

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IRAKLI HASTALARDA BAKTERİ ENFEKSİYONU VE TEDAVİSİNDE L-
ASPARAGİNAZ EKSPRESYONU

Husam Aldeen Khudhair NSAIF

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2024

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Husam Aldeen Khudhair NSAIF tarafından hazırlanan “**Iraklı Hastalarda Bakteri Enfeksiyonu ve Tedavisinde L-Asparaginaz Ekspresyonu**” adlı tez çalışması 12/02/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Abeer Talib ABDULQADER

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mine TÜRKTAS
Biyoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Fiziki Coğrafya Anabilim Dalı
Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “**Iraklı Hastalarda Bakteri Enfeksiyonu ve Tedavisinde L-Asparaginaz Ekspresyonu**” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (12/02/2024).

Husam Aldeen Khudhair NSAIF

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IRAKLI HASTALARDA BAKTERİ ENFEKSİYONU VE TEDAVİSİNDE L- ASPARAGINAZ EKSPRESYONU

Husam Aldeen Khudhair NSAIF

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Abeer Talib ABDULQADER

Bu çalışma, Irak'taki hastalardan L-asparaginaz ekspresyonu yoluyla bakteriyel enfeksiyonları ve tedavilerini araştırmaktadır. *Psychrobacter cryohalolentis*'ten L-asparajinazı kodlayan ansB geni, *H. pylori* ve *E. coli*'deki immünojeniteyi azaltmak için mutasyona uğratılmıştır. Mutasyonların başarılı bir şekilde yerleştirildiği DNA dizilimi ile doğrulanmıştır. Bununla birlikte, sadece doğal protein enzimatik ve sitotoksik aktiviteyi korumuş, pH 8,5 ve 60°C'de optimal aktivite göstermiştir. Tümör hücre hatlarında hücre büyümesini %80-95 oranında etkili bir şekilde inhibe etmiştir. Dairesel Dikroizm analizi, hem doğal hem de varyant proteinlerin bir α -sarmal yapısını koruduğunu ortaya koyarak yapısal kararlılığa işaret etmiştir. Moleküler Dinamik simülasyonları, G113D mutasyonunun substrat-katalitik bölge etkileşimlerini bozduğunu ve varyantlarda katalitik aktivite kaybına yol açtığını göstermiştir. Gelecekteki çalışmalar, enzimatik aktiviteyi geri kazanmak için G113D mutasyonunun kaldırılmasını ve varyantların, özellikle de terapötik etkinliği korunurken azaltılmış immünojenite sunabilecek dörtlü mutantın immünojenik potansiyelinin değerlendirilmesini içermelidir. Bu çalışma, bakteriyel enfeksiyonlarda L-asparajinaz tedavi etkinliğini artırmaya ve immünojeniteyi azaltmaya yönelik potansiyel stratejilere ışık tutmaktadır.

2024, 80 sayfa

ANAHTAR KELİMELE: Bakteri, Enfeksiyon, L-asparaginaz, Moleküler dinamik, Tedavi

ABSTRACT

Master of Science Thesis

STUDY BACTERIA INFECTION AND TREATMENT EXPRESSION OF L-ASPAEAGINASE FROM PATIENTS OF IRAQ

Husam Aldeen Khudhair NSAIF

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru ÖZDENİZ
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Abeer Talib ABDULQADER

This study investigates bacterial infection and treatment by expressing L-asparaginase from patients in Iraq. The *ansB* gene encoding L-asparaginase from *Psychrobacter cryohalolentis* was mutated to reduce immunogenicity in *H. pylori* and *E. coli*. Successful insertion of mutations was confirmed by DNA sequencing. However, only the native protein retained enzymatic and cytotoxic activity, exhibiting optimal activity at pH 8.5 and 60°C. It effectively inhibited cell growth in tumor cell lines by 80-95%. Circular Dichroism analysis revealed that both native and variant proteins maintained an α -helix structure, suggesting structural stability. Molecular Dynamics simulations demonstrated that the G113D mutation disrupted substrate-catalytic site interactions, leading to loss of catalytic activity in variants. Future work involves removing the G113D mutation to restore enzymatic activity and assessing the immunogenic potential of the variants, particularly the quadruple mutant, which may offer reduced immunogenicity while retaining therapeutic efficacy. This study sheds light on potential strategies for enhancing L-asparaginase treatment efficacy and reducing immunogenicity in bacterial infections.

2024, 80 pages

Keywords: Bacteria, Infection, L-asparaginase, Molecular dynamics, Treatment

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ'e sabrı, rehberliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Husam Aldeen Khudhair NSAIF

Çankırı, Şubat 2024



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 L-Asparaginaz	1
1.2 L-Asparaginazın Karakterizasyonu	2
1.3 Bakteriyel L-Asparaginaz	3
1.4 Bitkisel L-Asparaginaz	4
1.5 L-Asparaginaz Enzimi Ölçüm Teknikleri	5
1.6 <i>Helicobacter pylori</i>	6
1.7 <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu.....	7
1.8 <i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	8
1.9 Moleküler Modelleme	8
1.10 <i>H. pylori</i> ve <i>Escherichia coli</i> 'den L-Asparaginazın Biyokimyasal ve Yapısal Özellikleri.....	9
1.11 <i>Erwinia chrysanthemi</i> 'den Elde Edilen L-Asparaginazın Biyokimyasal ve Yapısal Özellikleri.....	11
1.12 PEG-Asparaginaz	11
1.13 L-Asparaginazın Mikrobiyal Üretimine İlişkin Genel Hususlar	12
1.14 Bakteriler Tarafından L-Asparaginaz Üretiminin Yönleri.....	13
1.15 <i>Escherichia coli</i>	17
1.16 L-ASP Katalitik Reaksiyonu ve Akut Lenfoid Lösemi Tedavisinde Kullanımı	18
1.17 L-ASP'lerin Antilösemik Aktivitesinin Belirleyici Faktörleri ve Ticari L-Asparaginaz Formülasyonları	20
1.18 L-ASP'nin Diğer Kullanımları.....	22

1.19L-ASP ile Tedavi Edilen Hastalarda Görülen Yan Etkiler.....	23
1.20Irak'ta L-ASP Tedariğiyle İlgili Sorunlar	24
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	25
2.1 Çalışma Tasarımı	26
2.2 Uygunluk.....	28
2.3 Gerekçe	29
2.4 Hedefler.....	30
2.4.1 Genel amaç	30
2.4.2 Özel hedefler.....	30
3. MATERYAL VE METOT	32
3.1 Genetik Materyalin Elde Edilmesi, L-Asparajinaz (L-ASP) Gen Manipülasyonu ve Bakteri Suşları	32
3.2 L-Asparajinaz Üretiminin İndüksiyonu.....	33
3.3 Primer Tasarımları.....	34
3.4 Enzim Aktivitesi	34
3.5 pH Dalgalanmasının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	35
3.6 Sıcaklık Değişiminin Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	35
3.7 Enzim Kinetiği.....	35
3.8 Agaroz ve Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE Analizi).....	36
3.9 Eksize Edilmiş Agaroz Jelden veya Çözültiden Gen Örneğinin Saflaştırılması	36
3.10Moleküler Dinamikler	36
3.10.1 Moleküler dinamik sistemler ve parametreler	36
3.10.2 Mutajenik primerler	38
3.11Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	38
3.12Kısıtlama Enzimi ile Plazmid Sindirimi	39
3.12.1 DpnI enzimi ile sindirim	39
3.12.2 <i>Bam</i> HI ve <i>Hind</i> III kısıtlama enzimleriyle sindirim	40
3.13Plazmid Vektörüne Bağlantı Ekleme	40
3.14Plazmid DNA'nın Ekstraksiyonu (Miniprep)	41
3.15Kimyasal Yöntemle Bakteriyel Yeterlilik	41
3.16Kemoterapiye Uygun Bakterilerin Dönüşümü	41
3.17Klonlama Tanısı için Dönüştürülmüş Kolonilerin PCR'si.....	42

3.18Bakteri Sisteminde Heterolog İfade	43
3.19Hücre Lizizi	43
3.20Rekombinant L-Asparaginazın Saflaştırılması.....	44
3.20.1 Hareketsizleştirilmiş metaller için afinite kromatografisi (IMAC).....	44
3.21Protein Ölçümü	45
3.22Dairesel Dikroizm	45
3.23Ökaryotik Hücrelerin Yetiştirilmesi	45
3.24Sitotoksosite Değerlendirmesi.....	45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	47
4.1 Yerli ansB Geninin bir Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	47
4.2 Bakterilerden L-Asparaginaz Mutantlarının Üretimi	48
4.3 Prokaryotik Sistemde Heterolog Ekspresyon ve Doğal ve Mutant L- Asparaginazın Saflaştırılması	49
4.4 Dairesel Dikroizm	51
4.5 Asparaginaz ve Glutamin Aktivitesi	52
4.6 pH ve Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi	54
4.7 Enzim Kinetiği.....	56
4.8 İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (IC50)	57
4.9 Moleküler Dinamik.....	58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGELER DİZİNİ

+	Artı
>	Büyüktür
<	Küçüktür
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
°C	Santigrat derece
%	Yüzde



KISALTMALAR DİZİNİ

SAT	Dışkı antijen testleri
L-ASP	L-asparaginaz
L-ASPI	L-asparajinaz I
L-Glu	L-glutamat
PEG	Polietilen glikol
UBT	Üre nefes testi



