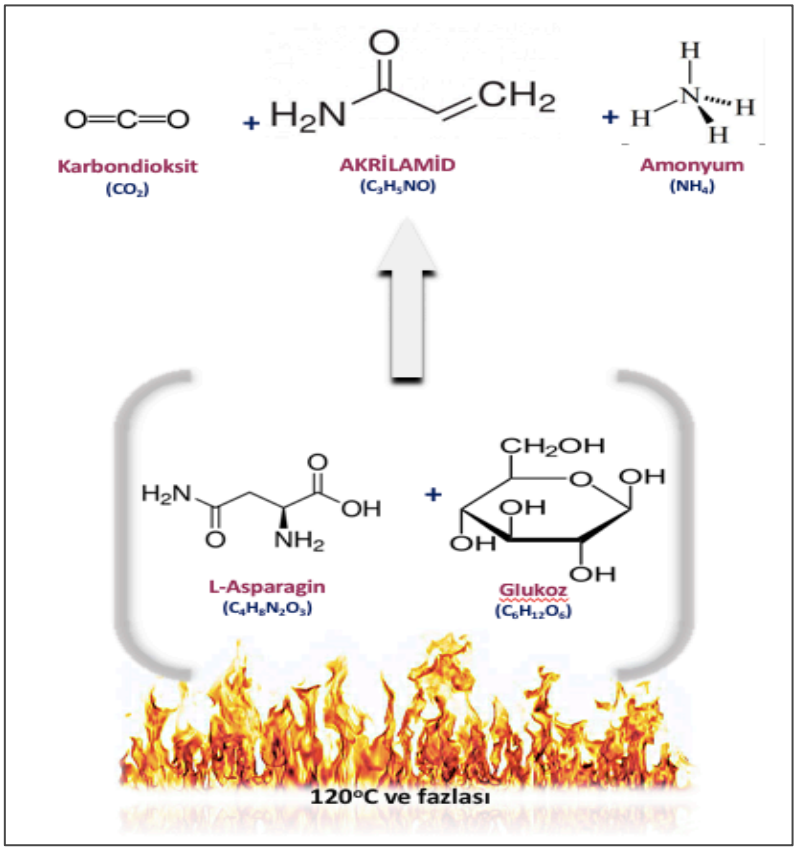
Kishore ve arkadaşları (2015), *Pseudomonas flourescens'* den elde ettikleri L-asparajinazı *E. coli* BL21 bakterisinde klonlayarak rekombinant L-asparajinazı saflaştırmış ve karakterize etmişler böylece rekombinant enzimin 37 ^{o}C 'da daha iyi aktivite ve stabilite gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca 37 ^{o}C' da yüksek yarılanma özelliğine sahip olmasından dolayı kanser hücrelerine karşı kullanımının daha uygun olabileceğini belirtmişlerdir.

2.4. L-Asparajinazın Kullanım Alanları

2.4.1. Gıda Endüstrisi

L-asparajina kemoterapinin yanısıra gıda endüstrisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Nişasta bazlı yiyecekler yüksek ateşte pişirildikleri zaman gıdaların içerisinde bulunan L-asparajinin ısıtılması, yiyeceklere kızarmışlık veren Millard reaksiyonunun başlamasına neden olmaktadır. 120 ^{o}C ve üzeri yüksek sıcaklıkta fırınlama veya kızartma sırasında oluşan Millar reaksiyonu, serbest haldeki asparajinin a-amino grubunu ve indirgenen şekerin karboksil grubu ile birleşerek nerotoksin madde olan akrilamidin (2-propenamide) açığa çıkmasına sebep olmaktadır (Şekil 2.4).

Gıda endüstrisinde kullanılmak üzere PreventASe (DSM, The Netherland) ve Acrylaway (Novozymes, Denmark) gibi ticari markalar *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus niger* organizmalarından enzimi üretmektedir [Batool et al., 2016].



Şekil 2.4: Millard reaksiyon sonucu açığa çıkan akrilamidin oluşumunun şekillendirilmesi. 120°C ve üzerindeki sıcaklıklarda açığa çıkan akrilamid L-asparajinin amino grubu ile indirgenen şekerin karboksil gurubu arasında oluşan etkileşim sonucu oluşur.

2.4.2. Amino Asit Mekanizması

Kreb döngüsü, lisin ve treonin amino asitlerinin öncü maddesi olan aspartik asit, L-asparajinaz enzim aktivasyonu sonucu açığa çıkarak amino asitlerin aspartik grubunun (lisin, treonin ve metionin) biyosentezinde önemli rol oynamaktadır [Batool et al., 2016].

2.4.3. Biyosensör

L-asparajinaz, asparajin seviyesini belirleme amacı ile medikal alanda veya gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Asparajinazın biyosensör analizi daha güvenilir, daha az maliyetli ve kullanıcı bazlı olması sebebiyle güncel olarak kullanılan XRD, XPS, SEM ve TEM gibi birçok spektroskopi tekniğine göre daha çok tercih edilmektedir.

Biyosensörün genel çalışma mekanizması asparajinaz enziminin aktivasyonuna dayanmaktadır; asparajinin hidrolizinden açığa çıkan amonyum iyonları pH değişime neden olarak ortamın hem renk hem de absorbans değişimine sebep olmaktadır [Batool et al., 2016].

2.5. Asparajinaz Enzim Kaynakları ve Üretimi

2.5.1.Enzimin Elde Edildiği Organizmalar

L-asparajinazlar günümüze kadar bakteriler, mantarlar, mayalar, aktinomisedler ve algler gibi farklı kaynaklardan elde edilmiştir [Ali et al., 1994, Mukherjee et al., 1999, Sarquis et al., 2004]. Ancak özütme (extraction) prosedürünün getirdiği zorluklar nedeniyle hepsi yaygın biçimde kullanılmamaktadır [El- Naggar et al., 2014]. Fungal ve bakteri kaynaklı asparajinaz enzimleri büyük miktarda ve basit enzim üretim metotları ile kolay üretilebildiklerinden dolayı diğer kaynaklara göre fazla tercih edilmektedir [Batool et al., 2016].

Karasal ve denizsel çevrelerde bulunan gram pozitif (G+) ve gram negatif (G-) bakteri türleri L-asparajinaz üretimi için uygun kaynaklardır. G- ile karşılaştırıldığında G+ bakteriler bu enzim için daha az kullanılmaktadır [Batool et al., 2016]. Akut lenfoblastik lösemi tedavisinde etkin anti tümör ajanı olarak kullanılan TipII L-asparajinaz *E. coli* ve *E. chrysanthemi* bakterilerinden elde edilmektedir [Batool et al., 2016].

2.5.2. Enzimin Üretim Şekli

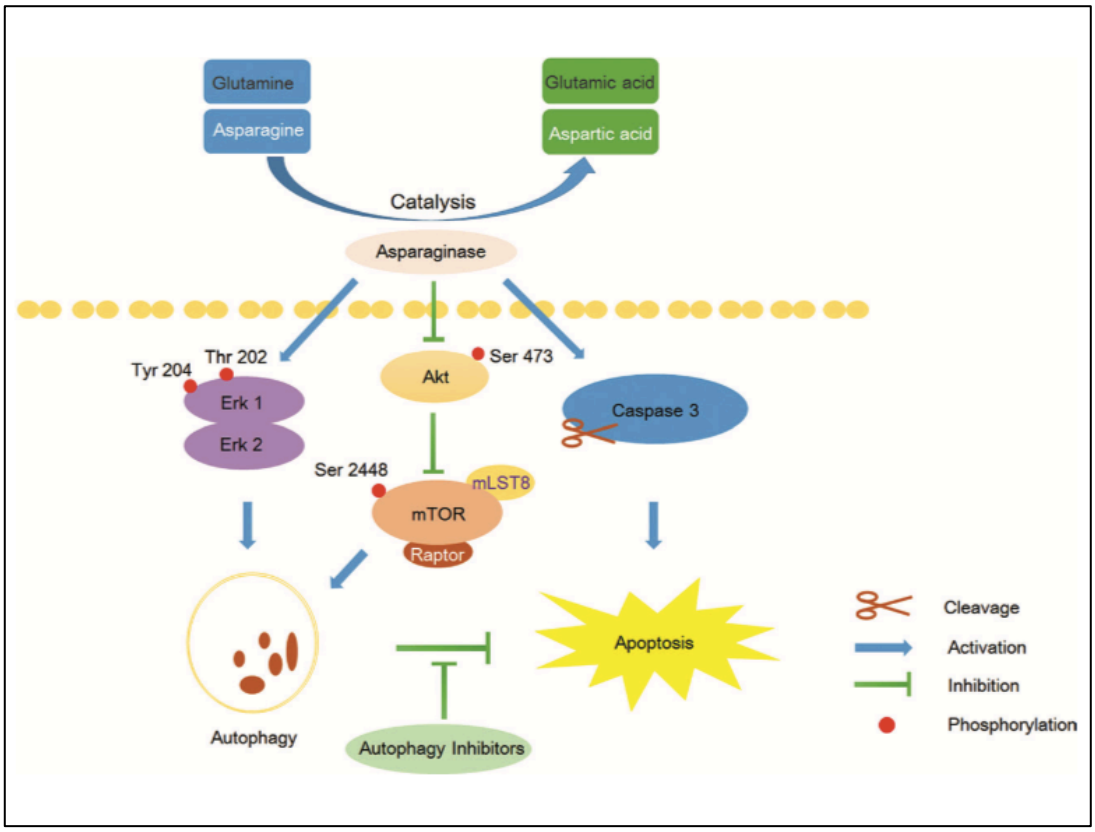
Önceleri submerged fermantasyon (SmF) yoluyla üretilen asparajinaz enzimi, bu tekniğin dezavantajlarından dolayı günümüzde rekombinant enzim olarak üretilmektedir. SmF az konsantrasyonla birlikte fazla atık oluşturması bu tekniğin maliyetli, problemli ve karışık bir operasyon haline getirmektedir. Eski yönteme göre çoğu olumsuzluklar kalkmasına rağmen, son çalışmalar enzim ekspresyonunun yavaş ve az olduğunu göstermektedir. Bunun sebebi; enzim ilaç ve gıda sektöründeki firmalar tarafından talep edilmektedir. Enzimin üretiminin az fakat enzim talebinin

fazla olması, ürün için istenilen maliyeti arttırmakta; böylece günümüzde kullanıcının enzime ulaşamaması gibi bir sorunla karşılaşılmaktadır. Bu olumsuzluğu gidermek amacıyla günümüzde daha düşük maliyetli fakat daha gelişmiş L-asparajinazlar elde edebilmek için biyoteknolojik çalışmalar devam etmektedir.

2.6. L-Asparajinazın Çalışma Mekanizması

Plazmada dolanan L-asparajin seviyesinin azaltarak tümör hücrelerinin ölümüne sebep olduğu bilinmesine rağmen L-asparajinazın teropatik kullanımının moleküler açıklaması çok zayıftır [Richard and Killberg, 2013].

Pagliardi ve arkadaşlarının (1973) yaptığı çalışmada L-asparajinazın enjektesini takiben G1 ve M fazındaki hücrelerin S fazına geçemedikleri, böylece protein, DNA veya RNA sentezini engellendiği için G1 fazında hücre döngüsünün durduğunu ve apoptosise neden olduğunu belirtmişlerdir [Pagliardi et al., 1973]. Son yıllarda K562 ve K4812 hücre hatları üzerinde yapılan çalışmada, asparajinazın Akt/mTOR ve Erk (ekstracellular signal-regulated kinase) sinyal yolaklarını etkileyerek otofajik cevabı indüklediği gözlemlenmiştir (Şekil 2.5) [Song et al., 2015].



Şekil 2.5: Akt/mTOR ve ERK sinyal yolakları K562 CML hücreleri üzerinde asparajinaz ile başlatılan otofajda yer alırlar.

2.7. L-Asparajinazın Toksisitesi

Tümör inhibitörü olarak kullanılan L-asparajinazlar birçok bakteriyel kaynaktan izole edilmiştir. Bugüne kadar en iyi bilinen bakteriyal asparajinaz üreticisi *E. coli* ve *E. conotovora* 'dır. Bu enzimler özellikle lösemi ve liposarkom tedavisinde kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu iki kaynaktan elde edilen asparajinazların iyileştirme potansiyellerin olmasına rağmen yaşamı tehdit eden anafilaksi, pankreatit, diyabet, lökopeni, nörolojik nöbetler, kuagülasyon anormallikleri gibi ciddi toksik etkilere de sebebiyet verdiği ortaya konulmuştur. Gözlemlenen yan etkilerin çoğu L-asparajinazın ikinci substrat aktivitisi olan glutaminaz aktivitesi sebebiyle olmaktadır [Müller et al., 1998, Narta et al., 2007]. Birçok L-asparajinaz yapısal benzerliği sebebiyle çok küçük glutaminaz aktivitesine de sahiptir. Bu sebeple, enzimlerin intrinsik glutaminaz aktivitesine sahip olması önemli dezavantajlarından biridir. Ayrıca, kısa serum yarılanma ömrü, proteolitik enzimlere karşı düşük tolerans göstermesi asparajinazın tekrar uygulanmasını

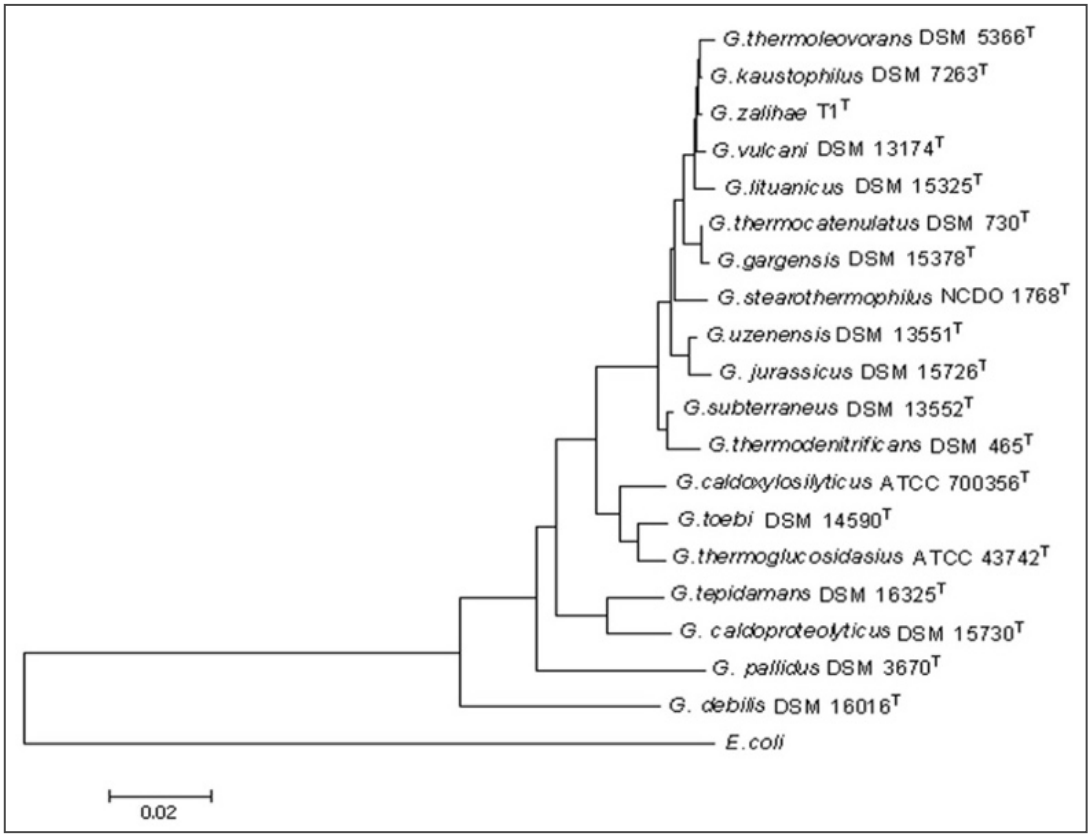
gerektirecek durumlarda bir sınırlama getirmektedir. Belirttiğimiz tüm bu sebeplerden dolayı yeni kaynaklardan uzun vadeli kullanıma sahip, yüksek sağ kalım oranı sağlayan, daha etkili antitümör özelliğinde yeni asparajinlerin bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yüksek sıcaklıkta yaşayan termofilik organizmalar termostabil enzimler için önemli kaynaklardır. Bu kaynaklardan elde edilen enzimler, mezofilik organizmalardan elde edilen enzimlere oranla belirgin olarak aktivitelerini kaybetmeden uzun periyotlarda oda sıcaklığında saklanabilmektedirler. Ayrıca, bu enzimler birçok kimyasal denature edici maddelere karşı direnç göstermektedirler.

2.8. *Geobacillus kaustophilus* Hücresel Yapı ve Metabolizması

Bacillus genusunun sınıflandırılması daha önce *Bacillus* üyesi olarak bilinen birçok türden yola çıkılarak yeni genuslar oluşturularak yapılmıştır. Yapılan 16S rRNA gen dizisi karşılaştırmaları sonucu bu ekstremofillerin çoğunun *Bacillus* ile yakın akraba olduğu anlaşılmış (Şekil 2.6); *Geobacillus* genusuna ait türlerin tayini de yine bu yöntem ile yapılmıştır [Leow et al*.,* 2007].

Pasifik okyanusundaki Maria Çukuru'nun derin deniz sedimentlerinden izole edilen *Geobacillus kaustophilus* (HTA 426) organizmasının optimal büyüme sıcaklığı 60°C ve büyüme için uygun pH aralığı 6.2-7.5 olan termofilik bir bakteridir [Takami et al*.,* 2004]. *G. kaustophilus*'un yaşam alanı akuatik ortamlardır, aynı zamanda bu genusa ait diğer türler petrol rezervlerinin bulunduğu ortamlarda da görülmektedir.

G. kaustophilus, bir membran ve flagellaya sahip olmakla beraber çubuk şekilli yapı gösterir. Hücreler koloni halinde büyüdüğünde dışbükey ve şeffaf bir görüntüye sahiptirler. Bu organizma, aynı zamanda endospor oluşturan, aerobik, Gram (+) bir bakteridir. 1,5 µM x 3,5 µM büyüklüğünde hareket etmeyen, oval ya da silindirik sporları rüzgarla taşınabilir canlıdır (*Bacillus* Stock Center Catalog of Strains). *G. kaustophilus*; 3,54 Mb büyüklüğünde halkasal bir kromozom ve 47.9 kb büyüklüğünde halkasal plazmit DNA'sına sahiptir. Genomun %86'sına denk gelen 3498 adet protein kodlayan dizi bulunur [Takami et al., 2004].



Şekil 2.6: Geobacillus kaustophilus'un Geobacillus cinsinin diğer türlere göre filogenetik yeri.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

2-propanol (C_3H_8O), asetik asit (AcOH), etanol (EtOH), β-Merkaptoetanol (C_2H_6OS), sodyum klorür (NaCl), sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), fenol (C_6H_5OH), kloroform ($CHCl_3$), izoamilalkol ($C_5H_{12}O$), sükroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$), metanol (CH_4O), sodyum dodesil sülfat (SDS), coomassie brillant blue R250, magnezyum fosfat ($MgCl_2.6H_2O$), lityum klorür (LiCl), agaroz, sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$), magnezyum klorür ($MgCl_2$) kimyasalları Merck (Germany) firmasından; ampisilin, Red Safe (Intron), ditiotreitol (DTT), TEMED ($C_6H_{16}N_2$), akrilamid solüsyonu (C_3H_5NO) (%40 elektroforez) Fisher BioReagents (USA) firmasından, trikloroasetik asit (TCA), imidazol ($C_3H_4N_2$), Metoksi-β-naftilamit (MNA), PMSF ($C_7H_7FO_2S$), glikoz ($C_6H_{12}O_6$) kimyasalları Sigma-Aldrich (USA) firmasından; Tritron X-100 ($C_{34}H_{62}O_{11}$), bisakrilamid ($C_7H_{10}N_2O_2$), amonyum persülfat ($(NH4)_2S_2O_8$), glisin ($C_2H_5NO_2$) Applichem (Germany) firmasından; DMSO (C_2H_6OS), sodyum fosfat (NaH_2PO_4), potasyum klorür (KCl) Riedel de Haen (Germany) firmasından; bakto tripton (BD), bakto maya özütü (BD) BD (France) firmasından; Agar ($(C_{12}H_{18}O_9)x$), magnezyum sülfat ($MgSO_4$) Fluka (Switzerland) firmasından; IPTG ($C_9H_{18}O_5S$) MBI Fermentas (USA) firmasından; Ni-NTA agaroz Qiagen (USA) firmasından; EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) Alfa aesar (Germany) firmasından; Tris ($C_4H_{11}NO_3$) Roche (Germany) firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Enzim ve Tamponlar

Lizozim Roche (Germany) firmasından, RNaz A Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) firmasından, *Bam*HI-HF Restriksiyon Endonükleaz, 10X Tampon 4 NEBbiolab (USA), *Nde*I Restriksiyon Endonükleaz NEBbiolabs (USA) firmasından, T4 DNA Ligaz, 1X Ligasyon Tamponu ve DNazI, MBI Fermantas AB (Vilniues, Lithuania USA) firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan Kitler

Mini Plazmit İzolasyon Kiti (High Pure Plasmid Isolation Kit), Roche (Germany) firmasından, Jelden DNA Saflaştırma Kiti (GeneJET^{TM} PCR Purification Kit), Fermentas (USA) firmasından, Analytikjena Biometra (Germany) firmasından, Plazmit izolasyon kiti (ZymoPURE Maxi Prep. Kit) ARDİ medikal (Türkiye) firmasından, Jelden DNA saflaştırma kiti (NucleoSpin, Gel and PCR clean-up kit) Machery-Nagel firmasından, BCA ile protein miktar tayin kiti (PierceTM BCA Protein Assay Kit) Thermo Fisher Scientific firmasından temin edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

+4 ^{o}C ve -20 ^{o}C Buzdolabı (Arçelik), -80 ^{o}C derin dondurucu (Thermo, Forma - 86 ºC ULT Freezer), Steril Kabin (Heraeus, HP48), Masa Üstü Santrifüj (VWR, Microsent 17R), Ultrasantrifüj (Beckman Coulter^{TM} Avanti^{TM} J-30I Centrifuge), Masa Üstü Santrifüj (BACKMAN COULTER, Microfuge 22R), Spektrofotmetre (BIO-RAD, Smartspec 3000), Yatay Elektroforez Sistemi (BIO-RAD, Mini-Sab Cell CT), Güç kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), Otoklav (HIRAYAMA, HİCLA HVE-50), UV Görüntüleme Cihazı (Vilmer Loumart), Dikey Elektroforez Sistemi (Bio-Rad Mini-Sab Cell CT), UV Görüntüleme Cihazı (Azure Biosystem, c600), BioSpec-nano (UV1800 Shimadzu/Biotech), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Su banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), Buz makinesi (BAR-LİNE BF85), Floresans Spektrofotometre (VARIAN, EClipse), UV Spektrofotometre (Beckman Coulter DU 530), Mikrodalga Fırın (Samsung), Western Blot Transfer Tankı (Hoefer TE22), Western Blot Yürütme Tankı (Hoefer SE260), Western Blot Güç Kaynağı (Hoefer RS300 B), Jel Görüntüleme Cihazı (Biorad), AKTA Purifier saflaştırma Cihazı (GE Healthcare, Bioscience).

