

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS
L-ASPARAJİNAZ II ENZİMİNİN
KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

ZEYNEP TANSU ATASAVUM
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2019

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS
L-ASPARAJİNAZ II ENZİMİNİN
KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

ZEYNEP TANSU ATASAVUM
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞRETİM ÜYESİ FATMA İNCİ ÖZDEMİR

GEBZE
2019

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**DETERMINATION OF KINETIC PROPERTIES OF
RECOMBINANT GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS L-
ASPARAGINASE II ENZYME**

ZEYNEP TANSU ATASAVUM

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

ASSIST. PROF. DR. FATMA İNCİ ÖZDEMİR

Gebze

2019

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 03.../07.../2019.. tarih ve 2019.../30..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 24/10/2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Zeynep Tansu ATASAVUM'un tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : DR. ÖĞR. ÜYESİ Fatma İnci ÖZDEMİR

ÜYE

: PROF. DR. Melek ÖZKAN

ÜYE

: PROF. DR. Fatma Neşe KÖK

4
Fatma İnci ÖZDEMİR
Melek ÖZKAN
Fatma Neşe KÖK

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

L-asparajinaz (EC 3.5.1.1) asparajin amino asidinin aspartik asit ve amonyağa dönüşümünü sağlayan enzimdir. Tümör hücreleri asparajini sentezleyemediklerinden kan dolaşımındaki asparajini kullanırlar. Bu sebeple, L-asparajinaz çeşitli kan kanseri tiplerinde kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır. L-asparajinaz aynı zamanda yüksek sıcaklıkta pişirilen gıda maddelerinde oluşan ve L-asparajinin öncül maddesi olduğu akrilamidin gideriminde de kullanılmaktadır. Hem ilaç hem de gıda sektöründe yüksek sıcaklık ve geniş pH aralığında aktivitesini kaybetmeyen L- asparajinaz türlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle ilgili tez çalışmasında, yüksek sıcaklıklarda yaşayan termofilik bakterilerden biri olan *Geobacillus kaustophilus*'a ait olan L-asparajinaz enziminin rekombinant olarak elde edilmesi ve kinetik ve termal kararlılık özelliklerinin çalışılması amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda *Geobacillus kaustophilus* tip II L-asparajinaz geni pET22b(+) vektörüne BamHI-Sall enzim çifti kullanılarak klonlanmış ve *E. coli* Rosetta 2 (DE3) hücrelerinde ekspresyonu incelenmiştir. Gen ürününün N-terminalinde periplazmik lokasyonu sağlayan pelB sinyal dizisi ve C-terminalinde Hisx6 etiketi bulunması amaçlanmıştır. Böylelikle hücrede yüksek miktarda üretimi IPTG uyarımıyla sağlanan rekombinant L-asparajinaz enziminin periplazmik bölgede birikiminin enziminin saflaştırılmasına olan etkisinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. N-terminalinde pelB sinyal dizisi taşıyan L-asparajinazın *E. coli* hücrelerinde ifade edilmediği görülmüştür. Çalışmalara pelB sinyal dizisi taşımayan rekombinant L-asparajinaz ile devam edilmiştir. Enzim Ni-NTA agaroz ile tek basamakta saflaştırılmıştır. Saflaştırılan L-asparajinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği 55°C sıcaklıkta ve pH 8.5'ta L-asparajin substratı için Km değeri 0.49 mM olarak hesaplanmış; L-glutamin substratı içinse Km değeri 2.5 mM olarak hesaplanmıştır. Yapılan termostabilite deneylerinde enzimin 37°C ve 55°C sıcaklıklarında aktivitesini 6 saat boyunca kaybetmediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: L-asparajinaz, enzim kinetiği, termostabilite.

SUMMARY

L-asparaginase (EC 3.5.1.1) is an enzyme that converts asparagine amino acid to aspartic acid and ammonia. Since tumor cells cannot synthesize asparagine, they use asparagine in the bloodstream. L-asparaginase has been used as a chemotherapeutic agent in various types of blood cancer. L-asparagine is the precursor of acrylamide formed in high-temperature foodstuffs. Therefore, L-asparaginase is used in the mitigation of acrylamide. L-asparaginases, which are stable in high-temperature and wide pH range, are needed in the pharmaceutical and food sectors. Therefore, our aim is to obtain the recombinant L-asparaginase enzyme belonging to a thermophilic bacteria *Geobacillus kaustophilus*, and to study its kinetic and thermostability properties. For this purpose, *Geobacillus kaustophilus* type-II L-asparaginase gene was cloned into the pET22b(+) vector using *Bam*HI-*Sal*I enzymes and its expression in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) cells was examined. The pelB signal sequence providing the periplasmic location at the N-terminus of the gene product and the Hisx6 tag at the C-terminus was intended. Thus, it was aimed to compare the effect of the accumulation of recombinant L-asparaginase enzyme in the periplasmic region on the purification of the enzyme. L-asparaginase bearing the pelB signal sequence at the N-terminal was not expressed in *E. coli* cells. The studies were continued with recombinant L-asparaginase without the pelB signal sequence. The enzyme was purified with Ni-NTA agarose. Km value for L-asparagine is 0.49mM at 55°C and pH 8.5, Km value for L-glutamine is 2.5mM. Thermostability experiments showed that the enzyme kept its activity at 37°C and 55°C for 6 hours.

Key Words: L-asparaginase, enzyme kinetics, thermostability.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip bilgisi ile bu çalışmanın oluşmasının yolunu açan danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Fatma İnci ÖZDEMİR'e;

Tez çalışmamı değerlendiren sayın jüri üyeleri Prof. Dr. Melek ÖZKAN ve Prof. Dr. Fatma Neşe KÖK'e;

Bilgi ve tecrübelerini büyük bir sabır ve sevgiyle paylaşan hocalarım Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK, Dr. Tuğrul DORUK, Dr. Zeynep DEMİR ÖKSÜZ ve Dr. Zeynep GİRGİN ERSOY'a; beni her zaman evimdeymişim gibi hissettiren, destekleyen ve güldüren canım arkadaşlarım Müge Didem ORHAN, Müberra Fatma CESUR, Nagihan GENEL, Buse ÇINAR, Halil YILMAZ, Ğarip DEMİR, Çiğdem BOZKURT, Aslı BAYRAKTAR KAVALCI, Mouhktar BARKAD, Gözde ÖZÇELİK, Bihter MURATOĞLU, Senanur OLFAZ, Fatma YILMAZ, Satı PALTACI, Hüseyin GÜL, Sinem GÜL ve Büşra TIRYAKI'ye,

Göstermiş olduğu koşulsuz sevgi ve desteği için Çağatay DENİZ'e

Sonsuz sevgileri, şefkatleri ve destekleri için sevgili annem Çeşminaz ATASAVUM, babam Ali Osman ATASAVUM ve ağabeyim Salim Onur ATASAVUM'a ve neşe kaynağım biricik dostum Volkan ÇOLAK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. L-ASPARAJİNAZLAR	4
2.1. L-asparajinazın Elde Edildiği Organizmalar	6
2.2. L-Asparajinazın İlaç Sektöründe Kullanımı	9
2.3. L-Asparajinazların Gıda Sektöründe Kullanımı	11
2.4. L-Asparajinaz Üretim Teknikleri	13
2.5. <i>Geobacillus kaustophilus</i> 'un Özellikleri	14
3. MALZEME VE YÖNTEM	15
3.1. Bakteri Soyları ve Plazmit Vektörleri	15
3.2. Kullanılan Besiyerleri	15
3.3. Kullanılan Çözeltiler	15
3.4. Kimyasallar ve Enzimler	15
3.5. Cihazlar	15
3.6. <i>G. kaustophilus</i> L-asparajinaz Geninin Çoğaltılması	16
3.7. Restriksiyon Enzim Kesimi	17
3.8. Ligasyon	17
3.9. Kompetan <i>E.coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması	17
3.10. Kompetan <i>E.coli</i> Hücrelerinin Transformasyonu	18
3.11. Transformantların Koloni PZR ile Doğrulanması	18
3.12. Plazmit İzolasyonu	19
3.13. AgaroZ Jel Elektroföresi	19

3.14. Jelden DNA İzolasyonu	20
3.15. Protein Ekspresyonu	20
3.16. Protein Saflaştırma	20
3.17. SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforezi	21
3.18. Protein Miktar Tayini	21
3.19. Enzim Aktivitesi Tayini	21
4. SONUÇLAR	23
4.1. <i>Geobacillus kaustophilus</i> L-Asparajinaz Geninin Klonlanması	23
4.2. <i>G. kaustophilus</i> L-Asparajinaz Geninin Rosetta 2 (DE3) Hücrelerinde Ekspresyonu	26
4.3. <i>Geobacillus kaustophilus</i> L-Asparajinaz Enziminin Saflaştırılması	28
4.4. Saflaştırılan <i>Geobacillus kaustophilus</i> L-Asparajinazın Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi	30
4.4.1. Asparajinaz Enziminin Aktivite Tayini	30
4.4.2. Sıcaklığın Asparajinaz Aktivitesine Etkisi	31
4.4.3. Substrat Konsantrasyonunun L-Asparajinaz Aktivitesine Etkisi	32
4.4.4. L-asparajinazın Kinetik Analizi	33
4.4.5. L-asparajinazın Isıl Kararlılığının Belirlenmesi	34
5. TARTIŞMA	36
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	50
EKLER	51

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
~	: Yaklaşık
α	: Alfa
β	: Beta
μ	: Mikron
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
ALL	: Akut Limfoblastik Lösemi
Amp	: Ampisilin
APS	: Amonyum Persülfat
Arg	: Arjinin
Asp	: Aspartat/Aspartik Asit
Asn	: Asparajin
Asnaz	: Asparajinaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
<i>Bam</i> HI-HF	: <i>Bacillus amyloliquenfaciens</i> H Endonükleaz
Bç	: Baz Çifti
DMSO	: Dimetilsülfoksit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EcA	: <i>Escherichia coli</i> Asparajinaz
ErA	: <i>Erwinia crysanthem</i> i Asparajinaz
EwA	: <i>Erwinia carotovora</i> Asparajinaz
Gk	: <i>Geobacillus kaustophilus</i>
GkASNazII	: <i>Geobacillus kaustophilus</i> Asparajinaz
Gly	: Glisin
HCl	: Hidroklorik Asit
His	: Histidin
IPTG	: İzopropil-Beta-D-Tiyo-Galaktopiranozid

kDa	: Kilodalton
L	: Litre
LB	: Luria Broth
Lys	: Lizin
M	: Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
PAGE	: Poliakrilamit Jel Elektroforezi
Phe	: Fenilalanin
pmol	: Pikomol
Rpm	: Dakika Başı Dönüş
SDS	: Sodyum Dodesilsülfat Salt
SOB	: Süperoptimal Brot
SOC	: Süperoptimal Brot (Katabolik Baskılama)
SmF	: Submerged Fermentasyon
TCA	: Triklor Asetik Asit
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TSS	: Toplam Katı Solüsyonu
UI	: Ünite
V	: Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: L-asparajinazın etki mekanizması.	3
2.2: L-asparajinaz türleri.	4
2.3: Maillard reaksiyonu.	12
3.1: <i>Geobacillus kaustophilus</i> L-asparajinaz II geninin PZR ile çoğaltılması.	24
3.2: pET22b(+) vektörünün ligasyon reaksiyonu için <i>Bam</i> HI- <i>Sall</i> enzim kombinasyonu ile kesilmesi.	25
3.3: Koloni PZR sonuçlarının agaroz jelde görüntülenmesi.	25
3.4: Rekombinant plazmidin restriksiyon enzim kesim analizi.	26
3.5: <i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) transformantlarının taranması.	27
3.6: pET22b(+)/GkASNazII içeren transformant <i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) hücrelerinin IPTG ile uyarımı.	28
3.7: IPTG ile uyarılan <i>E. coli</i> rosetta 2 (DE3) hücrelerinde protein ekspresyonu.	28
3.8: Saflaştırma için rekombinant <i>E.coli</i> Rosetta 2 (DE3) hücrelerinin saflaştırma için hazırlanması.	29
3.9: Ni-NTA agaroz ile GkASNazII enziminin saflaştırılması.	30
3.10: Saflaştırılmış proteinin SDS-PAGE analizi.	30
3.11: Farklı saflaştırma basamaklarında L-asparajinazın spesifik aktivitesi.	32
3.12: Sıcaklığın GkASNazII aktivitesi üzerine etkisi.	33
3.13: Substrat konsantrasyonunun L-asparajinaz aktivitesine etkisi.	34
3.14: GkASNazII'nin L-asparajin için Lineweaver-Burk grafiği.	34
3.15: GkASNazII'nin L-glutamin için Lineweaver-Burk grafiği.	35
3.16: GkASNazII'nin 0-120 dakika arasındaki ısı kararlılığı.	35
3.17: GkASNazII'nin 0-6 Saat arasındaki ısı kararlılığı.	36

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: L-asparajinaz enziminin bakteriyel kaynakları.	6
2.2: L-asparajinaz enziminin izole edildiği fungal kaynaklar.	8
2.3: L-asparajinaz enziminin elde edildiği bitkisel kaynaklar.	9
2.4: Kanseri tedavisinde kullanılan ticari L-asparajinazlar.	11
3.1: GkASNazII'yi çoğaltmak için kullanılan primer seti. pET22b(+) vektörü için tasarlanan primer seti.	17
3.2: GkASNazII'yi çoğaltmak için hazırlanan PZR reaksiyonu bileşenleri.	18

1. GİRİŞ

L-asparajin esansiyel olmayan bir amino asit olup, hücre içerisinde asparajin sentetazlar tarafından sentezlenmektedir. Birçok tümör hücresi, özellikle lenfatik tümör hücreleri, hızlı malignant büyüme için yüksek miktarda L-asparajine ihtiyaç duymaktadırlar. Sağlıklı hücrelerden farklı olarak tümör hücreleri L-asparajini sentezleyememekte ve bu nedenle beslenmeleri için kan dolaşımındaki L-asparajine ihtiyaç duymaktadırlar (Lanvers ve ark., 2002). L-asparajin eksikliğinde protein sentezi engellenmekte ve tümör hücreleri apoptoza uğramaktadır. Bu nedenle, L-asparajinaz enzimi ile kandaki L-asparajin havuzunun yok edilmesine yönelik çalışmalar kanser tedavisi açısından büyük önem arz etmektedir. L-asparajinaz aynı zamanda gıda endüstrisinde kanserojen ve nörotoksik bir madde olan akrilamit oluşumunun önlenmesinde kullanılmaktadır. Akrilamit, yüksek sıcaklıklarda işlem gören gıdalarda L-asparajin amino asidinin indirgen şekerler ile tepkimeye girmesi sonucu oluşmaktadır (Pedreschi, F., 2009). Pişirme öncesi gıda L-asparajinaz ile muamele edilerek L-asparajin L-aspartik aside dönüştürülmekte ve pişirme sonrası meydana gelen akrilamit seviyesini önemli ölçüde düşürmektedir.

Bugüne kadar *E. coli* ve *Erwinia conotovar*'dan elde edilen L-asparajinaz enzimleri özellikle lösemi tedavisinde kullanılmaktadır (Phillips, RM ve ark., 2013; Warangkar, SC., 2010). Enzimin uzun süreli kullanımı sonucunda, hastalarda anafilaktik şok, pankreatit, lökopeni gibi rahatsızlıklar ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, gıda endüstrisinde kullanılan L-asparajinazların yüksek sıcaklık ve geniş pH aralığında aktivitesini yitirmeden stabil kalmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca hem gıda sanayinde hem de hastalık tedavisinde yarı ömrü uzun L-asparajinazların gerekliliği ortadadır. Günümüzde kullanılan L-asparajinazlar ise hem bu ihtiyaçları tam karşılayamamakta hem de yeterli verimde üretilmemektedir. Yüksek sıcaklıklarda yaşayan termofilik organizmalardan elde edilen termostabilitesi yüksek enzimler, mezofilik organizmalardan elde edilen kaynaklara göre daha uzun yarı ömre sahip olabilmekte ve oda sıcaklığında aktivitelerini yitirmeden daha uzun süre dayanabilmektedirler. Bunun yanında, bu enzimler kimyasal denaturantlara karşı daha dirençli olabilmektedirler. L-asparajinazların ilaç ve gıda sanayindeki önemi ve

mevcut L-asparajinazların dezavantajları göz önüne alındığında, termofilik kaynaklardan elde edilen L-asparajinazların sahip olduğu potansiyel heyecan vericidir.