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	L-asparaginazın basitleştirilmiş etki mekanizması (Kumar and Verma 2012)	1
Şekil 1.2	L-asparaginaz etki mekanizması (Michalska and Jaskolski 2006).....	3
Şekil 1.3	<i>H. pylori</i> ve <i>Escherichia coli</i> 'den L-asparaginazın kristalize yapısı	4
Şekil 1.4	<i>Phaseolus vulgaris</i> 'te L-asparaginazın yapısı.....	5
Şekil 1.5	<i>H. pylori</i> izolatlarının polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı genotiplemesi, (Hussein <i>et al.</i> 2008).....	7
Şekil 1.6	Patojenik genetik varyasyonlar ve <i>H. pylori</i> (Hussein <i>et al.</i> 2008).....	7
Şekil 1.7	EcA-2 dördüncül yapısının gösterimi (Verma <i>et al.</i> 2007)	10
Şekil 1.8	<i>Escherichia coli</i> (Baneyx and Mujacic 2004)	17
Şekil 1.9	Lösemide L-ASP kataliz reaksiyonunun mekanizması (Hill <i>et al.</i> 1967)	18
Şekil 1.10	L-asparaginaz/L-glutaminaz kataliz reaksiyonunun mekanizması (Van Den Berg 2011)	19
Şekil 3.1	Protein amino asit dizisi	33
Şekil 4.1	Elektroforetik analiz ve sB gen amplifikasyonu.....	47
Şekil 4.2	pET-28a vektöründe ansB gen ligasyonu ile dönüştürülmüş kolonilerin elektroforetik PCR analizi	48
Şekil 4.3	PET28a vektöründe klonlanan mutasyona uğramış ve B genleri ile dönüştürülmüş kolonilerin elektroforez PCR analizi	49
Şekil 4.4	Bakteriyel sistemde PET-28A-His tag ile ilişkili JM103 L-ASP'nin heterolog ekspresyonuna sahip poliakrilamid jel	49
Şekil 4.5	JM103 L-ASPPET-28A- His'in dört varyantının heterolog ekspresyonunun poliakrilamid jeli.....	50
Şekil 4.6	Yerli JM103 L-ASP PET-28A-His poliakrilamid jeli ve varyantları.....	50
Şekil 4.7	JM103 L-ASP dairesel dikroizm spektrumu	51
Şekil 4.8	Mutasyona uğramış üç JM103 L-ASP varyantının dairesel dikroizm spektrumu	52
Şekil 4.9	Asparajin ve glutamin substratları için JM103 L-ASP'ye spesifik aktivitesi .	53
Şekil 4.10	JM103 L-ASP PET-28A-His enzim aktivite testi ve Nesslerizasyon ile dört varyantı. (A) Çift mutant; (B) Üçlü mutant; (C) Dörtlü mutant; (D) beşli mutant; (E) yerli JM103 L-ASP PET-28A-His ve (F) negatif kontrol...	54
Şekil 4.11	Farklı pH değerlerinde JM103 L-ASP enzimatik aktivitesi	55
Şekil 4.12	Farklı sıcaklıklarda JM103 L-ASP enzimatik aktivitesi.....	56
Şekil 4.13	JM103 L-ASP enziminin kinetik eğrisi	57
Şekil 4.14	Tümör hücrelerinde JM103 L-ASP'nin inhibitör yüzdesi	58
Şekil 4.15	JM103 L-ASP monomeri uzayda mutasyon pozisyonları	59
Şekil 4.16	Her bir JM103 L-ASP monomerinin mutasyon 1 kalıntısı ile L-Asn substratı arasındaki atomlar arası etkileşim potansiyeli	60

Şekil 4.17	Mutasyon 1 ile JM103 L-ASP'nin katalitik bölge kalıntıları arasındaki, substratın katalitik bölge kalıntılarıyla nasıl etkileşime girdiğini etkileyen atomlar arası etkileşim potansiyeli eğrisi	60
Şekil 4.18	Alt tabaka L-Asn geldiğinde bir JM103 L-ASP monomerindeki katalitik kalıntıların uzamsal düzeni (A) İlk doğal sistem Kurulum. (B) Çift mutant sisteminin ilk dengesi. (C) Doğal sistem L-Asn alt katman ile G113 yatırımı arası 7,5 Å'luk bölgelerdeki vurgulayan konfigürasyonu (D) L-Asn alt katman ile D113 yatırımı arası 1,8 Å'luk bölgelerdeki vurgulayan konfigürasyon	61
Şekil 4.19	Her bir JM103 L-ASP monomeri için L-Asn ile mutasyon 2 arasındaki etkileşim potansiyeli eğrisi	62
Şekil 4.20	JM103 L-ASP'nin katalitik bölgesindeki mutasyon 2'deki kalıntılar arasındaki atomlar arası etkileşim potansiyeli eğrisi	63
Şekil 4.21	L-Asn substratı ile JM103 L-ASP'nin dörtlü mutant sistemindeki her bir taşıyıcı kalıntı arasındaki etkileşim potansiyeli eğrisi	64
Şekil 4.22	JM103 L-ASP'nin dörtlü mutantı, değiştirme kalıntıları ve katalitik bölge kalıntıları arasındaki etkileşim potansiyeli eğrisi	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

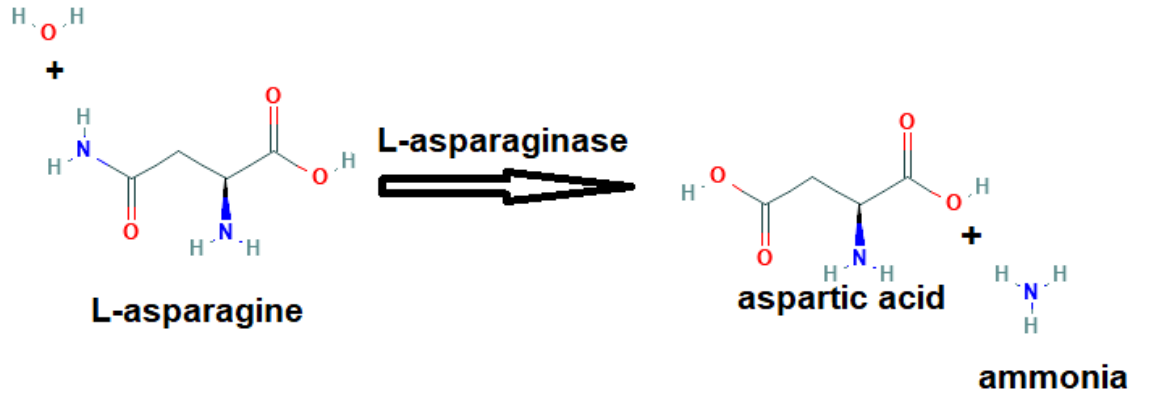
Çizelge 1.1	Rekombinant olmayan L-ASP kaynak bakterileri, ilişkili asparajinaz aktivite değerleri, K_m , K_{cat} , optimum reaksiyon pH'ı ve sıcaklığı.....	15
Çizelge 4.1	İki tümör hücre hattında L-asparaginazın inhibisyon profili	57



1. GİRİŞ

1.1 L-Asparaginaz

Şekil 1.1'de gösterildiği gibi, L-Asparagin aminohidrolaz (EC 3.5.1.1) olarak da bilinen L-asparaginaz (L-ASP) enzimi, L-Asn'yi aspartik asit ve amonyağa hidrolize edebilmektedir (Kumar and Verma 2012). Bu yöntem, tümör hücresinin enerji üretme kabiliyetine doğrudan müdahale eden ve hastalığın ilerlemesini durduran amino asidin serum seviyelerini düşürür (McCoy *et al.* 1956).



Şekil 1.1 L-asparaginazın basitleştirilmiş etki mekanizması (Kumar and Verma 2012)

L-ASP ilk olarak 20. yüzyılın başlarında Lang (1904) tarafından gözlemlenmiştir, ancak tümör inhibitörü olarak kullanımı ancak 1950'lerde, Hint domuz serumu lenfokarsinom ve meme karsinomuna enjekte edildiğinde, her ikisi de boyutta kademeli gerileme gösterdiğinde rapor edilmiştir. 1960'ların ortalarında, bakteriyel ve kültür ortamında varlığı doğrulanmıştır. Günümüzde ALL, Hodgkin Lenfoma ve diğer malign neoplazmlar için kemoterapi protokollerinde benimsenen ana L-ASP formülasyonları gram-negatif bakteriler *H. pylori* ve *Escherichia coli* ve *Erwinia chrysanthemi*'den kaynaklanmaktadır.

Genel olarak, mikrobiyal L-ASP'ler iki izoform halinde bulunur: L-asparajinaz I (L-ASPI), L-asparajin substratı için K_m $3,5 \times 10^{-3}$ M olan sitoplazmik enzim ve L-asparajinaz (L-ASP), K_m 'si $1,2 \times 10^{-5}$ M olan hücre dışı enzim (Ho *et al.* 1970). Daha düşük bir K_m

sunarak, L-ASP substrat için daha fazla afiniteye sahiptir, bu nedenle bu izoform kemoterapi protokollerinde genellikle vinkristin (Oncovin®) ve glukokortikoid ile kombine edilen koadjuvan biyofarmasötik olarak kabul edilir (Salzer *et al.* 2014).

1.2 L-Asparajinazın Karakterizasyonu

L-asparajinaz, yan zincirlerinde amid grubu bulunan amino asitleri hidrolize eden bir enzimdir. Bakterilerde, L-asparajinazın ana işlevi, azot kaynağı olarak asparajin ve glutaminin parçalanması yoluyla amonyak eksikliği olan bir ortamda hücre büyümesini sürdürmektir (Sanches *et al.* 2007).

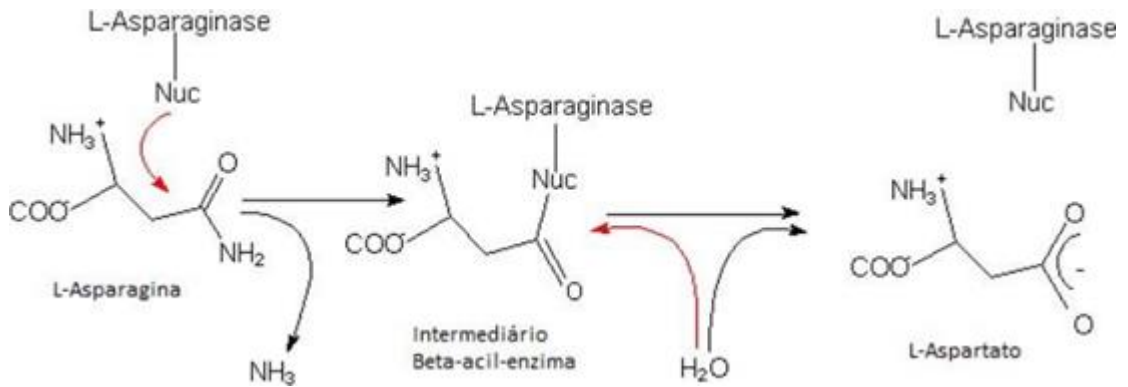
L-asparajinaz iki gruba ayrılır: asparajini yüksek özgüllükle hidrolize eden asparajinazlar ve asparajin ve glutamini aynı verimlilikle hidrolize eden, dolayısıyla daha az özgül olan asparajinaz-glutaminazlar. Asparajin hidrolizi aspartik asit ve amonyak ile sonuçlanırken, glutamin hidrolizi glutamik asit ve amonyak ile sonuçlanır (Sanches *et al.* 2007).

Escherichia coli (EcA) ve *H. pylori*'den elde edilen L-asparajinaz ALL'nin tıbbi tedavisinde yaygın olarak kullanılırken, glutaminaz aktivitesinin yan etkilere neden olduğu bulunmuştur, bu nedenle dozajının kontrol edilmesi hastanın sağlığının korunması için gereklidir. Erva *et al.* (2016)'a göre bu yan etkiler arasında pankreatit (mide ağrısı), nörolojik nöbetler, alerjenlere karşı reaksiyonlar (solunum güçlüğü, döküntü, ateş, ağrı, kızarıklık, enjeksiyon bölgesinde şişme), karaciğer sorunu semptomları (koyu renkli idrar, bulantı, iştah kaybı) ve anti-L-asparajinaz antikorlarının üretiminin indüklenmesi yer almaktadır.