3.1.5. Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçler

Agaroz jel görüntülemeleri için Moleküler DNA Belirteci (MBI Fermantas, O'GeneRuler^{TM} 1 kb DNA Marker, SM0311); ve SDS-PAGE jel analizinde Moleküler Protein Belirteci (Thermo Fisher Scientific, PageRuler^{TM} Plus Prestained Protein

Ladder 10 to 250 kDa, SM0671 ve BioLab, Protein Ladder 10-250 kDa, P7703S) kullanılmıştır (Şekil A1.1).

3.1.6. Kullanılan Vektörler

pET sistemi *E. coli*'de bulunan rekombinant proteinlerin klonlanması ve ekspresyonu için geliştirilmiş en güçlü sistemdir. Hedef genler, T7 transkripsiyonu ve translasyon sinyallerine sahip güçlü bir bakteriyofajın kontrolü altındaki pET plazmitlerine klonlanır ve ekspresyon konakçı hücredeki T7 RNA polimeraz kaynak sağlanarak indüklenir. T7 RNA polimeraz çok seçici ve aktif proteindir. T7 RNA polimeraz tamamen indüklendiğinde, hücrenin kaynaklarının hemen hepsi hedef gen ekspresyonuna dönüşür. İstenilen ürün ise, indüksiyondan birkaç saat sonra toplam hücre proteinin %50'sinden fazlasını içerebilir. Bu sistem çok güçlü olmasına rağmen, indükleyicinin konsantrasyonunu düşürerek ekspresyon sevisini azaltmak mümkündür. Böylece, hedef proteinlerin çözünülebilirliği arttırılabilir [Web 1, 2006].

Sistemin diğer önemli avantajı, indüklenmemiş durumda transkripsiyonel olarak sessiz hedef genleri korumasıdır. Hedef genler öncelikle, T7 RNA polimeraz geni içermeyen konak hücreye klonlanarak, konak hücreye toksin olan proteinlerin üretiminden dolayı oluşan plazmit kararsızlığı ortadan kaldırılır. Daha sonra hedef protein ekspresyonu, konak hücreye λpL ve pL promotörlerinin kontrolü altında T7 RNA polimeraz genini taşıyan bir faj olan λCE6 enjekte ederek ya da lacUV5 kontrolü altında T7 RNA polimeraz geninin bir kromozomal kopyasını içeren ifade konakçı hücreye transfer edilerek gerçekleştirilir. Ardından, bakteriyel kültüre IPTG veya laktoz eklenerek ya da hücre otoindüsyon ortamında büyütülerek ekspresyon gerçekleştirilir [Web 1, 2006].

pET-22b(+) vektörü, potensiyal periplazmik lokalizasyon için N-terminal pelB sinyal sekansı ve ek olarak C-terminal His-tag sekansı barındırmaktadır. Vektöre klonlanan genler, T7promoter bölgesi barındırdığından dolayı T7 RNA polimeraz tarafından ekspres olmaktadır (Şekil B1.1). pET-22b(+) vektörü *Nde*I/*Bam*HI-HF restriksiyon enzimleri ile kesilerek, vektöre eklenen asparajinaz geninin periplazmik bölgeye çıkışını engellemesini ve sitoplazmik bölgede enzimin açığa çıkmasını sağlamaktadır.

3.1.7. Kullanılan Saflaştırma Materyali

Protein saflaştırmasında HisTrap FF (5 ml) kolonu, kuyruklu proteinlerin immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) sistemi ile kullanılmıştır. HisTrap FF biyouyumlu polipropilenden oluşan ve Ni^{+2} içeren kolondur. Kolonda bulunan Ni^{+2} iyonları, saflaştırılacak hedef proteinlere ekli halde bulunan histidin aminoasitleri ile kovalent olarak bağlanmakta ve 6xHis kuyruğu bağlı proteinlerin kolonda bağlı kalmasını sağlamaktadır. Kolonda tutunmuş proteinler histidin rezidülerine karşı daha yüksek afinite gösteren imidazol içeren elüsyon tamponları ile kolondan indirilmektedir.

3.1.8. Kullanılan Bakteri Soyları

G. kaustophilus ASNaz geninin pET-22b(+) vektörüne klonlama aşamasında kullanılan *E. coli* DH5α hücre hattı ve GkASNaz'ın ekspresyonunu sağlamak amacıyla pET-22b(+)/ASNaz DNA'sının aktarıldığı kompetan *E. coli* BL21 (DE3) hücre hattı GTÜ Müleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Yüksek oranda gen ekspresyonu elde etmek için kullanılan *E. coli* Rosetta™ 2(DE3) hücre soyu Episome Biotech® Şirketinden' den temin edilmiştir. Daha önceki tez çalışmalarında kullanılmak üzere *Bacillus* Stok Merkezinden (Ohio State University, DSM 7263T) temin edilen *G. kaustophilus* mikroorganizması -80 °C stoklarından alınarak kullanılmıştır.

3.1.9. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

Hazırlanan çözeltiler, besiyerleri ve solüsyonlar 121 °C'da 20 dakika süre ile otoklavlanarak sterilize edilmişlerdir.

- Luria Broth (1 L, pH 7.5)
  - Tripton 10 g
  - Maya Özütü 5 g
  - NaCl 10 g karıştırılarak dH_2O ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır.

- SOB Medyum (1 L)
  - Tripton %2
  - Maya Özütü %0,5
  - NaCl 10 mM
  - KCl 2.5 mM
  - $MgCl_2$ 10 mM
  - $MgSO_4$ 10 mM karıştırılarak dH_2O ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır.

- SOC Medyum (1 L): SOB medyuma son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde Glikoz eklenir ve otoklavlanır.
- Ampisilin (5 ml, 100 mg/ml) : 0.5 g Ampisilin dH_2O ile 5 ml'ye tamamlanır. Filtreden geçirilerek sterilize edilir.

- IPTG (100 mM, 10 ml) : 0.238 g IPTG 10 ml dH_2O ile çözülür. Filtreden geçirilerek sterilize edilir.

i) Plazmit İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar:

- STET Tamponu (pH 8.0)
  - Sükroz %8
  - Tritron X-100 %5
  - EDTA 50 mM
  - Tris 50 mM karıştırılarak dH_2O ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır.
  -

- Lizozim (5 ml, 10 mg/ml) : 5 mg Lizozim 10 mM Tris-EDTA (pH 8.0) içinde çözülür.

- Alkali Lizis- Solüsyon I (pH 8.0)
  - Tris 25 mM
  - Glikoz 50 mM
  - EDTA 10 mM karıştırılarakdH_2O ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır.

ii) Transformasyon İçin Kullanılan Solüsyon:

- TSS Tamponu (pH 6.5)
  - PEG (6000 g/mol) %10
  - DMSO %5
  - $MgCl_2$ 50 mM
  -

iii) Ni-NTA Saflaştırma İçin Kullanılan Solüsyonlar :

- Lizis Tamponu (pH 8.0)
  - Sodyum Fosfat Tampon 50 mM
  - NaCl 300 mM
  - İmidazol 5 mM

- Bağlanma Tamponu (pH 7.4)
  - Sodyum Fosfat Tampon 50 mM
  - NaCl 300 mM
  - İmidazol 5 mM

- Elüsyon Tamponu (pH 7.4)
  - Sodyum Fosfat Tampon 50 mM
  - NaCl 300 mM
  - İmidazol 5 mM

iv) Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar :

- 50X TAE Tamponu (1L)
  - Tris 242 g
  - Glasiyal Asetik Asit 57.1 ml
  - 0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 ml

- %0,8'lik Agaroz Jel (40 ml)
  - Agaroz 0.32 g

- RedSafe (10µg/µl stoktan) 3 µl
- 1X TAE Tamponu 40 ml

v) SDS-PAGE İçin Kullanılan Solüsyonlar :

- 4X Örnek Tamponu (Laemmli Tamponu, pH 6.8)
  - SDS %4
  - Gliserol %20
  - β-merkaptoetanol %10
  - Bromofenol Mavisi %0.004
  - Tris HCl 0.125 M

- 10X SDS Yürütme Tamponu (1 L)
  - Tris 151.5 g
  - Glisin 720 g
  - SDS 50 g karıştırılarak dH_2O ile 1 L`ye tamamlanır.

- Coomassie Blue Boyama Solüsyonu
  - Coomassie Blue R-250 1 g
  - Metanol 450 ml
  - Glasiyal asetik asit 100 ml karıştırılarak dH_2O ile 450 ml tamamlanır.

- Boyadan Arındırma Solüsyonu (1L)
  - Metanol 400 ml
  - Glasiyal Asetik Asit 100 ml karıştırılarak dH_2O ile 500 ml tamamlanır.

vi) Western Blot için Kullanılan Solüsyonlar:

- Islak Transfer Tamponu
  - 3.03 gr Tris
  - 144 gr Glisin

–1ml %10 SDS

–%10 metanol karıştırılarak son hacim dH_2O ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır.

- 10X SDS-jel Elektroforez Tamponu

  –30.3 gr Tris

  –144 gr Glisin

  –10 gr SDS karıştırılarak son hacim dH2O ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır. Kullanılırken 1X olarak seyreltilir.

- 10X TBS Tamponu (1L)

  –30 gr Tris

  –80 gr NaCl

  –2 gr KCl karıştırılarak son hacim 1 L'ye dH2O ile tamamlanır pH 8,0 olarak ayarlanır. Kullanılırken 1 X olarak pH 7.6 olarak ayarlanır.

- TBS-Tween Solüsyonu: %0,1'lik Tween-20, 1X TBS solüsyonuna eklenir.

- Bloklama Solüsyonu: %5 (w/v) yağsız süt tozu, %0,1 Tween-20, 1X TBS içerisinde çözülerek taze hazırlanır.

3.2. Yöntemler

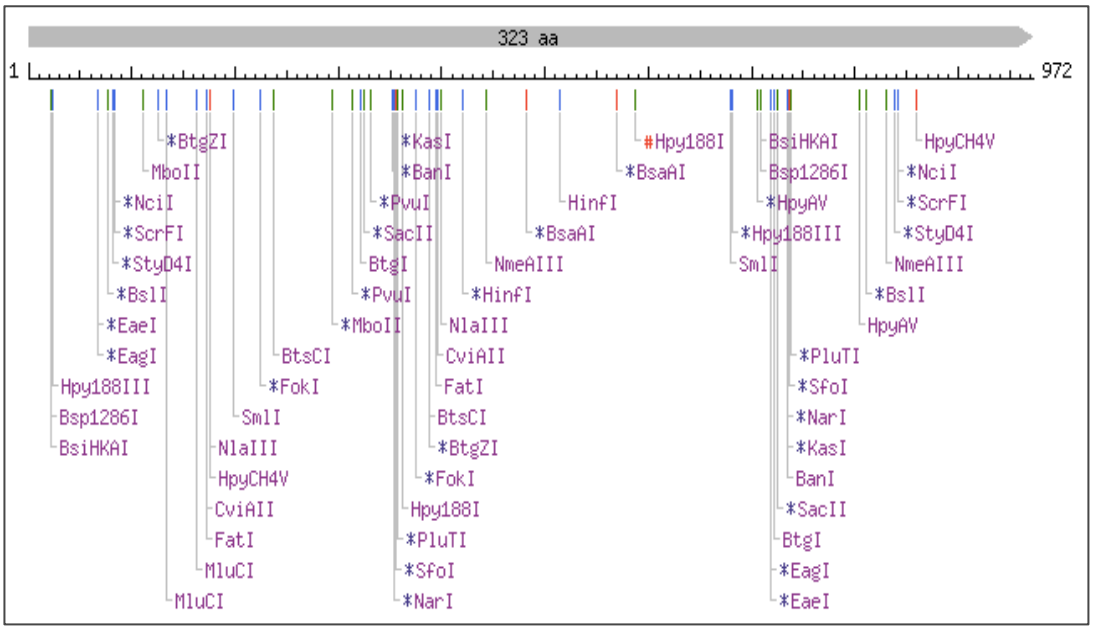
3.2.1. *Geobacillus kaustophilus* Kromozomal DNA İzolasyonu

G. kaustophilus kromozomal DNA'sı, Ronimus ve arkadaşlarının (1997) geliştirdiği yöntem kullanılarak izole edilmiştir. İzolasyondan sonra DNA örnekleri, TE tamponu (pH 6-7) ile doyurulmuş fenol ile 1 kez, fenol: kloroform (1:1, v/v) karışımı ile 2 kez özütleme yapıldıktan sonra 1/10 hacminde 3 M sodyumasetat (pH 5.2) ve %99,9'luk etanol ile çöktürülmüş ve %70'lik alkol ile yıkanmıştır. DNA konsantrasyonu, spektrofotometrik olarak 260 nm'de absorbans ölçümü yapılarak belirlenmiştir. DNA konsantrasyonu 1 A260 ünitesinin 50 μg/ml eşit olduğu kabul

edilerek hesaplanmıştır. Protein içeriği ise OD260/OD280 oranı dikkate alınarak saptanmıştır [Sambrook et al., 1989].

3.2.2. *Geobacillus kaustophilus* Asparajinaz Geninin Restriksiyon Enzim haritasının Çıkartılması

G. kaustaphilus genomundaki (NCBI Gene Databank, NC_006510.1) geninin (*GkASNaz*, GeneID: 3183602) restriksiyon enzim haritası NEBcutter programı ile hazırlanmıştır. Gen dizisinde klonlama içerisinde yer alan fakat gen içerisinde olmayan restriksiyon enzim kesim bölgeleri (*Nde*I-*5'-CATATG-3'* ve *Bam*HI-*5'-CCTAGG-3'*) belirlendikten sonra klonlama ve ekspresyon çalışmaları için uygun vektör seçilmiş ve klonlanacak gen için bu vektörlerin çoklu klonlama bölgelerine eklenmesini sağlayacak ileri ve geri primerler tasarlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: *GkASNaz* geninin restriksiyon enzim haritası.

3.2.3. *Geobacillus kaustophilus* Asparajinaz Geninin PCR ile Çoğaltılması

Klonlama ve ekpresyon çalışmalarında kullanılacak L-asparajinaz genine ait DNA fragmanı, *G. kaustophilus* DSM 7263^T'den elde edilen kromozomal DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. *G.*

kaustophilus HTA 426 genom dizisi (NCBI Gene Databank NC_006510.1) dikkate alınarak 972 bç uzunluğunda olan *GkASNaz* gen dizisini (Gene ID: 3183602) içeren bölgeyi çoğaltmak üzere primerler tasarlanmıştır.

- İleri primer: 5' CGAGCTCATATGGTGACGAAACGGAAA 3'
- Geri primer: 5' CGCGGATCCCTAATAAGCGAACAAGCC 3'

GkASNaz gen dizisinin vektör ile ligasyonu sağlaması için ileri ve geri primerlerin 5' ucuna, kullanılan ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesine uygun şekilde yerleştirmesini sağlayacak *Nde*I ve *Bam*HI-HF restriksiyon endonükleazlarına ait tanıma dizileri (*Nde*I-*5'-CATATG-3' ve Bam*HI-*5'-CCTAGG-3'*) eklenmiştir. Restriksiyon endonükleazların seçiminde kullanılacak enzimlerin *GkASNaz* geninde kesim yapmamasına ve vektörün çoklu klonlama bölgesinde kesim bölgesinin olmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca primer tasarımında primerlerin 5' ucuna enzimlerin kesim aktivitesini arttırmak için eklenen bazlar NEBbiolabs firmasının (Cleavage Close to the End of DNA Fragments) kataloğundan bakılarak seçilmiştir.

PCR reaksiyon karışımı Tablo 3.1'de verilmiştir. Reaksiyon termal döngü (MJ Research INC, PTC-200 USA) cihazında toplam 30 döngü olarak yürütülmüştür. PCR döngüsünde tekrarlanan aşamalar; denatürasyon için 94 ^{o}C'da 1 dakika, primer bağlanması için 60 ^{o}C'da 1 dakika ve polimerizasyon için 72 ^{o}C'da 2 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, başlangıçta 94 ^{o}C'da 2,5 dakikalık denatürasyon döngüsü başlatılmış ve 72 ^{o}C'da 10 dakikalık ek bir polimerizasyon döngüsü ile tamamlanmıştır.

Tablo 3. 1: GkASNaz'nı çoğaltmak için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri.

	STOK KONSANTRASYON	**FİNAL KONSANTRASYON**	**REAKSİYON**
Gk Kromozomal DNA			6 µL
İleri Primer	10 mM	10 µM	5 µL
Geri Primer	10 mM	10 µM	5 µL
$MgCl_2$	25 mM	2,5 µM	10 µL
1X Taq Polimeraz Tampon	10 X	1 X	10 µL
dNTPs	2 mM	0.2 mM	10 µL
Taq Polimeraz		1 U	5 µL
dH_2O			49 µL
Total			100 µL

PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek gözlenmiştir. DNA fragmanlarının büyüklüğü standart olarak 1 kb moleküler DNA belirteci (MBI Fermentas, 1 kb DNA marker, O'GeneRuler™ 1 kb, SM0311) kullanılarak belirlenmiştir (Şekil A1.1). Jel fotoğrafları, Jel Dökümasyon Sistemi (Vilber Lourmat, Germany) kullanılarak görüntülenmiştir. Daha temiz PCR fragmanı elde etmek için; DNA Saflaştırma Kiti (NucleoSpin, Gel and PCR clean-up kit; Machery-Nagel) kullanılarak oluşturulan DNA dizisi artıklardan arındırılmıştır.

PCR ile çoğaltılan *GkASNaz*'a ait DNA fragmanı, %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve jeldeki fragman yaklaşık bir saat 90 V'da elektroforez ile yürütülmüştür. Elektroforez ile büyüklüğü onaylanan DNA fragmanı saflaştırma kiti kullanılarak (NucleoSpin, Gel and PCR clean-up kit; Machery-Nagel) üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde saflaştırılmış ve konsantrasyonu ölçüldükten sonra -20 ^{o}C'da saklanmıştır.

3.2.4. Agaroz Jel Sistemi

Kromozomal DNA, plazmit DNA, PCR amplikonları, restriksiyon enzimleriyle kesilmiş DNA fragmanları 1X TAE tamponu içerisinde %1'lik agaroz jel üzerinde jel elektroforez sistemiyle analiz edilmiştir. Her 10-200 µl DNA örneği için 1/10 hacim 6 X izleme boyası eklenmiş ve bu karışım her 50 ml için 2,5 µl Red Safe (Intron) içeren agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez, 90 voltta 1 saat gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrası, bantlar Azur Biosistem c600 (IDA Yaşam Teknolojileri) ile görüntülenmiştir. DNA fragmanlarının moleküler boyutları, fragmanların jel üzerinde göç mesafesinin 1 kb standart moleküler belirteci (Thermo Fisher Scientific SM 0311) ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

3.2.5. PCR ile Çoğaltılan DNA Fragmanının Klonlanması

PCR'ı takiben elde edilen ürün, agaroz jel elektroforez yöntemiyle büyüklükleri saptandıktan sonra restriksiyon enzimleri ile kesilecek ve preparatif agaroz gel üzerinden izole edildikten sonra vektöre bağlanmaya (ligasyon) hazır hale getirilmiştir. Yapışkan uçlu PCR ürünlerinin, yine aynı enzimlerle kesilmiş vektöre T4 DNA ligaz yardımıyla bağlanması sağlanmıştır. Bağlanma reaksiyonu, daha sonra,

kompetan konakçı *E. coli* hücrelerinin (DH5α, BL21 (DE3) ve Rosetta™ 2(DE3)) transformasyonunda kullanılmıştır. Transforme olan hücrelerin seçimi, ampisilin (50 µg/ml) bulunan büyüme ortamında yapıldıktan sonra, plazmid DNA'lar klonlardan izole edilip, genin varlığı ve vektörün bütünlüğü *GkASNaz* geninin PCR ile çoğaltılması, restriksiyon enzim kesimleri ve dizi analizi yöntemleri kullanılarak doğrulanmıştır.

- PCR ürününün ve Klonlama Vektörünün Ligasyona Hazırlanması:

GkASNaz'ın vektöre bağlanmasını sağlamak amacıyla, ayrı ayrı PCR fragmanları ve pET-22b(+) vektörü *Nde*I/ *Bam*HI-HF restriksiyon enzimleriyle kesilerek yapışkan uçları oluşturulmuştur (sırasıyla Tablo 3.2 ve Tablo 3.3).

Tablo 3.2: GkASNaz PCR fragmanı için hazırlanan restriksiyon endonükleaz reaksiyon bileşenleri.

REAKSİYON BİLEŞENLERİ	**SON KONSANTRASYON**
GkASNaz PCR Ürünü	6500 ng
***Nde*I (NEBbiolabs)**	20 U
***Bam*HI-HF (NEBbiolabs)**	20 U
Tampon 4 (NEBbiolabs)	1 X
dH_2O	1,5 µL
TOPLAM	75 µL

Tablo 3.3: pET-22b(+) vektörü için hazırlanan restriksiyon endonükleaz reaksiyon bileşenleri.

REAKSİYON BİLEŞENLERİ	**SON KONSANTRASYON**
pET-22b(4) Plazmit Ürünü	6500 ng
***Nde*I (NEBbiolabs)**	20 U
***Bam*HI-HF (NEBbiolabs)**	20 U
Tampon 4 (NEBbiolabs)	1 X
dH_2O	1,5 µL
TOPLAM	75 µL

*Nde*Ive *Bam*HI-HFenzimleri ile ortak tampon olan Tampon 4 (NEBbiolabs, Buffer4) içerisinde 37ºC'da inkübatörde 3 saat inkübe edilerek gerçekleşmiştir. Kesim reaksiyonu bittikten sonra reaksiyon ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiş ve moleküler büyüklükleri 1Kb moleküler DNA belirteci ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Restriksiyon endonükleazlarla doğrusal hale getirilmiş pET-22b(+) plazmiti ve PCR ürünü, DNA saflaştırma kiti kullanılarak (NucleoSpin, Plasmid Isolation kit; Machery-Nagel) saflaştırılmıştır. Jelden izole edilen DNA fragmanları klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'da saklanmıştır.