L-asparajinaz enzimi, kanser, özellikle ALL (akut lenfoblastik lökemi) tedavisinde kullanılan terapötik bir ajandır. Enzim bugüne kadar *Aerobakter sp.*, *Erwinia sp.*, *Serratia sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Pectobacterium sp.*, *Photobacterium sp.*, *Streptomyces sp.* ve *Aspergillus sp.* gibi birçok farklı bakteri türünden saflaştırılmış olsa da klinik uygulamalarda *E. coli* ve *Erwinia chrysanthemi* organizmalarından elde edilen türleri yüksek afiniteleri nedeniyle tercih edilmektedir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında *Geobacillus kaustophilus*'a ait L-asparajinaz enziminin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilmesi ve temel kinetik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Yapılan literatür araştırmasına göre, *Geobacillus kaustophilus* organizmasından elde edilen L-asparajinaz ile ilgili kinetik analizler içeren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu amaç doğrultusunda rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan, gram-negatif bir bakteri olan *E. coli* konakçı hücre olarak seçilmiştir. *E. coli*'nin, eksprese edilen rekombinant proteinlerin yönlendirilip birikebileceği periplazmik bölgeye sahip olması, doğru katlanmış rekombinant proteinlerin saflaştırılması sırasında karşılaşılan sorunların giderilmesinde bir avantaj sağlamaktadır. Periplazmik bölgeden protein saflaştırılması, sitoplazmik proteinlerin saflaştırılmasına nazaran daha basittir. Proteinin periplazmik bölgeye salgılanması klonlanan gen ürünlerinin stabilitesini arttırmaktadır (Lee ve Choi., 2004). Daha önce yapılan çalışmalarda, periplazmik boşluğa salgılandığında rekombinant proinsülin proteinin yarı ömrünün 10 kat arttığı gösterilmiştir. *Geobacillus kaustophilus*'a ait L-asparajinaz geninin klonlanacağı pET22b(+) ekspresyon vektörü pelB (pectate lyase B) adı verilen ve *Erwinia carotovora*'da keşfedilen, proteinlerin N-terminaline eklenerek onları periplazmik bölgeye yönlendiren 22 amino asit uzunluğunda bir sinyal dizisi içermektedir. Sinyal dizisi, protein periplazmik bölgenin membranına ulaştığında buradaki bir reseptöre bağlanarak proteinden ayrılır. Sinyal dizisinden ayrılan protein periplazmik bölge içinde kalır. pelB sinyal dizisi ile birlikte eksprese

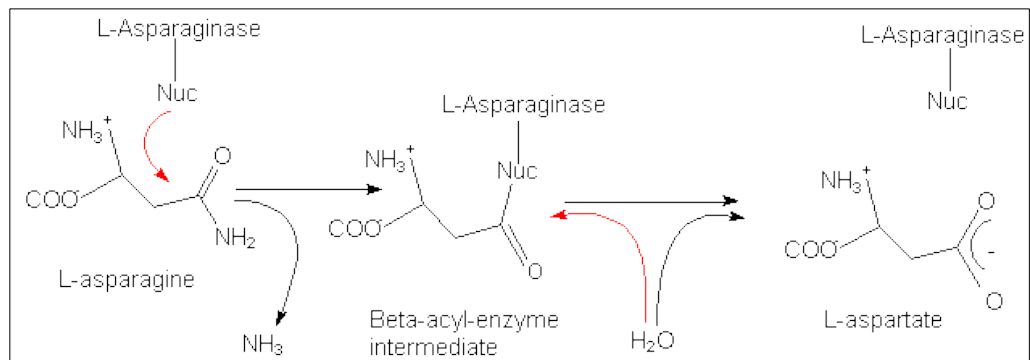
edilen ve periplazmik bölgede lokalize olması beklenen enzimin saflaştırma veriminin; pelB sinyal dizisi olmadan eksprese edilen rekombinant enziminki ile karşılaştırılması hedeflenmiştir. Termofilik bir bakteri olmasından dolayı, *Geobacillus kaustophilus*'tan elde edilen L-asparajinaz enziminin termostabilitesinin yüksek olması beklenmektedir.

Bu tez çalışmasında, termofilik bir bakteri olan *G. kaustophilus*'tan L-asparajinaz geninin pET22b(+) vektörüne aktararak, rekombinant proteinin hücrenin periplazmik bölgesinde birikerek daha kolay ve verimli şekilde saflaştırılmasını sağlaması için proteini periplazmik lokasyona yönlendirecek olan pelB sinyal dizisi içerecek şekilde *E. coli* Rosetta 2 (DE3) hücrelerinde eksprese edilmesi, 6xHistidin etiketli proteinin Ni-NTA agaroz kullanılarak saflaştırılması, kinetik değerlerinin hesaplanması, ısı kararlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. L-ASPARAJİNAZLAR

L-asparajinin, L-aspartat ve amonyuma enzimatik hidrolizi ilk olarak Lang tarafından 1904 yılında sığır dokularında gözlemlenmiştir. 1910 yılında Fürth ve Friedmann at ve domuza ait organlarda asparajinaz aktivitesini doğrulamıştır. 1961 yılına gelindiğinde ise antitümör etkiye sahip olduğu gözlemlenen guinea pig serumunun bu özelliğini L-asparajinaz aktivitesine borçlu olduğu anlaşılmıştır, bakteriler gibi birçok farklı organizmada L-asparajinaz enziminin varlığı keşfedilmeye ve enzim akut lenfoblastik lökemi (ALL) tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır.

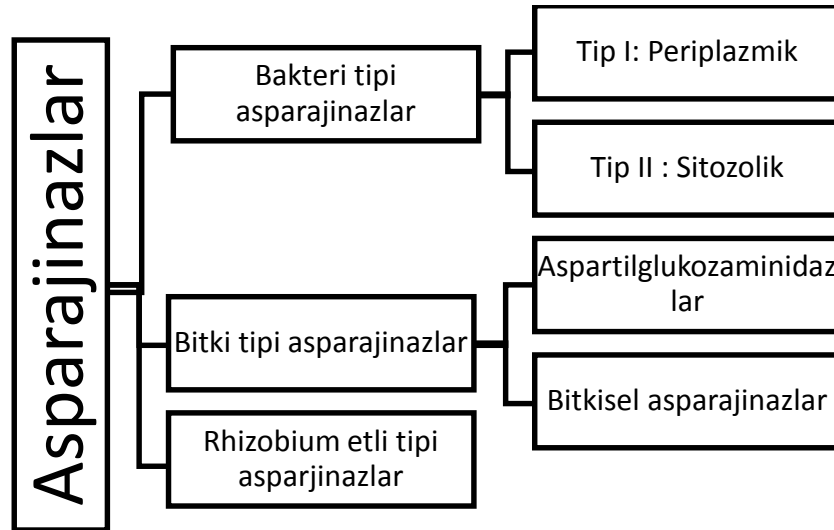
L-asparajinaz enzimi (EC 3.5.1.1.) L-asparajin amino asidini L-aspartat ve amonyuma parçalayan bir amidohidrolazdır. L-asparajinazlar diğer hidrolazlardan farklı olarak karbon-azot bağları üzerinde etki göstermekte ve L-asparajin amino asidinin amid yan zincirinin bir molekül H_2O ile hidrolizini katalizleyerek bir molekül amonyak ve bir molekül L-aspartik asit açığa çıkarmaktadırlar. L-asparajinazların çalışma prensibi genellikle aktivitesi katalitik üçlü olarak adlandırılan Ser-His-Asp amino asit dizisi ile sağlanan alışlagelmiş serin proteazlara benzemektedir (Carter & Wells, 1988). Bu amino asit dizisi hidrojen bağları ile çevrili bir adet nükleofilik rezidü (Ser), bir bazik rezidü (His) ve bir asidik rezidü (Asp) içermektedir. Enzimdeki nükleofilik rezidü, substrattaki (genellikle L-asparajin) amid bağındaki karbon atomuna saldırarak NH_2 grubunu OH ile değiştirmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: L-asparajinazın etki mekanizması.

L-asparajinaz enzimi birbirine eş 4 alt birimin bir araya gelerek oluşturduğu tetramerik yapıda bir proteindir. Alt birimlerin büyüklüğü organizmadan organizmaya farklılık göstermekle birlikte, bir L-asparajinaz molekülünün moleküler ağırlığı 140 ile 160 kDa arasında değişmektedir (Aung ve ark., 2000; Aghaiypour ve ark., 2001a,b; Kozak ve ark., 2002). Dört aktif bölgeden her biri, bitişik iki monomerin N- ve C-terminal bölgeleri arasında yer almaktadır. Bu nedenle L-asparajinaz tetrameri, iki dimerden oluşan bir dimer olarak düşünülebilir ancak enzim sadece tetramer formundayken aktiftir (Swain ve ark., 1993; Khushoo ve ark., 2004). Dimer oluşumu enzimin aktif bölgesi için gerekli tüm bileşenleri sağlamasına rağmen, L-asparajinaz enziminin neden sadece tetramer formunda iken işlevsel olduğu ve tip I ve tip II L-asparajinazların substrata olan afinitelerindeki farkın oligomer formlarıyla ilişkili olup olmadığı henüz açıklanamamıştır. Tip I ve tip II L-asparajinazların amino asit dizilimleri yüksek homolojiye sahipken, enzimlerin dördüncül yapıları birbirinden yüksek oranda farklılık göstermektedir (Bonthron & Jaskolski, 1997).

L-asparajinazlar, kristal yapıları, amino asit dizilerinin karşılaştırılması ve etki mekanizmalarına göre bakteriyel tip, bitki tipi ve *Rhizobium etli* tipi olarak 3 gruba ayrılmaktadır. (Şekil 2.2)



Şekil 2.2: Asparajinaz türleri.

Dördüncül yapısı belirlenmiş periplazmik *E. coli* L-asparajinaz enzimi EcAll'de bu alt birimler 326 rezidüden meydana gelmektedir. Yapılan dizi homoloji analizleri,

bilinen tip I ve tip II asparajinazların amino asit dizilerinin oldukça benzer olduğunu göstermiştir. Evrimsel süreçte en çok korunan bölge, enzimin aktif bölgesini oluşturan dizidir (Michalska ve Jaskolski, 2006).

L-asparajin ve L-glutaminin deaminasyonunu katalizleyen reaksiyonlar çok benzerdir. Tip I L-asparajinazlar sitoplazmada bulunan ve düşük afinite gösteren enzimlerken; periplazmik enzimler olan Tip II L-asparajinazlar, yüksek afinite ve düşük glutaminaz aktivitesine sahiptirler (Krishnapura ve ark., 2015). Bakteri kültüründe hücre dışında proteaz bulunmaması ve salgılanan proteinin çözünür olması nedeniyle periplazmik L-asparajinazların eldesi, sitoplazmik L-asparajinazlara kıyasla daha kolay ve verimlidir (Amena ve ark., 2011).

Günümüzde, Protein Data Bank (PDB; Berman ve ark., 2000) yaklaşık 20 farklı L-asparajinaz yapısı içermektedir. En iyi örneklerinden biri *Erwinia chrysanthemi*'ye ait olan ve 1 Å çözünürlükte karakterize edilmiş olan L-asparajinazdır. (Lubkowski ve ark., 2003). Henüz karakterize edilmiş ökaryotik L-asparajinaz bulunmamaktadır.

Hem L-asparajin amino asidi hem de L-asparajinaz enzimi bakterilerden memeli hayvanlara kadar tüm organizmalarda önemli roller üstlenmektedirler. L-asparajin bitkilerde protein biyosentezinde faydalanan azotun depolanması ve taşınması için en fazla kullanılan metabolittir. L-asparajinazın, dönüşümünü sağladığı L-Aspartat ise insanlarda üre döngüsünde ornitinin öncül molekülüdür ve glukoz açığa çıkaran glukogenik yolda oksaloasetat oluşumunda yer almaktadır.

2.1. L-asparajinazın Elde Edildiği Organizmalar

Günümüzde L-asparajinaz enziminin elde edildiği çok sayıda bakteriyel, mantar, aktinomiset, bitki ve hayvan kaynağı mevcuttur (Kumar ve ark., 2012). Mantar ve bakteri kaynaklı L-asparajinazlar, görece basit üretim metotları ile yüksek miktarda üretilbildiklerinden, diğer organizmalara ait L-asparajinazlara tercih edilmektedirler (Batoool ve ark., 2016).

Gram-negatif bakteri türleri olan *E. coli* ve *Erwinia*'dan elde edilen tip II L-asparajinazlar yüksek afiniteleri nedeniyle, başta akut lenfoblastik lösemi olmak üzere çeşitli kan kanserlerinde tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Batoool ve ark., 2016). *E. coli*

ve *Erwinia* türlerinden elde edilen L-asparajinazlar benzer boyutlarda (yaklaşık 140 kDa) olsalar da homolog değildir. *E. coli*, özellikle L-asparajine olan afiniteleri farklılık göstererek iki ayrı L-asparajinaz üretmektedir (Cedar ve ark., 1968). *E. coli* kaynaklı L-asparajinaz II, L-asparajin için çok daha yüksek afiniteye sahip (37°C için $K_m = 1.15 \times 10^{-5}$ M; Ho ve ark., 1970) ve hücre membranı ile hücre çeperi arasındaki periplazmik boşluğa salgılanırken, düşük afiniteli L-asparajinaz I (37°C için $K_m = 3.5 \times 10^{-3}$ M; Willis ve Woolfolk, 1974) sitoplazmik bölgede bulunmaktadır (Cedar ve ark., 1967). *Erwinia aroideae*'den izole edilen L-asparajinaz enzimi, *E. coli* L-asparajinaz enzimi ile tedavi edilen bazı hastaların karşılaştığı alerjik reaksiyonların üstesinden gelmek için kullanılmaktadır (Oettgen ve ark., 1967; Peterson ve ark., 1969; Vrooman ve ark., 2010).

E. coli ve *Erwinia* türlerinden elde edilen L-asparajinazlara ek olarak, klonlama ve enzim saflaştırma teknikleri geliştikçe *Aerobakter sp.*, *Erwinia sp.*, *Serratia sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Pectobacterium sp.*, *Photobacterium sp.*, *Streptomyces sp.* gibi çok sayıda farklı bakteri genusuna ait L-asparajinazların eldesi için çalışmalar yapılmıştır. Son yıllarda L-asparajinaz eldesinde kullanılan bakteriler arasında, *Pseudomonas aeruginosa* (El-Bessoumy ve ark., 2004), *Pyrococcus furiosus* (Bansal ve ark., 2010), *Helicobacter pylori* (Maggi ve ark., 2015) bulunmaktadır. Literatürdeki L-asparajinaz elde edilen bakteri türlerini içeren daha ayrıntılı bir liste Tablo 1.1.'de yer almaktadır.

Tablo 2.1: L-asparajinaz enziminin bakteriyel kaynakları.

Bakteriyel L-asparajinaz kaynakları	Referans
<i>E. coli</i> MTCC 739	Vidya ve ark., 2010
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Mukherjee ve ark., 1999
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Gaffar and Shethna, 1977
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Li ve ark., 2002
<i>Pyrobaculum calidifontis</i>	Chohan ve ark., 2019
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	Chohan ve ark., 2013
<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1	Hong ve ark., 2014
<i>Bacillus licheniformis</i>	Sudhir ve ark., 2014
<i>Erwinia carotovora</i>	Pourhossein ve ark., 2014
<i>Erwinia chrysanthemi</i> 3937	Kotzia ve ark., 2007
<i>Erwinia chrysanthemi</i> NCPPB 1125	Filpula ve ark., 1988
<i>Helicobacter pylori</i>	Maggi ve ark., 2015

Tablo 2.1: L-asparajinaz enziminin bakteriyel kaynakları devamı.

<i>Luteimicrobium album</i>	Miwa ve ark., 2019
<i>Marine Bacillus</i> AVP 14	Rudrapati ve ark., 2015
<i>Nocardiopsis alba</i> NIOT-VKMA08	Meena ve ark., 2015
<i>PaeniBacillus barengoltzii</i>	Shi ve ark., 2017
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Arrivukkarasan ve ark., 2010
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sindhu ve ark., 2018
<i>Rhizobium etli</i>	Huerta-Saquero ve ark., 2013
<i>Streptomyces avermitilis</i>	Hatanaka ve ark., 2011
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Hatanaka ve ark., 2011
<i>Streptomyces griseus</i> NIOT-VKMA29	Meena ve ark., 2015
<i>Streptomyces thermoluteus subsp. fuscus</i>	Hatanaka ve ark., 2011
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC6803	Kebeish ve ark., 2016
<i>Vibrio cholerae</i>	Radha ve ark., 2018
<i>Wolinella succinogenes</i>	Sannikova ve ark., 2016
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Pokrovskaya ve ark., 2012
<i>Zymomonas mobilis</i>	Einsfeldt ve ark., 2016
<i>Bacillus tequilensis</i> PV9W	Shakambari ve ark., 2018

Bakteriyel kaynakların yanı sıra L-asparajinaz enzimi çok sayıda farklı mantardan elde edilmiştir (Tablo 2.2). *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus niger*'den elde edilen L-asparajinazlar gıda sektöründe besinlerdeki akrilamid oluşumunu engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak filamentöz yapıdaki *Aspergillus tamari* ve *Aspergillus terreus*'tan yüksek miktarda L-asparajinaz elde edildiği rapor edilmiştir (Sarquis ve ark., 2004). Bakterilerde olduğu gibi, mayalarda da sitoplazmik ve periplazmik olmak üzere iki tip L-asparajinaz olduğu keşfedilmiş olsa da, yapılan filogenetik analizler bu enzimlerin birbirinden bağımsız olarak evrimleştiğini göstermiştir (Bonthron ve Jaskolski, 1997).

Tablo 2.2: L-asparajinaz enziminin izole edildiği fungal kaynaklar.

Fungal L-asparajinaz kaynakları	Referans
<i>Aspergillus oryzae</i>	Hendriksen ve ark., 2009
<i>Cladosporium sp.</i>	Mohan Kumar ve ark., 2013
<i>Flammulina velutipes</i>	Eisele ve ark., 2011
<i>Penicillium digitatum</i>	Shrivastava ve ark., 2012
<i>Candida utilis</i>	Kil ve ark., 1995
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lopes ve ark., 2019

Bitkiler de L-asparajinazın elde edildiği kaynaklardandır (Tablo 2.3). Çamgiller familyasından *Pinus pinaster* ve *Pinus radiata* köklerinden elde edilen izolatlarda L-asparajinaz aktivitesi tespit edilmiştir (Bell ve Adams, 2004). Morsalkım olarak da bilinen *Withania somnifera* bitkisinden elde edilen yüksek afiniteye L-asparajinaz enziminin, *E. coli* hücrelerinde eksprese edilmesi ile anti-tümör özelliklerinin olduğu ispatlanmıştır (Oza ve ark., 2011).