L-asparajinazın glutaminaz etkisinin neden olduğu bu sonuçların farkında olarak, bu aktivitenin gerçek etkileri hakkında belirsiz bir soru vardır. Bugüne kadar, ilacın terapötik etkisinin glutaminaz etkisindeki azalmaya bağlı olarak ne kadar iyileştiği veya bu enzim aktivitesinin istenen etkilerin var olması için gerekli olup olmadığı bilinmemektedir (Kafkewitz and Bendich 1983). Bir hipotez, ilacın terapötik potansiyelinin glutaminaz aktivitesindeki artışla arttığını ve zaman zaman, aslında kanser hücrelerine karşı

mücadele için kesinlikle gerekli olduğunu öne sürmektedir. Glutaminaz aktivitesindeki azalma, toksisitede antikanser aktivitesinden daha büyük bir artıştan sorumlu olduğundan, terapötik indekste bir azalmaya katkıda bulunur. Öte yandan, glutaminaz aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak L-asparajinazın terapötik indeksinin arttığına dair kanıtlar vardır (Warrell *et al.* 1982).

L-asparajinazın etki mekanizması (Şekil 1.2) tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak hidrolizin iki adımda gerçekleştiği ve bir ara bileşik olarak beta-açıl-enzim oluşturduğu bilinmektedir. İlk adımda, nükleofilik treonin karbonil radikaline saldırarak ara bileşiği oluşturur ve bir amonyak molekülü açığa çıkarır. Ardından, bir su molekülü ara bileşiğe saldırarak aspartik asit oluşturur (Michalska and Jaskolski 2006).



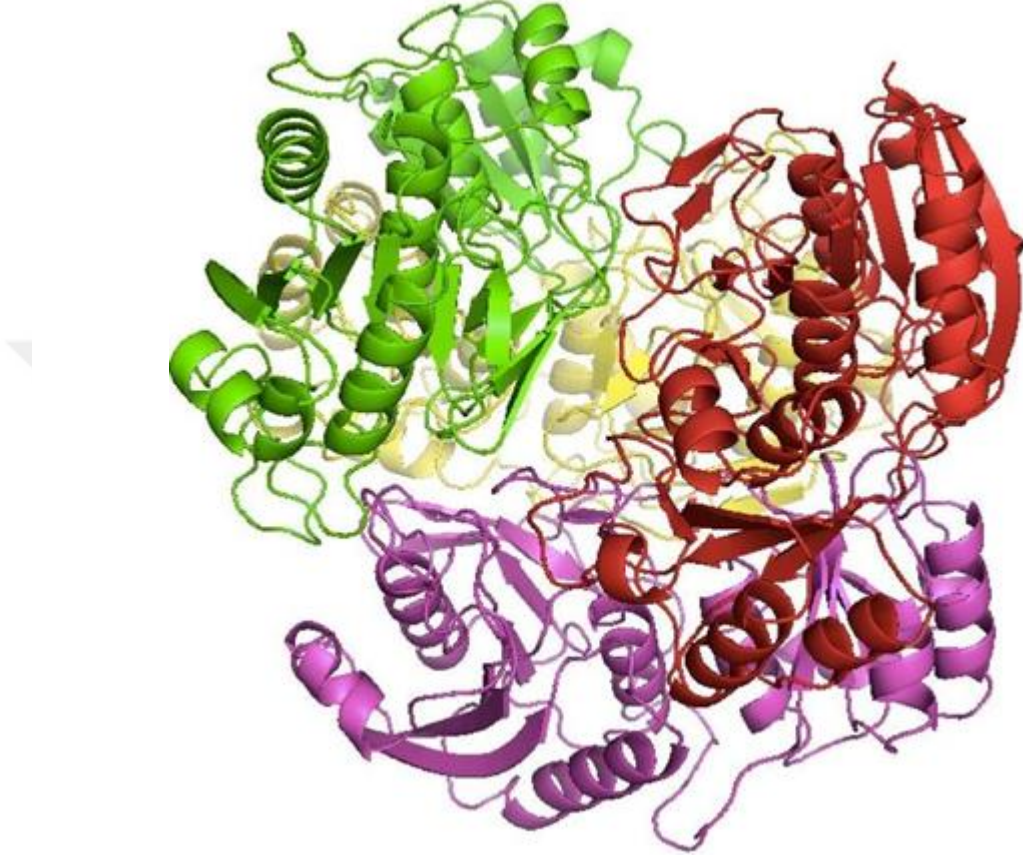
Şekil 1.2 L-asparaginaz etki mekanizması (Michalska and Jaskolski 2006)

1.3 Bakteriyel L-Asparaginaz

Bakteriyel asparajinazlar, tüm monomerlerde aktif bir bölgeye sahip olmalarına rağmen, sadece tetramer halindeyken enzim aktivitesine sahip olmaları ile karakterize edilirler (Swain *et al.* 1993).

En yaygın olarak çalışılan ve karakterize edilen L-asparajinazlardan biri *H. pylori* ve *Escherichia coli*'den elde edilen L-asparajinazdır (Şekil 1.3). Bu bakteri, maya (Broome 1965) ve *Bacillus coagulans*'da (Mashburn and Wriston 1964) bulunan enzimlerin aksine, anti-lenfoma aktivitesine sahip bir L-asparajinaza sahiptir. İki tip L-asparajinaz, EC-1 ve

EC-2. Her ikisi de aspartik asit ve amonyak üreten asparajin katalitik aktivitesine sahip olmasına rağmen, EC-1'in belirgin bir antitümör etkisi yoktur, EC-2 ise karakteristik bir antitümör aktiviteye sahiptir.



Şekil 1.3 *H. pylori* ve *Escherichia coli*'den L-asparaginazın kristalize yapısı

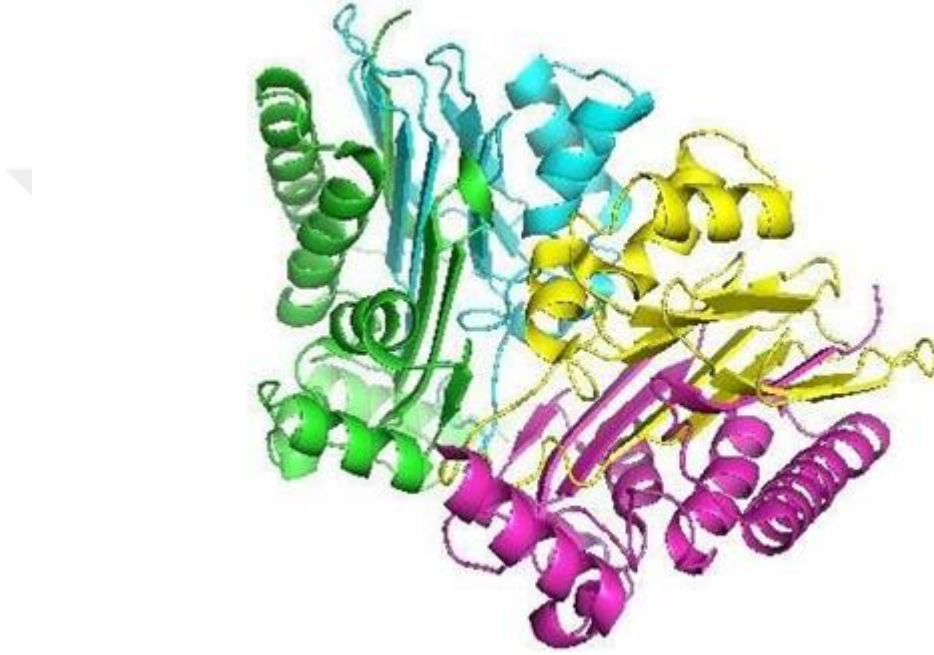
1.4 Bitkisel L-Asparaginaz

Bakteriyel asparajinazlar, bitkisel asparajinazlara göre asparajin ile daha büyük bir özgülüğe sahip olsa da bitki asparajinazları, bir asparajinaz aktivitesine sahip olmanın yanı sıra, bir izoaspartil peptidaz aktivitesine de sahiptir (Bejger *et al.* 2014).

Bitki asparajinazları potasyum iyonuna bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu bağımlılık, asparajin ligandı için enzimin K_m değeri ile doğrudan ilişkilidir ve bağımlı olanlar, K^+ iyonunun yokluğunda varlığından çok daha yüksek bir K_m değerine sahiptir.

K⁺ atomları, enzim yapısının döngülerini stabilize etmede önemli bir rol oynar ve kataliz verimliliğini artırır (Bejger *et al.* 2014).

Yapı olarak, Bejger *et al.* (2014)'e göre, bir homotetramer tarafından oluşturulan bakteriyel olanlardan farklı olarak, Şekil 1.4'te görülebileceği gibi, iki heterodimer tarafından oluşturulan tetramer ile tetramerik bir şekilde organize edilirler.



Şekil 1.4 *Phaseolus vulgaris*'te L-asparaginazın yapısı

1.5 L-Asparaginaz Enzimi Ölçüm Teknikleri

L-asparaginaz enzimi çeşitli yöntemler kullanılarak ölçülebilir. Verma *et al.* (2007) kromatografi kullanarak amino asitleri analiz etmek için yöntemler, ninhidrin ile kolorimetrik işlemler ve 7-amino-4-metilkumarin oluşumunu ölçmek için florometrik yaklaşımlar oluşturmuştur. Bununla birlikte, Nessler yöntemi, L-asparaginaz enziminin doğrudan ölçümü için kabul edilen teknik olmaya devam etmektedir. Nessler reaktifi, bu yaklaşımda asparajinoliz reaksiyonu sırasında üretilen amonyumu ölçmek için kullanılır. Bir spektrofotometre, amonyumun potasyum tetraiodomercurate ile kimyasal reaksiyonu sonucu oluşan turuncu rengi 436 nm'de ölçebilir (Wriston and Yellin 1973).

Hidroksilamin yaklaşımı, L-asparajinaz aktivitesini ölçmek için bir başka faydalı metodolojidir. Mekanizma, hidroksilamin hidroklorür ile etkileşim üzerine L-asparajinaz tarafından L-asparajinin β -hidroksil aspartik aside (AHA) dönüştürülmesini içerir. Daha sonra, AHA ve FeCl_3 'ün reaksiyonu ile spektrofotometrede 500 nm'de ölçülebilen kırmızımsı bir renk oluşur. Araştırmacılar, Nessler yaklaşımını pratik olmaktan çıkardığında, bazı bilim insanları asparaginolitik etkiyi belirlemek için bu çalışma yöntemini kullanmışlardır (Sanches *et al.* 2003).

1.6 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori, enfeksiyonunun kalp dışı mide kanserine ek olarak peptik ülser, atrofik gastrit, kronik aktif gastrit, mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfoması dahil olmak üzere birçok gastroduodenal hastalıkla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bir insan patojenidir (Reshetnyak *et al.* 2021). *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı gelişmiş ülkelerde %30-%50, gelişmekte olan ülkelerde ise %70-%90'dır (Cano-Contreras *et al.* 2018). Irak'ta yapılan birkaç çalışmaya göre, bu bakterinin prevalansına ilişkin kesin istatistikler ve bilgiler henüz mevcut değildir. Irak'taki çalışmalar, *H. pylori* için %11,3 ile %71,3 arasında bir prevalans göstermiştir (Majeed and Khoshnaw 2020).