- Ligasyon Protokolü:

*Nde*I ve *Bam*HI-HF restriksiyon endonükleazları ile kesilen *GkASNaz* geni aynı restriksiyon enzimleri ile kesilip doğrusal hale getirilen pET-22b(+) vektörüne aktarılmıştır. Bunun için 2X ligasyon tamponu içerisinde 200 ng pET-22b(+) plazmit DNA'sı, 140 ng PCR fragmanı ve 3U T4 DNA ligaz içeren reaksiyon karışımları +16 ºC'da gece boyunca inkübe edilmiştir. Ligasyon reaksiyonu hazırlanırken insert ve vektör oranları 1:3, 1:5 ve 1:8 olacak şekilde kurulmuş ve hesaplamaları verilen formül baz alınarak yapılmıştır:

$$\left[\text{insert}_{(ng)} = [\text{vektör}_{(ng)} \text{x insert}_{(bç)}] / \text{vektör}_{(bç)}\right] \quad (3.1)$$

- Transformasyon:

Gece boyunca inkübe edilen ligasyon reaksiyonu 16°C'dan alınmış ve 65°C'da su banyosunda 10 dakika bekletilerek reaksiyon durdurulmuştur. Kompetan hale getirilecek hücreler 5 ml sıvı LB'ye ekilmiş ve gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün 100 µl'lik ön kültür, 10 ml'lik taze sıvı LB'ye ekilmiştir. Hücrelerin büyüme miktarları spektrofotometre ile 600 nm'de ölçülerek, istenilen OD değerine (0.4-0.5) gelmesi beklenmiş ve kültür istenilen OD'ye geldiğinde +4 ºC'da 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant atılmıştır. OD ölçümlerindensonra kalan kültür hacminin %10'u kadar TSS eklenmiş ve pelet buz içinde çözüldükten sonra hücreler transformasyon için kullanılmıştır.

Daha önce buzda tutulup soğutulan ependorf tüplere ligasyon reaksiyonundan 10 µl konulduktan sonra yeni hazırlanan kompetan *E. coli DH5a (DE3)* hücrelerinden

50 µl eklenmiştir. Tüpler yavaşça karıştırıldıktan sonra buz da 30 dakika bekletilmiş ve hemen ardından hücrelere 42 ºC'da 30 saniyelik ısı soku uygulanmış ve buzda 2 dakika bekletilmiştir. Her bir tüpe 750 µl SOC medyum eklenip 37ºC'da, 150 rpm'de 80 dakika inkübe edilmiştir. Transformasyonun ardından seyreltilen hücreler LB/Ampisilin (50 µg/ml amp) içeren besiyerine tek koloniler elde etmek üzere ekilmişlerdir. 37 ºC'da gece boyu inkübasyonun ardından LB/Ampisilin (50 µg/ml amp) içeren besiyerinde üreyen olası rekombinant hücreler toplanmış ve yeni ortama çizilerek saf kültür hazırlanmıştır. Bu kültürlerden miniprep yöntemi ile plazmit izolasyonu yapılmış ve elde edilen plazmitler *Nde*I ve *Bam*HI-HF restriksiyon endonükleazları ile kesilerek rekombinant plazmiti içeren koloni tespit edilmiştir [Sambrook et al., 1989].

3.2.6. Rekombinant Kolonilerden Plazmit İzolasyonu

pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmitini taşıyan rekombinant koloniden Plazmit İzolasyon Kiti (NucleoSpin, Plasmid Isolation kit; Machery-Nagel) kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen rekombinant plazmitler uygun restriksiyon endonükleazlar (*Bam*HI-HF-*Nde*I) ile kesilerek irdelenmistir. Agaroz jel elektroforezi ile doğrulanan, *GkASNaz* genini taşıyan pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmiti, ekspresyon ve saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.7. Asparajinaz Geninin pET-22b(+)/*GkASNaz* Plazmitindeki Varlığının İspatlanması

Plazmite klonlanan *GkASNaz* geninin vektör üzerindeki varlığı; enzim kesim reaksiyonu, genin PCR ile çoğaltılması ve nükleotid dizileme ile doğrulanmıştır.

- Rekombinant Kolonilerin Colony PCR ile Seçimi:

ASN genin vektör üzerinde varlığının ispatlanması için, olası pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmiti DNA kalıp olarak kullanılarak gen PCR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Reaksiyonda primer olarak GkASNaz için tasarlanan ileri ve geri primerler kullanılmış; reaksiyon miktarı Tablo 3.4'te belirtilmiştir.

Tablo 3.4: Rekombinant plazmitler için hazırlanan PCR reaksiyonu.

PCR BİLEŞENLERİ	SON KONSANTRASYON
pET22b-(+)/*GkASNaz*	100 ng
İleri Primer	2 µM
Geri Primer	2 µM
$MgCl_2$	0,2 mM
1X Taq Polimeraz Tampon	2,5 mM
dNTPs	1 X
Taq Polimeraz	2,5 U
dH_2O	10,5 µL
TOTAL	20 µL

30 kez tekrarlanan PCR döngüsündeki aşamalar şöyledir; denatürasyon için 94 ^oC'da 1 dakika, primer bağlanması için 60 ^oC'da 1 dakika ve polimerizasyon için 72 ^oC'da 2 dakika. Reaksiyon, başlangıçta 94 ^oC'da 2,5 dakikalık denatürasyon döngüsü ile başlatılmış ve 72^oC'da 10 dakikalık ek bir polimerizasyon döngüsü ile tamamlanmıştır.

- Rekombinant pET-22b(+)/*GkASNaz* Plazmitinin Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi:

İzole edilen plazmitlerin geni taşıdıkları tek (*Nde*I veya *Bam*HI-HF) veya çift (*Nde*I ve *Bam*HI-HF) restriksiyon enzim kesimleri ile belirlenmiştir. Tek enzim kesimleri için plazmit DNA'sı, 10X CutSmart tampon (Neb3, Biolab), 20 U *Nde*I veya 20 U *Bam*HI-HF (Neb, BioLab) endonükleaz içeren 10µl'lik reaksiyon karışımı 37 °C'da 3 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Çift enzim kesim reaksiyonu için olası plazmit DNA'sı, 10 X CutSmart tampon (Neb3, Biolab), 20 U *Nde*I ve 20 U *Bam*HI-HF endonükleaz enzimleri içeren 10 µl'lik reaksiyon 37 °C'da 3 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Enzim kesimleri, reaksiyon bittikten sonra karışım %1'lik agaroz jele moleküler DNA belirteci ile karşılaştırılarak görüntülenmiştir.

- Klonlanan Asparajinaz Geninin Nükleotit Dizininin Belirlenmesi:

E. coli Rosetta^{TM} 2(DE3) hücrelerine transforme edilen pET-22b(+)/*GkASNaz* rekombinat plazmitindeki *ASNaz* geninin nükleotid dizisi, IONTEK firmasına yaptırılan analiz ile belirlenmiştir. Universal T7 promoter ve T7 Terminator primerleri

kullanılarak yapılan dizi analizleri sonucunda *GkASNaz* geninin pET-22b(+) vektörüne doğru bir biçimde (in frame) yerleşip yerleşmediğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Aynı zamanda klonlanan *G. kaupstophilus* DSM 7263T asparajinaz gen dizisinin Takami ve arkadaşları (2004) tarafından rapor edilen *G. kaustophilus* genomundaki (NCBI Gene Databank NC_006510.1) gen dizisi ile uygunluğunun belirlenmesi hedeflenmiştir.

• pET-22b(+)/*GkASNaz* Rekombinant Plazmitin *E. coli* Rosetta™ 2(DE3) Hücrelerine Transforme Edilmesi:

E. coli DH5a hücrelerinden izole edilen pET-22b(+)/*GkASNaz* DNA'sı *ASNaz* geninin ekspresyonu için uygun konakçı olan *E. coli Rosetta™* 2 (DE3) hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon için bölüm 3.2.5'de anlatılan Chung ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem (1989) kullanılarak *E. coli* Rosetta™ 2(DE3) hücreleri kompetan hale getirilmiştir. Kompetan hücrelere pET-22b(+)/*GkASNaz* DNA'sının aktarımı ısı şoku transformasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Gece boyu büyütülen transformant *E. coli* Rosetta™ 2(DE3) hücrelerinden olası klonlar seçilmiştir.

Seçilen *Rosetta* hücrelerinin *ASN* genini taşıdıkları tek (pET-22b(+)/*GkASNaz* *Bam*HI-HF ya da *Nde*I) ve çift (pET-22b(+)/*GkASNaz* *Bam*HI-HF ve *Nde*I) restriksiyon endonükleaz kesimleri ile belirlenmiştir. Tek enzim kesimleri için pET-22b(+)/*GkASNaz* DNA'sı, 2X tampon (Buffer4), 20 U endonükleaz *Bam*HI-HF içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımı 37 °C'da 2 saat boyunca kesilmiştir. Çift enzim kesimlerinde ise pET-22b(+)/*GkASNaz* DNA'sı 2X Buffer 4, 20 U endonükleaz *Bam*HI-HF, 20 U endonükleaz *Nde*I içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımı 37 °C'da 2 saat inkübe edilmiştir. Kesim reaksiyonları sona erdikten sonra reaksiyon karışımı %1'lik agaroz jele 1 kb moleküler DNA belirteci varlığında yüklenmiş ve klonlamanın doğruluğu enzim kesimleri ile de kesinleştirilmiştir.

3.2.8. Asparajinaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

E. coli DH5α hücrelerinden izole edilen rekombinant pET-22b(+)/*GkASNaz* DNA'sı ekspresyonu için daha uygun konakçı olan *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarılmıştır ancak bu hücrelerde ekspresyon gözlenmemiştir. Bundan sonraki ekspreson deneyleri için başka bir konakçı olan *E. coli* Rosetta™ 2(DE3) hücreleri kullanılmıştır. Transformasyon işlemleri için bölüm 3.2.5'de anlatıldığı şekilde

hazırlanmış kompetan *E. coli* Rosetta^{TM} 2(DE3) hücreleri Chung ve arkadaşlarının geliştirdiği ısı şoku yöntemi (1989) kullanılarak pET-22b(+)/*GkASNaz* DNA'sı ile transforme edilmiştir. Gece boyu büyütülen transformant *E. coli* Rosetta^{TM} 2(DE3) hücrelerinden olası rekombinant klonlar seçilmiştir. Bu seçilen klonlar daha önce belirtilen şartlarda restriksiyon enzimleri kullanılarak gen bütünlüğünün doğrulaması yapılmıştır.

- Rekombinant Asparajinaz Enziminin Ekspresyonu:

Asparajinaz enzimin ekspresyonu için pET-22b(+) plazmiti üzerinde *GkASNaz* genini içeren rekombinant *E. coli* Rosetta^{TM} 2(DE3) hücreleri ampisilin (50 µg/ml amp) içeren sıvı LB besiyerinde gece boyu büyütüldükten sonra 1/50 oranında taze LB besiyerine ekilmişlerdir. İkincil kültürler 37 ^{o}C`ta, 200 rpm`de, optik yoğunlukları 600 nm`de 0.6`ya gelene kadar büyümeye bırakılmışlardır. İstenen OD değerine ulaşan kültürler son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde izopropil-1-thio-β-D-galaktozit (IPTG) ile uyarılarak 4 saat büyütülmüştür. 4. saat sonunda hücre kültürleri toplanarak +4°C`ta, 4000 rpm`de, 20 dakika santrifüj ile çöktürülmüştür. Hücre peletleri, saflaştırma için hazırlanmıştır.

Kontrol grubu olarak *E. coli* Rosetta^{TM} 2(DE3) hücreleri, ASNaz geni içermeyen pET-22b(+) plazmiti ile transforme edilmiştir ve benzer şekilde 1 mM IPTG ile uyarılarak 4 saat büyütülmüştür. Kültürlerin IPTG ile uyarılmasından önceki ve sonraki protein ekspresyon profilleri %12`lik SDS- PAGE`de gözlenmiştir.

- Hücre Özütü Hazırlanması:

Hücre peletleri saflaştırmaya sonikasyon ile hazırlanmıştır. Peletler 1/10 oranında liziz tamponunda (pH 7.4 50 mM Sodyum fosfat tamponu, 300 mM NaCl and 10 mM Imidazole) çözdürülmüştür. Hücre çözeltisi üzerine 1 mg/ml lizozim eklenerek karıştırılmış ve buz içerisinde 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda hücreler, aralarında 15`er saniye soğutma süresi olan 20`şer saniyelik 8 sonikasyon prosedürü ile parçalanmıştır. Homojenat, 13000 g`de +4 $^{o}$C`ta 45 dakika santrifüj edilerek hücre kalıntıları uzaklaştırılmış ve üst sıvı steril şişelere alınarak -20 ^{o}C`ta saflaştırma işlemleri için saklanmıştır. 6xHis-GkASNaz proteinlerini içeren hücre özütleri %12`lik SDS-PAGE'de görüntülenmiştir.

• Asparajinaz Enziminin Saflaştırılması:

Yüksek oranda eksprese edildiği saptananan ve C-terminalinde ilave olarak 6xHis rezidü içeren *G. kaustophilus* TipII L-asparajinaz (GkASNaz) proteini bir immobilize metal afinite kromatografi yöntemi (IMAC) olan Ni-NTA afinite kromatografisi (GE Healtcare Bioscience, AKTA purifier) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma metodu firmanın belirlediği koşullar altında, proteinler 5 ml'lik HisTrap FF kolonu ile yapılmıştır. Sistem %20 etanol ile daha sonra ultra saf su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından kolon, 5 kolon hacminde, 5 ml/min akış hızında 40 mM imidazol içeren bağlanma tamponu (pH 7.4) ile dengelenmiştir. Örnekler cihaza yüklenmeden önce 0.45 µM'lik membrandan geçirilerek filtrelenmiş; ardından kolona yüklenmiştir. Kolona bağlanmayan proteinler 10 kolon hacminde bağlanma tamponuyla yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Kolona bağlanan 6xHis kuyruklu GkASNaz proteinleri, 500 mM imidazol içeren elüsyon tamponu (pH 7.4) ile ayrıştırılarak; 0.5 ml'lik fraksiyonlar halinde cam tüplerde toplanmıştır. Tüplerde toplanan protein konsantrasyonları 280 nm absorbansta kontrol edilmiştir. Aynı zamanda toplanan proteinler %12'lik SDS-PAGE üzerinde analiz edilmiştir. Protein varlığı tespit edilen elüsyon fraksiyonları bir araya getirilerek hacmin yaklaşık 3 katı 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponu ile 10 000 MWCO ultrafiltrasyon falkonları (Vivaspin 15R, Sartorius Stedim Biotech, Germany) kullanılarak +4 ^{o}C'da tampon değişimi yapılmış ve konsantre edilmiştir. Elde edilen proteinler -20 ^{o}C'da saklanmış. Protein konsantrasyonu BCA kit (Pierce^{TM} BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) ile hesaplanmıştır.

3.2.9. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) %0,1 aniyonik deterjan SDS varlığında, Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %12 ayırma jeli ve %5 yükleme jeli üzerinde gerçekleştirilmiştir. Dikey jel elektroforezi için Bio-Rad Mini-Slab Cell CT (Bio-Rad Laborataries INC, USA) kullanılmıştır.

15 µl enzim örnekleri %1 SDS içeren 4X örnek tamponu ile karıştırılarak kaynar suda 5 dakika bekletilmişlerdir. Daha sonra protein örnekleri moleküler ağırlık belirteçi (Invitrogen, BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder) ile birlikte jele yüklenmiştir ve jel 90 V'da yürütülmüştür. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel

Coomassie Brillant Blue-R250 ile boyanmış ve daha sonra boyadan arındırma çözeltisi ile birkaç kez yıkanarak boyadan arındırılmıştır. Proteinlerin oluşturduğu bantlar moleküler ağırlık belirtecindeki ağırlığı bilinen protein bantları ile karşılaştırılmış ve proteinlerin moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Her proteinin göreceli mobilitesi (Rf) ayırma jelinin en üst noktasından protein bandının merkezine kadar olan mesafe ile ölçülmüştür.

3.2.10. Western Blot Analizi

pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmitini taşıyan Rosetta™ 2(DE3) hücrelerinde GkASNaz proteini içerip içermediğini görmek amacıyla Western Blot analizi üniversitemizin Biyolojik Saat laboratuvarı'nda yaptırılmıştır. Analiz, eşit hacimde 20 µl olarak alınan örnekler aynı hacimde %5 β-merkaptoetanol içeren 5X SDS jel elektroforez tamponunda 100 °C'da 5 dakika maruz bırakılmış ve 2 dakika buzda inkübasyona yapılarak 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Her 2 örnekte SDS jel elektroforezinde 30 dakika 90 V ve sonrasında 120 dakika 120 V'da yürütülmüştür. Elde edilen jel İmmobilon-P PVDF transfer membranına (0.45 µm, Millipore MA, USA) 70 dakika 400 mA'de transfer edilmiştir. Transfer edilen membran %0.01 TSB-Tween içeren %5 yağsız süt tozunda +4 °C'da gece boyu inkübasyona bırakılarak bloklama yapılmıştır. Ertesi gün membrana birincil antikor olan Anti-his anti-mouse monoclonal antikor (Sigma-aldrich) eklenerek 2 saat boyunca 100 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon yapılmış, bu sürenin sonunda %1'lik TSB-Tween solüsyonunda 4x10 dakika (5 dakika, 15 dakika, 5 dakika, 5 dakika) yıkama yapılmıştır. İlk yıkamanın ardından ikincil antikor olan anti-mouse IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling) eklenerek +4 °C'da 2 saat 100 rpm'de inkübasyona bırakılmış, bu sürenin sonunda 3x10 dakika (5 dakika, 5 dakika, 5 dakika) olacak şekilde %1'lik TSB-Tween solüsyonunda yıkama yapılmıştır. Örnekler Signal FireTM ECL Reagent çözeltisinden 1:1 eklenerek görüntülenmiştir.

3.2.11. MALDI-TOF Kütle Spektrometre Analizi

Saflaştırılan GkASNaz'ın moleküler ağırlığı MALDİ TOF MS analizi ile belirlenmiştir. Bu analiz üniversitemizin Kimya Bölümünde Kütle Analiz Laboratuvarı'nda yaptırılmıştır.

3.2.12. BCA Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Aktivite deneylerinde kullanılacak olan saflaştırılan protein miktarı BCA (Bicinchoninic asit) yöntemi ile PierceTM BCA Protein Assay Kit kullanılarak tayin edilmiştir. Elde edilen protein örneklerinden 20 µl 96 kuyulu mikroplate plakasına konulmuştur. Taze hazırlanmış 50 hacim solüsyon A ile 1 hacim solüsyon B karıştırılarak oluşturulan BCA solüsyonundan 200 µl her bir örnek üzerine eklenmiştir. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda (1-20 g) kit içinde bulunan sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. 37 ºC`ta 30 dakika inkübasyona bırakılan örnekler 562 nm dalga boyunda eliza okuyucu (Elx800, Universal Microplate Reader, Biotek. İns.) ile ölçülmüştür. Örnekler içindeki protein miktarları BSA standartlarından elde edilen değerlere göre çizilen standart eğriye dayanarak hesaplanmıştır.

3.2.13. Saflaştırılan *Geobacillus kaustophilus* Asparajinaz Enziminin Biyokarakterizasyonu

- Enzim Aktivite Tayini

L-asparginaz enziminin aktivitesi Nessler reaksiyonu ile ölçülmüştür. Nesslerizasyon olarak adlandırılan bu yöntem ile doğrudan amonyak tayini yapılmıştır [Imada et al., 1973]. Toplam reaksiyon karışımı 400 µM olacak şekilde farklı miktarlardaki enzim örnekleri, 50mM Tris tamponu (pH 8.0) içerisinde 5 mM L-asparajin ile 55 ºC'da farklı zaman aralıklarında inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyonlar 150 µl 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) ilavesi ile durdurulmuş ve çöken proteinler 12000 g' de santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Elde edilen berrak süpernatant Nessler reaksiyonu için kullanılmıştır. Nessler reaksiyonu için 1400 µl distile su ve 150 µl süpernatant, 200 ul Nessler ayracı ile karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra açığa çıkan amonyak miktarı 450 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede (Beckman Coultre, DU530) ölçülmüştür. Bir ünite (U)

yukarıda belirtilen koşullar altında dakikada 1 µmol amonyak açığa çıkaran L-asparajinaz aktivitesi olarak tanımlanmaktadır [Zuo et al., 2014]. Enzim aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Enzim Aktivitesi (unit/ul)} = [NH_3\ (uM)x(\text{reaksiyon hacmi})\ ]/$$
$$[\ (\text{supernetant hacmi})x(\text{reaksiyon süreci})x(\text{enzim miktarı})] \quad (3.2)$$

Biyokimyasal karaktarizayon çalışmalarında her bir deney en az üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar 3 deneyin standart sapması (± S.E) olarak gösterilmiştir (Şekil C1.1).

- Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Saflaştırılan enzimin optimum reaksiyon sıcaklığını belirlemek için GkASNaz enzim aktivitesi yukarıda belirtilen standart koşullarda (pH 8.0) 30-70 ^oC sıcaklık aralığında test edilmiştir.

- pH'ın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzimin optimum pH'sı farklı pH değerlerinde tamponlar kullanılarak belirlenmiştir. Bu tamponlar; pH 4-6 aralıklarında 50 mM asetat tamponu, pH 5-7 aralığında 50 mM sodyum fosfat tamponu pH 7-9 aralığında 50 mM Tris-HCl tamponu, pH 9-11 aralığında 50 mM Glisin-NaOH tamponudur. Enzim belirtilen tamponlar içinde 5 mM L-asparajin ile 55 ^oC'da 10 dakika inkübe edilmiş ve açığa çıkan amonyak yukarıda belirtilen Nessler reaksiyonu ile ölçülmüştür. Aynı şekilde gerçekleştirilen fakat enzim içermeyen reaksiyonlar kontrol olarak kullanılmıştır. Enzimin pH kararlılığını belirlemek amacıyla enzim farklı pH'lara sahip tamponlarda 60 dakika inkübe edildikten sonra kalan enzim aktivitesi 55^oC'da standart koşullarda ölçülerek belirlenmiştir.

- Enzimin Glutaminaz Aktivitesi

GkASNaz'ın glutaminaz aktivitesi substrat olarak L-glutamin kullanılarak Nessler reaksiyonu ile belirlenmiştir. Enzim tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) içerisinde 2,5 µl enzim farklı konsantrasyonlardaki 5 mM L-glutamin ilavesi ile

55ºC'da 10 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonucu L-glutamik asit ile birlikte açığa çıkan amonyak miktarı yukarıda belirtilen Nessler reaksiyonu ile belirlenmiştir.

- Asparajinazın Kinetik Analizi

Substrat konsantrasyonunun saflaştırılan GkASNaz aktivitesinin L-asparajin üzerine etkisini belirlemek amacıyla enzim, 50 mM Tris tamponu (pH 8.5) içeresinde farklı konsantrasyonlarda (0.5-20 mM) L-asparajin ve L-glutamin ile ayrı ayrı 55ºC'da 10 dakika inkübe edilmiştir. Her bir reaksiyonda enziminin aktivitesi Nessler reaksiyonu ile ölçülmüştür. Belirlenen aktivite değerlerinden yararlanılarak Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiş ve saflaştırılan enziminin Vmax (maksimum hız) ve Km (Michaelis sabiti) sabitleri belirlenmiştir.