Tablo 2.3: L-asparajinaz enziminin elde edildiği bitkisel kaynaklar.

Bitkisel L-asparajinaz	Referans
<i>Maritime Pine</i>	Kerckhoven ve ark., 2017
<i>Solanum nigrum</i>	Kataria ve ark., 2015
Soya fasülyesi	Cho ve ark., 2007
<i>Spinacia oleracea</i>	Khabade ve ark., 2016
<i>Withania somnifera</i>	Oza ve ark., 2009

2.2. L-Asparajinazın İlaç Sektöründe Kullanımı

Sağlıklı hücreler, esansiyel olmayan bir amino asit olan asparajini kendileri sentezleyebilirken, kanser hücrelerinde L-asparajin sentetaz geni baskılanmış halde olduğundan ya da L-asparajinin öncül molekülleri olan aspartat ya da glutamine yeterli miktarda sahip olmadıklarından kendi L-asparajinlerini sentezleyememekte ve metabolizmalarının devamı için bu aminoasiti kan dolaşımından temin etmektedirler (Stams ve ark., 2005; Keating ve ark., 1993; Moola ve ark., 1994; Aslanian ve Kilberg, 2001). Damar içine uygulanan L-asparajinaz, kandaki L-asparajini tüketerek, kanser hücrelerini bu amino asitten yoksun bırakarak apoptozlarına sebep olmaktadır.

L-asparajinaz lenfoblastik lösemi, retikül sarkomu, Hodgkin hastalığı, akut miyelositik lösemi, akut miyelomonosit lösemi, kronik lenfositik lösemi ve limfosaekoma melanosarkoma gibi hastalıklarda terapötik ajan olarak yıllardır kullanılmaktadır (Abbas ve ark., 2010, Gulati ve ark., 1997). Ancak L-asparajinazın kemoterapötik ajan olarak uzun süreli kullanımlarında aşırı duyarlılık reaksiyonları, anafleksis ve tümör hücrelerinin direnç geliştirmesi gibi ciddi yan etkiler

görülmektedir (Bansal ve ark., 2010). Ayrıca, insanlarda bulunan asparajin endopeptidaz (AEP) ve cathepsin B (CTSB) adı verilen iki lizozomal proteaz, L-asparajinazın *in vivo* ömrünü kısaltmaktadır (Patel ve ark., 2009). L-asparajinazın anti-tümör etkinliği aynı zamanda kandaki yarılanma ömründen etkilendiğinden, enzimin kandaki yarılanma ömrünü yükseltmek için, L-asparajinazı lipozom ya da mikrokapsüller içinde hapsetme ya da dekstran, albumin ve PEG gibi makromoleküller ile kovalent bağlama gibi çalışmalar yapılmıştır (Fernandes ve Gregoriadis, 1997; Neerunjun ve Gregoriadis, 1976; Chang, 1984; Wileman ve ark., 1986; Poznansky ve ark., 1982; Kamisaki ve ark., 1982). Ancak hastanın bünyesinde PEG gibi L-asparajinaz enziminin modifikasyonunda kullanılan moleküllere karşı antikorların varlığının, modifiye L-asparajinazın hızlıca parçalanmasına neden olduğu anlaşılmıştır ve sonuç olarak terapi sırasında anti-PEG antikoru gibi antikorların araştırılmasına ihtiyaç duyulmasına sebep olmuştur (Armstrong ve ark., 2007). Kapsüllenmiş L-asparajinazların kullanımının hasta için daha az toksik olduğu belirlenmiştir (Rivera-Rodriguez ve ark., 2013).

Lösemi tedavisinde kullanılan ticari L-asparajinazlar bakteri kaynaklı ve glutaminaz aktivitesi olan enzimlerdir. Çok daha düşük glutaminaz aktivitesi, daha düşük Km değeri ve daha düşük moleküler ağırlığı olan; geniş çapta yapısal çeşitlilik gösteren ve efektör moleküllere farklı cevaplar veren L-asparajinazların keşfi için bilimsel araştırmalar sürmektedir (Krishnapura ve ark., 2016). Bu bağlamda enzimin aktif bölgesine yönelik mutagenез çalışmaları ile glutaminaz aktivitesinin engellenmesine yönelik çalışmalar yapılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Ardalan ve ark., 2018).

Yapılan ilk çalışmalarda, L-asparajinaz enziminin sağlıklı hücrelere etki etmeden sadece kanser hücrelerine zarar verdiği düşünülmekteyken, son zamanlarda yapılan çalışmalar kanser hücrelerinin L-asparajinaz sentetaz genlerini tekrar aktive ederek ilaca direnç kazanabildikleri anlaşılmıştır (Ho ve ark., 1970; Worton ve ark., 1991). Akut lenfoblastik lösemi hastalarında ve fare lenfoma hücrelerinde, L-asparajinaz tedavisinden bir süre sonra L-asparajinaz sentetaz aktivitelerinde artış görülmüştür (Prager ve ark., 1970; Haskell ve ark., 1969; Broome ve ark., 1967).

Evrimsel yakınlıklarından dolayı ökaryotik mikroorganizmalardan elde edilen L-asparajinaz insan bağışıklık sistemi ile daha iyi uyumluluk göstermektedir (Doriya ve

Kumar, 2016). Şimdiye kadar ilaç pazarında yerini alan ilk rekombinant L-asparajinaz *E. coli* konakçı hücresinde üretilen Spectrila®'dır (European Medicines Agency, 2015). Geliştirilen diğer ticari L-asparajinazlar Tablo 2.4'te verilmiştir. *E. coli* ve *Er. chrysanthemi*'den elde edilen L-asparajinazlar immünolojik özellikleri bakımından çok farklı olduklarından, birine karşı alerjik hassasiyet geliştiren hasta için diğeri alternatif olarak kullanılabilir (Moola ve ark., 1994).

Tablo 2.4: Kanser tedavisinde kullanılan ticari L-asparajinazlar.

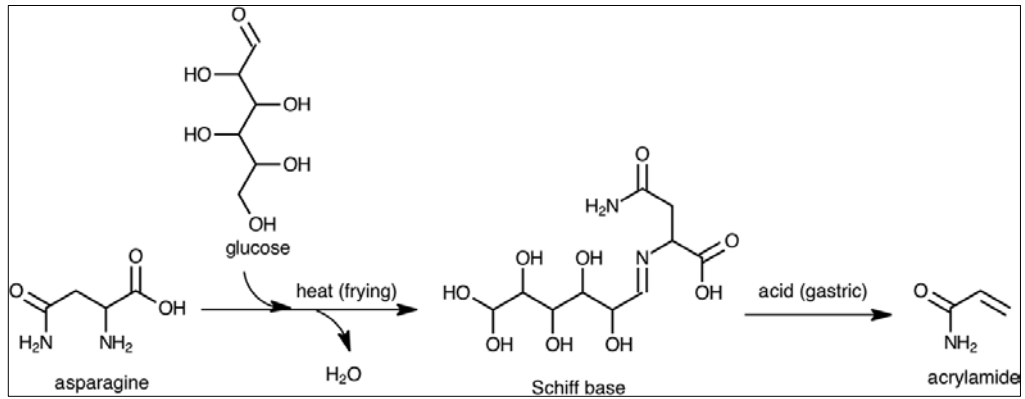
Kaynak mikroorganizma	L-asparajinaz	Üretici
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Erwinase®	Porton Biopharma,UK
	Erwinaze®	Jazz Pharmaceuticals,USA
<i>E. coli</i>	Leunase	Kyowa Hakko, Japan
	Oncaspar	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Italy
	Kidrolase	France Rhone-Poulenc, Canada & USA
	Elspar	Merck Sharp & Dohme, USA
	Crasnitin	Bayer, Germany

2.3. L-Asparajinazların Gıda Sektöründe Kullanımı

Yaygın olarak tüketilen gıda maddelerinde yüksek miktarlarda akrilamidin varlığının keşfi yoğun bir endişe uyandırmıştır. Akrilamid Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization - WHO) tarafından “insanlar için muhtemel karsinogen madde” olarak sınıflandırılmış ve beslenme ile maruz kalınması tehlikesi nedeniyle potansiyel bir sağlık tehdididir (Wilson ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarla birlikte akrilamidin nörotoksik etki gösterdiği ve karsinogen olduğu kabul edilmektedir (Tritscher ve ark., 2004).

120°C'den yüksek sıcaklıklarda pişen karbonhidratlarda Maillard reaksiyonu adı verilen tepkime ile serbest haldeki L-asparajinin a-amino grubu, indirgenen şekerin karboksil grubu ile birleşerek akrilamid açığa çıkarmaktadır (Mottram ve ark., 2002)(Şekil 1.3). Maillard reaksiyonu aynı zamanda kızarmış ya da fırınlanmış gıdalardaki arzu edilen görüntü ve tadın oluşumundan sorumludur. Akrilamidin öncül maddesi olan serbest asparajinin, en fazla tüketilen besin maddelerinden biri olan

patatesteki miktarının kilogram başına 940 mg olması ve toplam aminoasit içeriğinin %40'ını oluşturması, yüksek miktarda akrilamid oluşturma potansiyeli nedeniyle sağlık açısından tehlike arz etmektedir (Mottram ve ark., 2002). Bu bağlamda kızarmış patates, kahve, cips, bisküvi ve ekmek akrilamid içeriği yüksek besinler arasında bulunmaktadır (Rosen ve Hellenas., 2002).



Şekil 2.3: Maillard reaksiyonu.

Akrilamidin hazır gıdalardan giderilmesi pratik bir uygulama olmadığından, gıdalar pişirilmeden önce akrilamidin oluşumunun önlenmesine yönelik stratejilere odaklanılmıştır (Hendriksen ve ark., 2009). Akrilamid oluşumunu engellemek amacıyla, hazırlanma aşamasında süre ve ısı değişikliği yapılabileceği gibi, un bazlı fırınlanan gıdalarda tariflere sitrik asit ya da kalsiyum iyonunu eklemek, redükleyici şekerlerin yerine sükroz kullanmak ya da asparajin içeriği düşük un kullanmak tercih edilebilecek uygulamalar arasında yer almaktadır. Patates bazlı gıda ürünleri için ise düşük şeker içeren patates türlerinin tercih edilmesi, tariflere amino asit ya da kalsiyum eklenmesi ve pH'ın düşürülmesi söz konusudur. Ancak tüm bu uygulamalar istenmeyen tat ve görüntü oluşumu ve gıdaların besin değerlerinde düşüşe neden olabileceğinden çok fazla rağbet görmemektedir.

Sıkça tüketilen besin maddelerindeki akrilamid oluşumunu önlemek amacıyla *Aspergillus Oryzae* kaynaklı bir asparajinaz olan Acrylaway[®] ve *Aspergillus niger* kaynaklı asparajinaz PreventASe[®] ticari olarak kullanımdadır (Batool ve ark., 2016). Gıdaların kızartılmadan ya da fırınlanmadan önce belirli bir süre L-asparajinaz ile muamele edilmesinin, sonuçta oluşan akrilamid miktarını %95 oranında azalttığı

görülmüştür. L-asparajinazın seçici olarak serbest asparajini aspartik asit ve amonyağa parçalaması ile gıda maddesi içindeki amino asitlerin büyük çoğunluğu bu işlemde etkilenmediğinden besin değeri kayda değer bir düşüş görülmemektedir.

2.4. L-Asparajinaz Üretim Teknikleri

L-asparajinaz enzimi bugüne kadar submerged fermentasyon (SmF), Solid state fermentasyon (SsF) ve rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak birçok farklı bakteri, bitki ve mantar kaynağından izole edilmiştir. En fazla kullanılan yöntem olarak SmF'nin besiyeri bileşenlerinin ve ısı, pH gibi kültür koşullarının kolayca manipüle edilmesine olanak sağlaması, yüksek miktarda ve yüksek kalitede protein eldesine olanak sağlamıştır. SsF yöntemi ile ise mikroorganizmaların doğal büyüme koşullarının taklit edilmesiyle SmF'ye oranla daha yüksek miktarda protein üretimi sağlanmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi ise daha düşük maliyet ve immünojenisite gibi avantajlarının yanında, enzim aktivitesini geliştirmeye yönelik mutasyon yapabilme imkânı vermesiyle tercih edilen bir yöntemdir. Yüksek miktarda enzim üretimi için, düşük verimli olmasından dolayı yabani tiplerin kullanımından kaçınılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi enzim üretiminde yüksek verim sağlamaktadır (Adrio ve Demain, 2010). *E. coli* gibi bakteriyel konakçı hücreler rekombinant proteinlerin hızlı ve kolay şekilde yüksek miktarda ifade edilmesini sağlamalarından dolayı L-asparajinaz üretimi için yaygın olarak tercih edilmektedir (Ferrara ve ark., 2006; Liu ve ark., 2013; Costa ve ark., 2016).

Rekombinant proteinin hücre dışına salınmasının, hücre içinde birikmesine kıyasla bir çok avantajı vardır. Besiyerinde ve periplazmik bölgede proteaz aktivitesinin olmaması ve rekombinant proteinin hücre dışında hücre içine nazaran daha az endotoksine maruz kalması bu avantajlar arasında sayılmaktadır. Ayrıca, salgı proteinleri suda çözünür ve aktiftir. Bunlara ek olarak rekombinant proteini elde etmek için hücreleri parçalamanın gerekmemesi iş yükünü büyük ölçüde azaltmaktadır (Choi ve Lee., 2004; Jonasson ve ark., 2002).

Ekstrem fizikokimyasal koşullarda yaşayan termofilik organizmalar, enzim mühendisliği çalışmalarından daha kolay ve uygulanabilir olduklarından termostabil enzimlerin elde edilmesinde değerli kaynaklardır. Mezofilik organizmalardan elde edilen enzimlere nazaran, termofilik organizmalardan elde edilen enzimler işlevselliklerinde önemli bir kayıp olmadan uzun sreler boyunca oda sıcaklığında saklanabilmektedir. Bu enzimlerin bir diğer avantajı da kimyasal denaturantlara karşı dirençli olmalarıdır (Cowan ve ark., 1995).

2.5. *Geobacillus kaustophilus*'un zellikleri

Geobacillus kaustophilus (HTA 426) organizmasının optimal büyüme sıcaklığı 60°C ve büyüme için uygun pH aralığı 6.2-7.5 olan termofilik Gram (+) bir bakteridir (Takami ve ark., 2004). (*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 ve ark., 2004). *Geobacillus kaustophilus*'a ait L-asparajinaz enzimi 323 amino asit uzunluğndadır ve yaklaşık 37 kDa büyüklüğündedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Bakteri Soyları ve Plazmit Vektörleri

Geobacillus kaustophilus hücre hattı Bacillus Stock Center'dan temin edilmiştir.

E. coli DH5 α hücre hattı GTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Protein ekspresyonu için kullanılan *E. coli* Rosetta 2 (DE3) hücreleri Episome Biotech şirketinden temin edilmiştir.

Rekombinant *G. kaustophilus* L-asparajinaz geninin ekspresyonu için pET22b(+) plazmit vektörü kullanılmıştır. pET22b(+) vektörü (Novagen Cat. No. 69744-3) C-terminalde His-etiketi ve üretilen proteinin periplazmik lokalizasyonu için pelB sinyal dizisi taşımaktadır.

3.2. Kullanılan Besiyerleri

Besiyerleri ve tarifleri Ek A.'da verilmiştir.

3.3. Kullanılan Çözeltiler

Tampon çözeltiler, içerikleri ve hazırlanış şekilleri Ek B.'de verilmiştir.

3.4. Kimyasallar ve Enzimler

Kullanılan kimyasallar ve enzimler ile tedarikçileri Ek C.'de listelenmiştir.

3.5. Cihazlar

Kullanılan cihazların listesi Ek.D'te verilmiştir.

3.6. *G. kaustophilus* L-asparajinaz Geninin oğaltılması

Geobacillus kaustophilus'a ait tip II L-asparajinaz geni (GkASNazII) (GENE ID: 3183602) PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Kalıp DNA olarak, Orhan, MD (2018) tez çalışmasında izole edilen *G. kaustophilus* DM 7263T genomik DNA'sı (NCBI DataBank, NC_006510.1) kullanılmıştır. Gk HTA 426 genom dizisi dikkate alınarak 972 b uzunluğunda olan L-asparajinaz gen dizisini içeren bölgeyi çoğaltma üzere primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerin 5' uçlarına *SalI* ve *BamI* restriksiyon enzimleri tanıma bölgeleri eklenmiştir. PZR sonucunda L-asparajinaz enzimini kodlayan yaklaşık 972 baz uzunluğunda DNA ürünü beklenmektedir.

Tablo 3. 1: GkASNazII'nı çoğaltmak için kullanılan primer seti. pET22b(+) vektörü için tasarlanan primer seti.

İleri Primer	5'CGC GTCGAC CTAATAAGCGAACAAGCC'3	<i>Bam</i> HI RE kesim bölgesi
Geri Primer	5'CGAGCT GGATCC GTCTACGAAACGGAAA'3	<i>Sal</i> I RE kesim bölgesi

Restriksiyon endonükleazlar GkASNazII geninde kesim yapmamasına ve vektörün çoklu klonlama bölgesinde kesim bölgesinin olmasına dikkat edilerek seçilmiştir. Ayrıca primer tasarımında primerlerin 5' ucuna enzimlerin kesim aktivitesini arttırmak için eklenen bazlar NEB biolabs firmasının (Cleavage Close to the End of DNA Fragments) kataloğundan bakılarak seçilmiştir.