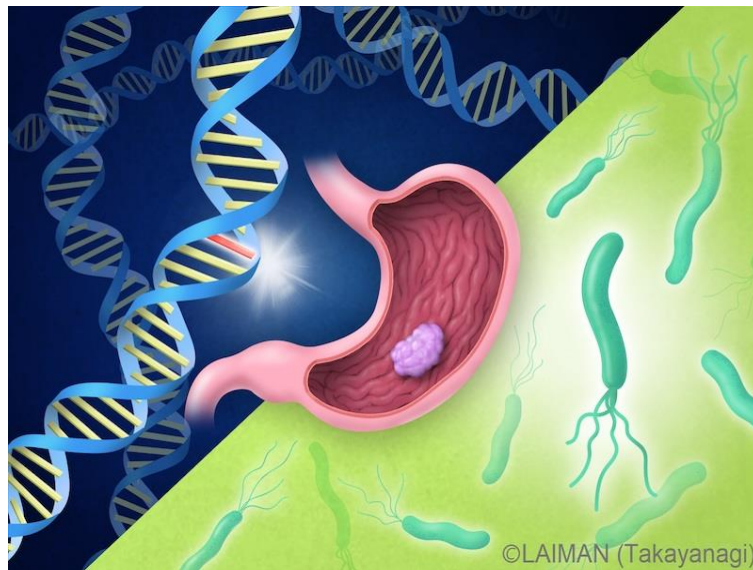
H. pylori enfeksiyonunu teşhis etmek için invaziv ve non-invaziv olarak ikiye ayrılan birçok teknik kullanılmaktadır. İnvaziv teknikler arasında hızlı üreaz testi (RUT), mikrobiyolojik kültür ve biyopsi bazlı polimeraz zincir reaksiyonu yer almaktadır (Sabbagh *et al.* 2019). İnvaziv olmayan teknikler arasında dışkı antijen testleri (SAT), üre nefes testi (UBT) ve serolojik incelemelerin yer aldığı iyi belgelenmiştir (Stefano *et al.* 2018). Gerekli teknik stratejinin seçimini etkileyen faktörler arasında duyarlılık, özgüllük, klinik durum ve maliyete dayalı konular yer almaktadır. Bu nedenle, klinik koşullara ve hasta geçmişine bağlı olarak her testin kendi sınırlamaları, avantajları ve dezavantajları vardır (Atkinson and Braden 2016). Bazı durumlarda non-invaziv yöntemler tercih edilmektedir.

1.7 *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu

Helicobacter pylori enfeksiyonu peptik ülserasyona ve gastrik adenokarsinoma neden olur. Irak'ta, *H. pylori* enfeksiyonunun erken dönemde edinilmesine rağmen (Hussein *et al.* 2008) mide kanseri olağandışı derecede nadirdir (Şekil 1.5). Bu nedenle, çalışmamızda Iraklıların midelerindeki enflamasyonun derecesini ve dağılımını ve *H. pylori* virülans faktörleri (*vacA*, *cagA* ve *dupA*) ile histopatolojik değişiklikler arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçlıyoruz (Şekil 1.6).



Şekil 1.5 *H. pylori* izolatlarının polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı genotiplemesi, (Hussein *et al.* 2008)



Şekil 1.6 Patojenik genetik varyasyonlar ve *H. pylori* (Hussein *et al.* 2008)

Histopatolojik verilerin karşılaştırılması için Mann-Whitney testi kullanılmıştır. Her bir patolojik indeksin varlığı veya yokluğu, χ^2 testi kullanılarak enfekte eden *H. pylori* suşu tarafından virülans faktörlerine sahip olma açısından değerlendirilmiştir.

1.8 *Psychrobacter cryohalolentis*

Gram-negatif bakteri *Psychrobacter cryohalolentis* K5T, morfolojik ve biyokimyasal düzeylerde karakterize edilmiş (Bakermans *et al.* 2006) ve genomu tamamen dizilenmiştir (GenBank erişim numarası CP000323). Gram-negatif organizma *Psychrobacter cryohalolentis* K5T suşu 2006 yılında keşfedilmiştir. L-ramnoz ve d-galaktoza ek olarak iki diasetamido- ve bir triasetamido-şeker içeren karmaşık bir O-antijenine sahiptir. Bu alışılmadık şekerlerin oluşumuna yol açan biyokimyasal yollar şu anda bilinmemektedir. Biz 0612, 0638 ve 0637 genlerinin sırasıyla bir 4,6-dehidrataz, bir aminotransferaz ve bir N-asetiltransferaz kodladığını ve bunların UDP-N-asetetten başlayarak diasetamido-şekerlerden biri olan 2,4-diasetamido-2,4,6-trideoksi-d-glukozun biyosentezi için gerekli olduğu düşünüldüğünde, çalışmamızda 0638 ve 0637 genleri tarafından kodlanan proteinler hakkında işlevsel ve yapısal bilgiler sunulmaktadır. Bu enzimlerin kinetik özelliklerini araştırmak için süreksiz bir HPLC deneyi kullanılmıştır. 0638'in dış aldimin formunda 1.3 çözünürlüğe kadar belirlenen X-ışını kristalografik yapısı, UDP ligandının aktif bölgede nasıl konumlandığını göstermiştir.

1.9 Moleküler Modelleme

Enzimlerin etki mekanizmalarının aydınlatılması Biyokimya, Organik Kimya ve Moleküler Biyoloji gibi farklı bilgi alanlarının entegrasyonu yoluyla yapılabilir (Carvalho *et al.* 2003). Modelleme, bu anlayışa yardımcı olan ve bileşikler için rasyonel planlama sürecinde daha fazla verimlilik sağlayan çok çeşitli hesaplama yöntemlerinin bir parçasıdır.

IUPAC'a (International Union of Pure and Applied Chemistry) göre Moleküler Modelleme tekniği, Hesaplamalı Biyokimya kullanılarak moleküler yapıların ve

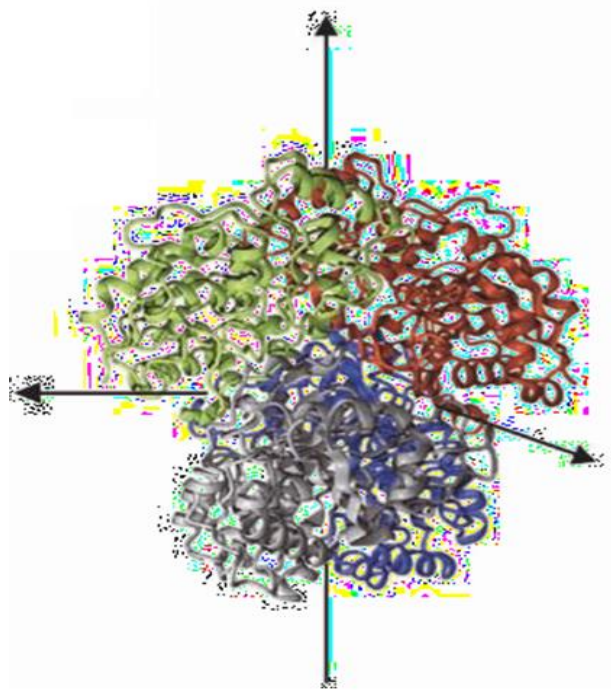
özelliklerin araştırılması olarak tanımlanabilir. Grafik görselleştirme tekniklerine ek olarak, belirli bir dizi koşul altında üç boyutlu bir yeniden üretim sağlamayı amaçlamaktadır.

Moleküler modelleme yoluyla, bir molekülün üç boyutlu yapısını tahmin etmek ve minimum enerji geometrileri elde etmek için hesaplamalar yapmak mümkündür. Proteinlerin moleküler modellemesi için çeşitli yöntemler vardır, bunlar arasında klasik kuvvet alanları kullanarak bir moleküler sistemin davranışını incelemek için zamanın bir fonksiyonu olarak bir simülasyon kullanan DM gibi klasik yöntemler öne çıkmaktadır (Young 2001); deneysel olarak elde edilenlere yakın veriler sağlayabilen kuantum yöntemleri, diğer yaklaşım modellerinin yanı sıra Born-Oppenheimer yaklaşımını kullanır; İlk yöntemler protein veya peptit yapı tahmini, bir proteinin üçüncül yapısının birincil amino asit dizisinden tahmin edildiği, yapılan hesaplamaların çözünürlüğe yardımcı olmak için deneysel verileri kullanmadığı algoritmik bir süreci ifade eder (Young 2001), örneğin I-TASSER.

1.10 *H. pylori* ve *Escherichia coli*'den L-Asparajinazın Biyokimyasal ve Yapısal Özellikleri

Bu enzimi üreten rekombinant *H. pylori* ve *Escherichia coli* hiper suşlarından biyoteknolojik olarak elde edilen L-asparajinaz, dünya çapında akut lenfoblastik lösemi ve lenfosarkomların tedavisinde kullanılan standart biyofarmasötiktir. *H. pylori* ve *Escherichia coli*'den elde edilen L-asparajinazın görünür KM'si 10 µM ve yarılanma ömrü 1,24±0,17 gündür. Bununla birlikte, çeşitli formülasyonlar arasında, özellikle enzimin yarı ömrü açısından büyük bir fark vardır. *H. pylori* ve *Escherichia coli* bakterileri EcA-1 ve EcA-2 olarak adlandırılan iki farklı L-asparajinaz üretir. Çalışmalar, L-asparajinaz EcA-2'nin periplazmik alanda bulunduğunu ve sadece bunun antitümör aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. EcA-2'nin KM'sinin 10 µM civarında olduğu, substrat için yüksek bir afiniteye sahip olduğu ve molar kütlelerinin 141 kDa civarında olduğu tahmin edilmektedir. Yapısal olarak EcA-2, birbirine sıkı sıkıya bağlı iki dimerden oluşan bir tetramerdir. Monomerlerin her biri 326 kurucu amino asit bakımından aynıdır. Her bir monomer, enzim-substratı L-asparajin molekülüne bağlayan aktif bir enzim bölgesine

sahiptir. Aktif bölge yalnızca iki treonin kalıntısı aracılığıyla gerçekleşen monomerlerin yakın etkileşimi ile oluşur; bu kalıntılardan biri amid bağının karbon atomuna saldıran nükleofildir. EcA-2'nin bir başka özelliği de aktif bölgesinin sadece substratla temas halindeyken "monte" edilmesidir, çünkü çekirdek elemanları oldukça esnek bir döngünün parçasıdır. Şekil 1.7, yeşil-kırmızı ve gri-mavi çiftlerin yakın dimerleri temsil ettiği EcA-2'nin kuaterner yapısını göstermektedir.