- Asparajinaz Aktivasyonunun Metal İyon Profili

Çeşitli metal iyonlarının ($BaCl_2$, $CaCl_2$, $CdCl_2$, $CoCl_2$, $CuSO_4$, $FeCl_3$, KCl, $LiCl_2$, $MgSO_4$, $MnSO_4$, NaCl ve $ZnSO_4$) enzim aktivitesine etkisini belirlemek için metal iyonları son konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde enzim tamponuna ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra enzim reaksiyonu 5 mM L-asparajinin ilavesiyle 55ºC'da daha önce belirtilen standart deney koşullarında gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi, metal iyonu içermeyen reaksiyon sonucu oluşan aktivitenin yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

- Çeşitli Efektör ve Modülatörlerin Asparajinaz Üzerine Etkisi

Asparajinaz aktivitesi çeşitli deterjanların ve modülatörlerin farklı konsantrasyonlarda (0,5 mM beta-merkaptaetanol, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0,5 mM DTT, 2,5 mM SDS, %1 Triton X-100, %1 Tween20 ve 2,5 mM Urea) varlığında belirlenmiştir. Çeşitli oranlardaki deterjan ve modülatörler direk olarak 2,5µl saflaştırılmış enzime ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra enzim reaksiyonları standart deney şartlarında gerçekleştirilmiştir. Göreceli aktivite bileşikler ile inkübe edilmiş enzimin etkinliği, muamele edilmemiş olan enzime oranı olarak ifade edilmiştir.

- Enziminin Antiproliferasyon Etkisi
  - Hücre Çözme İşlemi ve Alt Kültürleme:

Saflaştırılan L-asparajinazın antiproliferasyon etkisini belirlemek amacıyla iyi diferansiye HEP3B ve az diferansiye SNU387 hepatosellular karsinom hücre hatları kullanılmıştır. Sıvı azot tankından alınan hepatoselüler Hep3B ve SNU-387 hücre hatları oda sıcaklığında geldiğinde, üzerine yavaşça %10 fetal dana serumu, %1 penisilin-streptomisin ve 8 mM L-Glutamin ile desteklenen besiyeri (Hep3B için DMEM ve SNU-387 için RPMI1640) eklenmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, her bir kuyucuğa SNU387 için $7,5x10^3$ hücre ve Hep3B için $1,0x10^4$ hücre gelecek şekilde dilüye edilip 16-kuyulu bir elektronik mikrotitrasyon plakasına (E-plate, ACEA) 50 µl eklenip sisteme konulmuştur ve hücre kültürü 37°C'da %5 CO_2 varlığında 24 saat inkübe edilmiştir.

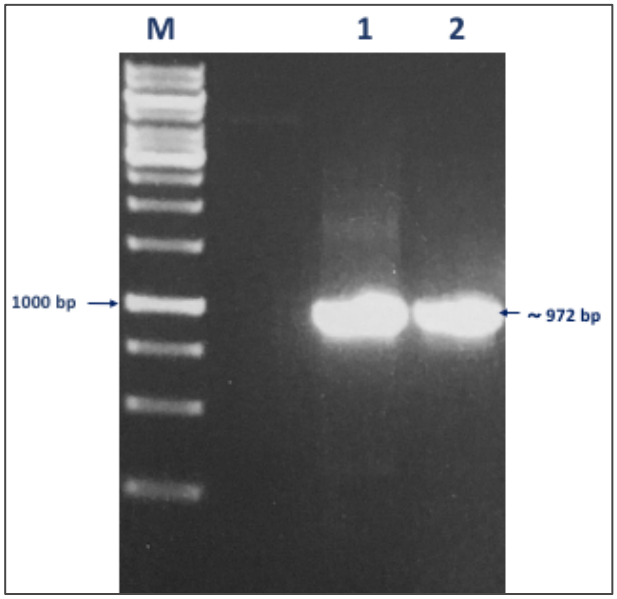
  - Hücre Proliferasyon Analizi:

GkASNaz'ın hücre proliferasyonunun üzerine etkisinin araştırılması için, farklı dozlarda enzim hücre hatlarına uygulanmış ve proliferasyon analizleri impedans-temelli xCELLigence RTCA DP Analyzer (ACEA Bioscienses, ABD) sistemi kullanılarak yapılmıştır. Etkin enzim konsantrasyonunun belirlenmesi için, 24 saat inkübe edilen SNU387 ve Hep3B hücreleri üzerine 50 µL besiyeri içinde son konsantrasyonları 0 ile 4,32µg/ml arasında değişen miktarlarda saflaştırılmış GkASNaz eklenmiş ve 37°C'da %5 CO_2 varlığında 96 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler sayısındaki artış kuyucuklarda bulunan elektronik sensörler tarafından algılanarak, veriler gerçek-zamanlı olarak cihaz tarafından her 15 dakikada bir kaydedilmiştir. Her bir kuyuda bulunan hücre sensörünün direnci, hücre indeksi olarak adlandırılmaktadır. Hücre indeksi, hücrenin bulunduğu kuyunun elektrotunun direncinden (Rn), yalnızca besiyeri bulunan kontrol kuyusu elektrotunun direncinin (Rb) çıkarılıp 15'e bölünmesi ile hesaplanmaktadır (Hücre indeksi= (Rn-Rb) /15).

4. BULGULAR

4.1. Asparajinaz Geninin *Geobacillus kaustophilus*'dan PCR ile Çoğaltılması

G. kaustophilus DSM 7263T'e ait olan L-asparajinaz geni, *G. kaustophilus* HTA 426 genom dizisine göre hazırlanan ileri ve geri primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Şekil 4.1'de gözlemlendiği gibi, 130 ng/µl kalıp DNA kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucunda 60 °C tutunma sıcaklığında ~972 bç uzunluğunda özgül bir *GkASNaz* fragmanı gözlemlenmiştir.

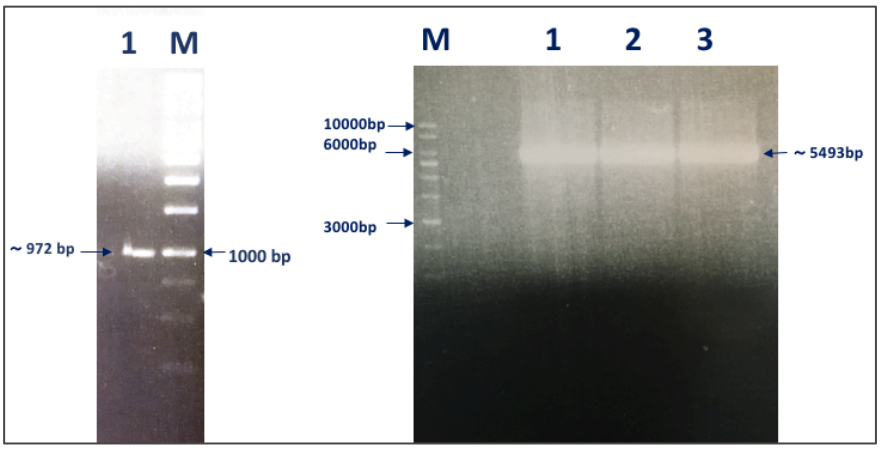


Şekil 4. 1: PCR ile çoğaltılan asparajinaz geninin %1'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.

4.2. PCR Ürününün ve Vektörün Ligasyona Hazırlanması

PCR ile çoğaltılan ~972 bç *Gk-ASNaz* geni doğrudan T7 promoter'ının alt bölgesine C-terminalde His6 olacak şekilde pET-22b(+) ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Bu amaçla, yapışkan uçlar oluşturmak için sırasıyla 5' ve 3' uçlarında *Nde*I ve *Bam*HI-HF enzim kesim bölgeleri içeren *GkASNaz* fragmanı ve geninin

klonlanması için kullanılan ~5493 bç uzunluğundaki pET-22b(+) ekspresyon vektör DNA'sı aynı enzimlerle kesilerek doğrusal hale getirilmiş ve daha sonra kit aracılığıyla jelden saflaştırılarak ligasyona hazırlanmıştır (Şekil 4.2).

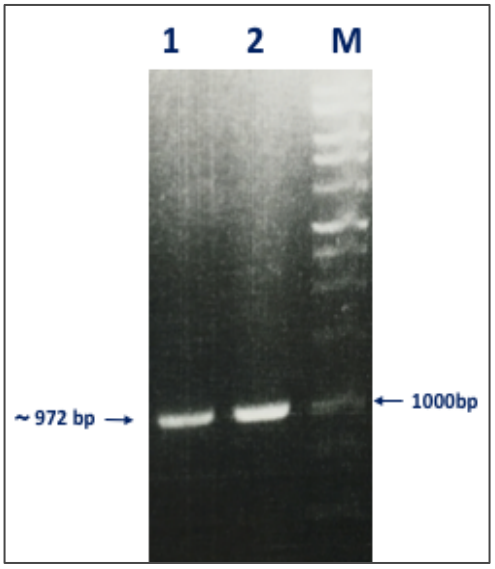


Şekil 4.2: Ligasyon için hazırlan insert ve vektörün %1'lik agaroz jel görüntüsü A) 1: NdeI ve BamHI-HF ile kesilen ve jelden saflaştırılan *GkASNaz* gen fragmanı, B) 1-3: NdeI ve BamHI-HF ile kesilen ve jelden saflaştırılan doğrusal pET-22b(+) vektör DNA'sı. M: DNA belirteci.

4.2.1. Transformasyon ve Transformantların Seçimi

*Nde*I ve *Bam*HI-HF restriksiyon enzimleri ile kesilerek 5' ve 3' uçlarında yapışkan uçlar oluşturulan ~972 bç uzunluğundaki asparajinaz gen fragmanı, yine aynı enzimlerle kesilerek klonlama için hazır hale getirilen ~5493 bç uzunluğundaki ekspresyon vektörüne ligasyon ile bağlanmıştır. Ligasyon ürünü taze olarak hazırlanmış *E. coli* DH5α kompetan hücrelerine steril ortamda ve buz üzerinde yapılan çalışma ile aktarılmıştır. Transformasyonun negatif kontrolü için doğrusal pET-22b(+) plazmiti, pozitif kontrolü için ise halkasal formda bulunan pET-22b(+) plazmiti kullanılmıştır. Transformasyon işlemi sonunda, tüm hücreler ampisilinli besi yerlerine aktarılmıştır ve petriler 37°C'da büyümeye bırakılmıştır. Gece boyu inkübe edilen petrilerde negatif kontrolde hiç koloni olmadığı, pozitif kontrolde ise ~20 koloni olduğu tespit edilmiştir. Ligasyon ürününün bulunduğu petride ise 20 olası rekombinat koloni sayılmıştır. Ampisilin içeren LB besi yerinde büyüyebilen *E. coli* DH5α hücre kolonilerinin rekombinant plazmit içerip içermediklerinin saptanması için koloni PCR yöntemi uygulanmıştır ve PCR sonuçları %1'lik agaroz jel elektroforezi ile

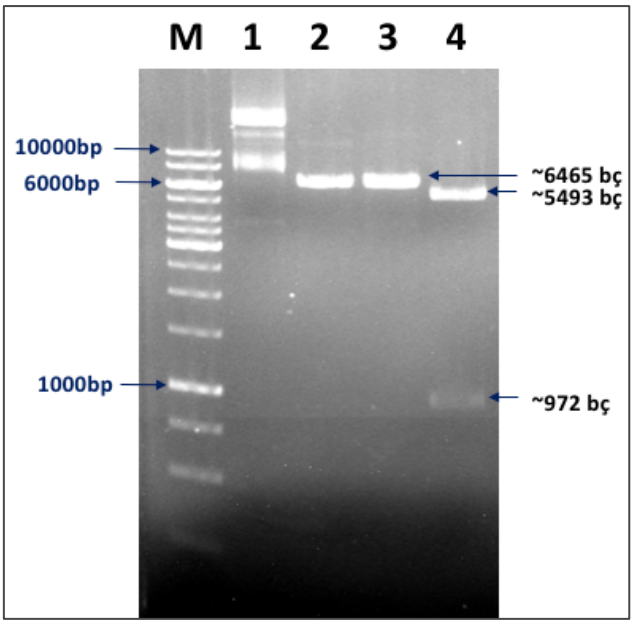
görüntülenmiştir (Şekil 4.3). pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmiti taşıdığı öngörülen koloniler ile yapılan PCR sonucu L-asparajinaz geni yaklaşık 972 bç uzunluğunda amplikon verdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3: Koloni PCR sonuçlarının %1'lik agaroz jelde görüntüsü. 1-2: pET-22b(+)/GkAsnaz içeren koloni PCR ürünleri; M: DNA belirteci.

4.2.2. Rekombinant pET-22b(+)/*GkASNaz* Vektörünün Doğruluğunun Belirlenmesi

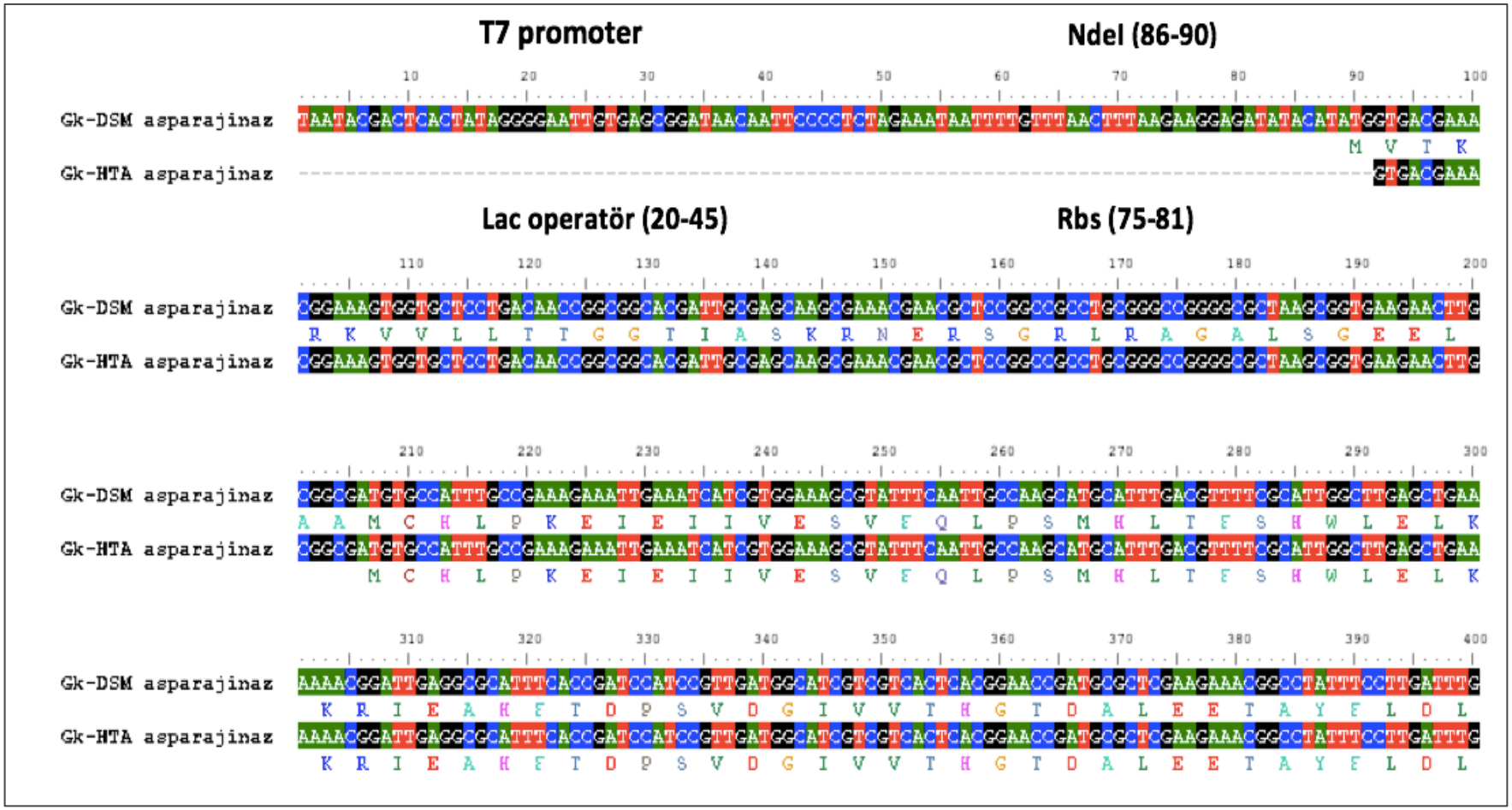
Koloni PCR sonucu rekombinant pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmidini taşıdığı doğrulanan kolonilerden plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen rekombinant plazmidin asparajinaz genini taşıyıp taşımadığı aynı zamanda *Nde*I ve *Bam*HI-HF restriksiyon endonükleaz kesimleri ile de doğrulanmıştır. Buna göre Şekil 4.4'de görüldüğü gibi pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmidinin *Nde*I ve *Bam*HI-HF restriksiyon enzimleriyle ayrı ayrı tek kesim reaksiyonları neticesinde beklenen büyüklükte (~6465 bç) bir fragman gözlenirken, aynı vektörün aynı enzimlerle çift kesim reaksiyonu neticesinde yaklaşık ~972 bç uzunluğundaki *GkASNaz* geni ve yaklaşık 5493 bç uzunluğundaki doğrusal pET-22b(+) vektörü agaroz jelde görüntülenmiştir.



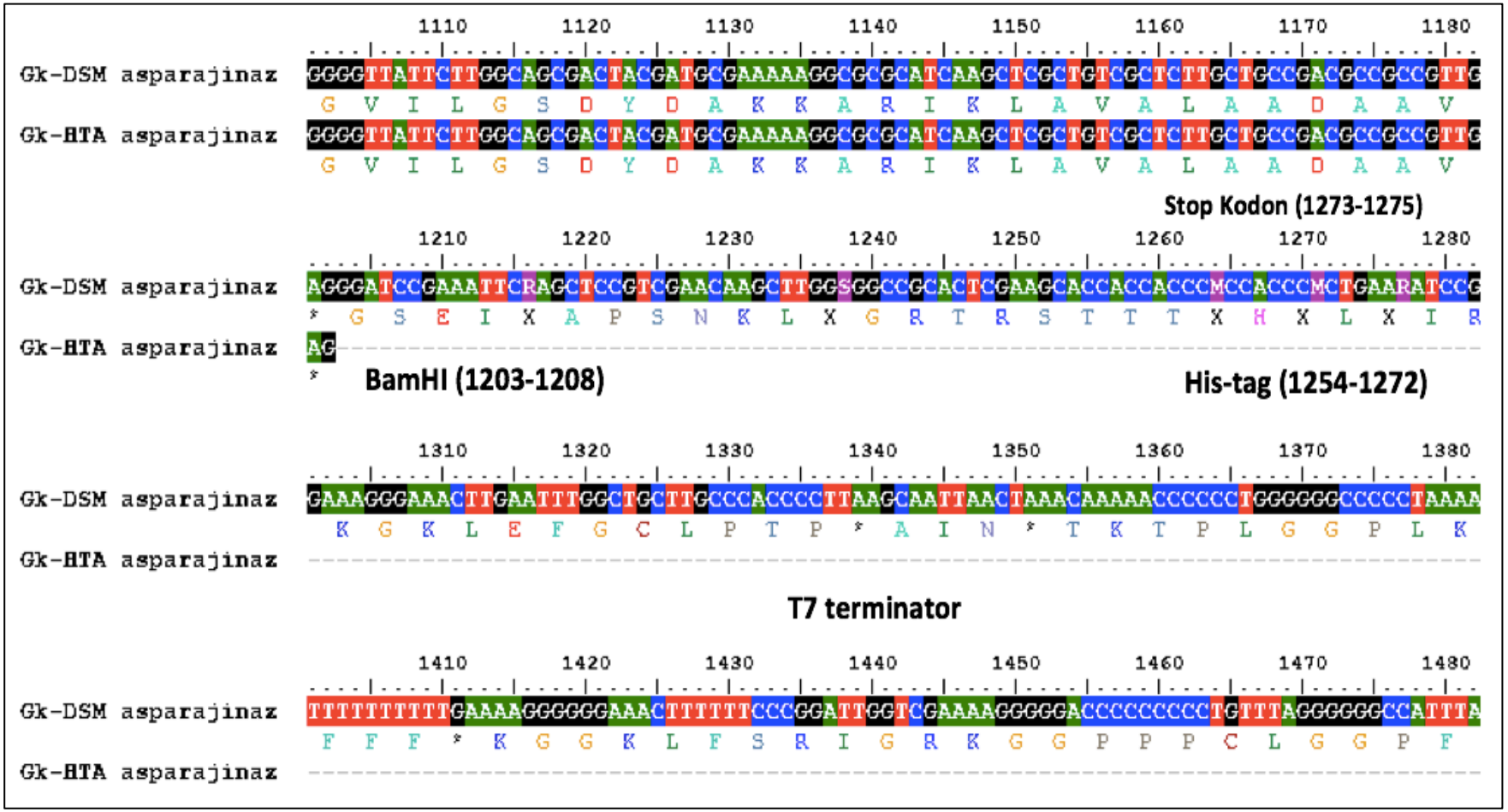
Şekil 4. 4: Rekombinant plazmitin restriksiyon enzim kesim analizi. M: DNA belirteci, 2: Kesilmemiş pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmiti; 2-3: pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmitinin sırasıyla *Bam*HI-HF ve *Nde*I ile tek kesimi; 4: pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmitinin BamHI-HF ve NdeI ile çift kesimi.

4.2.3. Klonlanan Asparajinaz Geninin Nükleotit Dizininin Belirlenmesi

Klonlanan *GkASNaz* geninin, pET-22b(+) vektörüne doğru bir şekilde (in frame) yerleştiği universal T7 promoter ve T7 terminator primerleriyle kullanılarak dizi analizi ile belirlenmiştir. İONTEK firması tarafından belirlenen *G. kaustophilus* DSM 7263T ait rekombinant L-asparajinaz gen dizisi Takami ve arkadaşları (2004) tarafından rapor edilen *G. kaustophilus* HTA 426 genomundaki (NCBI Gene Databank, NC_006510.1) ASN gen dizisi (ASN, GeneID: 3183602) ile BioEdit programı kullanılarak karşılaştırılmıştır ve iki gen dizisinin birbirleri ile %99 uygunluk gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



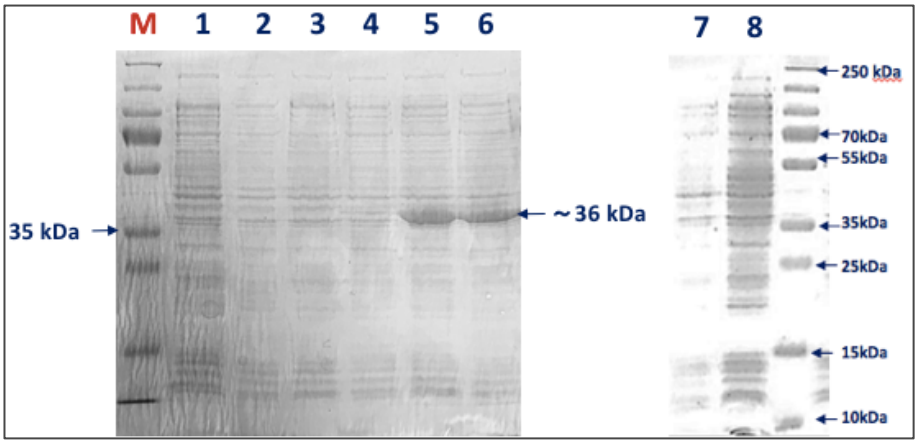
Şekil 4.5: Gk DSM 726′ ye ait rekombinant L-asparajinaz gen dizisi ile Gk HTA 426 L-asparajinaz gen dizisinin karşılaştırılması (ilk 400bç).