PZR reaksiyon karışımı Tablo 2.3'te verilmiştir. Termal dnę (MJ Research INC, PTC-200 USA) cihazında toplam Taq DNA polimeraz enzim kullanılarak gerçekleştirilen PZR reaksiyonunun aşamaları sırasıyla şöyledir: Bir PZR dnęs; denatürasyon için 94°C'da 1 dakika, primer bağlanması için 65°C'da 1 dakika ve polimerizasyon için 72°C'da 2 dakika olacak şekilde 35 dnęde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, başlangıçta 94°C'da 2,5 dakikalık denatürasyon ile başlatılmış ve 72°C'da 10 dakikalık ek bir polimerizasyon ile tamamlanmıştır. Çoğaltılan gen fragmanı MN PCR Clean-up kit kullanılarak, PZR bileşenlerinden izole edilmiştir.

Tablo 3.2: GkASNazII'nı çoğaltmak için hazırlanan PZR reaksiyonu bileşenleri.

	Stok Konsantrasyonu	Son Konsantrasyon	Miktar
G.kaustophilus genomik DNA	130 ng/ul	1.3 ng/ul	1 µl
Taq Polimeraz Tampon Çözelti	10X	1X	10 µl
dNTP	2 mM	0.2 mM	4 µl
İleri Primer	10 mM	10 µM	4 µl
Geri Primer	10 mM	10 µM	4 µl
MgCl ₂	25 mM	10 µM	8 µl
Taq DNA Polimeraz		1U	1 µl
dH ₂ O			68 µl

3.7. Restriksiyon Enzim Kesimi

Ligasyon için hazırlanan PZR ürünü ve plazmit vektörlerinin restriksiyon enzim kesimi reaksiyonları ile transformasyon işleminin doğrulanması deneylerinde, *Bam*HI ve *Sa*II (Thermo Fischer) enzimleri ile üreticinin önerdiği protokol referans alınmıştır.

3.8. Ligasyon

*Sa*II ve *Bam*HI-HF restriksiyon enzimleri ile kesilen asparajinaz geni, aynı restriksiyon enzimleri ile kesilip doğrusal hale getirilen pET22b(+) vektörü ile T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon insört ve vektör oranları 1:1, 1:3 ve 1:5 olacak şekilde kurulmuş ve +4°C'de 16 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 65°C'de 15 dakika tutularak durdurulmuştur.

3.9. Kompetan *E.coli* Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetan *E. coli* DH5a ve *E. coli* Rosetta 2 (DE3) hücreleri Chung ve ark. (1993) tarafından tarif edilen TSS kompetan hücre hazırlama yöntemi kullanılmıştır. Kompetan yapılmak istenen hücreler 1 ml LB sıvı besiyerine ekildikten sonra gece boyu 37°C'de çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. 16 saat sonra bu kültür 100 ml LB sıvı besiyerine ekilmiş ve 37°C'de optik yoğunluğu 600 nm dalga boyunda 0.4'e gelene kadar inkübe edilmiştir. İstenilen yoğunluğa ulaşan kültür 2,700

g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj ile çöktürülmüştür. Pelet, +4°C'de soğutulmuş 10 ml TSS tampon çözeltisi içinde nazikçe çözüldükten sonra 1.5 ml'lik Eppendorf tüplere paylaştırılmıştır. Hazırlanan hücreler daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

3.10. Kompetan *E.coli* Hücrelerinin Transformasyonu

Çalışmadaki tüm transformasyon deneyleri Sambrook ve ark. (1989) referans alınarak gerçekleştirilmiştir.

Yaklaşık 100 ng DNA içermekte olan 10 µl ligasyon ürünü 100 µl *E. coli* kompetan hücrelerine eklenmiş ve 30 dakika buz içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler 42°C'lik su banyosunda 90 saniye bekletilip hemen ardından 2 dakika boyunca buz içerisinde inkübe edilerek ısı şokuna tabii tutulmuştur. Hücrelerin üzerlerine yaklaşık 900 µl LB sıvı besiyeri eklenmiş ve 1 saat boyunca 37°C'de 180 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler 50 µg/ml ampisilin içeren katı LB besiyerlerine yayılmış ve gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün olası rekombinant kolonilerden alınan örnekler numaralandırılarak, 100 µg/ml ampisilin LB katı besiyerine ekilmiştir.

3.11. Transformantların Koloni PZR ile Doğrulanması

Olası rekombinant hücrelerin doğrulanması için koloni PZR yöntemi uygulanmıştır. Her bir koloniden kürdan yardımı ile alınan örnekler 50 µl dH₂O içine bırakılmış ardından 100°C'de 5 dakika bekletilerek hücrelerin parçalanması ve kalıp olarak kullanılacak DNA'nın açığa çıkması sağlanmıştır. Ardından elde edilen DNA kalıp DNA olarak kullanılarak PZR uygulanmıştır.

Reaksiyon termal döngü (MJ Research INC, PTC-200 USA) cihazında toplam 30 döngü olarak yürütülmüştür. PCR döngüsünde tekrarlanan aşamalar; denatürasyon için 94 °C'da 1 dakika, primer bağlanması için 65°C'da 1 dakika ve polimerizasyon için 72°C'da 2 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, başlangıçta 94°C'da 2,5

dakikalık denatürasyon döngüsü başlatılmış ve 72 °C'da 10 dakikalık ek bir polimerizasyon döngüsü ile tamamlanmıştır.

3.12. Plazmit İzolasyonu

Rekombinant plazmit izolasyonu Sambrook ve arkadaşlarının (1989) geliştirdiği yöntem kullanılarak izole edilmiştir. Rekombinant kültür 100 µg/ml ampicilin içeren 100 ml LB sıvı besiyerinde 37°C'de 180 rpm'de 16 saat büyütülmüş olan kültür 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek sıvı üst faz uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelet yaklaşık 600 µl Solüsyon I içinde çözülmüş ve oda sıcaklığında 5 dakika beklenmiştir. Elde edilen pelet yaklaşık 600 µl Solüsyon I içinde çözülmüş ve oda sıcaklığında 5 dakika beklenmiştir. Bu aşamada karışım 200'şer µl 1.5 ml'lik steril Eppendorf tüplere bölünmüştür. Örnekler üzerine taze olarak hazırlanan 400 µl Solüsyon II eklenmiş yavaşça karıştırılıp 5 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Son olarak örnekler üzerine 300 µl Solüsyon III eklenmiş yavaşça karıştırılıp 10 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 4°C'de 14000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen sıvı üst faz yeni 1.5 ml'lik steril Eppendorf tüplere aktararak üzerlerine ~500 µl izopropanol eklenmiş ve en az 15 dakika bekletilip oda sıcaklığında 11000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı üst faz uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen peletin kuruyup saydamlaşması beklenmiş ve pelet son hacim 100 µl olacak şekilde dH₂O 'da çözülmüştür. 100 µl örnek üzerine 7 µl RNaz eklenmiş ve 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Son olarak elde edilen ürün Machery-Nagel PZR Clean-up DNA saflaştırma kiti ile saflaştırılmıştır.

3.13. Agaroz Jel Elektrofrez

PZR ile amplifiye edilen DNA fragmanları, hücrelerden izole edilen plazmitler ve restriksiyon enzim kesimi uygulanan tüm DNA fragmanları 6X DNA yükleme boyası ile boyanmış, 2.5 uL RedSafe (Intron) içeren 50 ml %0.8'lik agaroz jele yüklenerek elektroforez sistemi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmıştır. Jel, Azure

biosystem c600 görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülenmiştir. DNA belirteci olarak 1 kb DNA Marker (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır.

3.14. Jelden DNA İzolasyonu

DNA izolasyonları Machery-Nagel PCR & Gel Clean-up kitleri kullanılarak üretici firmaların sağladığı kullanım talimatına uyularak gerçekleştirilmiştir.

3.15. Protein Ekspresyonu

L-asparajinaz genini yüksek miktarda ifade edebilmek için *E. coli* Rosetta 2(DE3) konakçı hücresi rekombinant pET22b(+)/GkAS_{NazII} vektörü ile transforme edilmiştir. Hücrelerden, IPTG (1mM) ile uyarıldıktan önce ve uyarıldıktan sonra 2şer saat ara ile örnekler alınmıştır. Hücrelerin IPTG ile uyarımı öncesi ve sonrası ekspresyon profili, gen taşımayan kontrol grubu ile birlikte SDS-PAGE ile görüntülenmiştir. Hücre kültürü, ultrasantrifüj ile 20000 rpm’de 30 dakika süreyle çöktürülmüş ve pelet -20°C ‘de saklanmıştır.

Hücre peleti 15 dakika buz içerisinde bekletilerek eritilmiş ve gram başına 2-5 ml lizis tampon çözeltisi içinde çözdürülmüştür. 1 mg/ml lizozim eklenerek buz üzerinde 30 dakika inkübe edilerek hücre duvarlarının parçalanması amaçlanmıştır. Ardından örnek, buz içerisinde 10 saniye vuruş – 10 saniye bekleme olacak şekilde 6 set halinde sonikasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen lizatın akışkanlığı kontrol edilerek +4°C 10000 g’de 30 dakika boyunca santrifüj edilerek hücre duvarı gibi kalıntılar çöktürülmüş ve ilgili rekombinant proteinin bulunduğu düşünülen sıvı üst faz -20°C’de saklanmıştır. SDS-PAGE analizi için 100 µl örnek ayrılmıştır.

3.16. Protein Saflaştırma

Eksprese edilen L-asparajinaz enziminin saflaştırılmasında Qiagen marka Ni-NTA agaroz kullanılmıştır. 4 ml hücre özütü, 1 ml Ni-NTA agaroz ile 200 rpm +4°C’de

bir saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örnek, içine bir kat filtre kağıdı yerleştirilen 2,5 ml hacimli şırıngadan geçirilmiştir. Ardından 4 ml yıkama tampon çözeltisi ile yıkanmış, yıkama fraksiyonları SDS-PAGE analizi için ayrılmıştır. Son olarak kolon 2 ml elüsyon tampon çözeltisi ile yıkanmış, elüsyon fraksiyonları Eppendorf tüp içinde -20°C’de saklanmıştır.

Fosfat tampon çözeltisi içinde elde edilen 20 ml enzim örneği, Amicon Ultra-15 10K filtre kullanılarak 5 ml Tris-HCl tampon çözeltisi içinde konsantre edilmiştir.

3.17. SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforezi

Ekspresyon ve saflaştırma sonrası elde edilen örneklerdeki proteinlerin analizi için %12’lik SDS-PAGE kullanılmıştır. Hazırlanışı Ek.5’de yer almaktadır.

3.18. Protein Miktar Tayini

Saflaştırma sonrası elde edilen örneklerdeki protein miktarı BCA ile tayin edilmiştir. Elde edilen protein örneklerinden 10 µl 96 kuyulu mikropate plakasına konulmuştur. Taze hazırlanan BCA solüsyonu 50:1 oranında CuSO₄ ile karıştırılmış ve örneklerin üzerine bu solüsyondan 200 µl eklenerek 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Standart olarak 1 mg/ml sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. Son olarak örnekler 562 nm dalga boyunda Varioskan Microplate okuyucu ile ölçülmüştür. Örnekler içindeki protein miktarları BSA standartlarından elde edilen değerlere göre çizilen standart eğriye dayanarak hesaplanmıştır.

3.19. Enzim Aktivitesi Tayini

L-asparajinaz enziminin aktivitesi Nessler reaksiyonu ile ölçülmüştür. Nesslerizasyon olarak adlandırılan bu yöntem ile doğrudan amonyak tayini yapılmıştır [Imada ve ark., 1973]. Toplam reaksiyon karışımı 400 µM olacak şekilde 2.5 µl enzim örneği, 50 mM Tris tamponu (pH 8.5) içerisinde 5 mM L-asparajin ile 55°C’da farklı

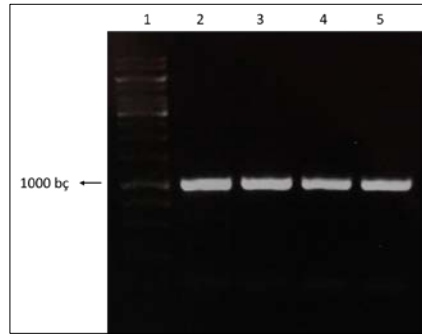
zaman aralıklarında inkübe edilmiştir. Reaksiyon 150 µl 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) ilavesi ile durdurulmuş ve çöken proteinler 12000 g'de santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Elde edilen berrak süpernatant Nessler reaksiyonu için kullanılmıştır. Nessler reaksiyonu için 1400 µl dH₂O ve 150 µl süpernatant, 200 µl Nessler ayracı ile karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra açığa çıkan amonyak miktarı 450 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede ölçülmüştür. Bir ünite (U) yukarıda belirtilen koşullar altında dakikada 1 µmol amonyak açığa çıkaran L-asparajinaz aktivitesi olarak tanımlanmaktadır. Enzim aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Enzim Aktivitesi (unit/}\mu\text{l)} = \frac{[\text{NH}_3 (\mu\text{M}) \times \text{reaksiyon hacmi } (\mu\text{l})]}{[\text{supernatant hacmi } (\mu\text{l}) \times \text{reaksiyon süresi (dk)} \times \text{enzim miktarı } (\mu\text{l})]} \quad (1)$$

4. SONUÇLAR

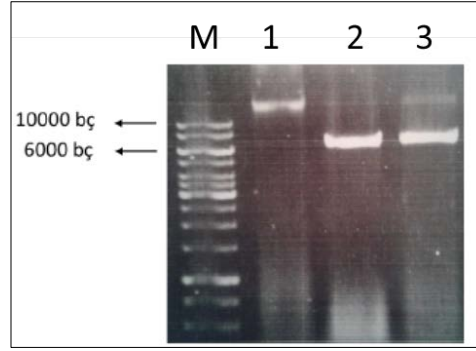
4.1. *Geobacillus kaustophilus* L-Asparajinaz Geninin Klonlanması

PZR ile çoğaltılan *Geobacillus kaustophilus* L-asparajinaz geni; periplazmik ekspresyonu sağlamak amacı ile T7 promotörünün alt bölgesine C-terminalde Hisx6 etiketi ve N-terminalde pelB sinyal dizisi olacak şekilde pET22b(+) ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. 972 bç uzunluğundaki L-asparajinaz geni *Geobacillus kaustophilus* genomik DNA'sından 65°C tutunma sıcaklığında PZR ile çoğaltılmıştır (Şekil 4.1). Çoğaltılan gen *Bam*HI ve *Sal*I restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen ikili kesimin ardından izole edilmiştir.



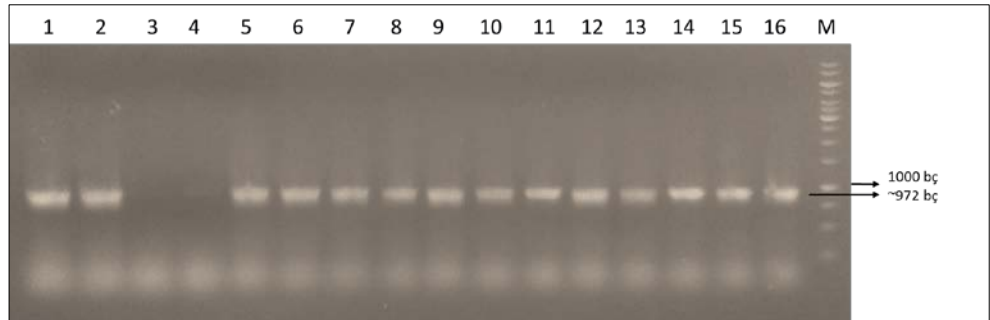
Şekil 4.1: *Geobacillus kaustophilus* L-asparajinaz II geninin PZR ile çoğaltılması
1. 1 kb DNA marker 2-4. GkASNII fragmanı (~972 bç).

Yaklaşık 5493 bç uzunluğuncaki pET22b(+) vektörü aynı enzim kombinasyonu (*Bam*HI ve *Sal*I) ile muamele edilerek doğrusal hale getirilmiş, agaroz jelde görüntülenmiş (Şekil 4.2) ardından jelden izole edilmiştir.



Şekil 4.2: pET22b(+) vektörünün ligasyon reaksiyonu için *Bam*HI- *Sal*I enzim kombinasyonu ile kesilmesi. M: 1 kb DNA marker 21 pET22b(+) vektörü 2-3. *Sal*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş pET22b(+) vektörü.

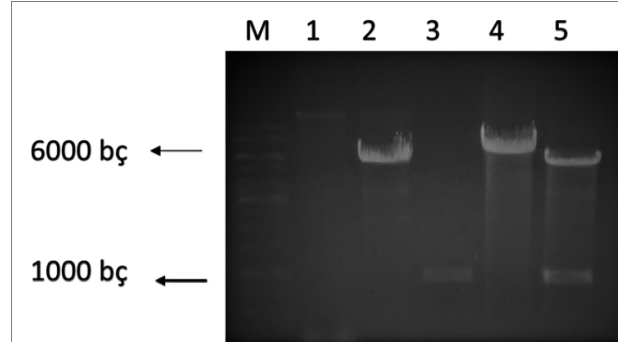
Yapışkan uçlu hale getirilmiş olan yaklaşık 972 bp uzunluğundaki L-asparajinaz geni ile doğrusal hale getirilmiş yaklaşık 5493 bp uzunluğundaki pET22b(+) plazmit vektörü ile kurulan ligasyon reaksiyonu ve gen içermeyen boş pET22b(+) vektörü *E. coli* DH5a kompetan hücrelerine aktarılmıştır. Olası rekombinant ~40 koloni gözlemlenmiş ve 16 tanesi seçilerek koloni L-asparajinaz geni için tasarlanan primer çifti kullanılarak koloni PZR yapılmıştır. PZR sonuçları agaroz jelde görüntülenerek, 14 koloninin L-asparajinaz genini (~972 bp) içeren vektörü başarılı bir şekilde aldığı görülmüştür.