Şekil 1.7 EcA-2 dördüncül yapısının gösterimi (Verma *et al.* 2007)

Periplazmik EcA-2 enziminin aksine EcA-1, daha düşük substrat afinitesine sahip olan ve tümör büyümesinin engellenmesinde etkisiz olan sitozolik bir enzimdir (Verma *et al.* 2007). Enzimler aynı reaksiyonu katalize etmelerine rağmen, amonyum sülfattaki çözünürlükleri ve termal inaktivasyona duyarlılıkları ile ayırt edilebilirler. EcA-1'in kurucu olduğuna ve EcA-2'nin nitrojen yoksunluğu tepkisi altında salgılandığına inanılmaktadır (Verma *et al.* 2007).

1.11 *Erwinia chrysanthemi*'den Elde Edilen L-Asparajinazın Biyokimyasal ve Yapısal Özellikleri

Erwinia chrysanthemi bakterisinin *Erwinia carotovora*, *Pectobacterium chrysanthemi* gibi çeşitli eşanlamlıları vardır ve son zamanlarda adı *Dickeya dadantii* olarak değiştirilmiştir. *Enterobacteriaceae* familyasına ait gram-negatif basiller bir bakteridir ve çeşitli bitkilerde fitopatojen olarak görev yapar. *Erwinia chrysanthemi*'den elde edilen L-asparajinaz (ErA), diğer bakteriyel periplazmik L-asparajinazlar gibi, her bir monomerinde 330 amino asit bulunan ve moleküler kütlesi 140 ile 150 kDa arasında olan bir tetramerdir. ErA ve EcA'nın yapısal benzerliğine rağmen, her ikisi de substratları için farklı afinitelere sahiptir; ErA'nın glutaminolitik aktivitesi EcA'nın glutaminolitik aktivitesinden çok daha fazladır. ErA, EcA'ya alerjisi olan hastaları tedavi etmek için kullanılır. KM değeri 12 μ M ve yarılanma ömrü $0,65 \pm 0,13$ gündür. Yarılanma ömrünün düşük olması nedeniyle hastalara daha sık uygulanması gerekmektedir. Bununla birlikte, literatürde ErA'nın daha az etkili olduğu ve serum L-asparajinde EcA'ya göre daha düşük bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Endike olduğunda, ErA ile tedavi standart tedavi için önerilen dozun en az iki katı olmalıdır. Bir başka sorun da EcA alerjisi olan hastaların en az üçte birinin çapraz immünojenisite nedeniyle ErA'ya da alerjisi olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca ErA'nın EcA'ya göre daha az yan etkiye neden olduğuna inanılmaktadır.

1.12 PEG-Asparajinaz

Günümüzde, polipeptit ve protein yapısına sahip ilaçların geliştirilmesine büyük ilgi duyulmaktadır. Rekombinant DNA teknikleri sayesinde büyük ölçekte peptit ilaçlar üretmek mümkündür. Tıbbın çeşitli alanlarındaki önemli uygulamalarına rağmen, bu ilaçların kullanımında birçok dezavantaj da vardır: vücut enzimleri tarafından proteolize yatkınlık, yarı ömürlerini azaltma; düşük çözünürlük, düşük raf ömrü; hızlı karaciğer klirensi, ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarına ve/veya ilaç inaktivasyonuna neden olabilecek antikör üretme eğilimi. Bu sorunların üstesinden gelmek için üzerinde çalışılan çeşitli yollar arasında en umut verici olanı polietilen glikol (PEG) zincirlerinin polipeptitlere

esterleştirilmesidir. PEG ile konjugasyonun avantajları arasında peptitlerin yarı ömrünün artması ve immünojenikliğin azalması yer almaktadır (Harrison 2015).

PEG, aşırı duyarlılık reaksiyonlarını azaltmak ve uygulamadan sonra enzimin yarı ömrünü artırmak için bir esterleşme reaksiyonu yoluyla *H. pylori* ve *Escherichia coli*'den L-asparaginaza konjuge edilmiştir. Avantajlarından biri, ilacın *H. pylori* ve *Escherichia coli*'den elde edilen L-asparajinaza karşı aşırı duyarlılığı olan hastalara uygulanabilmesidir, bu da onu yeniden indüksiyon tedavileri için yararlı bir ilaç haline getirir. Ticari olarak mevcut PEG-asparajinaz Oncaspar®'dir. Avrupa'da PEG-asparajinaz yalnızca hastanın doğal *H. pylori* ve *Escherichia coli* L-asparajinaza aşırı duyarlı olduğu durumlarda kullanılmaktadır, ancak ABD'de tedavi protokolleri PEG-asparajinazın ilk seçenek olarak kullanılmasına izin vermektedir. PEG-asparajinazın yarı ömrü $5,73 \pm 3,24$ gündür ve doğal *H. pylori* ve *Escherichia coli* L-asparajinazın yarı ömründen neredeyse 5 kat daha uzundur. Dolayısıyla, haftada 2 ile 3 kez uygulanması gereken *H. pylori* ve *Escherichia coli* L-asparajinazın aksine, PEG-asparajinazın yalnızca iki haftada bir uygulanması gerekmektedir. Yarılanma ömrü EcA ve ErA'dan daha uzun olmasına rağmen, L-asparajin için KM'si EcA ve ErA için bulunan $12 \mu\text{M}$ 'ye benzer şekilde $10 \mu\text{M}$ civarındadır.

1.13 L-Asparajinazın Mikrobiyal Üretimine İlişkin Genel Hususlar

Daha sonra bu büyük tümör inhibisyon kapasitesinin üç temel nedeni olduğu hipotezini ortaya atmıştır: 1) *H. pylori* ve *Escherichia coli*'den elde edilen L-asparajinaz, muhtemelen karaciğer hücreleri tarafından sekestrasyon nedeniyle dolaşımdan çıkarıldıktan sonra bile olağanüstü aktif kalmaktadır. 2) Enzimin L-asparajine olan yüksek afinitesi, küçük bir Michaelis-Menten (KM) sabitine dönüşerek, enzimin kanda fizyolojik olarak bulunan az miktarda L-asparajin altında bile aktivite seviyesini korumaya devam etmesini sağlar ve 3) Kobaylara lenfoma kanser hücreleri implante edildiğinde, enzimin yarı ömrü artar. O zamandan bu yana, *H. pylori* ve *Escherichia coli* tarafından üretilenden daha yüksek antikanser aktivitesine sahip, ticari olarak uygulanabilir bir L-asparajinaz formu üretmek amacıyla bir dizi mikrop araştırılmıştır. İlaç olarak kullanılması amaçlanan yeni L-asparajinazların az sayıda yan etkiyle

farmakolojik etki göstermesi gerektiği düşünülmektedir. Bu nedenle, mükemmel stabilite, düşük immünojenite, birkaç doz ihtiyacını önleyecek kadar uzun bir yarı ömür süresi ve substrat için yüksek bir afinite sergilemeleri beklenmektedir. Ayrıca, enzim tedavisinin çok fazla olumsuz sonuç doğurmasını önlemek için, çapraz glutaminolitik aktivitenin minimum düzeyde olması gerektiği öne sürülmüştür.

1.14 Bakteriler Tarafından L-Asparajinaz Üretiminin Yönleri

Enterobakteriler *H. pylori* ve *Escherichia coli* ve *Erwinia chrysanthemi* tarafından üretilen enzimler, şu anda L-asparajinaz ile antileukemik tedavilerde kullanılan tek enzimlerdir. L-asparajinaz üreten mikroorganizmalar üzerine yapılan ilk araştırmalarda *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus* bakterileri, *Tetrahymena pyriformis* ve termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'un L-asparajinaz üreticisi olduğu tespit edilmiştir (Verma *et al.* 2007). Genel olarak, farklı bakteri cinsleri tarafından üretilen enzimlerin biyokimyasal ve kinetik özelliklerinin kendi aralarında önemli farklılıklar gösterdiği bilinmektedir (Prakasham *et al.* 2007). Bugün bile, bakteriler L-asparajinaz üretimi için en çok çalışılan mikroorganizmalardır, çünkü bu amaç için uzun süredir çalışılan organizmalardır. Son yıllarda L-asparajinazın bakteriyel üretimi alanındaki başlıca gelişmeler ve çalışmalarda varılan bazı sonuçlar aşağıda listelenmiştir.

Bakteriler tarafından L-asparajinaz üretimini etkileyen ana yetiştirme koşullarının hangileri olduğu ve bunun hangi mekanizmalarla gerçekleştiği bugün hala speküle edilmektedir. Ortama %0,5 glukoz eklendiğinde *H. pylori* ve *Escherichia coli* tarafından L-asparajinaz sentezinin baskılandığı bildirilmiştir. Bu durumda, glukozun laktatın taşınmasında rol oynayan bileşenlerin katabolik olarak baskılanmasına neden olduğu ve laktatın L-asparajinaz sentezini uyaran bir faktör olduğu sonucuna varılmıştır (Verma *et al.* 2007). Geckil *et al.* (2004), genel olarak fermentatif bakterilerin, kültür pH'ını düşüren asitlerin oluşumu ve esas olarak hücre içi cAMP seviyelerini azaltarak katabolik baskılama nedeniyle yüksek glikoz konsantrasyonları ile L-asparajinaz sentezinin baskılandığını öne sürmüştür. L-asparajinazın *H. pylori* ve *Escherichia coli*'de fumarat ve nitratın indirgeyici proteininin indüksiyonu ve cAMP reseptör proteini tarafından

yukarı regülasyonu nedeniyle anaerobik olarak sentezlendiğine inanılmaktadır. Verma *et al.* (2007) organik asitlerin ve L-lösin ve L-metiyonin amino asitlerinin *H. pylori* ve *Escherichia coli* tarafından L-asparajinaz sentezini arttırdığını belirtmiştir. *Staphylococcus aureus* tarafından L-asparajinaz üretiminin düzenlenme mekanizması Rozalska and Mikucki (1992) tarafından incelenmiş ve sükroz, maltoz, galaktoz, laktoz, mannitol ve mannoz gibi karbon kaynaklarının L-asparajinaz üretimini engellediği görülmüştür. Öte yandan, ortam eksojen cAMP ile desteklendiğinde üretimi uyarılmıştır.

Vitreoscilla sp. (VHb) eksprese edebilen rekombinant bir *Enterobacter aerogenes* suşu, vahşi tip suşa kıyasla 10 kat daha az L-asparajinaz üretimi göstermiştir. Bu çalışmada, %1'in üzerindeki glukoz konsantrasyonu enzim üretiminin neredeyse tamamen engellenmesine neden olmuştur (Geckil *et al.* 2004). *E. aerogenes*'in aksine, VHb eksprese eden rekombinant *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi vahşi tip suştan daha fazla L-asparajinaz üretebilmiş ve glukoz bir inhibitörden ziyade üretimin bir indükleyicisi haline gelmiştir. Araştırmacılar, muhtemelen aerobik metabolizmaya sahip bakterilerin L-asparajinaz sentezinde *E. coli* ve *E. aerogenes* ve *H. pylori* gibi anaerobik metabolizmaya sahip bakterilerle aynı katabolik baskılanmaya maruz kalmadığı sonucuna varmıştır.