Şekil 4. 6: Gk DSM 726′ ye ait rekombinant L-asparajinaz gen dizisi ile Gk HTA 426 L-asparajinaz gen dizisinin karşılaştırılması (son 370 bç).

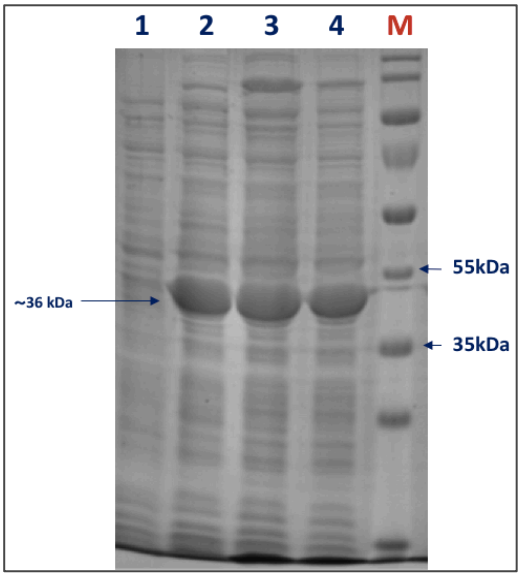
4.3. *Geobacillus kaustophilus* Asparajinaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

L-asparajinaz genini ekspres edebilmek için *E. coli* Rosetta^{TM} 2(DE3) konakçı hücresi rekombinant pET-22b(+)/*GkASNaz* vektörü ile transforme edilmiştir. Protein ekspresyonunun en fazla olduğu zamanı belirlemek amacıyla, hücreler IPTG ile uyarıldıktan sonra farklı zamanlarda örnekler alınmıştır. Hücrelerin IPTG ile uyarımı öncesi ve sonrası ekspresyon profili, gen taşımayan kontrol grubu ile birlikte SDS-PAGE ile görüntülenmiştir (Şekil 4.7). Jel analizi sonucunda pET-22b(+)/*GkASNaz* taşıyan *E. coli* Rosetta^{TM} 2(DE3) hücrelerinde 4. saatte yüksek oranda yaklaşık 36 kDa büyüklüğünde protein ekspresyonu gözlemlenirken; gen içermeyen pET-22b(+) vektörü taşıyan *E. coli* Rosetta^{T2} 2(DE3) ve vektör içermeyen *E. coli* Rosetta^{TM} 2 (DE3) hücrelerinde belirgin ekspresyon bandı gözlemlenmemiştir.



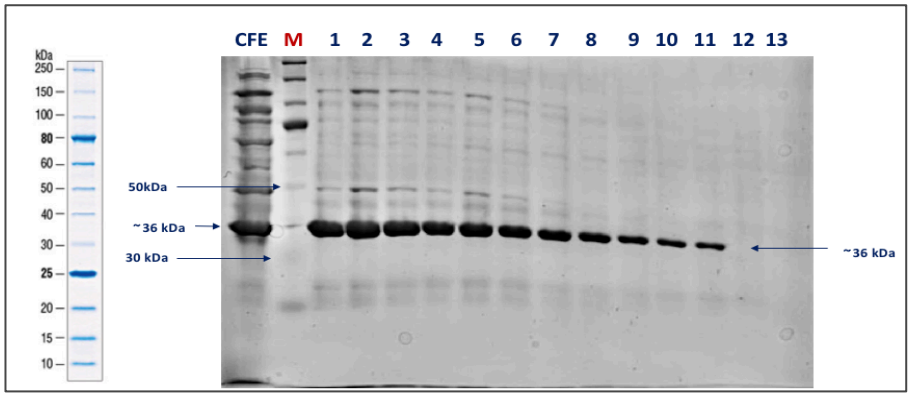
Şekil 4.7: *GkASNaz* ekspresyonunun SDS-PAGE analizi. 1-3: *E. coli* Rosetta^{TM} 2 (DE3)/pET-22b(+) hücrelerinin IPTG uyarımı sonrası 0, 2 ve 4. saatlerde alınan örnekler, 4-5: (DE3)/pET-22b(+)/*GkASNaz*'ın *E. coli* Rosetta^{TM} 2(DE3) hücrelerinde IPTG uyarımı sonrası 0, 2 ve 4.saatlerde alınan örnekler 7-8: Boş *E. coli* Rosetta^{TM} 2 (DE3) hücrelerinin IPTG uyarımı sonrası 0, 2 ve 4. saatlerde alınan örnekler. M: Protein belirteci (10-250kDa, P7703S).

Rekombinant protein ekspresyonu doğrulandıktan sonra protein saflaştırma çalışmalarında kullanılmak üzere büyük ölçekte protein ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon sonucunda toplanan hücreler sonikasyon ile parçalanarak hücre özütü elde edilmiş ve 0,45 um filtreden geçirilerek saflaştırmaya hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.8).



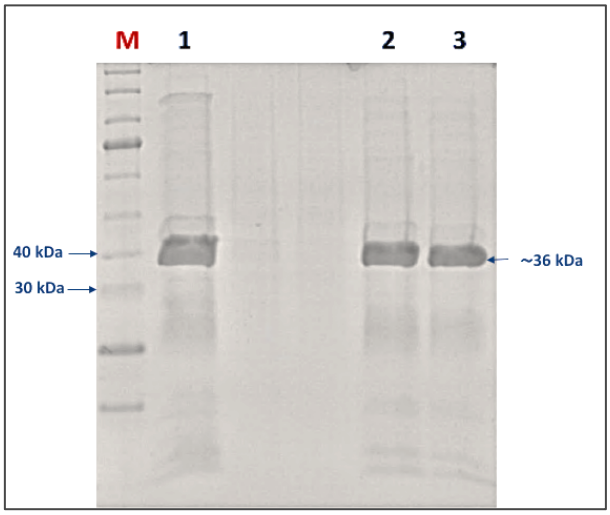
Şekil 4.8: Saflaştırma için rekombinant *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücrelerinden hazırlanan hücre özütlerinin SDS-PAGE analizi. 1: IPTG uyarımı öncesi alınan örnek, 2: IPTG uyarımı sonrası 4. saatte alınan örnek, 3: Hücre özütü, 4: Filtrelenmiş hücre özütü, M: Protein belirteci (Thermo Fisher Scientific SM26619).

Hücre özütünde yüksek oranda bulunan rekombinant protein, bir Ni-NTA kolonu olan His-Trap FF (5ml) ile tek basamakta 80 ml hücre özütünden saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucu elde edilen fraksiyonlardaki füzyon protein miktarı SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve C-terminalinde 6xHis ile elüye edilen L-asparajinaz proteini yaklaşık 37 kDa büyüklüğünde kalın tek bir band olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.9). Elde edilen bu sonuç GkASNaz proteinin amino asit dizisine göre hesaplanan moleküler ağırlığı ile uyum göstermiştir (36kDa).



Şekil 4.9: Afinite kromatografisi elüsyon fraksiyonlarının SDS-PAGE analizi.

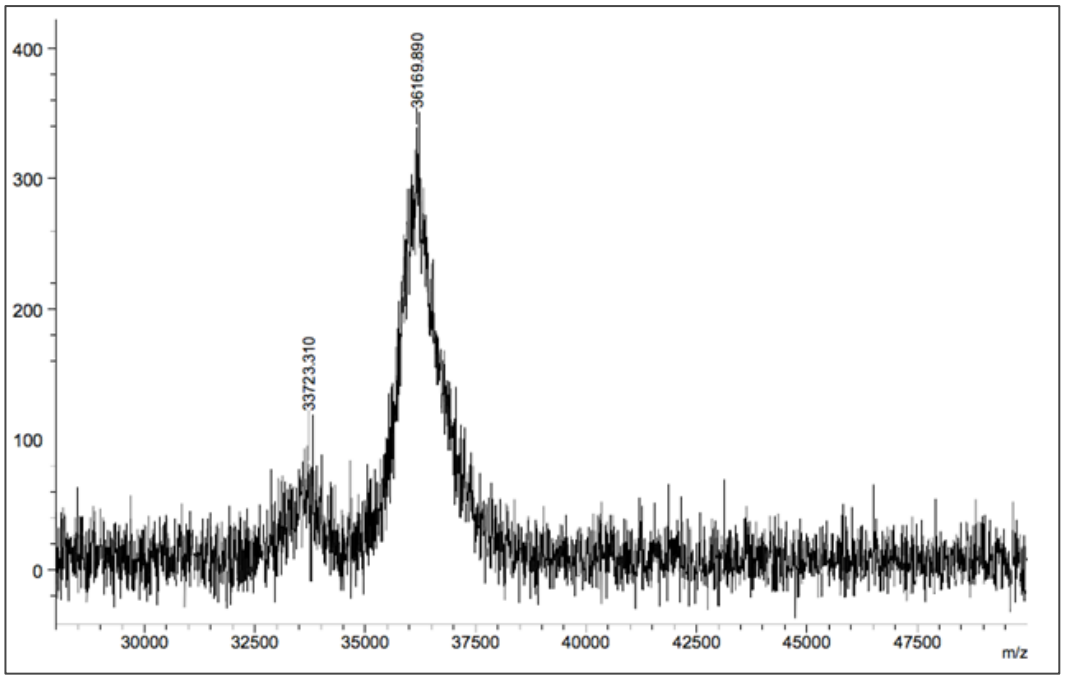
Beklenen moleküler büyüklüğe sahip füzyon proteinini içeren fraksiyonlar toplandıktan sonra Vivaspin filtre ile konsantre edilmiş ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 4.10). Saflaştırılan proteinin protein miktarı BCA (Bicinchoninic asit) yöntemi ile belirlenmiş; konsantre edilmiş ve protein miktarı 4,32 $\mu g.ml^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.10: Saflaştırılmış proteinin SDS-PAGE analizi. M: Protein belirteci, 1: Saflaştırılmış protein, 2-3: Konsantre edilmiş saflaştırılmış protein.

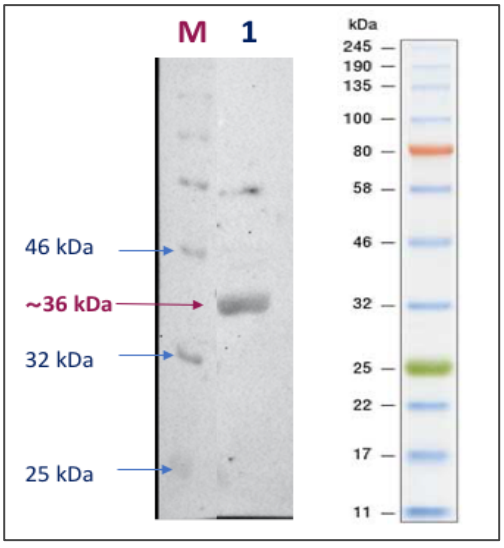
4.4. Saflaştırılan *Geobacillus kaustophilus* Asparajinazın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

Saflaştırılan proteinin moleküler ağırlığı aynı zamanda Matriks Asisted Laser Desorption Ionized Time of Flight (MALDI-TOF) kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi 6xHis etiketli monomerik L-asparajinazın moleküler ağırlığı 36.169 kDa olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11: GkASNaz'ın moleküler ağırlığının MALDI-TOF kütle spektrometresi ile analizi.

C terminalinde 6xHis ile etiketli olarak ekspres edilen GkASNaz proteinleri aynı zamanda anti-His antibody kullanılarak Western blot analizi ile doğrulanmıştır. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi proteinin görünen moleküler büyüklüğü yaklaşık 36 kDa olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 4.12: Western Blot analizi. 1: Saflaştırılmış protein örneği (25 ml). M: Marker P7712S (NEB, BioLabs).

4.5. Saflaştırılan *Geobacillus kaustophilus* L-Asparajinazın Biyokarakterizasyonu

4.5.1. Asparajinaz Enziminin Aktivite Tayini

L-asparajinazın hidrolitik aktivitesini belirlemek için substrat olarak L-asparajin kullanılmıştır. Enzim aktivitesi, substratın enzim tarafından yıkımı sonucu açığa çıkan amonyak miktarının ölçümü ile belirlenmiştir. Enzim aktivitesi için kalibrasyon eğrisi seri dilüsyonlar yapılarak hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin denklemi y= 0,0988x-0,0796 olarak hesaplanmıştır (Şekil C1.1). Reaksiyon sonucu örnekler 450 nm dalga boyunda ölçülerek elde edilen değerler denklemde yerine konulmuş ve açığa çıkan amonyak miktarı μmol olarak hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi gereç ve yöntemlerde verilen denkleme göre U/μl cinsinden hesaplanmıştır.

Enzim reaksiyonu için uygun enzim miktarını belirlemek amacıyla farklı miktarlardaki rekombinant enzim, 50 mM TrisHCl tamponunda pH 8.0, 5 mM L-asparajin ile 55 ºC'da 10 dakika inkübe edilmiş ve açığa çıkan amonyak miktarı "Araç ve Yöntemlerde" belirtilen Nesslerizasyon yöntemi ile belirlenmiştir. GkASNaz enzimi FF Histrap afinite yöntemi kullanılarak 134,9 UI/mg spesifik ktivite ile %13 verim ile saflaştırılmıştır (Tablo 4.1).

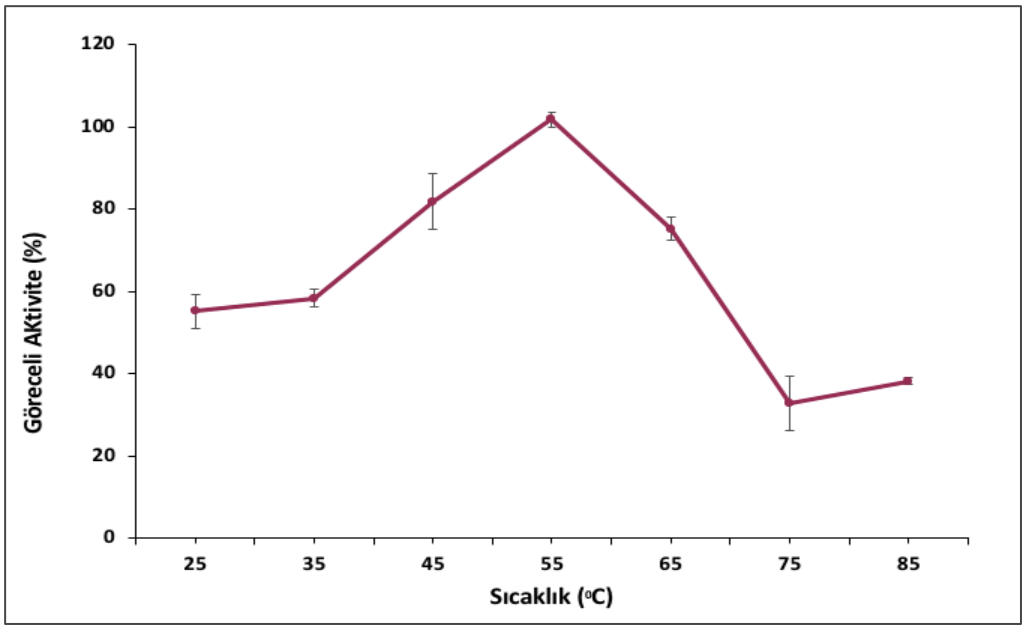
Tablo 4. 1: GkASNaz'ın saflaştırılma tablosu.

	Hacim (ml)	**Total Protein (mg)**	**Total Aktivite (UI)**	**Spesifik Aktivite (UI/mg)**	**Göreceli Aktivite (%)**
Hücre Özütü	80	0,5622	67,204	119,533	100
Saflaştırılmış Protein	47,5	0,2504	45,082	180,051	67
Konsantre Protein	15	0,0648	8,747	134,997	13

4.5.2. Sıcaklığın Asparajinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Rekombinant enzimin optimum sıcaklığını bulmak amacıyla enzim aktivitesi, daha önce belirtilen reaksiyon koşullarında 25-85 ºC arasında değişen farklı sıcaklıklarda ölçülmüştür. Enzimin aktivitesi, maksimum aktivitenin yüzdesi (Göreceli Aktivite) olarak ifade edilmiştir. Şekil 4.13'de gösterildiği gibi enzim

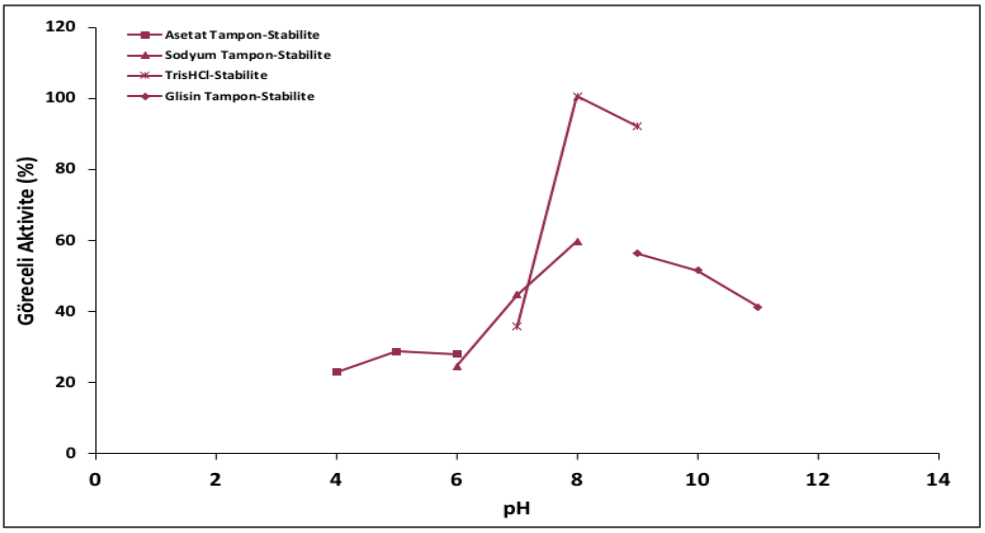
aktivitesi 25-55 ºC sıcaklık aralığında artış göstermiş ve 55 ºC'da en yüksek değere ulaşmıştır (0,0069 UI/µl). Rekombinant enzim 65 ºC'da %65 oranında aktivite gösterirken, bu sıcaklığın üzerindeki derecelerde enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.13: Sıcaklığın GkASNaz aktivitesi üzerine etkisi.

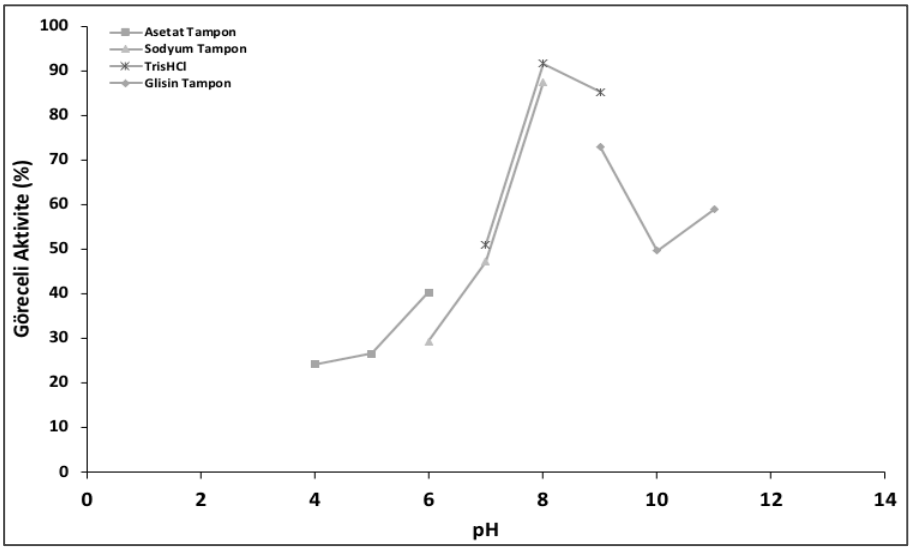
4.5.3. pH'ın Asparajinaz Aktivitesine Etkisi

Saflaştırılan L-asparajinazın enzimatik aktivitesi "Gereç ve Yöntemler"de açıklandığı gibi, 4 ile11 arasında değişen farklı pH aralıklarında gerçekleştirilmiştir. pH bağımlı aktivite profili Şekil 4.14'de gösterilmiştir. Aktivite ölçümleri sonucunda, pH 6.0'nın altındaki düşük pH'larda çok düşük enzim aktivitesi gözlenirken, pH değeri 6.0'dan 8.0'a doğru arttırıldığında aktivitede önemli derecede artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). Maksimum enzim aktivitesi pH 8.0'de gözlemlenmiş ve pH 8.5'da enzim aktivitesini %90 oranında korumuştur (Şekil 4.16). pH 9.0 ve üzerindeki aralıklarda ise enzim aktivitesinde azalma belirlenmiştir.



Şekil 4.14: pH'nın GkASNaz aktivitesi üzerine etkisi.

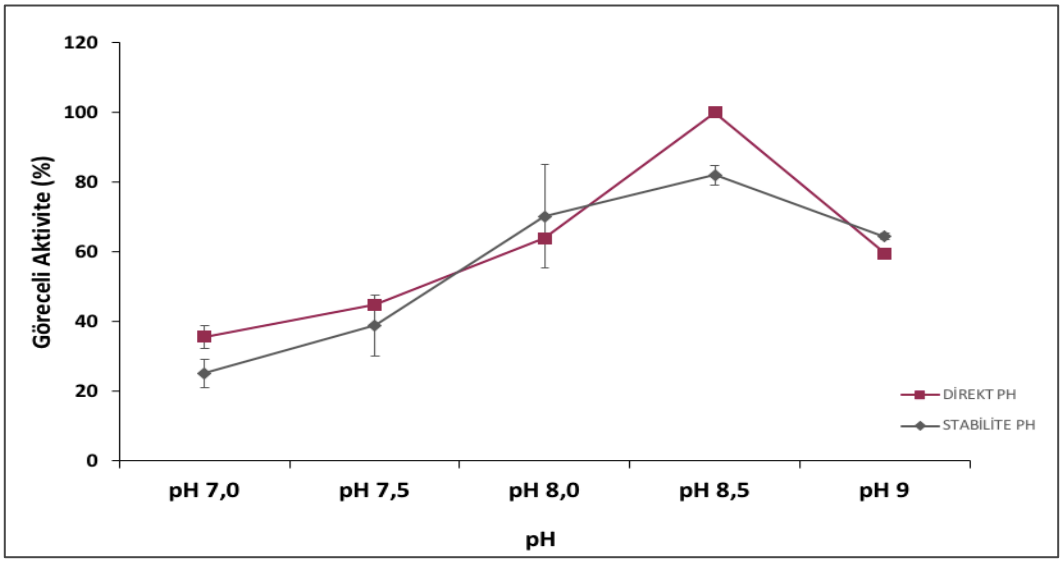
pH kararlılık deneyinde enzim farklı pH'lara sahip tamponlarda 60 dakika inkübe edildikten sonra enzimin kalan aktivitesi 55 ^{o}C'da standart koşullarda ölçülerek belirlenmiştir. Enzim pH 7.0-9 aralığında yüksek pH kararlığı göstermiş ve bu pH aralıklarında enzim aktivitesinin %50'inden fazlasını korumuştur. Enzim 50 mM Tris tamponunda pH 8.0'de aktivitesinin %70'ini korurken aynı tamponda pH 8.5'de aktivitesinin %80'ini korumuştur (Şekil 4.16).