Şekil 4.3: Koloni PZR sonuçlarının agaroz jelde görüntülenmesi. 1-16. pET22b(+)/GkASNazII(peIB) vektörü içeren 16 koloni. M: 1kb DNA Marker.

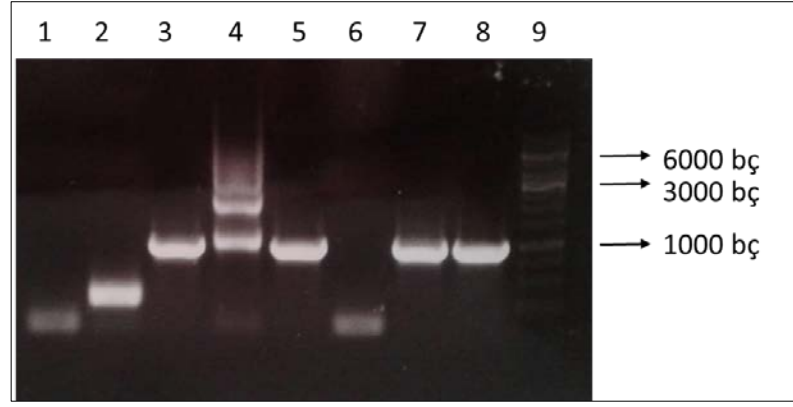
Rekombinant plazmidin L-asparajinaz genini taşıyıp taşımadığı aynı zamanda *Sal*I FastDigest ve *Bam*HI FastDigest restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak doğrulanmıştır. Buna göre Şekil 4.4'de görüldüğü gibi pET22b(+)/GkASNazII(peIB) plazmidinin *Bam*HI restriksiyon enzimi ile kesiminin ardından beklenen büyüklükte

(~6465 bç) bir fragman gözlenirken, aynı vektörün *SalI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleriyle çift kesim reaksiyonu neticesinde yaklaşık ~972 bç uzunluğundaki GkASNazII geni ve yaklaşık 5493 bç uzunluğundaki doğrusal pET22b(+) vektörü agaroz jelde görüntülenmiştir.



Şekil 4.4: Rekombinant plazmidin restriksiyon enzim kesim analizi. 1. pET22b(+) vektörü (5493 bç) 2. *BamHI* ile kesilmiş pET22b(+) plazmiti (~5493 bç) 3. ASN geni PZR ürünü (~972) 4. *BamHI* kesilmiş pET22b(+)/GkASNazII(pelB) vektörü (~6465bç) 5. *SalI* kesilmiş pET22b(+)/GkASNazII(pelB) vektörü.

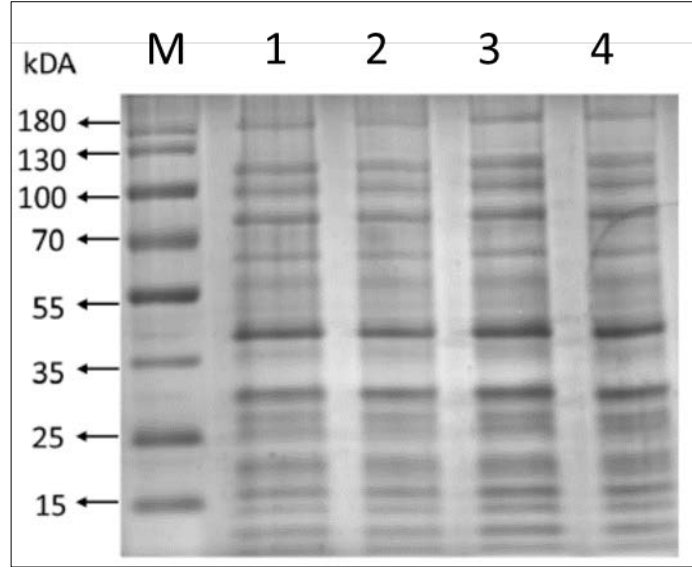
Koloni PZR ve restriksiyon endonükleaz kesimleri ile transformant olduğu doğrulanmış kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen vektör ile Rosetta 2 (DE3) kompetan hücreleri standart transformasyon protokolü ile transforme edilmiş ve elde edilen yaklaşık 100 olası koloni içerisinde 8 tanesi seçilerek koloni PZR yapılmıştır. Koloni PZR sonucunda transformant olduğunun doğruluğu tam olarak belirlenmiş 4 koloni gözlemlenmiştir. (Şekil 4.5.) 3, 5, 7 ve 8 numaralı kolonilerin başarılı şekilde transforme olduğu görülmüştür.



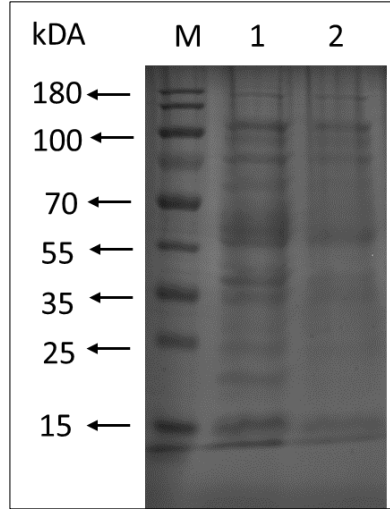
Şekil 4.5: *E. coli* Rosetta 2 (DE3) transformantlarının taranması. 1-8. Olası rekombinant koloniler 9. 1 kb DNA marker.

4.2. *G. kaustophilus* L-Asparajinaz Geninin Rosetta 2 (DE3) Hücrelerinde Ekspresyonu

L-asparajinaz genini ifade edebilmek için *E. coli* Rosetta 2 (DE3) konakçı hücresi rekombinant pET22b(+)/GkASNazII(pelB) vektörü ile transforme edildiği kanıtlanan hücreler ampicilin (100µg/µl) içeren katı ve sıvı besiyerlerinde büyütülmüştür. Protein ekspresyonunun en fazla olduğu zamanı belirlemek amacıyla, hücreler IPTG ile uyarıldıktan sonra 2., 4. ve 6. saatlerde örnek alınmıştır. Hücrelerin IPTG ile uyarımı öncesi ve sonrası ekspresyon profili, gen taşımayan kontrol grubu ile birlikte SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (sırasıyla Şekil 4.6 ve Şekil 4.7) ancak hücrelerden indüksiyon öncesi ve sonrası alınan örneklerde 37 kDa büyüklüğünde beklenen protein bandında değişiklik gözlenmemiştir. IPTG ile uyarım deneyi diğer transformant kolonilerle de tekrarlanmış ve L-asparajinaz geninin ifade edilmediği görülmüştür



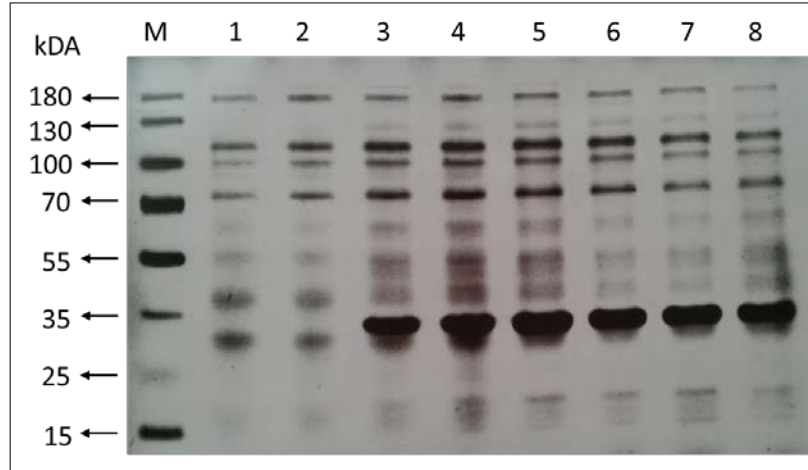
Şekil 4.6: pET22b(+)/GkASNazII(pelB) içeren transformant Rosetta 2 (DE3) hücrelerinin IPTG ile uyarımı. M: Protein belirteci 1. İndüklenmemiş Rosetta 2 (DE3)'den alınan örnek 2-4. Sırası ile IPTG ile uyarıldıktan sonra 2., 4., ve 6. saatlerde alınan örnekler.



Şekil 4.7: pET22b(+) içeren transformant Rosetta 2 (DE3) hücrelerinin IPTG ile uyarımı. İndüklenmemiş Rosetta 2 (DE3)'den alınan örnek 2. IPTG ile uyarıldıktan 4 saat sonra alınan örnek.

Bundan sonraki çalışmalara daha önce laboratuvarımızda yapılan ve pelB sinyal peptidi taşımayan pET22b(+)/GkASNazII vektörü taşıyan transformant Rosetta 2 (DE3) hücreleri ile devam edilmiştir. pET22b(+)/GkASNazII vektörü taşıyan hücreler ampisilin (100ug/ul) içeren sıvı besiyerinde büyütülmüş ve optik yoğunlukları 0.6'ya ulaştığında IPTG (1mM) ile uyarılmıştır. IPTG ile uyarımdan sonra 2., 4., ve 6.,

saatlerde örnekler alınarak SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve L-asparajinaz proteinin yüksek miktarda eksprese edildiği görülmüştür (Şekil 4.8). Gen içermeyen pET-22b(+) vektörü taşıyan *E. coli* RosettaT2 2(DE3) hücrelerinde belirgin ekspresyon bandı gözlemlenmemiştir.



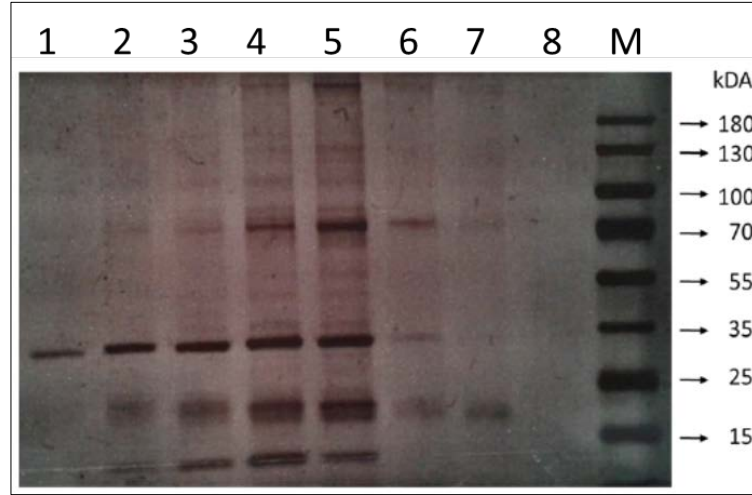
Şekil 4.8: IPTG ile uyarılan Rosetta 2 (DE3) hücrelerinde protein ekspresyonu. M. Protein belirteci 2-3. Uyarılmamış Rosetta 2 (DE3) pET22b/GkASNazII örneği 4-5. IPTG ile uyarılma sonrası 2. saatte alınan örnekler 6-7. IPTG ile uyarılma sonrası 4. saatte alınan örnekler 8-9. IPTG ile uyarılma sonrası 6. saatte alınan örnekler.

4.3. *Geobacillus kaustophilus* L-Asparajinaz Enziminin Saflaştırılması

Saflaştırma çalışmalarında, daha önce laboratuvarımızda pelB sinyal peptidi taşımayan pET22b(+)/GkASNazII vektörü ile transforme edilmiş L-asparajinaz genini ifade ettiği doğrulanmış Rosetta 2 (DE3) hücreleri kullanılmıştır. IPTG (1mM) ile uyarılmış 800 ml Rosetta 2 (DE3) hücre kültüründen elde edilen hücreler sonikasyon ile parçalandıktan sonra ultra santrifüjle çöktürülerek örnekler saflaştırma için hazırlanmıştır.

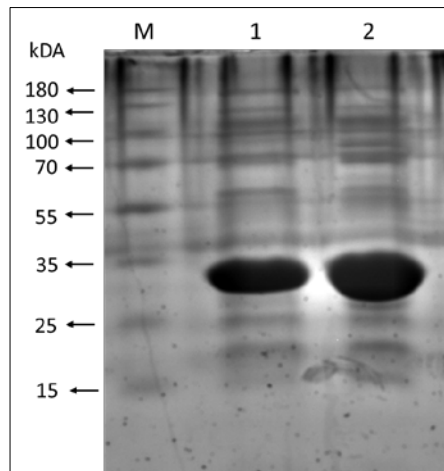
Karboksi terminalinde 6xHistidin etiketi bulunan rekombinant protein hücre özütünden, bir immobilize metal afinite kromatografi yöntemi (IMAC) olan Ni-NTA afinite kromatografisi ile tek basamakta saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucu elde edilen fraksiyonlardaki rekombinant protein varlığı SDS-PAGE ile analiz edilmiş (Şekil 4.9) ve C-terminalinde 6xHis ile elüye edilen L-asparajinaz proteini yaklaşık 37 kDa

büyükliğünde kalın bir bant olarak gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuç GkASNazII proteininin amino asit dizisine göre hesaplanan moleküler ağırlığı ile uyum göstermiştir.



Şekil 4.9: Ni-NTA agaroz ile GkASNazII enziminin saflaştırılması. 1-8. Saflaştırma ardından elde edilen enzim fraksiyonları 9. Protein belirteci.

Beklenen moleküler büyüklüğe sahip rekombinant protein içeren fraksiyonlar toplandıktan sonra Amicon Ultra-15 10K filtre ile tampon çözeltisi fosfat tampon çözeltisinden (pH 8.5) Tris-HCl tampon çözeltisine (pH 8.5) değiştirilmiş ve konsantre edilmiştir (Şekil 4.10). Hücre özütündeki total protein, saflaştırılan protein ve konsantre edilen protein miktarı BCA yöntemi ile tayin edilmiştir.



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

4.4. Saflaştırılan *Geobacillus kaustophilus* L-Asparajinazın Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi

4.4.1. Asparajinaz Enziminin Aktivite Tayini

L-asparajinazın enzimatik 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 $y = 0.3136x - 0.0158$ olarak hesaplanmıştır. 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:

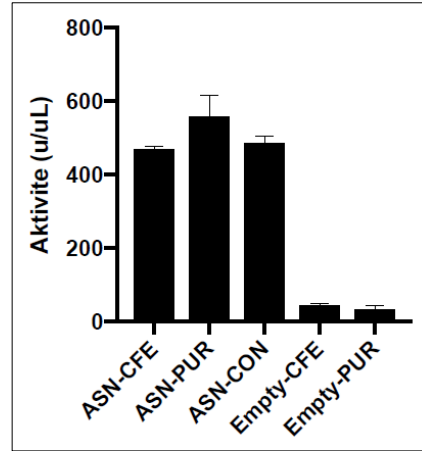
$$\text{Enzim Aktivitesi (unit}/\mu\text{l}) = \frac{[\text{NH}_3 (\mu\text{M}) \times \text{reaksiyon hacmi } (\mu\text{l})]}{[\text{supernatant hacmi } (\mu\text{l}) \times \text{reaksiyon süresi (dk)} \times \text{enzim miktarı } (\mu\text{l})]} \quad (1)$$

Tablo 4. 1: GkASNazII'in saflaştırılma tablosu.

Saflaştırma	Hacim	Total	Total	Spesifik	Saflaştırma	Verim (%)
Hücre Özütü	40	42	468.12	11.073	1.00	100
Saflaştırma	20	5.3	557.37	103.87	9.38	119.06
Konsantre	5	3.2	485.90	151.69	13.70	87.17

Saflaştırılmış ve konsantre edilmiş proteindeki enzim aktivitesi, saflaştırma için kullanılan hücre özütü ve L-asparajinaz geni taşımayan boş vektör ile transforme edilmiş hücrelerden elde edilen hücre özütü ve saflaştırılan proteindeki enzim aktivitesi karşılaştırılmıştır. Enzim aktivitesini belirlemek için her örnekten 0.8 μg protein, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) tamponunda, 5 mM L-asparajin ile 55°C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve açığa çıkan amonyak miktarı "Yöntemler"de belirtilen Nesslerizasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Saflaştırılmış ve konsantre edilmiş proteindeki enzim aktivitesinin hücre özütündeki enzim aktivitesine göre yaklaşık 15 kat arttığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubu olarak boş pET22b(+) vektörü içeren

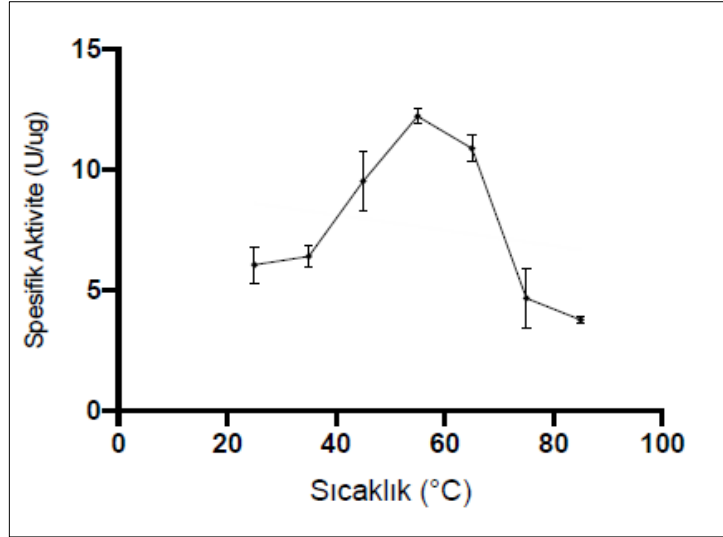
hücrelerden elde edilen hücre özütü ve Ni-NTA agarozdan geçirilen hücre özütü kullanılmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Farklı saflaştırma basamaklarında L-asparajinazın spesifik aktivitesi. ASN-CFE: pET22b(+)/GkASNazII Vektörü İçeren *E. coli* Rosetta 2 (DE3) Hücre Özütü ASN-PUR: Saflaştırılmış GkASNazII ASN-CON: Konsantre edilmiş GkASNazII Empty-CFE: pET22b(+) Vektörü İçeren *E. coli* Rosetta 2 (DE3) Hücre Özütü Empty-PUR: Protein Saflaştırma İşlemi Uygulanmış pET22b(+) Vektörü İçeren *E. coli* Rosetta 2 (DE3) Hücre Özütü.