Kültür ortamının %6 n-dodekan ile takviyesi, *E. coli* tarafından L-asparajinaz üretimi için fermentasyon süreci boyunca çözünmüş O₂ konsantrasyonunu %80'in üzerinde tutabilmiştir. Böylece, hücre konsantrasyonunda %12,7'lik bir artış ve L-asparajinaz üretiminde %21'lik bir artış elde edilerek 60,8 U.mL⁻¹ değerine ulaşılmıştır (Wei and Liu 1998). Nawaz *et al.* (1994) L-asparajinaz sentezleyebilen bakterileri izole etmek için tek azot kaynağı olarak L-asparajin içeren besiyeri kullanmışlardır. Bu çalışmada, *Enterobacter cloacae* türü olarak tanımlanan izolatlardan biri, %0,4 fruktoz içeren ve tek azot kaynağı olarak L-asparajin ile desteklenen bir kültür ortamında 35 U.mg⁻¹ L-asparajinaz üretebilmiştir. Ayrıca *E. cloacae*'nin L-asparajini indükleyici olarak kullanmadan L-asparajinaz üretme kabiliyetini de vurgulamışlardır.

Erwinia sp. cinsine ait bir bakteri Hindistan'da izole edilmiş ve L-asparajinaz üretim kapasitesi açısından test edilmiştir. Çalışmalar sonucunda optimum aktivite pH'ı 8-9

arasında, K_m 'si 0,22 mM ve optimum aktivite sıcaklığı 40°C olan bir enzim elde edilmiştir. L-asparajinaz üretimi, tek karbon kaynağı olarak mannitol ve indükleyici olarak L-asparajin, L-glutamin, L-arginin ve L-alanin amino asitleri kullanılarak daha yüksek olmuştur.

Başka bir çalışmada, Prakasham *et al.* (2007) bir *Staphylococcus* sp. suşu tarafından L-asparajinaz üretiminde 9 kat artış elde etmek için Taguchi'nin deneysel tasarımını kullanmıştır. İnkübasyon sıcaklığı, inokulum konsantrasyonu, başlangıç pH'ı, glukoz ve amonyum klorür konsantrasyonu L-asparajinaz üretimini etkileyen ana faktörler olarak belirlenmiştir. Bakteriler tarafından batık fermantasyon altında periplazmik L-asparajinaz üretiminin seçimi ve optimizasyonu üzerine daha yakın zamanda yapılan diğer çalışmalar Çizelge 1.1'de rapor edilmiştir.

Çizelge 1.1 Rekombinant olmayan L-ASP kaynak bakterileri, ilişkili asparajinaz aktivite değerleri, K_m , K_{cat} , optimum reaksiyon pH'ı ve sıcaklığı

source organism	Activity L-ASP	K_m	pH	T(°C)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	62.7 U/mg	0.017 mM	8	60
<i>Bacillus aryabhatai</i>	680.5 U/mg	0.257 mM	8.5	40
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	168.4 U/mg	110 mM	8	37
<i>Bacillus licheniformis</i>	697.1 U/mg	0.014 mM	6 a 10	40
<i>Nocardiopsis alba</i>	158.1 U/mg	0.127 mM	8	37
<i>Streptomyces noursei</i>	0.803 U/mg	25 μ M	7.5	50
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	35.24 U/mg	657 μ M	8 a 10	40
<i>Streptomyces parvulus</i>	146 U/mg	25 μ M	7.5	50
<i>Bacillus subtilis</i>	23.8 U/mg	430 μ M	7.5	40
<i>Streptomyces ginsengisoli</i>	3.32 U/mg	25 μ M	7.5	30
<i>Streptomyces thermoluteus</i>	68.09 U/mg	1830 mM	8 a 9	63.6
<i>Photobacterium</i> sp.	20 U/mg	760 mM	7	25
<i>Pyrococcus furiosus</i>	550 U/mg	12.000 mM	9	85
<i>Bacillus licheniformis</i>	597.8 U/mg	0.420 mM	8	37

Diğer çalışmalarda, bazı yazarlar bakteriler tarafından L-asparajinaz üretimi için katı hal fermantasyon (FES) tekniğini kullanmıştır. Abdel-Fattah and Olama (2002) enzimi üretmek için *Pseudomonas aeruginosa* bakterisini ve katı substrat olarak soya fasulyesi küspesini kullanmıştır. Enzim üretimi Plackett-Burman ve Box-Behnken faktöriyel tasarımlarına göre optimize edilmiştir. Maksimum enzimatik aktivite (142,8 U), başlangıç

pH'sının 7,9 olduğu koşullarda, sırasıyla %3,11 ve %3,68 konsantrasyonlarda kazein hidrolizatı ve maizecin kullanılarak elde edilmiştir. El-Bessoumy *et al.* (2004) katı hal fermentasyonu altında *Pseudomonas aeruginosa*'dan L-asparajinaz üretip saflaştırarak 1900 U/mg spesifik aktiviteye sahip saflaştırılmış bir enzim elde etmişlerdir. Yazarlar ayrıca bu L-asparajinazın 160 kDa moleküler ağırlığa ve 0,147 mM KM'ye sahip olduğu sonucuna varmışlardır. Yakın zamanda, susam yağı üretim kalıntılarını tek substrat olarak kullanarak FES altında *Serratia marcescens* tarafından L-asparajinaz üretimi, kuru substratın gramı başına 110,8 U verim elde etmiştir (Vuddaraju *et al.* 2010). *Serratia marcescens* kullanılarak yapılan bir başka çalışmada, Hymavathi *et al.* (2009) FES altında *Bacillus circulans* tarafından L-asparajinaz üretimi için çeşitli katı substratları test etmiştir. Güvercin kabuğu, optimize edilmiş koşullar altında gram kuru substrat başına 2322 U verime ulaşarak en iyi sonuçları vermiştir.

Yaygın olarak çalışılmasına rağmen, bakteriler tarafından L-asparajinaz üretimini indükleyebilen veya inhibe edebilen faktörler hakkında hala çok fazla tutarsızlık vardır. Bu durumda, süreci yürütmenin farklı yolları ve esas olarak çalışılan bakterilerin cins ve türleri çok farklı sonuçlar vermektedir. Son olarak, moleküler biyoloji tekniklerinin bu enzimin üretkenliğini artırmak ve saflaştırılmasını kolaylaştırmak için gerekli olduğu bilinmektedir.

70'li yıllarda, *M. tuberculosis* (Mtb), BCG (*Bacillus calmette-Guérin*), *M. phlei*, *M. butyricum*, *M. bovis*, *M. lacticola* (Sharma *et al.* 1973) ve *M. smegmatis*'ten rekombinant olmayan L-ASP'ler ile çeşitli testler yapılmış ve tüm türlerde asparajinaz aktivitesi gözlenmiştir. Sıçanlarda sarkomların büyümesinin engellenmesi, *E. coli*'den elde edilen L-ASP'nin gerekli konsantrasyonuna kıyasla Mtb'den elde edilen L-ASP'nin daha düşük bir konsantrasyonu kullanılarak sağlanmışır (Reddy *et al.* 1969). Ayrıca, Mtb ve *M. phlei*'den elde edilen L-ASP'lerin yüksek asparajinaz aktivitesine sahip olduğu, ancak tespit edilemeyen glutaminaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür (Gouzy *et al.* 2014). Bahsedilen mikobakteriyel L-ASP'lerin glutaminaz aktivitesi göstermediğinin rapor edilmiş olması, AS-negatif ALL hücrelerine karşı biyofarmasötik olarak kullanılabilecekleri için bu çalışmadaki çalışmanın seçimi açısından hayati önem taşımaktadır.

1.15 *Escherichia coli*

Enterik bakteri *Escherichia coli* (Şekil 1.8), genetik manipölasyonlar ve terapötik veya ticari öneme sahip proteinlerin endüstriyel üretimi için en çok kullanılan prokaryotik organizmalardan biridir. Diğer ekspresyon sistemleriyle karşılaştırıldığında *E. coli*, kullanım kolaylığı, vektör bulunabilirliği, ucuz karbon kaynaklarında büyüme, hızlı biyokütle birikimi, kolay ölçeklendirme ve yüksek hücre yoğunluğu fermentasyonları gibi avantajlar sunar. *E. coli*'nin toplam proteinin %10-30'u düzeyinde rekombinant proteinler üretmesi yaygındır. Ayrıca, bir model sistem olarak uzun geçmişi nedeniyle, *E. coli* genetiğı tamamen karakterize edilmiştir ve klonlamayı ve gen ifadesini kolaylaştırmak için manipüle edilmiştir (Goulding and Perry 2003, Baneyx and Mujacic 2004).



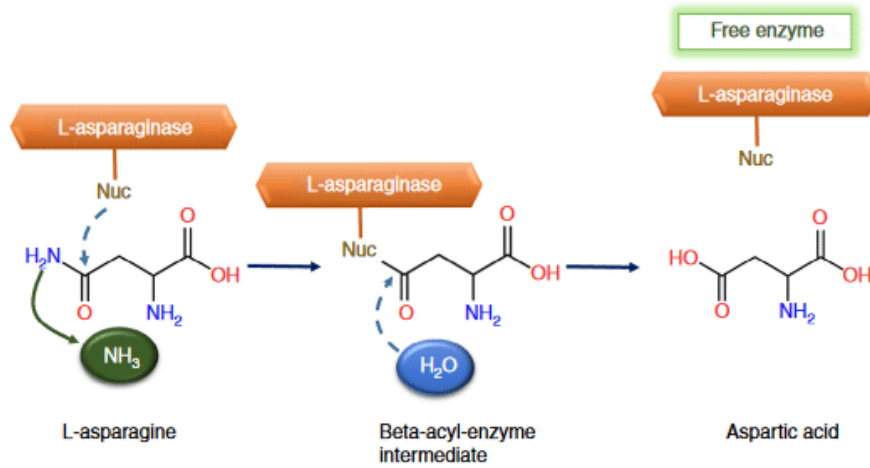
Şekil 1.8 *Escherichia coli* (Baneyx and Mujacic 2004)

Heterolog proteinler karmaşık translasyon sonrası modifikasyonlar gerektirmiyorsa ve çözünür formda ifade ediliyorsa, *E. coli* genellikle biyokimyasal ve/veya yapısal çalışmalar ve daha sonra katma değerli ürünlerin büyük ölçekli üretimi için yeterli materyal elde etmek için ilk tercihtir. Bununla birlikte, aşırı eksprese edilen rekombinant proteinlerin doğru bir konformasyon elde edememesi ve proteolitik bozunmaya uğraması veya inklüzyon cisimcikleri olarak bilinen doğal olmayan proteinlerin çözünmeyen

agregatlarını oluşturmak üzere birbirleriyle birleşmeleri yaygındır (Baneyx and Mujacic 2004).