Şekil 4.15: GkASNaz aktivitesinin pH kararlılığı.

Yaptığımız farklı pH'lardaki enzim aktivite çalışmalarında pH 8.0 ve pH 8.5'da değişkenlik gözlenmiş bundan dolayı 50 mM Tris tamponunda pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5,

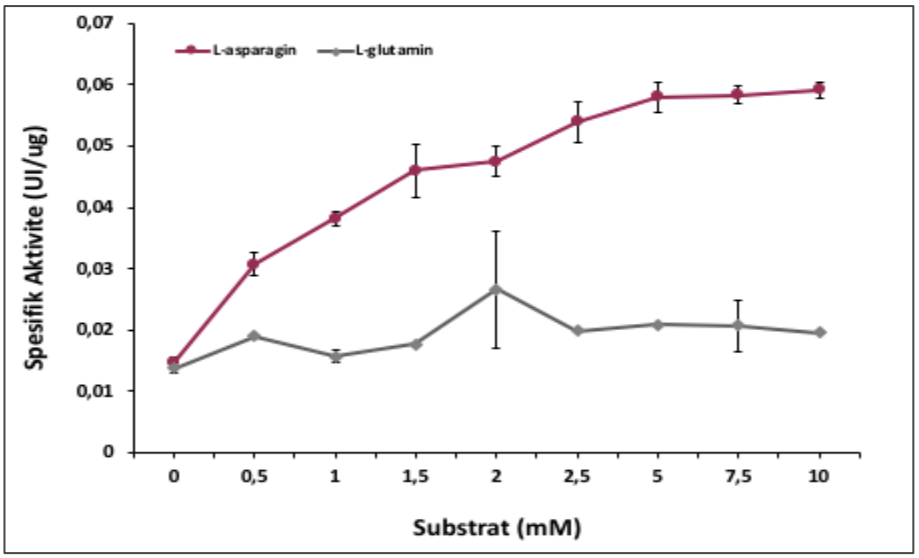
ve 9.0 aralıklarında enzim aktivitesi ve kararlılık deneyleri tekrarlanmıştır. Bu sonuçlara göre saflaştırılmış asparajinaz en yüksek enzim aktivitesini pH 8.5'da gösterirken bu pH'da 60 dakika inkübasyon sonrasında enzim aktivitesini %82'sini korumuştur (Şekil 4.15). Bundan sonraki aktivite deneyleri pH 8.5'de yapılmıştır.



Şekil 4.16: 50 mM Tris-HCl tamponunda GkASNaz'ın optimal pH ve stabilitesi.

4.5.4. Substrat Konsantrasyonunun Asparajinaz Aktivitesine Etkisi

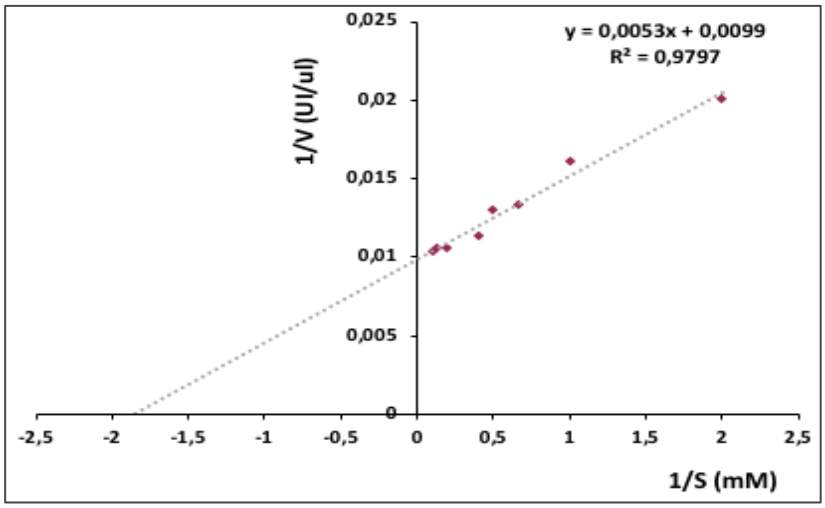
Substrat konsantrasyonunun saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için L-asparajin ve L-glutamin kullanılmıştır. Enzim ayrı ayrı 0-20 mM arasında değişen farklı substrat konsantrasyonlarında 50 mM TrisHCl tamponu (pH 8.5) içinde 55 ^{o}C'da 10 dakika inkübe edilerek enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Enzimin substrat-doygunluk eğrisini gösteren Şekil 4.17'ye göre enzim, L-glutamin ile düşük bir aktivite eğrisi gösterirken; L-asparajin ile enzim aktivitesi yaklaşık 3 kat artmıştır. *GkASNaz*'ın glutaminaz aktivitesi 5 mM substrat varlığında 0,020 UI/µg olarak belirlenirken, enzimin asparajinaz aktivitesi 0,058 UI/µg olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.17: Substrat konsantrasyonunun GkASNaz aktivitesine etkisi.

4.5.5. Asparajinaz'ın Kinetik Analizi

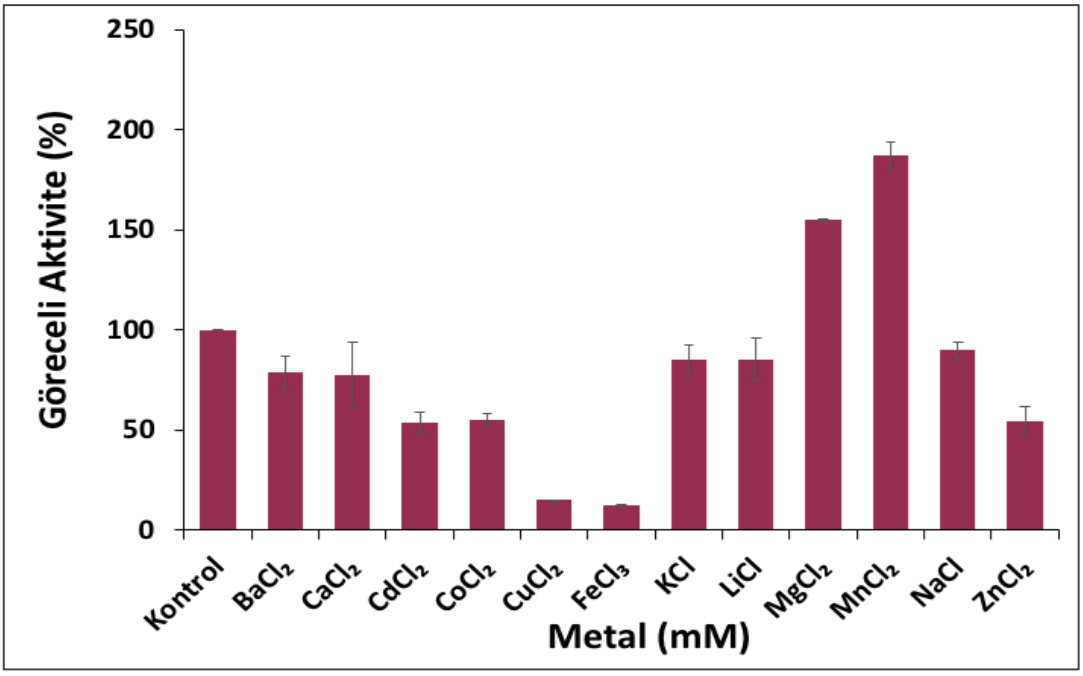
Rekombinant enzimin kinetik özelliği standart deney koşullarında L-asparajinin substrat olarak kullanılması ile belirlenmiştir. Enzimin Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerlerinin belirlenmesi için Şekil 4.18' de verilen substrat-doygunluk grafiğinden elde edilen verilere göre1/V'ye karşı 1/S doğrusal Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Lineweaver-Burk veri analizi sonucu enzimin Km değeri 0,535 mM ve Vmax değeri ise ve 101 U/ul olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.18: GkASNaz 'ın Lineweaver-Burk grafiği.

4.5.6. Çeşitli Metal İyonlarının Asparajinaz Aktivitesine Etkisi

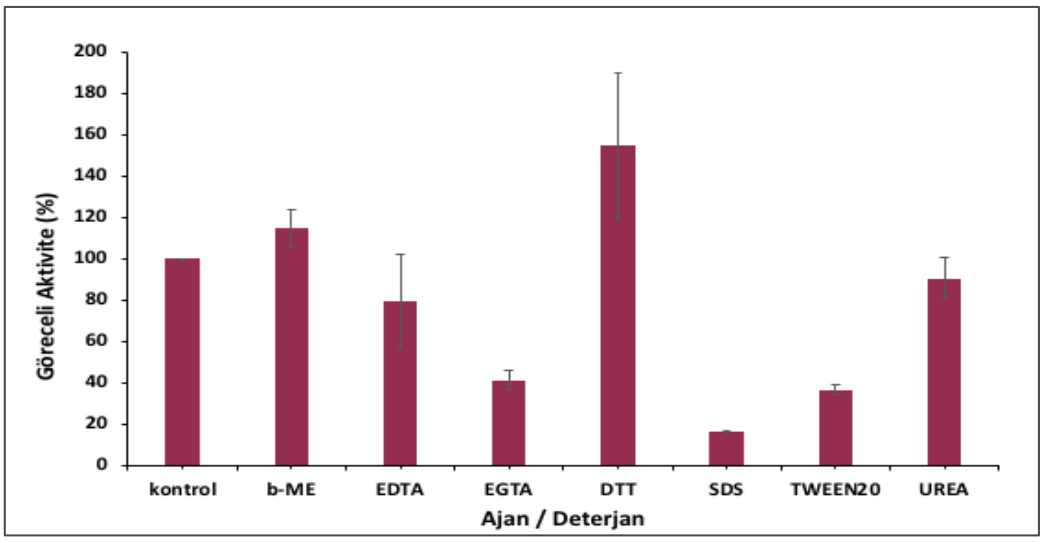
Çeşitli metal iyonlarının *GkASNaz* aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, metal iyonları son konsantrasyonları 1mM olacak şekilde enzim deney tamponuna direk olarak ilave edilmiş ve enzim ile birlikte 1 saat inkübe edilmiştir. Enzim aktiviteleri metal iyonu içermeyen enzim aktivitesinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.19). Elde ettiğimiz sonuçlara göre çoğu metal iyonunun göreceli enzim aktivite üzerine engelleyici bir etkisi olmuştur (Şekil D1.1). Bu sonuçlara göre; Cu^{2+} ve Fe^{3+} enzim aktivitesini sırasıyla %86 ve %88 gibi yüksek bir oranında inhibe ederken Co^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} yaklaşık %45 oranında inhibe etmiştir. Bununla birlikte Ca^{2+} ve Ba^{2+} enzim aktivitesini yaklaşık %23 oranında, K^{+}, Na^{+} ve Li^{2+} gibi tuzlar ise yaklaşık %15 gibi daha düşük bir oranda inhibe etmişlerdir. Test edilen metal iyonları arasında, Mn^{2+} ve Mg^{2+} enhancer gibi davranarak enzim aktivitesini yüksek oranda arttırmıştır. Bu oran Mn^{2+} için %187, Mg^{2+} için %154 oranında hesaplanmıştır. Metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin UI/µl değerleri 0,0069'da verilmiştir.



Şekil 4.6: Metal iyonlarının GkASNaz aktivitesi üzerine etkisi.

4.5.7. Çeşitli Deterjan ve Ajanların Asparajinaz Aktivasyonu Üzerine Etkisi

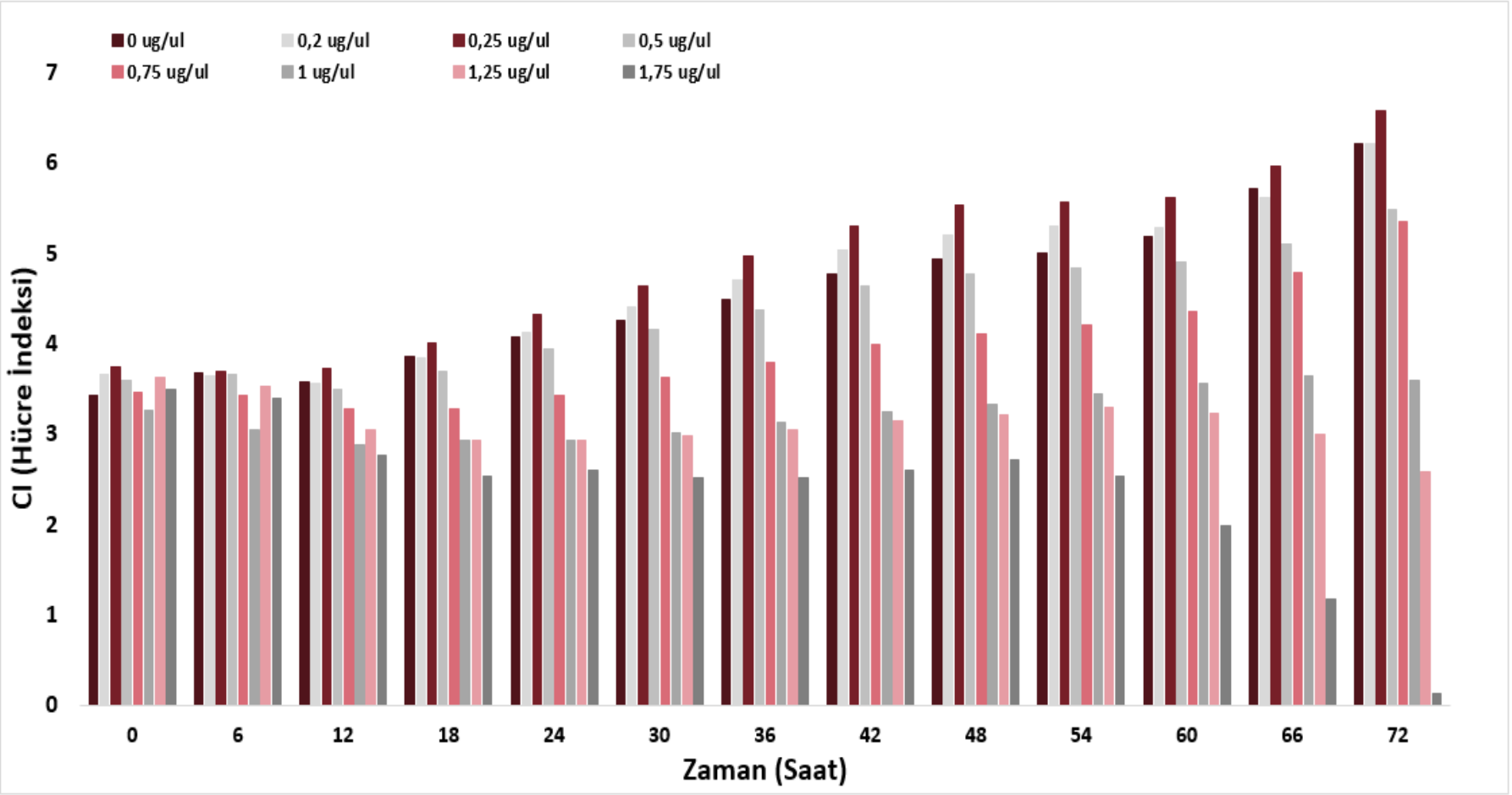
Asparajinaz aktivitesi çeşitli deterjanların (Triton-X100, Tween20 (%1), SDS, üre (2,5 mM), indirgeyici ajanların (2-merkaptoethanol (0,5 mM), DTT (5 mM) ve yakalayıcı ajanların (EGTA, EDTA (5 mM)) varlığında test edilmiştir. Çeşitli oranlardaki deterjan ve ajanlar saflaştırılan enzim ile birlikte oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş ve daha sonra enzim aktivite deneyleri standart deney şartlarında gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.20'de gözlemlendiği gibi *GkASNaz* deterjanlar ve yakalayıcı ajanlar tarafından inhibe edilmiştir. L-asparajinaz aktivitesi iyonik deterjan olan SDS ile %84 oranında inhibe olurken anyonik deterjan olan Tween20 ile %20 oranında olmuştur (Şekil D1.2). Triton X-100 deterjanı ile gerçekleştirilen enzim aktivitesi, reaksiyonda çökelme oluşturduğu için spektrometrede ölçümü gerçekleştirilememiştir. Ayrıca enzim aktivitesi, bir kaotropik deterjan olan üre varlığında %10 oranında azalmıştır. Enzim aynı zamanda, EDTA ve EGTA gibi yakalayıcı ajanların varlığında ile sırasıyla %20 ve %60 oranında inhibe olmuştur. Bununla birlikte indirgeyici ajanların *GkASNaz* aktivitesi üzerinde sitümüle edici etkisi gözlenmiştir; DTT enzim aktivitesini %55 oranında arttırırken β-merkaptoetanol aktiviteyi %15 oranında arttırmıştır.



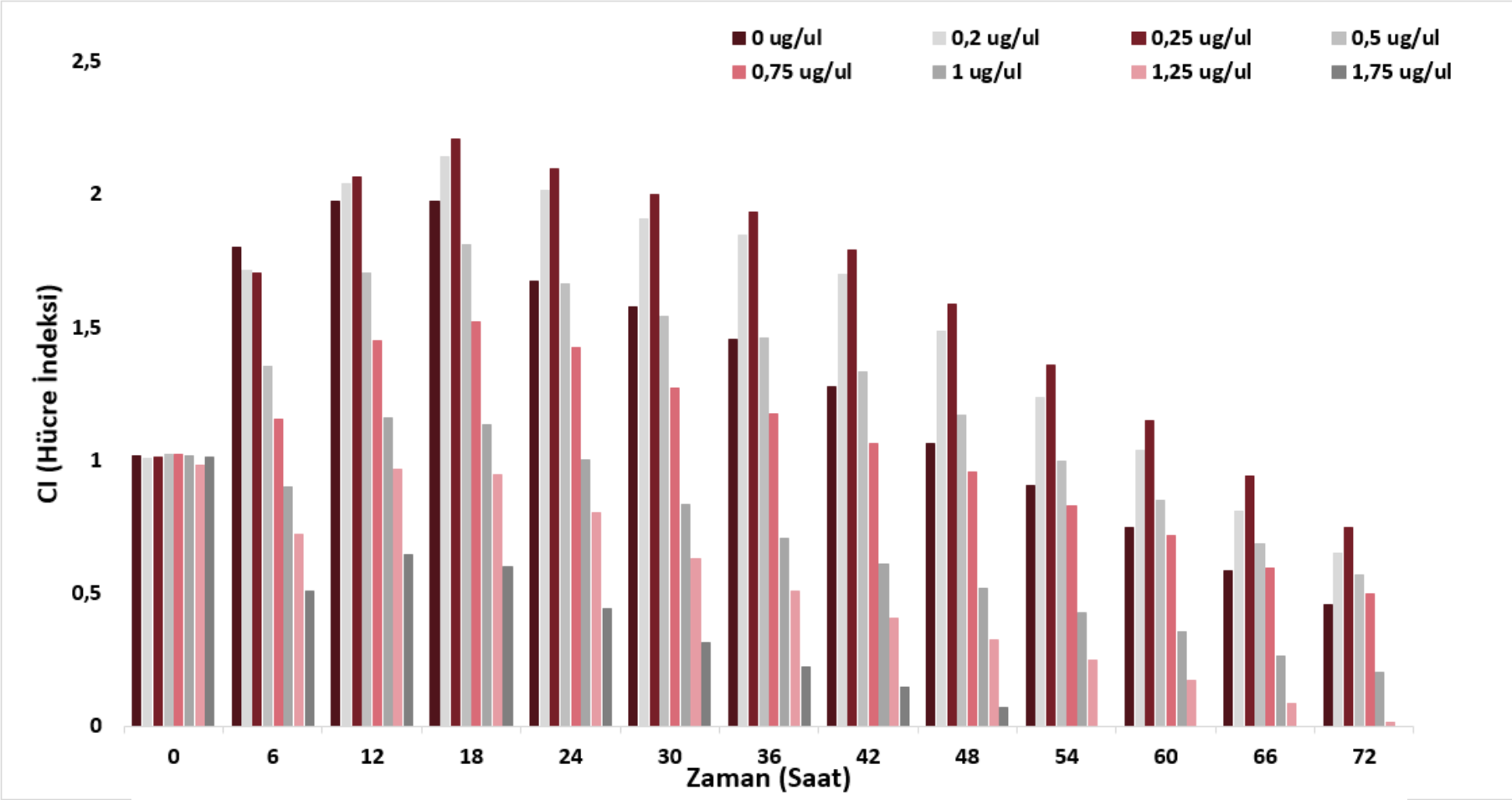
Şekil 4.20: Deterjanların ve ajanların GkASNaz aktivitesi üzerine etkisi.

4.5.8. Asparajinaz'ın Antiproliferasyon Etkisi

Rekombiant asparajinazın antiproliferasyon etkisi hepatosellular karsinom hücre hatlarından iyi differansiye HEP3B ve az differansiye SNU387 kullanılarak analiz edilmiştir. Hücre hatları 0 ile 1.75 µg/ml konsantrasyon aralıklarında asparajinaz ile 0-72 saat muamele edilerek 6 saat aralıklarla ölçüm alınmıştır. Hücrelerin büyümesi 96 saat boyunca xCELLigence RTCA DP Analyzer (ACEA Bioscienses, ABD) sistemi ile izlenmiş ve her 15 dakika bir ölçüm alınmıştır. Enzimin SNU387 hücre hattı üzerindeki etkisi incelendiğinde 0.2-0.75 µg/ml oranındaki enzim miktarlarının proliferasyon üzerinde etkisinin bulunmadığı (Şekil 4.22), 1.0-1.75µg/ml oranındaki enzim konsantrasyonlarında ise artan enzim miktarına bağlı olarak hücre büyümesinde kontrol grubuna göre anlamlı azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.21). 1 ug/ml konsantrasyon uygulanan hücrelerde 6 ($p<0.01$), 12 ($p<0.05$), 18 ($p<0.05$), saatlerde hücrelerin kontrol grubuna göre proliferasyonunun anlamlı olarak baskılandığı fakat ilerleyen saatlerde fark tespit edilememiştir. Enzimin HEP3B hücre hattı üresindeki etkisi incelendiğinde ise yine 0.2-0.75 µg/ml oranındaki enzim miktarlarının proliferasyon üzerinde etkisinin bulunmadığı, 1.0.1.75µg/ml oranındaki enzim konsantrasyonlarında ise anlamlı bir şekilde azalma olduğu tespit edilmiştir. 1 ug/ml konsantrasyon uygulanan hücrelerde 72. saatte ($p<0.05$) azalma olduğu gözlemlenirken, 1.25 µg/ml ve 1.75 µg/ml konsantrasyon uygulanan hücrelerde sırasıyla 66. saat ($p<0.05$) ve 60.saatte ($p<0.01$) hücrelerin kontrol grubuna göre proliferasyonunda anlamlı azalma görülmüştür (Şekil 4.21).



Şekil 4.71: Hep3B malignant hücreleri üzerinde uygulanan GkASNaz rekombinant enziminin etkisini gösteren grafik.