4.4.2. Sıcaklığın Asparajinaz Aktivitesine Etkisi

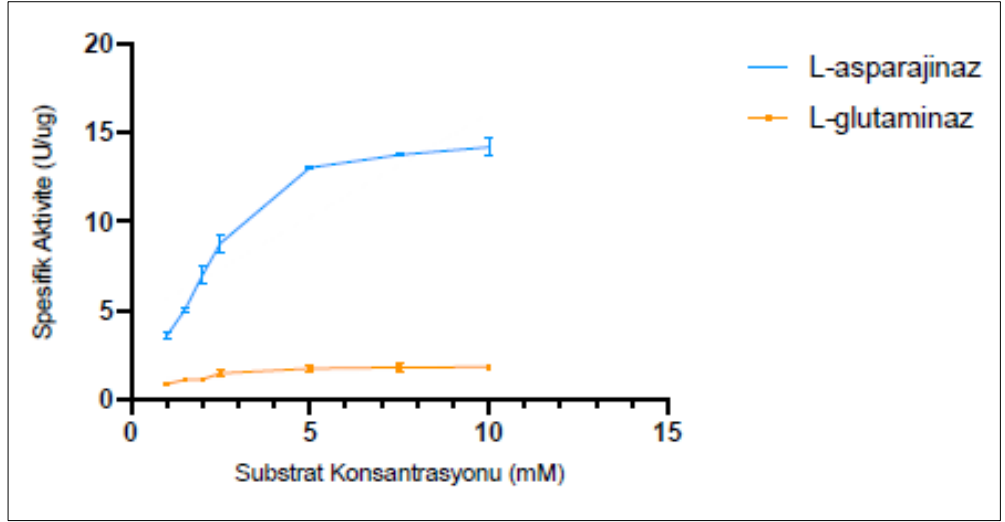
Rekombinant enzimin çalıştığı optimum sıcaklığın belirlenmesi amacıyla enzim aktivitesi, daha önce belirtilen reaksiyon koşullarında 25-85°C arasında değişen farklı sıcaklıklarda ölçülmüştür. Enzimin aktivitesi, UI/ μ L cinsinden ifade edilmiştir. Şekil 4.12’de gösterildiği gibi enzim aktivitesi 25-55°C sıcaklık aralığında artış göstermiş ve 55°C’de en yüksek değere ulaşmıştır (38.89 UI/ μ L). Rekombinant enzimin aktivitesi 65°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda düşüş göstermiştir.



Şekil 4.12: Sıcaklığın GkASNazII aktivitesi üzerine etkisi.

4.4.3. Substrat Konsantrasyonunun L-Asparajinaz Aktivitesine Etkisi

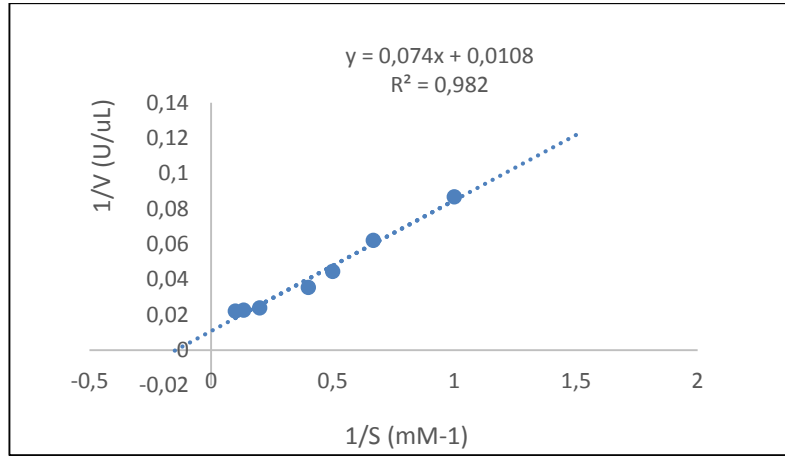
Substrat konsantrasyonunun saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için L-asparajin ve L-glutamin kullanılmıştır. 2.5 uL enzim ayrı ayrı 0-20 mM arasında değişen farklı substrat konsantrasyonlarında 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.5) içinde 55°C'de 5 dakika inkübe edilerek enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Enzimin substrat-doygunluk eğrisini gösteren grafiğe göre enzim, L-glutamin ile düşük bir aktivite eğrisi gösterirken; L-asparajin ile enzim aktivitesi yaklaşık 14 kat artmıştır. GkASNazII'nin L-glutaminaz aktivitesi 5 mM substrat varlığında 1.76 UI/μg olarak belirlenirken, enzimin L-asparajinaz aktivitesi 13.02 UI/μg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13).



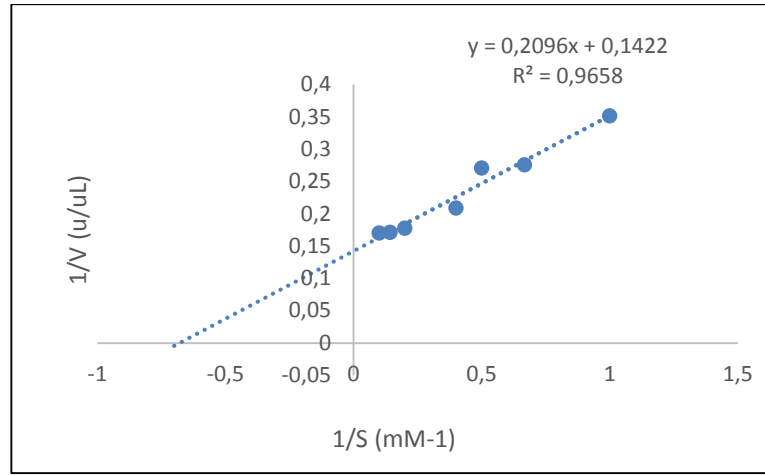
Şekil 4.13: Substrat konsantrasyonunun L-asparajinaz aktivitesine etkisi.

4.4.4. L-asparajinazın Kinetik Analizi

Rekombinant enzimin kinetik özelliği standart deney koşullarında L-asparajin ve L-glutaminin substrat olarak kullanılması ile belirlenmiştir. Enzimin Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerlerinin belirlenmesi için Şekil 3.14’de verilen substrat doygunluk grafiğinden elde edilen verilere göre $1/V'$ ye karşı $1/S$ doğrusal Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir (Şekil 4.15). Lineweaver-Burk grafiğinden elde edilen eğilim denklemi enzimin L-asparajin için K_m değeri 0.491 mM ve V_{max} değeri ise 92.59 mol olarak; L-glutamin için K_m değeri 2.5 mM V_{max} değeri ise 6.92 mol olarak hesaplanmıştır.



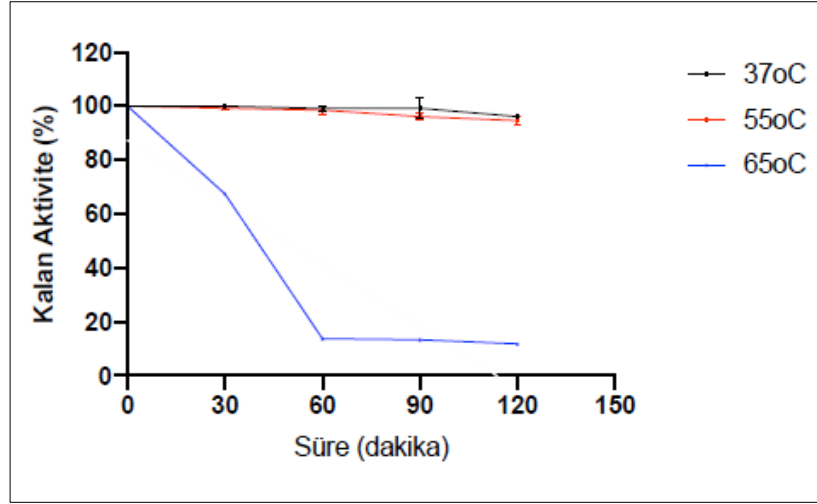
Şekil 4.14: GkASNazII'nin L-asparajin için Lineweaver-Burk grafiği.



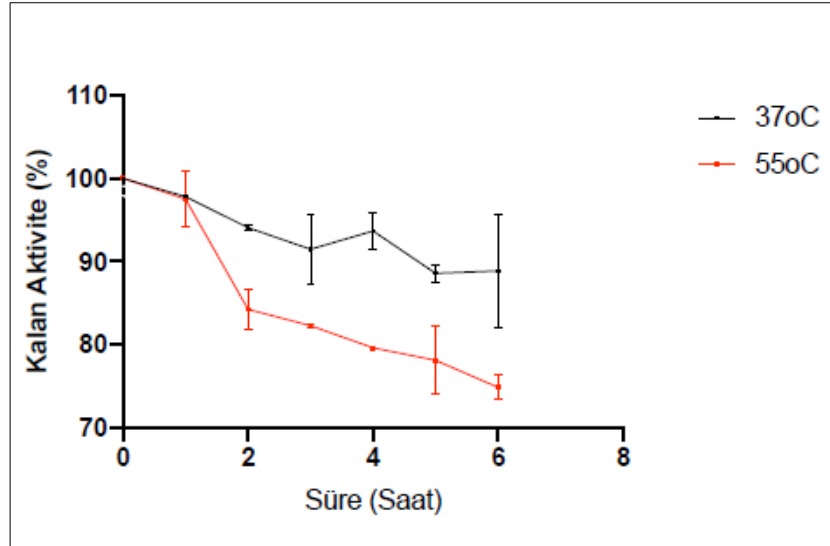
Şekil 4.15: GkASNazII'nin L-glutamin için Lineweaver-Burk grafiği.

4.4.5. L-asparajinazın Isıl Kararlılığının Belirlenmesi

Saflaştırılan enzimin ısıya dayanıklılığının belirlenmesi için 2.5 uL enzim 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.5) içinde 30, 60, 90 ve 120 dakika sürelerince 37, 55 ve 65°C sıcaklıklarında inkübe edildikten sonra, 5 mM substrat konsantrasyonu kullanılarak 55°C'de 5 dakika süresince enzim aktivite deneyi yapılarak enzim aktivitesi belirlenmiştir (Şekil 4.16). Buna ek olarak 37 ve 55°C sıcaklıklarında 6 saate kadar inkübe edilen enzimin, yine 5 mM substrat konsantrasyonu kullanılarak enzim aktivitesi belirlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.16: GkASNazII'nin 0-120 dk arasındaki ısı kararlılığı.



Şekil 4.17. GkASNazII'nin 0-6 saat arasındaki ısı kararlılığı.

5. TARTIŞMA

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 kanser tedavisinde ve son yıllarda gıdalardaki akrilamid oluşumunun engellenmesinde kullanılmaktadırlar. Bugüne kadar bilinen en iyi bakteriyal asparajinaz üreticisi *E. coli* ve *Erwinia conotovora*'dır. Çoğunlukla *Escherichia coli* kaynaklı L-asparajinazlar ilaç ve gıda gibi birçok sektörde kullanılmaktadır. Hem ilaç hem de gıda sektöründe yüksek sıcaklık ve geniş pH aralığında aktivitesini kaybetmeyen L-asparajinaz türlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasında, kinetik özellikleri literatürde yer almayan bir tip II L-asparajinaz türü olan Gram-pozitif termofilik bakteri *G. kaustophilus* DSM 7263T suşuna ait L-asparajinaz enzimi rekombinant olarak üretilip saflaştırılmıştır ve enzimin kinetik ve termostabilite özelliklerinin belirlenmesi ve hücre içi ve hücre dışı üretim verimlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda *G. kaustophilus* 7263T suşuna ait tip II L-asparajinaz geni klonlanmış ve bu gen tarafından kodlanan protein ile aktivasyon deneyleri yapılmıştır. Öncelikle, enzimin hücre içi ve hücre dışı ekspresyonunun, proteinin ekspresyon verimine, saflaştırılma sürecine ve kinetik özelliklerine olan etkisini karşılaştırmak amacıyla, proteinin hücre dışı ekspresyonunu sağlayacak pET22b(+)/GkASNazII(pelB) klonu elde edilmiş; hücre içi ekspresyon deneyleri için ise daha önce laboratuvarımızda klonlanmış olan pEt22b(+)/GkASNazII klonu (Orhan, MD, 2017) kullanılmıştır. *G. kaustophilus* L-asparajinaz enzimini kodlayan gen, hücre dışı ekspresyonunu sağlayacak olan pelB sinyal dizisi taşıyacak şekilde pET22b(+) vektörüne klonlanıp *E. coli* Rosetta 2 (DE3) ekspresyon hücrelerine aktarıldıktan sonra protein ekspresyon deneyleri elde edilen birden fazla transformant koloni için üç kez tekrarlanmış ancak yapılan SDS-PAGE analizlerinde ilgili transformantlarda L-asparajinaz ekspresyonu saptanamamıştır. Bu nedenle çalışmaya yalnızca pelB sinyal dizisi taşımayan yani L-asparajinazın hücre içi ekspresyonunu sağlayan pET22b(+)/GkASNazII klonu ile devam edilmiştir. 37°C sıcaklıkta LB besiyeri içerisinde inkübe edilen rekombinant pET22b(+)/GkASNazII vektörü içeren *E. coli* Rosetta 2 (DE3) hücreleri IPTG ile uyarılarak L-asparajinaz

enziminin yüksek miktarda ifadesi sağlanmıştır. Ni-NTA agaroz ile tek basamakta saflaştırılan protein, Tris-HCl tampon çözeltisi içinde konsantre edilerek kinetik analiz deneyleri için hazır hale getirilmiştir.

Optimum şartlarda (55°C, pH 8.5) yapılan enzim aktivitesi deneylerinde, saflaştırılmış ve konsantre edilmiş L-asparajinaz enziminin spesifik aktivitesi 151.6 U.mg⁻¹ olarak hesaplanmıştır. *G. kaustophilus* L-asparajinaz enziminin spesifik aktivitesi, literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, hipertermofilik olan *Thermococcus gammatolerans* 'dan (7622 U.mg⁻¹), ve arkea olan *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 (2350 U.mg⁻¹) ile *Pyrococcus furiosus* (550 U.mg⁻¹) L-asparajinazlardan düşük olduğu belirlenmiştir.

L-asparajinazın, L-asparajin ve L-glutamin substratları için ayrı ayrı Km ve Vmax değerlerinin hesaplanması için 0-20 mM aralığında farklı substrat konsantrasyonları ile optimum şartlarda enzim aktivasyon deneyleri yapılmıştır. Nesslerizasyon yöntemi ile açığa çıkan amonyak miktarının ölçülmesi ile dakikada parçalanan substrat miktarı belirlenmiş ve substrat konsantrasyonu ve reaksiyon hızı değerleri ile her bir substrat için ayrı ayrı Lineweaver-Burk eğrileri çizilmiştir. Lineweaver-Burk eğrisi kullanılarak hesaplanan Km ve Vmax değerleri elde edilen L-asparajinaz enziminin L-asparajine karşı L-glutamine nazaran yaklaşık 7 kat yüksek afiniteye sahip olduğunu göstermiştir.

Farklı organizmalardan elde edilen L-asparajinazlar biyokimyasal özellikleri bakımından geniş çapta çeşitlilik göstermektedir. Uzun yıllardır kanser tedavilerinde kullanılan *E. coli* ve *E. chrysanthemi* organizmalarından elde edilen L-asparajinazlar düşük termostabiliteye sahip enzimler olmakla birlikte, genellikle bakteriyel kaynaklı L-asparajinazlar 30-40°C arasında optimum aktivite göstermektedirler. Optimum aktivite sıcaklığı *Streptomyces*'lerde 40-60°C arasında olduğu, *Thermococcus kodakarensis* KOD1, *T. gammatolerans* EJ3, *Pyrococcus furiosus* gibi hipertermofilik arkealarda ise 80-85°C olduğu rapor edilmiştir (Vidya ve ark., 2011; Moreno-Enriquez ve ark., 2012; Chohan ve Rashid, 2013; Bansal ve ark., 2010). *G. kaustophilus* termofilik bir bakteridir ve 37°C ile 70°C arasındaki sıcaklıklarda büyüyebilmektedir (Takami ve ark., 2004). *G. kaustophilus*'tan elde ettiğimiz rekombinant L-asparajinaz enzimi 45-65°C sıcaklıkta aktivite gösterirken, 55°C'de en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Yapılan ısı kararlılık deneylerinde, *G. kaustophilus*'tan elde edilen asparajinaz enziminin iki saat süreyle 37°C ve 55°C'de enzim aktivitesini kaybetmeden

kalabildiği ancak 65°C sıcaklıkta 30 dakika inkübasyonun ardından enzim aktivitesinde %50 oranında azalma olduğu gözlenmiştir. 37°C ve 55°C sıcaklıklarında yapılan 6 saatlik ısıl kararlılık deneylerinde enzimin 37°C sıcaklığında 6 saat bekletildikten sonra enzimatik aktivitesini yaklaşık olarak %90 oranında koruduğu, 55°C sıcaklığında ise 6 saat sonunda aktivitesini %75 oranında koruduğu görülmüştür. *Geobacillus kaustophilus*'a ait L-asparajinazın 37°C sıcaklıkta koruduğu ısıl kararlılığı, klinik amaçlı uygulamalar için avantaj sağlayabileceğini göstermektedir. Enzimin termostabilitesini ve substrat seçiciliğini artırmaya yönelik, aktif bölgedeki amino asitler modifiye edilebilir.

G. kaustophilus L-asparajinazın, L-asparajine karşı Km ve Vmax değerleri sırasıyla 0,49 mM ve 92.59 U/μl olarak hesaplanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre Km değerleri *E. coli* için 0,01 mM, *E. crysanthemii* için 0,06 mM olarak rapor edilmiştir (Hong ve ark., 2014). GkASNazII, antitümör ajanı olarak kullanılmakta olan bu L-asparajinaz türlerinden daha düşük bir aktiviteye sahiptir. Termofilik bir *Bacillus*'tan saflaştırılan rekombinant GkASNazII'nın 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 ve ark., 2013; Mohamed ve ark., 2015). Bununla birlikte enzimin Km değeri günümüze kadar rapor edilen Km değerlerine sahip termofilik L-asparajinazlardan (*Pyrococcus furiosus* için 12 mM, *Thermus aquaticus* için 8,6 mM, *Thermococcus kodakarensis* için 5,5 mM, *Thermococcus gammatolerans* için 10 mM (Hong ve ark., 2014)) daha düşük olduğu belirlenmiştir (Chohan ve Rashid, 2013; Zuo ve ark., 2014).

KAYNAKLAR

Abd El Baky H. H., El Baroty G. S. (2016), "Optimization of Growth Conditions for Purification and Production of L-Asparaginase by *Spirulina maxima*." *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 1785938.

Aghaiypour K., Wlodawer A., Lubkowski J. (2001), "Do bacterial L-asparaginases utilize a catalytic triad Thr-Tyr-Glu?" *Biochim Biophys Acta*, 1550(2), 117-128.

Aghaiypour, K., Wlodawer A., Lubkowski J. (2001), "Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase." *Biochemistry*, 40(19), 5655-5664.

Amena S., Vishalakshi N., Prabhakar M., Dayanand A., Lingappa K. (2010), "Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*." *Braz J Microbiol*, 41(1), 173-178.

Amrein T. M., Andres L., Escher F., Amado R. (2007), "Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options." *Food Addit Contam*, 24 Suppl 1, 13-25.

Ardalan N., Mirzaie S., Sepahi A. A., Khavari-Nejad R. A. (2018), "Novel mutant of *Escherichia coli* asparaginase II to reduction of the glutaminase activity in treatment of acute lymphocytic leukemia by molecular dynamics simulations and QM-MM studies." *Med Hypotheses*, 112, 7-17.

Armstrong J. K., Hempel G., Koling S., Chan L. S., Fisher T., Meiselman H. J., Garratty G. (2007), "Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients." *Cancer*, 110(1), 103-111.

Arrivukkarasan S., Muthusivaramapandian M., Aravindan R., Viruthagiri T. (2010), "Effect of medium composition and kinetic studies on extracellular and intracellular production of L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum*." *Food Sci Technol Int*, 16(2), 115-125.

Aung H. P., Bocola M., Schleper S., Rohm K. H. (2000), "Dynamics of a mobile loop at the active site of *Escherichia coli* asparaginase." *Biochim Biophys Acta*, 1481(2), 349-359.

Bansal S., Gnaneswari D., Mishra P., Kundu B. (2010), "Structural stability and functional analysis of L-asparaginase from *Pyrococcus furiosus*." *Biochemistry (Mosc)*, 75(3), 375-381.

Baskar G., Aiswarya R. (2018), "Overview on mitigation of acrylamide in starchy fried and baked foods." *J Sci Food Agric*, 98(12), 4385-4394.

Batool T., Makky E. A., Jalal M., Yusoff M. M. (2016), "A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications." *Appl Biochem Biotechnol*, 178(5), 900-923.

Belviso S., Iuliano R., Amato R., Perrotti N., Menniti M. (2017), "The human asparaginase enzyme (ASPG) inhibits growth in leukemic cells." *PLoS One*, 12(5), e0178174.

Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. (2000), "The Protein Data Bank." *Nucleic Acids Res*, 28(1), 235-242.

Bonthron D. T., Jaskolski M. (1997), "Why a "benign" mutation kills enzyme activity. Structure-based analysis of the A176V mutant of *Saccharomyces cerevisiae* L-asparaginase I." *Acta Biochim Pol*, 44(3), 491-504.

Broome J. D., Schwartz J. H. (1967), "Differences in the production of L-asparagine in asparaginase-sensitive and resistant lymphoma cells." *Biochim Biophys Acta*, 138(3), 637-639.

Cachumba J. J., Antunes F. A., Peres G. F., Brumano L. P., Santos J. C., Da Silva S. S. (2016), "Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production." *Braz J Microbiol*, 47 Suppl 1, 77-85.

Cappelletti D., Chiarelli L. R., Pasquetto M. V., Stivala S., Valentini G., Scotti C. (2008), "Helicobacter pylori-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent." *Biochem Biophys Res Commun*, 377(4), 1222-1226.

Carter P., Wells J. A. (1988), "Dissecting the catalytic triad of a serine protease." *Nature*, 332(6164), 564-568.

Cedar H., Schwartz J. H. (1968), "Production of L-asparaginase II by *Escherichia coli*." *J Bacteriol*, 96(6), 2043-2048.

Chan W. T., Verma C. S., Lane D. P., Gan S. K. (2013), "A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*." *Biosci Rep*, 33(6).

Chohan S. M., Rashid N. (2013), "TK1656, a thermostable L-asparaginase from *Thermococcus kodakaraensis*, exhibiting highest ever reported enzyme activity." *J Biosci Bioeng*, 116(4), 438-443.

Chohan S. M., Rashid N., Sajed M., Imanaka T. (2019), "Pcal_0970: an extremely thermostable L-asparaginase from *Pyrobaculum calidifontis* with no detectable glutaminase activity." *Folia Microbiol (Praha)*, 64(3), 313-320.

Choi J. H., Lee S. Y. (2004), "Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol*, 64(5), 625-635.

Costa I. M., Schultz L., Araujo Bianchi Pedra B. de, Leite M. S., Farsky S. H., de Oliveira M. A., Pessoa A., Monteiro G. (2016), "Recombinant L-asparaginase 1 from

Saccharomyces cerevisiae: an allosteric enzyme with antineoplastic activity." *Sci Rep*, 6, 36239.

Einsfeldt K., I. C. Baptista, J. C. Pereira, R. E. Bruno, F. V. Mello, I. C. Costa-Amaral, E. S. Costa, Ribeiro M. C., Land M. G., Alves T. L., Larentis A. L., Almeida R. V. (2016), "Correction: Recombinant L-Asparaginase from *Zymomonas mobilis*: A Potential New Antileukemic Agent Produced in *Escherichia coli*." *PLoS One*, 11(9), e0163203.

Eisele N., Linke D., Bitzer K., Na'amnieh S., Nimtz M., Berger R. G. (2011), "The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*." *Bioresour Technol*, 102(3), 3316-3321.

El-Bessoumy A. A., Sarhan M., Mansour J. (2004), "Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation." *J Biochem Mol Biol*, 37(4), 387-393.

Fernandes A. I., Gregoriadis G. (1997), "Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics." *Biochim Biophys Acta*, 1341(1), 26-34.

Filpula, D., Nagle J. W., Pulford S., Anderson D. M. (1988), "Sequence of L-asparaginase gene from *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1125." *Nucleic Acids Res*, 16(21), 10385.

Foot R. J., Haase N. U., Grob K., Gonde P. (2007), "Acrylamide in fried and roasted potato products: a review on progress in mitigation." *Food Addit Contam*, 24 Suppl 1, 37-46.

Fu Z., S. Hamid B. A., Razak C. N. A., Basri M., Salleh A. B., Rahman R. N. Z. A. (2003), "Secretory expression in *Escherichia coli* and single-step purification of a heat-stable alkaline protease." *Protein Expression and Purification*, 28(1), 63-68.

Gaffar S. A., Shethna Y. I. (1977), "Purification and Some Biological Properties of Asparaginase from *Azotobacter vinelandii*." *Appl Environ Microbiol*, 33(3), 508-514.

Geckil H., Gencer S. (2004), "Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for efficient oxygen uptake." *Appl Microbiol Biotechnol*, 63(6), 691-697.

Guenther H., Anklam E., Wenzl T., Stadler R. H. (2007), "Acrylamide in coffee: review of progress in analysis, formation and level reduction." *Food Addit Contam*, 24 Suppl 1, 60-70.

Haase N. U., Grothe K. H., Matthaus B., Vosmann K., Lindhauer M. G. (2012), "Acrylamide formation and antioxidant level in biscuits related to recipe and baking." *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 29(8), 1230-1238.

Han S., Jung J., Park W. (2014), "Biochemical characterization of L-asparaginase in NaCl-tolerant *Staphylococcus* sp. OJ82 isolated from fermented seafood." *J Microbiol Biotechnol*, 24(8), 1096-1104.

Haskell C. M., Canellos G. P., Leventhal B. G., Carbone P. P., Serpick A. A., H. H. Hansen (1969), "L-asparaginase toxicity." *Cancer Res*, 29(4), 974-975.

Hatanaka T., H. Usuki, Arima J., Uesugi Y., Yamamoto Y., Kumagai Y., Yamasato A., Mukaihara T. (2011), "Extracellular production and characterization of two streptomyces L-asparaginases." *Appl Biochem Biotechnol*, 163(7), 836-844.

Hendriksen H. V., Kornbrust B. A., Ostergaard P. R., Stringer M. A. (2009), "Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*." *J Agric Food Chem*, 57(10), 4168-4176.

Ho D. H., Whitecar J. P., Jr., Luce J. K., Frei E., 3rd (1970), "L-asparagine requirement and the effect of L-asparaginase on the normal and leukemic human bone marrow." *Cancer Res*, 30(2), 466-472.

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-asparaginase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1." *J Basic Microbiol*, 54(6), 500-508.

Huerta-Saquero A., Evangelista-Martinez Z., Moreno-Enriquez A., Perez-Rueda E. (2013), "Rhizobium etli asparaginase II: an alternative for acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment." *Bioengineered*, 4(1), 30-36.

Izadpanah Qeshmi F., Homaei A., Fernandes P., Javadpour S. (2018), "Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry." *Microbiol Res*, 208, 99-112.

Jayachandran D., Chityala S., Prabhu A. A., Dasu V. V. (2019), "Cationic reverse micellar based purification of recombinant glutaminase free L-asparaginase II of *Bacillus subtilis* WB800N from fermentation media." *Protein Expr Purif*, 157, 1-8.

Jia M., Xu M., He B., Rao Z. (2013), "Cloning, expression, and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06." *J Agric Food Chem*, 61(39), 9428-9434.

Jonasson P., Liljeqvist S., Nygren P. A., Stahl S. (2002), "Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*." *Biotechnol Appl Biochem*, 35(2), 91-105.

Kamisaki Y., Wada H., Yagura T., Nishimura H., Matsushima A., Inada Y. (1982), "Increased antitumor activity of *Escherichia coli*. L-asparaginase by modification with monomethoxypolyethylene glycol." *Gan*, 73(3), 470-474.

- Kante R. K., Vemula S., Somavarapu S., Mallu M. R., Boje Gowd B. H., Ronda S. R. (2018), "Optimized upstream and downstream process conditions for the improved production of recombinant human asparaginase (rhASP) from *Escherichia coli* and its characterization." *Biologicals*, 56, 45-53.
- Kaur J., R. Kumar, Kumar K. (2017), "Comparative Characterization of L-Asparaginase Extracted from Plant and Microbial Sources." *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 8(5), 86-89.
- Kebeish R., El-Sayed A., Fahmy H., Abdel-Ghany A. (2016), "Molecular Cloning, Biochemical Characterization, and Antitumor Properties of a Novel L-Asparaginase from *Synechococcus elongatus* PCC6803." *Biochemistry (Mosc)* 81(10), 1173-1181.
- Khushoo A., Pal Y., Mukherjee K. J. (2005), "Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor." *Appl Microbiol Biotechnol*, 68(2), 189-197.
- Khushoo A., Pal Y., Singh B. N., Mukherjee K. J. (2004), "Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II." *Protein Expr Purif*, 38(1), 29-36.
- Kotzia G. A., Labrou N. E. (2007), "L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization." *J Biotechnol*, 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 Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58(Pt 1), 130-132.
- Krishnapura P. R., Belur P. D., Subramanya S. (2016), "A critical review on properties and applications of microbial L-asparaginases." *Crit Rev Microbiol*, 42(5), 720-737.
- Kukurova K., Morales F. J., Bednarikova A., Ciesarova Z. (2009), "Effect of L-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model." *Mol Nutr Food Res*, 53(12), 1532-1539.
- Laila R., Islam A., Bhuiyan M. M. (2016), "Incidence of Hyperglycemia during Induction of Remission Phase of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia." *Mymensingh Med J*, 25(4), 730-735.
- Lanvers-Kaminsky C. (2017), "Asparaginase pharmacology: challenges still to be faced." *Cancer Chemother Pharmacol*, 79(3), 439-450.
- Lubkowski J., Dauter M., Aghaiypour K., Wlodawer A., Dauter Z. (2003), "Atomic resolution structure of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59(Pt 1), 84-92.

Maggi M., Chiarelli L. R., Valentini G., Scotti C. (2015), "Engineering of *Helicobacter pylori* L-asparaginase: characterization of two functionally distinct groups of mutants." *PLoS One*, 10(2), e0117025.

Maggi M., Chiarelli L. R., Valentini G., Scotti C. (2015), "Engineering of *Helicobacter pylori* L-asparaginase: characterization of two functionally distinct groups of mutants." *PLoS One*, 10(2), e0117025.

Meena B., Anburajan L., Sathish T., Vijaya Raghavan R., Dharani G., Vinithkumar N. V., Kirubakaran R. (2015), "L-Asparaginase from *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29: optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of L-asparaginase gene." *Sci Rep*, 5, 12404.

Meena B., Anburajan L., Vinithkumar N. V., Shridhar D., Raghavan R. V., Dharani G., Kirubakaran R. (2016), "Molecular expression of l-asparaginase gene from *Nocardiosis alba* NIOT-VKMA08 in *Escherichia coli*: A prospective recombinant enzyme for leukaemia chemotherapy." *Gene*, 590(2), 220-226.

Mioara N., Enuta I., Alina A., Luminita C., Nastasia B., Andreea S., Dragos E., Hassan Y. A. E. (2016), "Analysis and Evaluation of the Acrylamide Levels in Some Bread Assortments on the Romanian Market by GC-MS/MS." *Journal of Environmental Science and Engineering*, A 5(4).

Miwa N., Mitsuhashi M., Kajiura T. (2019), "Screening of microorganisms producing a novel protein-asparaginase and characterization of the enzyme derived from *Luteimicrobium album*." *J Biosci Bioeng*, 127(3), 281-287.

Mohan Kumar N. S., Manonmani H. K. (2013), "Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp." *World J Microbiol Biotechnol*, 29(4), 577-587.

Moola Z. B., Scawen M. D., Atkinson T., Nicholls D. J. (1994), "*Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes." *Biochem J*, 302 (Pt 3), 921-927.

Moreno-Enriquez A., Evangelista-Martinez Z., Gonzalez-Mondragon E. G., 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." *J Microbiol Biotechnol*, 22(3), 292-300.

Mukherjee J., Joeris K., Riechel P., Scheper T. (1999), "A simple method for the isolation and purification of L-asparaginase from *Enterobacter aerogenes*." *Folia Microbiol (Praha)*, 44(1), 15-18.

Neerunjun E. D., Gregoriadis G. (1976), "Tumour regression with liposome-entrapped asparaginase: some immunological advantages." *Biochem Soc Trans*, 4(1), 133-134.

Oettgen H. F., Old L. J., Boyse E. A., Campbell H. A., Philips F. S., Clarkson B. D., Tallal L., Leeper R. D., Schwartz M. K., Kim J. H. (1967), "Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase." *Cancer Res*, 27(12), 2619-2631.

Oza V. P., Parmar P. P., Patel D. H., Subramanian R. B. (2011), "Cloning, expression and characterization of L-asparaginase from *Withania somnifera* L. for large scale production." *3 Biotech*, 1(1), 21-26.

Parmentier J. H., Maggi M., Tarasco E., Scotti C., Avramis V. I., Mittelman S. D. (2015), "Glutaminase activity determines cytotoxicity of L-asparaginases on most leukemia cell lines." *Leuk Res*, 39(7), 757-762.