Şekil 4.22: SNU387 malignant hücreleri üzerinde uygulanan GkASNaz rekombinant enziminin etkisini gösteren grafik.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

L-asparajinaz (EC 3.5.1.1, L-asparajin amidohidrolaz), L-asparajinin L-aspartik asit ve amonyağa dönüştürülmesini katalizleyen bir enzimdir. Hidrolitik özellikleri sayesinde L-asparajinazlar uzun yıllardan beri lösemi ve liposarkom tedavisinde tümör inhibitörü olarak kullanılan enzimlerdir. Bütün normal ve lösemik hücreler, metabolik gereksinimleri için amino asit L-asparajine ihtiyaç duymaktadır. L-asparajin gelişmemiş lenfositlerin proliferasyonu için kullanılan esansiyel olmayan (nonessential) bir amino asittir. Bu amino asitin biyosentez yolağı, krebss döngüsünün bir ara ürünü olan oksaloasetatın transaminaz enzimi tarafından L-aspartat hale dönüştürülmesini ve ardından amino grubunun L-glutamattan α-ketogluterat ve aspartat üreten oksaloasetata transferini içermektedir. Oluşan aspartat, insan asparajin sentetaz enzimi tarafından, enerji kaynağı ATP kullanılarak, L-asparajine dönüştürülmektedir. Bununla birlikte tümör hücreleri alışılmadık bir şekilde L-asparajine gereksinim duymaktadır ve çok düşük L-asparajin sentetaz seviyesi nedeniyle yeterli L-asparajin sentezleyemeyen hücreler proliferasyon ve sağkalım için dış kaynaklı L-asparajinazın tümör hücrelerine sağlanması tüm dolaşımdaki L-asparajini bitireceği için kanser hücrelerin açlığına neden olmakta ve sonuç olarak apoptoza yol açmaktadır.

L-asparajinazlar şimdiye kadar, memeliler de dâhil olmak üzere kuşlar, bitkiler, bakteriler (*Escherichia coli, Erwinia sp., Salmonella, Mycobacteria, Pseudomonas ve Acinetobacter species* vb.) ve mantarlarda (*Aspergillus, Fusarium species* vb.) bulunmuştur [Verma et al*.,* 2007]. Bununla birlikte mikroorganizmalar; hızlı büyümeleri, üretim kolaylıkları, geniş biyokimyasal çeşitlilikleri ve kolaylıkla genetik olarak manipüle edilebilmelerinden dolayı, önemli L-asparajinaz kaynaklarını oluşturmaktadırlar. Günümüze kadar karasal ve deniz ortamlarından izole edilen birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerden elde edilen L-asparajinazlar rapor edilmiştir ancak Gram negatif bakteriler ile karşılaştırıldığında Gram pozitif bakterilerle yapılan daha az çalışma bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında L-asparajinaz enzimi Gram pozitif termofilik bakteri olan *G. kaustophilus* DSM 7263^{T} suşu ile çalışılmıştır ve bu bakteriye ait enzimin sitotoksik etkisi daha az çalışılmış olan hepatosellular karsinom (HCC) hücrelerde_denenmesi

amaçlanmıştır. Bu kapsamda *G. kaustophilus* 7263^T suşuna ait Tip II L-asparajinaz geni klonlanmış ve bu gen tarafından kodlanan protein genel olarak karakterize edilerek iyi differansiye HEP3B ve az differansiye SNU387 hücreleri üzerindeki antiproliferasyon etkisine bakılmıştır.

Bu amaçla, genom dizisi Takami ve arkadaşları (2004) tarafından rapor edilen *G. kaustophilus* HTA 426 (NCBI Gene Databank, NC_006510.1) 972 bç uzunluğundaki L-asparajinaz gen dizisi (Gene ID: 3183602) dikkate alınarak *G. kaustophilus* DSM 7263^T L-asparajinaz gen bölgesini çoğaltacak ileri ve geri primerler tasarlanmıştır. PCR ile çoğaltılan ve 5' ve 3' ucunda sırasıyla *Nde*I ve *Bam*HI enzim kesim bölgeleri içeren *G. kaustophilus* DSM 7263^T L-asparajinaz DNA fragmanı T7 promoter'ının altında C-terminalde His6 olacak şekilde pET-22b(+) vektörüne klonlanmıştır. Klonlanan *GkASNaz'ın* varlığı koloni PCR ve enzim kesim reaksiyonları ile doğrulanarak yaklaşık 972 bç uzunluğunda L-asparajinaz fragmanının vektör içinde varlığı belirlenmiştir. pET-22b(+) vektöründe klonlandığı doğrulanan *GkASNaz*'ın vektör içinde doğru çerçevede yerleştiğini belirlemek amacıyla pET22b(+)/*GkASNaz* vektörü dizilemeye gönderilmiştir. pET-22b(+) vektöründe klonlama bölgesi, T7 promotorunun kontrolü altındadır. Universal T7 promoter ve terminator primerleri ile yapılan dizileme sonucunda klonlanan *G. kaustophilus* DSM 7263T' e ait L-asparajinaz gen dizisinin *G. kaustophilus* HTA 426' ya ait TipII L-asparajin gen dizisi ile %99 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. pET-22b(+) vektörü üzerinde varlığı tespit edilen *GkASNaz*'ın ekspresyon çalışmaları için *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri pET-22b(+)/*GkASNaz* vektörü ile transforme edilmiştir ancak protein ekpresyonu gözlenmemiştir. Bunun üzerine rekombinant vektör diğer bir *E. coli* expresyon suşu olan Rosetta^{TM} 2(DE3) hücrelerine aktarılmıştır.

Vektöre yerleştirilen *GkASNaz*'ın ekspresyonu T7 promotörü kontrolü altındadır. *E. coli* Rosetta^{TM} 2(DE3) hücresinde aracılığıyla, LacUV5 promotor kontrolü altında T7 RNA polimeraz ekspresyonu IPTG (1 mM) ile uyarılmış ve T7 RNA polimerazın *GkASNaz* genini eksprese etmesi sağlanmıştır. Yapılan SDS çalışmaları sonucunda pET-22b(+)/*GkASNaz* vektörü taşıyan hücrelerde beklenen büyüklükte (yaklaşık 36 kDa) yüksek oranda rekombinant proteinin ekspresyon bandı gözlenirken kontrol hücrelerde ekspresyon gözlenmemiştir. C-terminal bölgelisine eklenmiş 6xHis kuyruğu ile eksprese olan L-asparajinaz enzimini saflaştırmak için Ni-NTA afinite kolonu kullanılmıştır. Saflaştırma sonucu elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve moleküler büyüklüğü yaklaşık 36 kDa olarak

belirlenmiştir. Saflaştırma işlemi sonucu elde edilen proteinlerin His-tag ile füzyon oluşturan GkASNaz enzimi olduğu His-tag antibody kullanılarak Western Blot analizi ile doğrulanmıştır. Ayrıca, saflaştırılan asparajinazın monomer moleküler ağırlığı MALDI-TOF kütle spektrometresi analiz edilmiş ve 36.136 kDa olarak belirlenmiştir. Analizlerde gözlemlenen sonuçlar, GkASNaz proteinin, daha önce çalışılmış bakteriyel asparajinazlar ile benzer büyüklükte olduğunu belirtmektedir. *E. coli*'de L-asparajinaz II'nin fonksiyonel formunun 140-160 kDa moleküler büyüklüğe sahip birbirine kovalent olmayan bağlarla bağlı özdeş 4 alt-üniteden oluştuğu rapor edilmiştir [Aung et al., 2000; Aghaiypour et al., 2001; Kozak et al., 2002].

L-asparajinaz, tetramer yapıda aktif olan bir proteindir. Moleküler ağırlığı elde edilen organizmaya göre değişiklik göstermektedir. Swain ve arkadaşlarının (1993) yaptığı çalışmada, klinik olarak kullanılan ve *E. coli* bakterisinden elde edilen L-asparajinazın tetramerik yapıda aktif olduğu ve özdeş altyapılardan oluşan bu dörtlü yapının her bir monomerinin moleküler ağırlığının 35.6 kDa olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte *E. coli* MTCC 739 ile yapılan başka bir çalışmada tetrameric L-asparajinaz II'nin moleküler ağırlığı 37 kDa olarak belirlenmiştir [Vidya et al.,2011]. 2015 yılında Kishore ve arkadaşlarının (2015) *Pseudomonas fluorescens* ile çalışmada tetramer yapıdaki L-asparajinazın 141 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir. *Bacillus licheniformis* ile yapılan bir çalışmada düşük glutaminaz aktivitesine sahip hücre dışı bir L-asparajinaz saflaştırılmıştır. 134.8 kDa büyüklüğünde bir homotetramer olan enzimin her bir monomerinin 33.7 kDa olduğu belirlenirken [Mahajan et al., 2014], diğer bir Bacillus soyu olan *Bacillus subtilis* B11−06 rekombinant L-asparajinaz molekül ağırlığının 38 kDa olduğu belirtilmiştir [Jia et al., 2013].

GkASNazın aktivite tayini için L-asparajin kullanılmıştır. Çalışmamızda, L-asparajinaz aktivitesi, enzimin L-asparajinaz ile hidroliz reaksiyonu sonucu açığa çıkan amonyak tayinine dayanan Nessler reaksiyonu ile ölçülmüştür. Açığa çıkan amonyum miktarı enzimin aktivitesi ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Saflaştırılmış enzimin spesifik aktivitesi 53,8 $U.mg^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bu aktivite yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında *G. kaustophilus* termofilik bakterisinden alınan L-asparajinazın, hipertermofilik olan *Thermococcus gammatolerans* 'dan (7622 Umg^{-1}), ve arkeon olan *Thermococcus kodakaraensis KOD1* (2350 Umg-1) ile *Pyrococcus furiosus* (550 Umg^{-1}) L-asparajinazlardan çok düşük olduğu belirlenmiştir [Zuo et al., 2014].

Farklı organizmalardan elde edilen L-asparajinazlar biyokimyasal özellikleri bakımından çok farklılık göstermektedirler. Sıcaklık ve pH, enzim aktivitesini belirleyen temel çevresel faktörlerden biridir. Günümüzde klinik amaçlı kullanılan *E. coli* ve *E. chrysanthemi*'den elde edilmiş olan L-asparajinazlar düşük termostabiliteye sahip enzimlerdir [Zuo et al., 2014]. Bununla beraber, genel olarak bakteriyel kaynaklardan elden edilen L- asparajinazlar için optimum sıcaklık 30 ile 40°C arasındadır. Optimum aktivite sıcaklığı *Streptomyces'lerde* 40-60°C arasında olduğu, *Thermococcus kodakarensis KOD1, T. gammatolerans EJ3, Pyrococcus furiousus* gibi hipertermofilik arkealarda ise 80-85°C olduğu rapor edilmiştir [Vidya et al., 2011, Moreno-Enriquez et al., 2012, Chohan and Rashid, 2013, Bansal et al., 2010]. *G. kaustophilus* termofilik bir bakteridir ve 37°ile 70°C arasındaki sıcaklıklarda büyüyebilmektedir [Takami et al., 2004]. Saflaştırılan rekombinant *GkASNaz* ile yaptığımız aktivite çalışmalarında, enzim 45-65°C arasında %70'den fazla aktivite gösterirken maksimum aktiviteyi 55°C'da göstermiştir.

pH aktivite çalışmaları sonucu saflaştırılan rekombinant L-asparajinaz, L-asparajine karşı en yüksek aktiviteyi pH 8.5'da göstermiştir. Bununla birlikte 7-9 arasındaki pH aralıklarında enzim %82 oranında stabilite göstermiştir. Antitümör aktivite için L-asparajinazın maksimum aktivitesi fizyolojik pH 7,4 değerinde olması ön koşullarından biri olarak düşünülmesine rağmen; daha önce yapılan çalışmalarda klinik amaçlı kullanılan bakteriyel L-asparajinazların çoğunluğu alkali pH (8,0-10,0) aralıklarında enzim aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir [Mohamed et al., 2015]. Termofilik kökenli L-asparajinazların çoğunun pH değeri 7-9 arasında değişmektedir. *E. coli*, *E. crysanthemi* ve *Pseudomonas stutzeri* gibi farklı mikroorganizmalardan gelen L-asparajinazların pH 8.0-9.0 arasındaki aktivite değerine yakın olduğu görülmüştür [Hong et al., 2014].

GkASNaz'ın göreceli enzim aktivitesi çeşitli metal iyonlarının varlığında belirlenmiştir. Enzim aktivitesi en yüksek oranda Cu^{2+} (%14) ve Fe^{3+} (%12) olmak üzere Co^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Ca^{2+}, Ba^{2+}, K^{+}, Na^{+} ve Li^{2+} gibi metal iyonları varlığında inhibe olurken, Mn^{2+} ve Mg^{2+}iyonları varlığında ise yaklaşık 1,8 ve 1,5 kat artış göstermiştir. Bununla birlikte enzim, birçok bakteriden elde edilen L-asparajinazlardan farklı olarak EDTA ve EGTA gibi şelaklayıcı ajanların varlığında inhibe olmuştur. Bu sonuç GkASNaz'ın bir metallo protein olabileceğini düşündürmektedir. Birçok bakteride olduğu gibi L-asparajinaz aktivitesi, DTT ve 2-mercaptoetanol gibi tiol koruyucu ajanlar varlığında artış göstermiştir [Nguyen et al., 2016, Warangkar and Khobragade,

2010]. Bu indirgeyici ajanların GkASNAaz'ı stimüle edici aktivitesi, sülfidril grupların enzimin katalitik aktivitesinde rolü olduğunu düşündürmektedir. Farklı olarak saflaştırılmış *Bacillus licheniformis* L-asparajinaz aktivitesi, Na^+ ve K^+ içeren katyonların varlığında artış göstermiş, divalent katyonlar ve tiyol grup bloke edici reaktiflerin varlığında orta derecede inhibe edilmiştir [Mahajan et al., 2014].

Proteinin klinik kullanımdaki yan etkileri, enzimin glutaminaz aktivitesine bağlanmıştır. L-glutamin, çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar için bir amino grubu vericisidir ve ayrıca kandaki amino nitrojeninin temel taşıma formudur. Yüksek glutaminaz aktivitesine sahip L-asparajinaz, plazma glutamin seviyesini düşürmekte ve dolayısıyla birçok biyokimyasal fonksiyonu bozabilmektedir [Pieters et al*.,* 2011]. Tip II grubuna giren periplazmik asparajinazlar, L-glutamine karşı düşük aktiviteye ve asparajine karşı düşük Km değerini sahip olduğu rapor edilmiştir [Covini et al*.,* 2012]. Gen dizisi bilinen *G. kaustophilus* asparajinaz Tip II grubuna girmektedir. Enzimin L-glutaminaz aktivitesi substrat olarak L-glutamin (5 mM) kullanılarak belirlenmiş ve enzim aktivitesinin etkinliği L-asparajinaz aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, GkASNaz glutamine karşı %65 oranında daha düşük aktivite göstermiştir. Benzer sonuçlar *Thermococcus gammatolerans*'dan elde edilen L-asparajinaz ile benzerlik göstermiş ve L-asparajin ile karşılaştırıldığında L-glutamine karşı %62 oranında daha düşük aktivite göstermiştir [Zuo et al, 2014].

G. kaustophilus L-asparajinazın, L-asparajine karşı Km ve Vmax değerleri sırasıyla 0,5 mM ve 101 U/µl olarak hesaplanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre Km değerleri *E. coli* için 0,01 mM, *E. crysanthemi* için 0,06 mM olarak rapor edilmiştir [Hong et al*.,* 2014]. Bu değerler GkASNaz ile karşılaştırıldığında daha efektiftir. Termofilik bir *Bacillus*'tan saflaştırılan rekombinant GkASNaz'ın Km değeri diğer Bacillus türleri ile karşılaştırıldığında (*B. megaterium H-1* için 0.8 mM ve *B. subtilis B11*-06 için 0.43 mM) yakın Km değerine sahip olduğu belirlenmiştir [Jia et al., 2013, Mohamed et al*.,* 2015]. Bununla birlikte enzimin Km değeri günümüze kadar rapor edilen Km değerlerine sahip termofilik L-asparajinazlardan (*Pyrococcus furious* için12 mM, *Thermus aquaticus* için 8,6 mM, *Thermococcus kadokarensis* için5,5 mM, *Thermoccus gammatolerans* için 10 mM [Hong et al*.,* 2014] daha düşük olduğu belirlenmiştir [Chahan and Rashid, 2013, Zuo et al*.,* 2014].

G. kaustophilus organizmasından elde edilen asparajinazın antiproliferasyon özelliği, xCELLigence sistemi ile yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Enzimin sağlıklı

hepatoselular epitel HEP3B hücresi üzerinde etkisi incelendiğinde, enzimin hücrelerin büyümesine etki etmediği gözlemlenmiştir. *GkASNaz* enziminin metastatik mezenşim hepatoselular karsinoma SNU387 hücreleri üzerindeki büyüme etkisi ise, düşük konsantrasyonlarda (0,2-0,25 µg/ml) bulunan enzimin hücre üzerinde büyümeyi desteklediği; konsantrasyon miktarı arttıkça (0,5-1,75 µg/ml hücre büyümesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda L-asparajinaz enzimi ilk defa *G. kaustophilus* organizmasından elde edilerek çalışılmıştır. Çalışmalarımız klinik olarak kullanılan asparajinazlara benzer karakteristik özellikler taşıdığını, ancak klinik olarak kullanılması için düşük üretiminin yeterli olmadığını ve düşük antikanser özelliği taşıdığını göstermektedir. *G. kaustophilus* organizmasından elde edilen L-asparajinazın optimum sıcaklığı öteki bakterilerden elde edilen asparajinazlarla kıyaslandığına antitumor uygulaması için uygun görülebilmektedir. Ayrıca, GkASNaz enziminin glutamini göz ardı edilebilecek değerlerde hidrolize ettiği gözlemlendiğinden dolayı glutaminaz içermediği ve bu sebeple antikanser tedavisi sırasında oluşabilecek yan etkilerin olasılığını azaltabileceği düşünülebilir. Fakat elde edilen bu rekombinant enzimin akut limfoblastik löseminin tedavisinde potansiyel bir aday olarak kullanılmasını belirlemek için ek çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Ali, S.S., Rai, Soni, V.K., Kulshrestha, P., Lai, S.K., (1994), "A Fungal L-Asparaginase with Potential Anti-Tumor Activity", Indian Journal of Microbiology, 34: 73-76.

Aghaiypour K, Wlodawer A, Lubkowski J., (2001), "Structural Basis for the Activity and Substrate Specificity Of *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase", Biochemistry, 40:5655–5664.

Aung H. P., Bocola M., Schleper S., Röhm K. H., (2000), "Dynamics of a Mobile Loop at the Active Site ff *Escherichia coli* Asparaginase", Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology, 1481(2):349-59.

Avramis V.I., Tiwari P.N., (2006), "Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia", International Journal of Nanomedicine, 1: 241–254.

Bansal S, Gnaneswari D, Mishra P, Kundu B., (2010), "Structural Stability and Functional Analysis of L-Asparajinase from *Pyrococcus furiosus"*, Biochemistry (Moscow), 75(3), *375 381*.

Basha, N.S., Rekha, R., Komala, M., Ruby, S., (2009), "Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme L-asparaginase from Marine Actinomyces by Solid-state and Submerged Fermentation: Purification and Characterization", Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 8 (4) 353-360.

Batool T., Makky E. A., Jalal M., Yusoff M.M., (2016), "A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications", Applied Biochemistry Biotechnology, 178 (5), 900-923.

Bhat M, Marar T., (2015), "Cytotoxic Effect of Purified L-Asparaginase from *Salinicoccus* sp. M KJ997975", International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4 (4):701-712.

Borah, D., Yadav, R.N.S., Sangra, A., Shahin, L., Chaubey A. K., (2012), "Production, Purification and Process Optimization of Asparaginase (An Anticancer Enzyme) from *E. coli*, Isolated from Sewage Water", Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 5, 202-204.

Borek D, Jaskólski M., (2001), "Sequence Analysis of Enzymes with Asparaginase Activity", Acta Biochimica Polonica, 48 (4):893-90.

Cantor, J.R., M. Stone, E., Chantranupong, L., Georgiou, G., (2009), "The Human Asparaginase-Like Protein1 hASRGL1 is an Ntn Hydrolase with β-aspartyl Peptidase Activity", Biochemistry, 48, 11026–11031.

Chohan S.M., Rashid N., (2013), "TK1656, A Thermostable L-Asparaginase from *Thermococcus kodakaraensis*, Exhibiting Highest Ever Reported Enzyme Activity", Journal of Bioscience and Bioengineering, 116 (4): 438-443.

Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H., (1989), "One-step Preparation of Competent *Escherichia coli*: Transformation and Storage of Bacterial Cells in the Same Solution", Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86 (7): 2172-5.

Covini, D., Tardito, S., Bussolati, O., Chiarelli, L.R. Pasquetto, M.V., Digilo, R., Valentini., Scotti, C., (2012), "Expanding Targets for a Metabolic Therapy of Cancer: L- Asparaginase", Recent Patent on Anti-Cancer Drug Discovery, 7: 4-13.

De Vita V. T., Jr., Chu E., (2008),"A History of Cancer Chemotherapy", Cancer Research, 68: (21).

El-Ahmady El-Naggar N., El-Ewasy S.M., El-Shewihy N.M., (2014), "Microbial L-Asparaginase as a Potential Therapeutic Agent for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: The Pros and Cons", International Journal of Pharmacology, 10 (4): 182-199.

Ghasemi, Y., Ebrahiminezhad, A., Amini, S.R., Zarrini, G., Ghoshoon, M.B., Raee, M.J. (2008), "An Optimized Medium for Screening of L-Asparaginase Production by *Eschrichia coli*", American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 4 (4): 422-424.

Hong, S.J., Lee, Y.H., Khan, A.R., Ullah, I., Lee, C., Park, C.K., Shin, J.H., (2014), "Cloning, Expression, and Characterization of Thermophilic L-Asparajinase from *Thermococcus kodakarensis KOD1*", Journal of Basic Microbiology (JBM). 54: 500-508.

Huang, L., Liu, Y., Sun, Y., Yan, Q., Jiang, Z., (2014), "Biochemical Characterization of a Novel L-Asparaginasewith Low Glutaminase Activity from *Rhizomu cormiehei* and Its Application in Food Safety and LeukemiaTreatment", Applied and Environmental Microbiology, 80(5): 1561–1569.

Husain I., Sharma A., Kumar S., Malik F., (2016), "Purification and Characterization of Glutaminase Free Asparajinase from *Pseudomonas otitidis*: Induce Apoptosis in Human Leukemia MOLT-4 Cells", Biochemie, 121: 38-51.

Hymavathi, M., Sathish T., Rao, Ch.S., (2009), "Enhancement of L-Asparaginase Production by Isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) Using Response Surface Methodology", Applied Biochemistry and Biotechnology, 159: 191-198.

Imada, A., Igarashı, S., Nakahama, K., Isono, M., (1973), "Asparaginase and Glutaminase Activities of Microorganisms", Journal of General Microbiolgy", 76: 85-89.