Patel N., Krishnan S., Offman M. N., Krol M., Moss C. X., Leighton C., van Delft F. W., Holland M., Liu J., Alexander S., Dempsey C., Ariffin H., Essink M., Eden T. O., Watts C., Bates P. A., Saha V. (2009), "A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase." *J Clin Invest*, 119(7), 1964-1973.

Pedreschi F., Kaack K., Granby K. (2008), "The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries." *Food Chem*, 109(2), 386-392.

Peterson R. E., Ciegler A. (1969), "L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*." *Appl Microbiol*, 18(1), 64-67.

Peterson R. E., Ciegler A. (1969), "L-asparaginase production by various bacteria." *Appl Microbiol*, 17(6), 929-930.

Pokrovskaya M. V., Aleksandrova S. S., Pokrovsky V. S., Omeljanjuk N. M., Borisova A. A., Anisimova N. Y., Sokolov N. N. (2012), "Cloning, expression and characterization of the recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase." *Protein Expr Purif*, 82(1), 150-154.

Pourhossein M., Korbekandi H. (2014), "Cloning, expression, purification and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase in *Escherichia coli*." *Adv Biomed Res*, 3, 82.

Powers S. J., Mottram D. S., Curtis A., Halford N. G. (2017), "Acrylamide levels in potato crisps in Europe from 2002 to 2016." *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 34(12), 2085-2100.

Poznansky M. J., Shandling M., Salkie M. A., Elliott J. F., Lau E. (1982), "Advantages in the use of L-asparaginase-albumin polymer as an antitumor agent." *Cancer Res*, 42(3), 1020-1025.

Pradhan B., Dash S. K., Sahoo S. (2013), "Screening and characterization of extracellular L-asparaginase producing *Bacillus subtilis* strain hswx88, isolated from Taptapani hot spring of Odisha, India." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(12), 936-941.

Prager M. D., Derr I. (1970), "Inhibition of primary antibody response by *E. coli* asparaginase." *Nature*, 225(5236), 952.

Qiao J., Qi L., Ma H., Chen Y., Wang M., Wang D. (2010), "Study on amino amides and enzyme kinetics of L-asparaginase by MCE." *Electrophoresis*, 31(9), 1565-1571.

Radha R., Arumugam N., Gummadi S. N. (2018), "Glutaminase free L-asparaginase from *Vibrio cholerae*: Heterologous expression, purification and biochemical characterization." *Int J Biol Macromol*, 111, 129-138.

Rajesh M. J., Rajesh L., veni V. S., Thirumurugan G., Sethuraman O. S. (2011), "Effect of Inducers and Physical Parameters on the Production Of L-Asparaginase Using *Aspergillus Terreus*." *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 01(04).

Ramirez-Paz J., Ortiz-Andrade B. M., Griebenow K., Diaz-Vazquez L. (2017), "Show Yourself, Asparaginase: An Enzymatic Reaction Explained through a Hands-On Interactive Activity." *J Chem Educ*, 94(6), 722-725.

Ravi A., Gurunathan B. (2018), "Acrylamide Mitigation in Fried Kochchi Kesel Chips Using Free and Immobilized Fungal Asparaginase." *Food Technol Biotechnol*, 56(1), 51-57.

Rosen J., Hellenas K. E. (2002), "Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry." *Analyst*, 127(7), 880-882.

Saeed H., Soudan H., El-Sharkawy A., Farag A., Embaby A., Ataya F. (2018), "Expression and Functional Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Recombinant L-Asparaginase." *Protein J*, 37(5), 461-471.

Safary A., Moniri R., Hamzeh-Mivehroud M., Dastmalchi S. (2019), "Highly efficient novel recombinant L-asparaginase with no glutaminase activity from a new halo-thermotolerant *Bacillus* strain." *Bioimpacts*, 9(1), 15-23.

Sanghvi G., K. Bhimani, D. Vaishnav, T. Oza, G. Dave, P. Kunjadia, N. Sheth (2016), "Mitigation of acrylamide by L-asparaginase from *Bacillus subtilis* KDPS1 and analysis of degradation products by HPLC and HPTLC." *Springerplus*, 5, 533.

Sannikova E. P., Bulushova N. V., Cheperegin S. E., Chestukhina G. G., Ryabichenko V. V., Zalunin I. A., Kotlova E. K., Konstantinova G. E., Kubasova T. S., Shtil A. A., Pokrovsky V. S., Yarotsky S. V., Efremov B. D., Kozlov D. G. (2016), "The Modified Heparin-Binding L-Asparaginase of *Wolinella succinogenes*." *Mol Biotechnol*, 58(8-9), 528-539.

Santos J., Costa I. M., Molino J. V. D., Leite M. S. M., Pimenta M. V., Coutinho J. A. P., Pessoa A., Jr., Ventura S. P. M., Lopes A. M., Monteiro G. (2017), "Heterologous expression and purification of active L-asparaginase I of *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* host." *Biotechnol Prog*, 33(2), 416-424.

Schalk A. M., Nguyen H. A., Rigouin C., Lavie A. (2014), "Identification and structural analysis of an L-asparaginase enzyme from guinea pig with putative tumor cell killing properties." *J Biol Chem*, 289(48), 33175-33186.

Shakambari G., Sameer Kumar R., Ashokkumar B., Ganesh V., Vasantha V. S., Varalakshmi P. (2018), "Cloning and expression of L-asparaginase from *Bacillus tequilensis* PV9W and therapeutic efficacy of Solid Lipid Particle formulations against cancer." *Sci Rep*, 8(1), 18013.

Shi R., Liu Y., Mu Q., Jiang Z., Yang S. (2017), "Biochemical characterization of a novel L-asparaginase from *Paenibacillus barengoltzii* being suitable for acrylamide reduction in potato chips and mooncakes." *Int J Biol Macromol*, 96, 93-99.

Shrivastava A., Khan A. A., Shrivastav A., Jain S. K., Singhal P. K. (2012), "Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*." *Prep Biochem Biotechnol*, 42(6), 574-581.

Sindhu R., Manonmani H. K. (2018), "Expression and characterization of recombinant l-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens*." *Protein Expr Purif*, 143, 83-91.

Sindhu R., Manonmani H. K. (2018), "l-asparaginase induces intrinsic mitochondrial-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells and impedes tumor progression." *Biochem Biophys Res Commun*, 503(4), 2393-2399.

Skovgaard N. (2005), "Evaluation of certain food additives." *International Journal of Food Microbiology*, 101(3), 348-349.

Souza P. M., de Freitas M. M., Cardoso S. L., Pessoa A., Guerra E. N. S., Magalhaes P. O. (2017), "Optimization and purification of l-asparaginase from fungi: A systematic review." *Crit Rev Oncol Hematol*, 120, 194-202.

Sudhir A. P., Agarwal V. V., Dave B. R., Patel D. H., Subramanian R. B. (2016), "Enhanced catalysis of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* by a rational redesign." *Enzyme Microb Technol*, 86, 1-6.

Sudhir A. P., B. R. Dave, A. S. Prajapati, K. Panchal, D. Patel, R. B. Subramanian (2014), "Characterization of a recombinant glutaminase-free L-asparaginase (ansA3) enzyme with high catalytic activity from *Bacillus licheniformis*." *Appl Biochem Biotechnol*, 174(7), 2504-2515.

Sun Z., R. Qin, D. Li, K. Ji, T. Wang, Z. Cui, Y. Huang (2016), "A novel bacterial type II l-asparaginase and evaluation of its enzymatic acrylamide reduction in French fries." *Int J Biol Macromol*, 92, 232-239.

Swain A. L., M. Jaskolski, D. Housset, J. K. Rao, A. Wlodawer (1993), "Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(4), 1474-1478.

Takami H., S. Nishi, J. Lu, S. Shimamura, Y. Takaki (2004), "Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench." *Extremophiles*, 8(5), 351-356.

Taylor M. J., T. Richardson (1979), *Applications of Microbial Enzymes in Food Systems and in Biotechnology*, 7-35.

Trang T. H. N., Cuong T. N., Thanh S. L. N., Tuyen T. D. (2016), "Optimization, purification and characterization of recombinant L-asparaginase II in *Escherichia coli*." *African Journal of Biotechnology*, 15(31), 1681-1691.

Tritscher A. M. (2004), "Human health risk assessment of processing-related compounds in food." *Toxicol Lett*, 149(1-3), 177-186.

Van Kerckhoven S. H., de la Torre F. N., Canas R. Avila A., C., Canton F. R., Canovas F. M. (2017), "Characterization of Three L-Asparaginases from Maritime Pine (*Pinus pinaster* Ait.)." *Front Plant Sci*, 8, 1075.

Vidya J., Pandey A. (2012), "Recombinant expression and characterization of L-asparaginase II from a moderately thermotolerant bacterial isolate." *Appl Biochem Biotechnol*, 167(5), 973-980.

Vidya J., Sajitha S., Ushasree M. V., Sindhu R., Binod P., Madhavan A., Pandey A. (2017), "Genetic and metabolic engineering approaches for the production and delivery of L-asparaginases: An overview." *Bioresour Technol*, 245(Pt B), 1775-1781.

Vimal A., Kumar A. (2017), "Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme." *Biotechnol Genet Eng Rev*, 33(1), 40-61.

Vrooman L. M., Supko J. G., Neuberg D. S., Asselin B. L., Athale U. H., Clavell L., Kelly K. M., Laverdiere C., Michon B., Schorin M., Cohen H. J., Sallan S. E., Silverman L. B. (2010), "Erwinia asparaginase after allergy to *E. coli* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia." *Pediatr Blood Cancer*, 54(2), 199-205.

Worton K. S., Kerbel R. S., Andrulis I. L. (1991), "Hypomethylation and reactivation of the asparagine synthetase gene induced by L-asparaginase and ethyl methanesulfonate." *Cancer Res*, 51(3), 985-989.

Xu F., Oruna-Concha M. J., Elmore J. S. (2016), "The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food." *Food Chem*, 210, 163-171.

Yang C. P., Lin S. T., Liang D. C., Hung I. J., Yang Y. M., Chen H. N., Hsieh Y. L., Law K. L., Lin M. T., Twu B. H. (1993), "Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia with protocol TCL-842 in Taiwan: the Taiwan Children's Cancer Study Group." *J Formos Med Assoc*, 92(5), 431-439.

Zuo S., T. Zhang, B. Jiang, W. Mu (2015). "Recent research progress on microbial L-asparaginases." *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(3), 1069-1079.

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep Tansu ATASAVUM 1992 yılında İstanbul’da doğdu. 2010 yılında başladığı Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünü 2014 yılında başarıyla tamamlayarak aynı yıl yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı.

EKLER

Ek A: Besiyerleri

Hazırlanan besiyerleri 121°C’da 20 dakika süre ile otoklavlanarak sterilize edilmişlerdir.

Tablo A1.1: LB Broth besiyeri.

Luria Bertani Broth	
Trypton	10 g/L
Maya özütü	5 g/L
NaCl	5 g/L

- SOC Sıvı Besiyeri: Super Optimal Broth’a son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde glikoz eklenir ve otoklavlanır.

Ek B: Çözeltiler

- Ampisilin (5 ml, 100 mg/ml) : 0.5 g Ampisilin dH₂O ile 5 ml'ye tamamlanır. Filtreden geçirilerek sterilize edilir.
 - IPTG (100 mM, 10 ml) : 0.238 g IPTG 10 ml dH₂O ile çözülür. Filtreden geçirilerek sterilize edilir.
- i) Plazmit İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar:
- Lizozim (5 ml, 10 mg/ml) : 5 mg Lizozim 10 mM Tris-EDTA (pH 8.0) içinde çözülür.

Tablo B1.1: Plazmit izolasyonu için kullanılan solüsyonlar.

STET Tamponu (pH 8.0)		Alkali Lizis- Solüsyon I (pH 8.0)	
Sükroz	%8	Tris	25 mM
Triton X-100	%5	Glikoz	50 mM
EDTA	50 mM	EDTA	10 mM
dH ₂ O içinde çözülür.			

- ii) Plazmit İzolasyonu (Sambrook ve ark. 1989) İçin Kullanılan Solüsyonlar:

Tablo B1.2: Plazmit izolasyonu (Sambrook ve ark. 1989) için kullanılan solüsyonlar.

Solüsyon I		Solüsyon II		Solüsyon II	
Tris pH 8.0	25 mM	NaOH 10 N	0.2 ml	Potasyum Asetat 5 M	120 ml
EDTA pH 8.0	10 mM	SDS %20	0.5 ml	Glasiyel Asetik Asit	23 ml
Glikoz	50 mM	dH ₂ O	9.3 ml	dH ₂ O	57 ml

- iii) Transformasyon İçin Kullanılan Solüsyonlar:

Tablo B1.3: Transformasyon için kullanılan solüsyonlar.

TSS Tamponu pH 6.5	
PEG (6000 g/mol)	%10
DMSO	%5
MgCl ₂	50 mM

iv) Ni-NTA Saflaştırma İçin Kullanılan Solüsyonlar :

Tablo B1.4: Ni-NTA saflaştırma için kullanılan solüsyonlar.

pH 8.0	Sodyum Fosfat Tamponu	NaCl	İmidazol
Lizis Tamponu	50 mM	300 mM	10 mM
Bağlanma Tamponu	50 mM	300 mM	20 mM
Elüsyon Tamponu	50 mM	300 mM	250 mM

v) Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar :

Tablo B1.5: Agaroz jel elektroforezi için kullanılan solüsyonlar.

50X TAE Tamponu (1L)		%0.8'lik Agaroz Jel (50 ml)	
Tris	242 g	Agaroz	0.32 g
Glasiyal Asetik Asit	57.1 ml	RedSafe (10µg/µl)	3 µl
0.5 M EDTA pH 8.0	100 ml	1X TAE Tamponu	50 ml

vi) SDS-PAGE İçin Kullanılan Solüsyonlar :

Tablo B1.6: SDS-PAGE için kullanılan solüsyonlar.

4X Örnek Tamponu pH 6.8	
SDS	%4
Gliserol	%20
β-merkaptotanol	%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
Coomassie Blue Boyama Solüsyonu (1L)	
Coomassie Blue R-250	1 g
Metanol	450 ml
Glasiyal asetik asit	100 ml
dH ₂ O	450 ml
Boyadan Arındırma Solüsyonu (1L)	
Metanol	400 ml
Glasiyal Asetik Asit	100 ml
dH ₂ O	500 ml

Ek C : Kimyasallar

Tablo C1.1. Kullanılan kimyasallar.

2-propanol (C ₃ H ₈ O)	Merck (Germany)
Asetik asit (AcOH)	
Etanol (EtOH)	
B-Merkaptoetanol (C ₂ H ₆ OS)	
Sodyum klorür (NaCl)	
Sodyum hidroksit (NaOH)	
Hidroklorik asit (HCl)	
İzoamilalkol (C ₅ H ₁₂ O)	
Metanol (CH ₄ O)	
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	
Coomassie brilliant blue R250	
Magnezyum fosfat (MgCl ₂ .6H ₂ O)	
Lityum klorür (LiCl)	
Agaroz	
Sodyum asetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	
Ampisilin	Fisher BioReagents (USA)
Red safe (Intron)	
Temed (C ₆ H ₁₆ N ₂)	
Trikloroasetik asit (TCA)	Sigma-Aldrich (USA)
İmidazol (C ₃ H ₄ N ₂)	
Glikoz (C ₆ H ₁₂ O ₆)	
Bisakrilamid (C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂)	Applichem (Germany)
Amonyum persülfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	
Glisin (C ₂ H ₅ NO ₂)	
Dmso (C ₂ H ₆ OS)	Riedel de Haen (Germany)
Sodyum fosfat (NaH ₂ PO ₄)	
Potasyum klorür (KCl)	
Agar ((C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _x)	Fluka (Switzerland)
Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	
IPTG (C ₉ H ₁₈ O ₅ S)	MBI Fermentas (USA)
Ni-NTA agaroz	Qiagen (USA)
Edta (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Alfa aesar (Germany)
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Roche (Germany)

Tablo C1.2:Kullanılan enzimler.

RNaz A	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
BamHI-HF Restriksiyon Endonükleaz	Thermo Fischer Scientific
Sall Restriksiyon Endonükleaz	
T4 DNA Ligaz	MBI Fermentas AB (Vilnius, Lithuania USA)
10X T4 DNA Ligaz Tamponu	

Tablo C1.3: Kullanılan belirteçler.

Moleküler DNA Belirteci	Thermo Fischer Scientific, GeneRuler 1 kb DNA Marker
Moleküler Protein Belirteci	Thermo Fisher Scientific, PageRuler Prestained Protein 18 Ladder 10 to 250 kDa
DNA Saflaştırma Kiti	NucleoSpin, Gel and PCR Clean-up Kit, Machery-Nagel

Ek D: Cihazlar

Tablo D1.1: Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka
+4 °C Buzdolabı	Arçelik
-20 °C	Bosch
-80 °C derin dondurucu	Thermo, Forma - 86 °C ULT Freezer
Steril Kabin	Heraeus, HP48
Masa Üstü Santrifüj	VWR, Microsent 17R
Ultrasantrifüj	Beckman Coulter™ Avanti™ J-30I Centrifuge
Masa Üstü Santrifüj	Beckman Coulter, Microfuge 22R
Spektrofotometre	BIORAD, 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	Hanna Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter
Buz makinesi	BAR-LINE BF85
Floresans Spektrofotometre	VARIAN, Eclipse
UV Spektrofotometre	Beckman Coulter DU 530
Jel Görüntüleme Cihazı	Azure
AKTA Purifier saflaştırma Cihazı	GE Healthcare, Bioscience
Mikrodalga Fırın	Samsung