Jain R, Zaidi KU, Verma Y, Saxena P., (2012), "L-Asparaginase: A Promising Enzyme for Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia", People's Journal of Scientific Research. 5(1): 29-35.

Jia M, Xu M, He B, Rao Z., (2013), "Cloning, Expression, and Characterization of L-Asparaginase from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* B11−06", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61: 9428-9434.

Jois, S., Chandru, S., Chavan A., Lakshmikantha, R.Y., Satwadi., (2013), "Study on Production, Prufication and Characterization of L-Asparajinase from *Escerichia coli* and *Pseudomonas Aeruginosa*", International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 3(3), 565-570.

Kishore, V., Nishita, K. P., Manonmani, H. K., (2015), "Cloning, Expression and Characterization of L-Asparaginase from *Pseudomonas Fluorescens* for Large Scale Production in *E. coli* BL21", *3 Biotech*, *5*(6): 975–981.

Kotzia, G.A., Labrou, N.E., (2007), "L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: Cloning, Expression and Characterization", Journal of Biotech, 127 (4): 657–669.

Kozak, M., Borek, D., Janowski, R., Jaskolski, M., (2002), "Crystallization and Preliminary Crystallographic Studies of Five Crystal Forms of *Escherichia coli* L-Asparaginase II (Asp90Glu mutant)", Acta Crystallographica Section D, 58: 130–132.

Laemmli U.K., (1970), "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", Nature, 227 (5259): 680-5.

Leow T.C., Rahman R.N., Basri M., Salleh A.B., (2007), "A Thermoalkaliphilic Lipase of *Geobacillus* sp. T1", Extremophiles,11 (3): 527-35.

Lubkowski, J., Palm, G.J., Gilliland, G.L., Derst, C., Rohm, K.H., Wlodawer, A., (1996), "Crystal Structure and Amino Acid Sequence of *Wolinella succinogenes* L-Asparaginase", European Journal of Biochemistry, 241(1): 201-7.

Mahajan RV, Kumar V, Rajendran V, Saran S, Ghosh PC, Saxena RK (2014) "Purification and Characterization of a Novel and Robust L-Asparaginase Having Low-Glutaminase Activity from *Bacillus licheniformis: In Vitro* Evaluation of Anti-Cancerous Properties", PLOS ONE, 9(6): e99037.

Michalska K., Jaskolski M. (2006), "Structural Aspect of L-asparajinases, Their Friend and Relations", 53 (4): 627-640.

Mohamed, S.A., Elshal, M.F., Kumosani, T.A., Aldalawi, A.M., (2015), "Purification and Characterization of Asparajinase from *Phaseolus vulgaris* Seeds", Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-6.

Moreno-Enriquez A, Evangelista-Martinez Z, Gonzalez-Mondragon EG, Calderon-Flores A, Arreguin R, Perez-Rueda E, Huerta-Saquero A., (2012), "Biochemical Characterization of Recombinant L-Asparaginase (AnsA) from *Rhizobium etli*, a Member of an Increasing Rhizobial-type Family of L-Asparaginases", Journal of Microbiology Biotechnology, 22(3): 292-300.

Mukherjee, J., Focris, K., Riechel, P., Scheper, T., (1999), "A Simple Method for the Isolation and Purification L-Asparaginase from *Enterobacter aerogenes*", Folia Microbiology, 44(1): 15-18.

Müller H. J., Boos J., (1998), "Use of L-Asparaginase in Childhood ALL", Critical Review in Oncology/Hematology, 28: 97–113.

Narta, UK., Kanwar, S.S., Azmi, W., (2007), "Pharmacological and Clinical Evaluation of L-Asparaginasein the Treatment Of Leukemia", Critical Reviews in Oncology/Hematology, 61: 208-221.

Nguyen H.A., Su Y., Lavie A., (2016), "Structural Insight into Substrate Selectivitiy of *Erwinia chrysanthemi* L-Asparajinase", Biochemistry, 55: 1246-1253.

Pagliardi G. L., Gabutti V., Gavosto F., (1973) "Mechanism of Action of L-Asparaginase on the Cell Cycle and Growth in Acute Lymphoblastic Leukemia", Acta Haematology, 50: 257-268.

Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel A,. (2011), "L-Asparaginase Treatment in Acute Lymphoblastic Leukemia", Cancer, 117: 238–49.

Pokrovskaya MV, Aleksandrova SS, Pokrovsky VS, Omeljanjuk NM, Borisova AA, Anisimova NY, Sokolov NN., (2012), "Cloning, Expression and Characterization of the Recombinant *Yersinia Pseudotuberculosis* L-Asparaginase", Protein Expression and Purification, 82:150-154.

Richard, Nigel G. J., Kilberg, Michael S., (2013), "Asparajine Synthetase Chemotherapy", Annual Review of Biochemistry, 75: 629-654.

Ronimus R.S., Parker L.E., Morgan H.W., (1997), "The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species", FEMS Microbiology Letter, 147 (1),75-9.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., (1989), "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", 2nd edition. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sarquis, M.I.M., Oliveira, E.M.M., Santos, Alberdan S.S., Costa, G. L., (2004), "Production of L-asparaginase by Filamentous fungi", Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 99(5): 489-492

Shukla, S., Mandal, S.K., (2013), "Production Optimization of Extracellular L-Asparaginase Through Solid State Fermentation by Isolated *Bacillus subtilis*", International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 4 (1): 219-226.

Song P., Ye L., Fan J., Li Y., Zeng X., Wang Z., Wang S., Zhang G., Yang P., Cao Z., Ju D., (2015), "Asparaginase Induces Apoptosis and Cytoprotective Autophagy in Chronic Myeloid Leukemia Cells", Oncotarget, 6(6): 3861-3873.

Swain, A. L., Jaskólski, M., Housset, D., Rao, J. K., & Wlodawer, A. (1993), "Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an Enzyme Used in Cancer Therapy", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *90*(4), 1474–1478.

Takami H., Nishi S., Lu J., Shimamura S., Takaki Y., (2004), "Genomic Characterization of Thermophilic *Geobacillus* species Isolated from The Deepest Sea Mud of the Mariana Trench", Extremophiles, 8 (5): 351-356.

Verma, N.; Kumar, K.; Kaur, G.; Anand, S., (2007), "L-Asparaginase: A Promising Chemotherapeutic Agent", Critical Reviews in Biotechnology*, 27*: 45–62.

Vidya, J., Vasudevan, U.M., Soccol, C.R., Pandey, A., (2011), "Cloning, Functional Expression and Characterization of L-Asparaginase II from *E. coli MTCC 739*", Food Technology and Biotechnology, 49 (3): 286–290.

Vidya J., Pandey A., (2012), "Recombinant Expression and Characterization of L-Asparaginase II from a Moderately Thermotolerant Bacterial Isolate", Applied Biochemistry and Biotechnology, 167: 73–980.

Warangkar, S.C., Khobragade, C.N., (2010), "Purification, Characterization, and Effect of Thiol Compounds on Activity of the *Erwinia carotovora* L-Asparaginase," Enzyme Research, 2010, Article ID 165878.

Web 1, (2006), http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf, (Erişim Tarihi : 11/04/2018).

Yang H., He X., Zheng Y., Feng W., Xia X., Yu X., Lin Z., (2014), "Down Regulation of Asparagine Synthetase Induces Cell Cycle Arrest and Inhibits Cell Proliferation of Breast Cancer", Chemical Biology and Drug Design, 84: 578-584.

Yu, M., Henning, R., Walker, A., Kim, G., Perroy, A., Alessandro, R., Virador, V., Kohn, E.C., (2012), "L-Asparaginase Inhibits Invasive and Angiogenic Activity and Induces Autophagy in Ovarian Cancer", Journal of Cellular and Molecular Medicine,16(10): 2369-78.

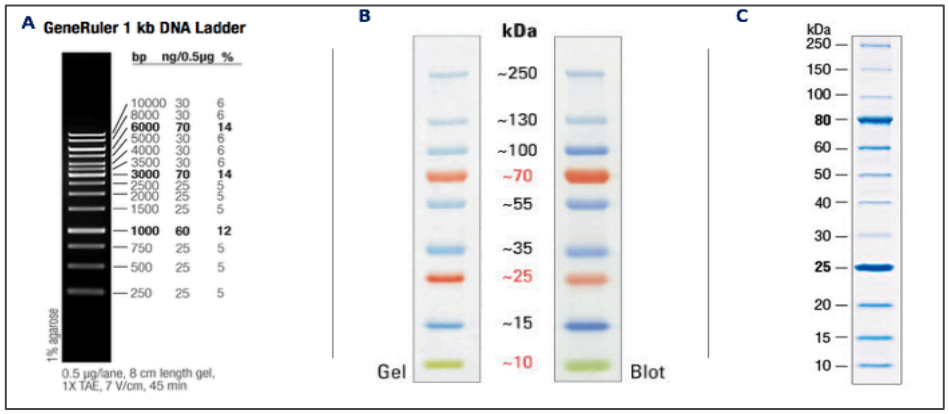
Zou S., Xue D., Zhang T., Jiang B., Mu W., (2014), "Biochemical Characterization of an Extremely Thermostable L-Asparajinase from *Thermococcus gammatolerans EJ3*", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 109: 122–129.

ÖZGEÇMİŞ

MÜGE DİDEM ORHAN, 26 Mart 1988 yılında İstanbul'da doğdu. 2013 yılında Sabancı Üniversitesi Fen Bilimleri ve Mühendislik Fakültesi Biyoloji Bilimleri ve Biyomühendislik bölümünde lisans eğitimini tamamladıktan sonra Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Ensititüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Eylül 2015 yılında yüksek lisansa başladı.

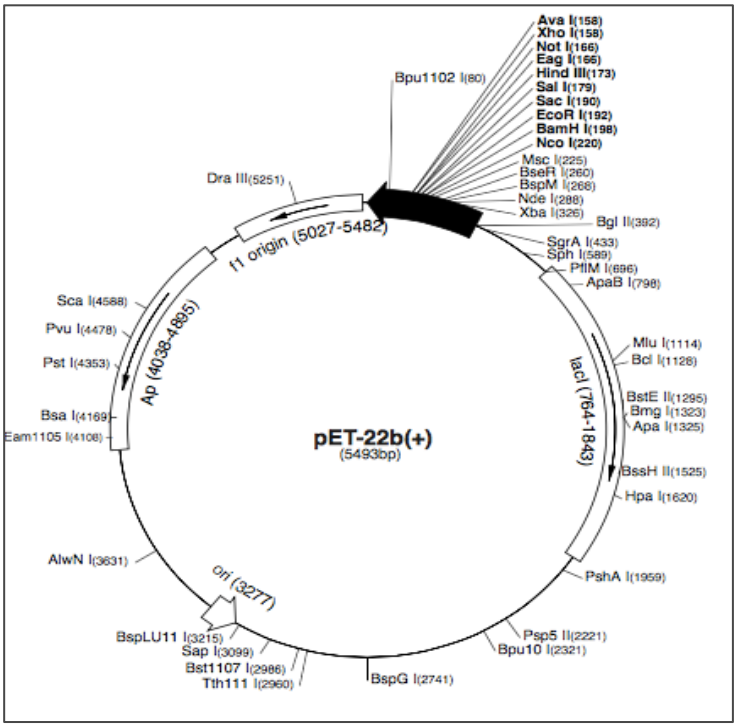
EKLER

EK-A: Moleküler Belirteçler



Şekil A1.1: a) Moleküler DNA belirteci, Thermo Fisher Scientific SM 0311. b) Moleküler protein belirteci; Thermo Fisher Scientific SM 26619. C) Moleküler protein belirteci; BioLab, Protein Ladder 10-250kDa, P7703S.

EK-B: Kullanılan Plazmit Vektörü

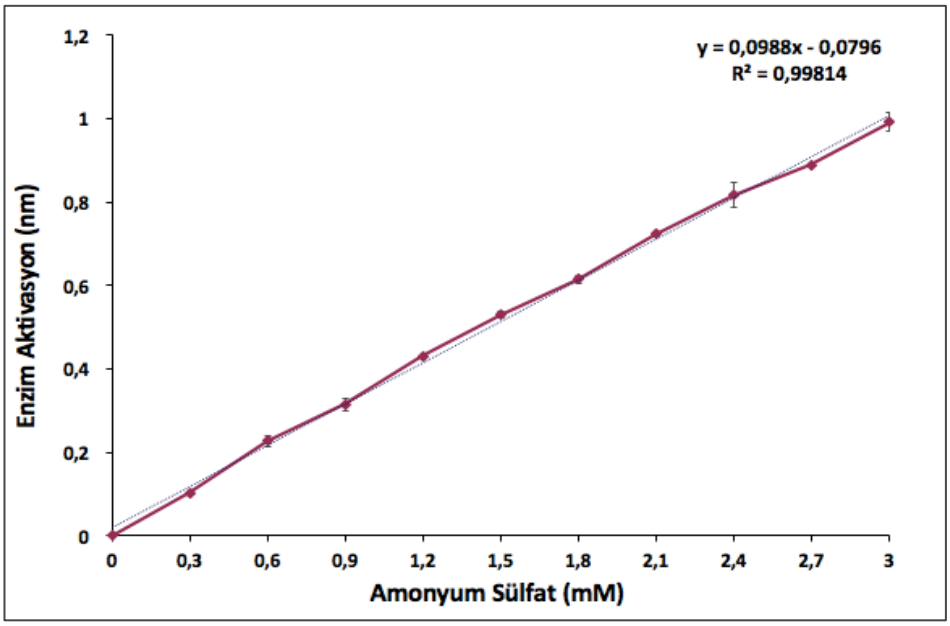


Şekil B1.1: pET-22b(+) ekspres vektörünün dairesel haritası.



Şekil B1.2: pET-22b(+) klonlama/ekspresyon bölgesi

EK-C: Amonyum Sulfat Standard Grafiği



Şekil C1.1:Açığa çıkan amonyak tayini için Amonyum Sulfat standard grafiği

EK-D : *GkASNaz* Aktivitesine Etki Eden Metallerin UI/ug ve Standard Sapma Değerleri.

METAL İON	UI/ug
Kontrol	0,879 ± 0,048
$BaCl_2$	0,686 ± 0,035
$CaCl_2$	0,674 ± 0,108
$CdCl_2$	0,465 ± 0,024
$CoCl_2$	0,485 ± 0,002
$CuCl_2$	0,130 ± 0,005
$FeCl_3$	0,105 ± 0,002
KCl	0,747 ± 0,019
LiCl	0,745 v 0,053
$MgCl_2$	1,359 ± 0,070
$MnCl_2$	1,644 ± 0,032
NaCl	0,788 ± 0,007
$ZnCl_2$	0,475 ± 0,038

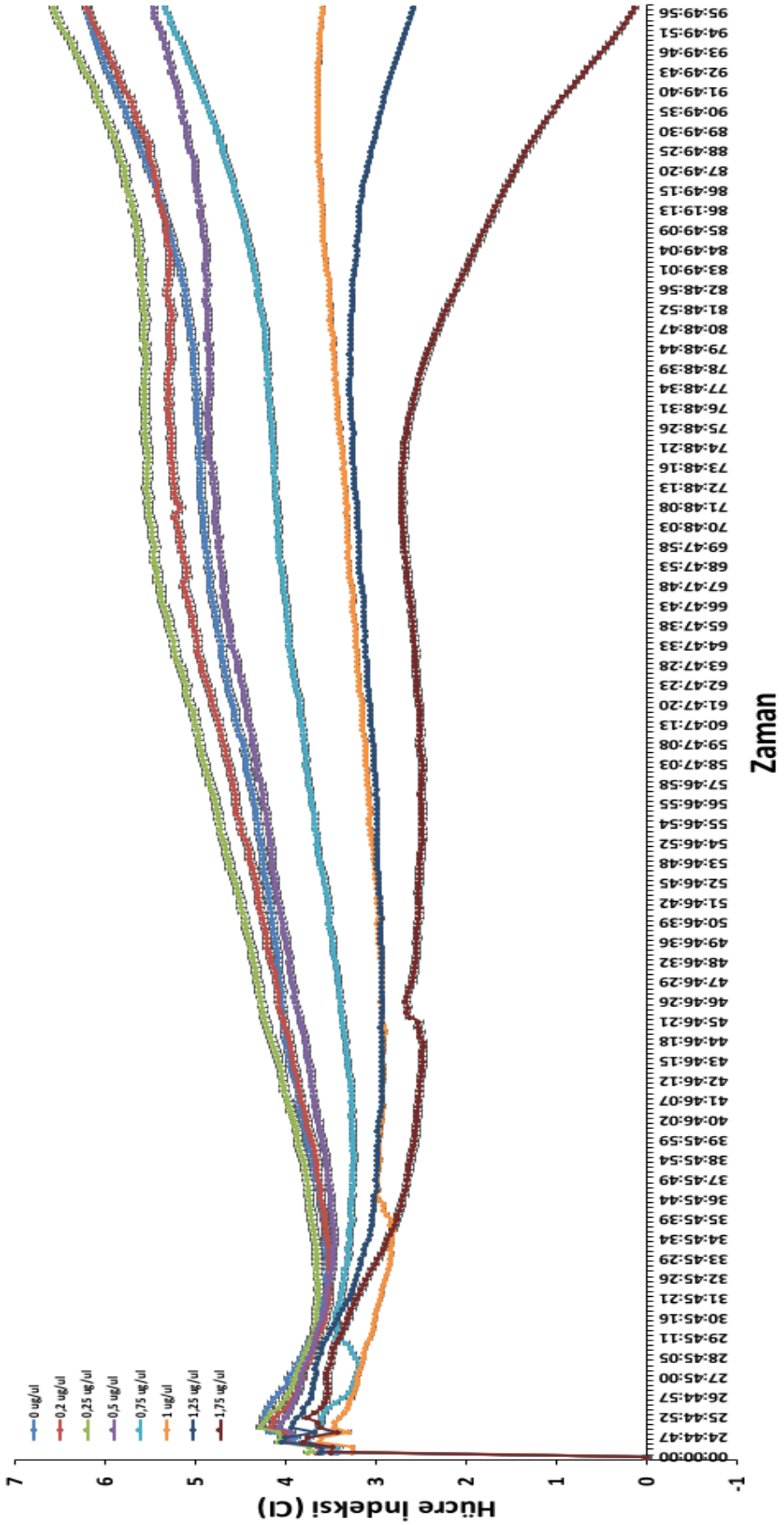
Şekil D1.1: GkASNaz aktivitesine etki eden metallerin UI/ug ve standard sapma değerleri.

EK-E: *GkASNaz* Aktivitesine Etki Eden Deterjan ve Ajanların UI/ug ve Standard Sapma Değerleri.

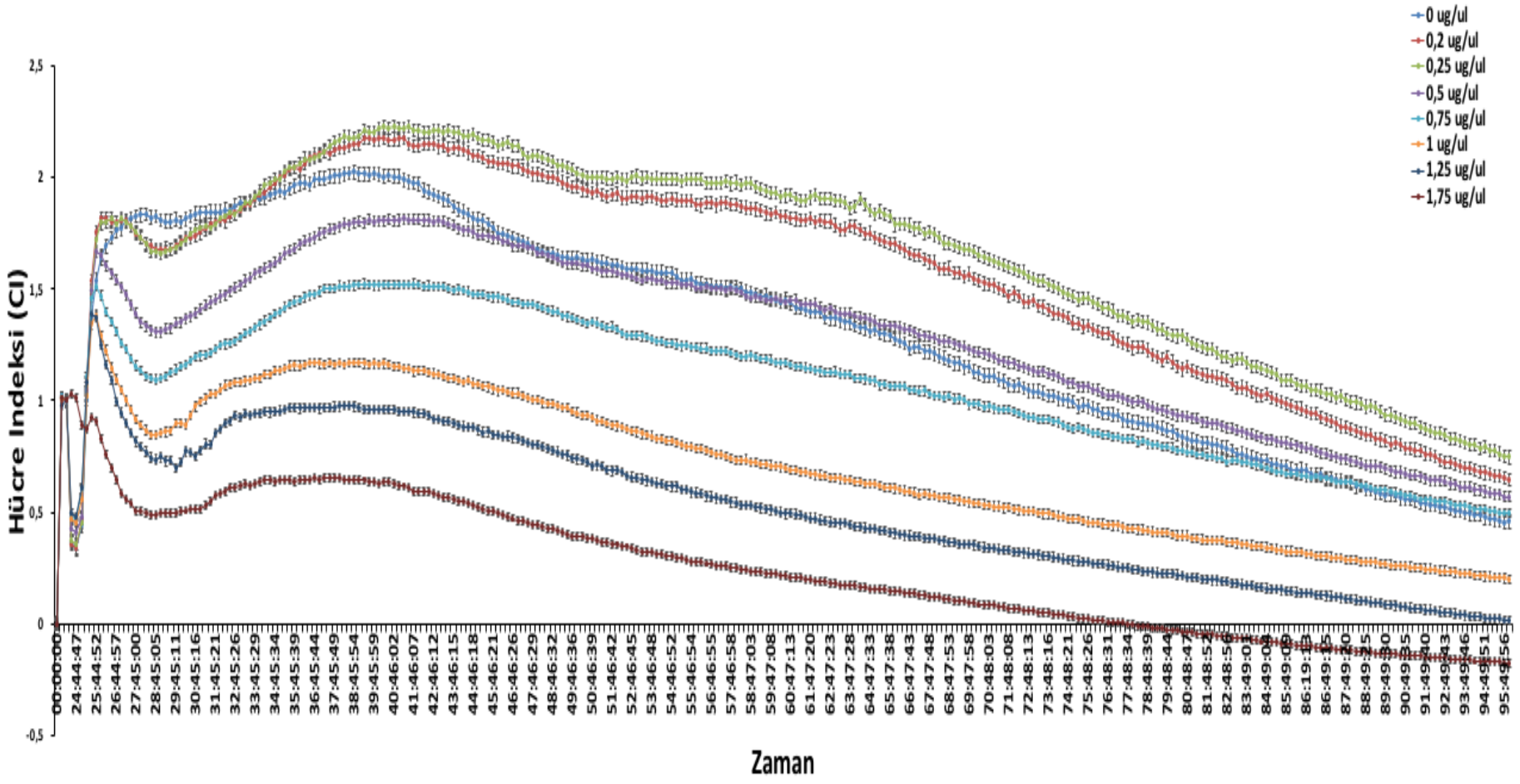
Deterjan/Ajan	UI/ug
Kontrol	0,879±0,048
0,5 mM 2-ME	1,005±0,023
5 mM EDTA	0,688±0,160
5 mM EGTA	0,358±0,020
5 mM DTT	1,341±0,238
2,5 mM SDS	0,143±0,011
%1 TRİTON X-100	0,041± 1,086
%1 TWEEN20	0,323±0,037
2,5 mM UREA	0,790±0,043

Şekil E1.1: GkASNaz aktivitesine etki eden detrjan ve ajanların UI/ug ve standard sapma değerleri.

EK-F: Antiprolifereasyon Etkisi



Şekil F1.1: Hep3B malignant hücreleri üzerinde uygulanan GkASNaz rekombinant enziminin 96 saatlik etkisini gösteren grafik.



Şekil F1.2: SNU387 malignant hücreleri üzerinde uygulanan GkASNaz rekombinant enziminin 96 saatlik etkisini gösteren grafiği.