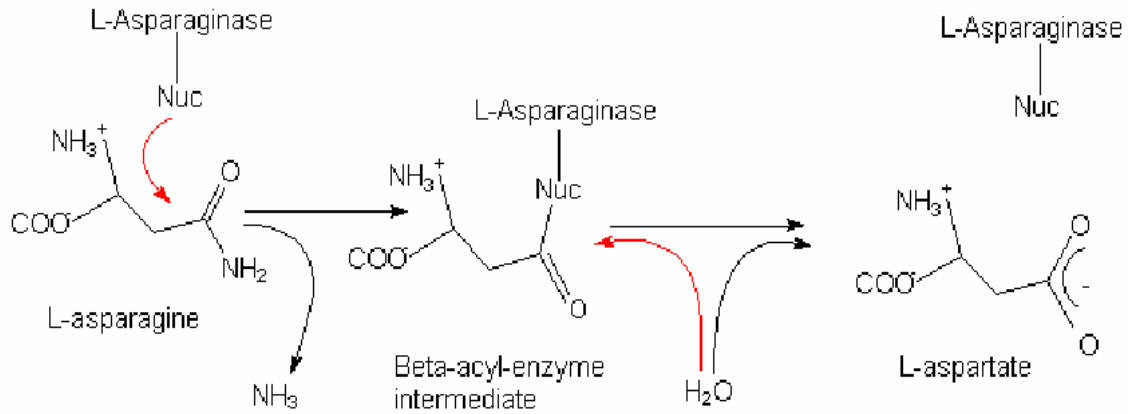
1.16 L-ASP Katalitik Reaksiyonu ve Akut Lenfoid Lösemi Tedavisinde Kullanımı

L-ASP'nin enzimatik reaksiyonu, bir ara bileşiğin oluşmasıyla birlikte iki aşamada meydana gelen hidroliz yoluyla gerçekleşir. İlk adımda, L-ASP'nin nükleofilik bir kalıntısı güçlü bir baz tarafından aktive edilir ve L-Asn'nin (substratlardan biri) amid karbon atomuna saldırarak bir ara ürün üretir: beta-asil enzimi. İkinci adım, bir su molekülü aracılığıyla nükleofilik aktivasyonla gerçekleştirilen ester karbona saldırıdır (Hill *et al.* 1967, El-Bessoumy *et al.* 2004, Verma *et al.* 2007, Shrivastava *et al.* 2016) (Şekil 1.9).



Şekil 1.9 Lösemide L-ASP kataliz reaksiyonunun mekanizması (Hill *et al.* 1967)

Birçok L-ASP aynı zamanda şu yeteneğe de sahiptir: L-Glutamin (L-Gln) üzerinde etkili olan ve L-Glutamat (L-Glu) ve amonyak (NH₃) oluşturan başka bir rekabetçi reaksiyonu katalize eder; L-Gln, L-Asn'nin hidrolizinin rekabetçi bir inhibitörüdür (Şekil 1.10). L-Asn ve L-Gln arasındaki yapısal benzerliğe işaret etmektedir (Van Den Berg 2011).



Şekil 1.10 L-asparaginaz/L-glutaminaz kataliz reaksiyonunun mekanizması (Van Den Berg 2011)

Serratia marcescens, *Escherichia coli* ve *Erwinia chrysanthemi*'den elde edilen L-ASP gibi bazı mikroorganizmalardan elde edilen L-ASP'ler L-Asn hidrolizine kıyasla %5 oranında L-Gln hidroliz kapasitesine sahipken; *Pseudomonas* sp. gibi diğer mikroorganizmalardan elde edilen diğer L-ASP'ler (Greenberg *et al.* 1964, El-Asmar *et al.* 1966) ve *Acinetobacter glutaminasificans* (Holcenberg *et al.* 1975) gibi diğer mikroorganizmaların L-ASP'leri aynı düzeyde asparajinaz ve glutaminaz aktivitesine sahiptir. Daha sonra, *Wolinella succinogenes*'ten elde edilen gibi, kullanılan metodoloji ile tespit edilebilen glutaminaz aktivitesi göstermeyen bazı L-ASP'ler tanımlanmıştır (Distasio *et al.* 1982).

L-Gln plazmada bol miktarda bulunan bir amino asittir ve amino asitlerin ve nükleotidlerin sentezi için gereklidir. Pankreas kanseri, kolon kanseri, karaciğer kanseri ve lösemi gibi birçok insan kanseri türünün çoğalmaları ve hayatta kalmaları için L-Gln'e bağımlı oldukları gösterilmiştir (Wise and Thompson 2010). Ortamdaki L-Gln tükenmesinin, L-Asn tükenmesinden daha büyük bir seçicilikle kanser hücresi apoptozunu indüklediği gözlemlenmiştir (Yuneva *et al.* 2007).

E. coli'den elde edilen L-ASP'nin antikanser aktivitesi, sıçanlarda tümörlerin inhibisyonunu gözlemleyen Mashburn and Wriston (1964) tarafından gösterilmiştir. Bununla birlikte, biyofarmasötik olarak kullanımına yönelik en büyük ilgi Broome (1965)'un kobay serumu ile tedavi edilen transplant sıçanlarda lenfosarkomların gerilediğini

tespit etmesi ve bunun ilk kez malign hücrelerin L-Asn'ye olan beslenme bağımlılığından kaynaklandığını bildirmesiyle başlamıştır. Dolayısıyla, L-ASP'nin bazı kanser türleri, özellikle de lenfatik kanserler üzerinde başarılı bir şekilde kullanılması, bunları oluşturan hücrelerin büyümek için yüksek miktarda L-Asn'ye ihtiyaç duymasından kaynaklanmaktadır (Kiriya *et al.* 1989).

L-ASP ile tedavi, L-Asn amino asidini sentezleyememeleri nedeniyle asparajin sentetaz (AS) üretmeyen ALL hücrelerine sahip hastalara uygulandığında etkili olur (Shrivastava *et al.* 2016). Etkili bir şekilde uygulandığında, enzim hücre dışı ortamda L-Asn substratında bir azalmaya, LLA neoplastik hücrelerinin seçici apoptozuna (Shrivastava *et al.* 2016) ve diğer antikanser ilaçlarla birlikte uygulandığında çocukların %80 ile 90'ında ve gençlerin ve yetişkinlerin %30 ile 60'ında kesin iyileşmeye yol açar. L-ASP 1970'lerde tek başına uygulandığında, pediatrik vakaların %40 ile 60'ında tam remisyona neden olmuştur (Tallal *et al.* 1970, Jaffe *et al.* 1971, Sutow *et al.* 1971).

1.17 L-ASP'lerin Antilösemik Aktivitesinin Belirleyici Faktörleri ve Ticari L-Asparaginaz Formülasyonları

L-ASP'lerin antileukemik aktivitesinin L-ASP'nin substratı ile hidroliz hızına ve afinitesine (Shrivastava *et al.* 2016), enzimin serum klirensinin farmakolojik faktörlerine (Avramis and Panosyan 2005), tümör hücrelerinde asparajinaz direnci gelişimine (Avramis *et al.* 2002) bağlıdır. Konakçı bağışıklık sistemi tarafından anti-asparajinaz antikorlarının sunulması (Panosyan *et al.* 2004) ve besin alımıyla metabolizmadan ne kadar L-Asn elde edildiğinin hem L-Asn'nin biyosentezine katkısı (Avramis and Tiwari 2006) önemlidir. Bu nedenle, farklı ticari L-ASP'lerin en iyi formülasyonu ve dozajı halen araştırılmaktadır.

Bugüne kadar, markalar altında ticari olarak kullanılan üç L-ASP formülasyonu bulunmaktadır. Aşağıdaki paragraflarda, büyük ölçekte üretilen bu tür biyofarmasötikler detaylandırılmıştır.

Tsuji *et al.* (1957) *H. pylori* ve *Escherichia coli*'den elde edilen ilk L-ASP'yi bildirmiştir. Substrat afinitesi (L-Asn) ve konumu bakımından farklılık gösteren iki tip L-ASP gözlemlenmiştir: sitozolde bulunan tip I ve bakteriyel periplazmada bulunan tip II. Tip II L-ASP en çok ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır çünkü L-Asn için daha fazla afiniteye sahiptir (Tip I L-ASP için $K_m=3,5$ mM'ye karşılık tip II L-ASP için $K_m=0,0115$ mM, her iki protein için pH 7 ve 25°C sıcaklıkta dozlanan parametreler) (Schwartz *et al.* 1966, Wriston and Yellin 1973, Derst *et al.* 2000). Tip II L-ASP'nin özdeğ 35,6 kDa alt birimlerden oluşan bir tetramer oluşturduğunda aktif olması dikkat çekicidir (Epp *et al.* 1971).

Diğer ticari L-ASP, *H. pylori* ve *Escherichia coli*'den elde edilen L-ASP ile karşılaştırıldığında daha az immünojenik (Ohnuma *et al.* 1972) ve daha az toksik ancak daha az etkili olan *Erwinia chrysanthemi*'den elde edilmektedir.

Alternatif olarak, mono-metoksi polietilen glikol (PEG) birimlerinin konjugasyonu ile kovalent modifikasyondan *H. pylori* ve *Escherichia coli* veya *E. chrysanthemi*'den elde edilen PEGile L-ASP'ler vardır. Bu modifikasyon, hastalarda enzimin farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini etkileyerek (artan yarı ömür, daha yavaş klerens ve azalan bağışıklık tepkisi) bileşiğin biyoyararlanımını ve biyoyararlanımını iyileştirir (Inada *et al.* 1995, Mehvar 2000), ancak konjugatın biyolojik aktivitesinin bir kısmının kaybına neden olur (Veronese and Pasut 2005). Bu nedenle, PEGile L-ASP daha düşük dozlarda ve daha kısa aralıklarla uygulanabilir (Veronese and Pasut 2005).

Sunulan formülasyonlardan herhangi birinden elde edilen L-ASP, hidroliz veya enzim inaktivasyonu yoluyla vücutta sürekli bozunmaya uğrar. İki lizozomal proteazın (asparajinaz endopeptidaz (AEP) ve katepsin B (CTSB)) L-ASP'yi hidroliz yoluyla bozduğu ve inaktive ettiği ve tedavi başarısızlığına katkıda bulunduğu bilinmektedir (Patel *et al.* 2009). AEP ve CTSB, Philadelphia lösemik hücreleri (Ph) ve iAMP21 (Intrachromosomal Amplification of Chromosome) içeren hücreler tarafından yüksek oranda eksprese edilir, bunlar tedaviye zayıf yanıt veren çok agresif lösemik hücrelerdir (Forghieri *et al.* 2015, Harrison 2015). Bu nedenle, CTSB hidrolizi, L-ASP inaktive eden tümörlerin tedavisinde kullanımını sınırlamaktadır (Patel *et al.* 2009).

Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD), L-ASP'lerin üç formülasyonu bulunmaktadır; bunlardan biri kullanımdan kaldırılmıştır ve ikisi şu anda ALL ile mücadelede kullanılmaktadır: *H. pylori* ve *Escherichia coli*'den elde edilen PEG ile edilmemiş doğal L-ASP (Elspar®, Merck & Co., Inc., West Point, PA, ABD), insanlarda kullanım için üretimi yan etkiler nedeniyle 2012 itibariyle durdurulmuştur; PEGylated L-ASP (Oncaspar®, Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc. Gaithersburg, ABD) ve *Erwinia chrysanthemi*'den elde edilen (Erwinaze®, Jazz Pharmaceuticals, Palo Alto, ABD). Bu son formülasyon, önceki iki formülasyona karşı aşırı duyarlılığı (%15 ile 20) olan hastalar için ikinci basamak tedavi olarak İngiltere'de onaylanmıştır. Yerel L-ASP'ler, İngiltere hariç Avrupa'da ve Asya'da farklı marka isimleri altında sunulmaktadır (Avramis and Panosyan 2005). Şu anda Irak'ta hiçbir L-ASP tescilli değildir. Kapsüllenmiş L-ASP (78 ile 146 IU/mL arasında) içeren eritrosit formunda sunulan Graspera® hariç tüm ticari formülasyonlar liyofilize formda (3,750 ile 10,000 IU arasında) mevcuttur. Etki mekanizması, sodyuma bağlı taşıyıcılar (SNAT 3/5) aracılığıyla L-Asn'yi kan plazmasından kendi içine "pompalayabilen" eritrositlerden (Graspera®) oluşur ve kapsüllenmiş L-ASP amino asidi bozar. Bu şekilde L-ASP yarı ömrünü ve aktivitesini artırır ve bağışıklık tepkileri ile enzim inaktivasyonunu önler.

1.18 L-ASP'nin Diğer Kullanımları

L-ASP diğer hastalık türlerinin tedavisinde de faydalı olabilir. Kimerik bir enzim olan L-ASP-EP-T/B'nin (L-ASP artı B hücresi epitoplari ve tetanoz toksinine karşı T yardımcı hücre epitoplari) üretimi ve saflaştırılması, 3 doz aşılamaadan sonra farelerde yüksek titrelerde anti-L-ASP- EP-T/B ile sonuçlanmıştır. Bu enzim, ateroskleroza karşı yeni bir aşı geliştirilmesinin yolunu açmaktadır (Gaofu *et al.* 2006).

Lösemik hücrelerde bulunan farklı L-asparajin (L-ASP'nin substratlarından biri) seviyelerinin tespit edilmesi ve sınıflandırılmasıyla, L-ASP lösemik hücreler için bir biyosensör olarak kullanılabilir (Verma *et al.* 2007).

CMTN (Üçlü Negatif Meme Kanseri) hücreleri meme kanserleri grubu içinde en agresif olanlar olarak kabul edilir. Bu hücreler büyüme için hücre dışı glutamine belirgin bir

bağımlılık göstermektedir ve *E. chrysanthemi*'den türetilen L-ASP'nin glutaminaz aktivitesi kullanılarak bu amino asidin yoksun bırakılmasının, bu tümör hücrelerinin apoptozuna yol açtığı ve böylece CMTN hücrelerine karşı yeni bir biyolojik ilacın geliştirilmesine izin verdiği bulunmuştur (Mauro-Lizcano and López-Rivas 2018).

Ekstranodal Doğal Öldürücü Hücre ve Nazal-tip T-hücreli (LE-NK/T) Lenfoma, geleneksel kemoterapiye dirençli olduğu gösterilen oldukça agresif bir lenfomadır. İn vitro çalışmalar L-ASP'nin normal NK hücrelerinin aktivitesini azaltabildiğini ve tümör NK hücrelerinde apoptozu indükleyebildiğini göstermiştir (Charamella *et al.* 1985, Obama *et al.* 2003, Ando *et al.* 2005).

L-ASP, klorokin ile kombinasyon halinde, glioblastoma hücrelerine karşı yüksek sitotoksositeye sahiptir.

L-ASP'nin bir diğer kullanım alanı da gıda endüstrisindeki kullanımudur. L-ASP, gıdalar yüksek sıcaklıklarda işlendiğinde, özellikle de kızartıldıklarında (Mohan Kumar and Manonmani 2013), gıda kaynatıldığında oluşmayan bir süreç olan L-Asn amino asidinin varlığında indirgen şekerlerin yoğunlaşmasının neden olduğu akrilamid oluşumunu önlemek için kullanılır. Akrilamid oluşumunun önlenmesi, insanlar için potansiyel bir kanserojen olarak sınıflandırılan nörotoksosite nedeniyle önemlidir (Vinci *et al.* 2012). L-Asn konsantrasyonu daha yüksek olan gıdalar sebzeler, özellikle de kızartılmış patateslerdir (Friedman 2003). Zyzak *et al.* (2003), gıdaların yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi işleminden önce L-ASP kullanıldığında, hammaddedeki L-ASP enziminin L-Asn konsantrasyonunu %88 oranında azaltması nedeniyle nihai üründe akrilamid oluşumunun %99'dan fazla azaldığını göstermiştir.

1.19 L-ASP ile Tedavi Edilen Hastalarda Görülen Yan Etkiler

L-ASP tedavisi, genellikle 25. haftadan itibaren tedavi remisyonuna neden olan glutaminaz aktivitesine (Warrell *et al.* 1982, Distasio *et al.* 1982, Silverman *et al.* 2010)

atfedilen yan etkilere neden olmaktadır (Silverman *et al.* 2010); ancak Chan *et al.* (2014) ALL AS-pozitif hücrelerde glutaminaz aktivitesinin önemini doğrulamaktadır.

PEG'lenmiş veya PEG'lenmemiş *H. pylori* ve *Escherichia coli*'den türetilen doğal L-ASP ile tedavi edilen hastaların sahip olduğu yan etkiler çoktur. Buna karşılık, *E. chrysanthemi*'den elde edilen L-ASP'nin uygulanması aynı yan etkileri gösterir, ancak daha az yoğunluktadır; ancak daha düşük asparajinaz aktivitesine sahip olarak tedavi başarısı azalır (Kotzia and Labrou 2006).

1.20 Irak'ta L-ASP Tedarikiyle İlgili Sorunlar

Irak'ta L-ASP tedariği, öncelikle fiyat artışı ve daha sonra ELSPAR® üretiminin durdurulması nedeniyle son birkaç yılda çeşitli sorunlar yaşadı. Bu kayıpla birlikte, alternatif olarak tedarikçi tarafından 2017 yılının başına kadar AGINASA® satın alınmıştır, ancak iyi uygulamalar sertifikasının olmaması, menşe ülkede tescil ve AGINASA® ile yapılan klinik çalışmaların raporlarının bulunmaması gibi bekleyen 17 sorun nedeniyle ithalat askıya alınmıştır. Sağlık Bakanlığı (MS) başka bir L-ASP alımı için uluslararası bir fiyat teklifi talep etti. Leuginase®'in etkinliğinin olmadığı iddiası, Irak'ta ruhsatının bulunmaması ve Anvisa (Ulusal Sağlık Gözetim Ajansı) tarafından değerlendirilen klinik çalışmaların olmaması ve çok sayıda safsızlığın muhtemel varlığı nedeniyle Federal Mahkeme 2017 sonunda Irak'ta dağıtımını yasaklamış ve halihazırda dağıtılan tüm ilaçların geri çekilmesini talep etmiştir. Öte yandan MS, satın alınan ürün 6 farklı laboratuvar (LNbio, INCQS/Fiocruz, MS bioworks, Bioduro, USP ve Butantan) tarafından kanıtlanmış enzimatik aktiviteye (beklenen etki) sahip L-ASP etken maddesini içerdiği için karara itiraz edeceğini bildirmiştir, ancak bugüne kadar Irak'taki hastanelerin çoğunda L-ASP eksikliği devam etmektedir.

Öte yandan, MS'nin yeni bir L-ASP'nin geliştirilmesi ve gelecekteki ulusal üretimini değerlendirmek üzere ülkedeki biyofarmasötik araştırma, geliştirme ve üretim gruplarıyla çeşitli toplantılar düzenlemesi dikkat çekicidir. Hâlihazırda, ulusal ruhsatlı L-ASP elde etmek için ülke çapında farklı laboratuvarlarda çalışmalar yürütülmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

L-asparaginaz geninin (ansB) indüksiyonu ve baskılanması, çeşitli transkripsiyon faktörlerini içeren karmaşık mekanizmalar tarafından kontrol edilir; Buna göre L-asparaginaz sentezi karbon, nitrojen kaynağı ve oksijen gibi beslenme ve çevresel faktörler tarafından düzenlenir (Albanese and Kafkewitz 1978). *E. coli*'den elde edilen L-asparaginaz (FNR) proteininin (ArcA) ve (CRP) tarafından pozitif olarak düzenlendiği ve dolayısıyla enzimin sentezinin anaerobiyoz tarafından indüklendiği ve glukoz tarafından baskılandığı bulunmuştur (Iuchi and Lin 1991). Ayrıca birçok gram-negatif bakteride glikozun ansB geninde karbon katabolit baskılaması gösterdiği, karbon katabolit baskılama düzeyinin bakteriden bakteriye farklılık gösterdiği, bazı bakterilerde böyle bir baskılamanın olmadığı da rapor edilmiştir (Mukherjee *et al.* 2000). Oksijen ile enzim sentezinin düzenlenmesinde de benzer bir durum bildirilmiş ve bazı çalışmalarda oksijenin aynı bakterilerde enzim sentezini indüklerken bazılarında baskıladığı belirtilmektedir (Mukherjee *et al.* 2000).

H. pylori ve *Escherichia coli*'de glikozun L-asparaginaz sentezine etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada Tosa *et al.* (1911)'a göre %5 glukoz içeren büyüme ortamında enzim sentezinin neredeyse tamamen baskılandığı bulunmuştur. Burada L-asparaginaz sentezini inhibe eden tek faktörün glikozun neden olduğu hücre içi cAMP düzeyindeki azalma olmadığı, oluşan asit ortamının da bunda etkili olduğu ileri sürülmüştür. Azotla enzim sentezinin düzenlenmesinde, çözünebilir azot kaynağı olan L-asparajin, L-glutamin ve L-glutamik asit gibi amino asitler ve üre, enzim sentezini uyarırken, amonyum bileşikleri enzim sentezini baskılamaktadır (Nawaz *et al.* 1994). Bu durum farklı çalışmalarda rapor edilmiştir (Müller and Boos 1998). Bu bağlamda yapılan bir çalışmada ortama glikoz ve amonyum iyonları eklenerek L-asparaginaz üretiminin baskılandığı, *Klebsiella aerogens* ile yapılan benzer bir çalışmada ise glikozun bu bakteride L-asparaginaz üretimini engellemediği belirlenmiştir.

Atmosferdeki oksijen içeriğinin, karbon ve nitrojen kaynakları gibi L-asparaginaz sentezi üzerindeki etkisine ilişkin farklı sonuçlar rapor edilmiştir. İyi bir havalandırma bazı bakterilerde L-asparajin sentezini tetiklerken bazılarında baskılar (Erenler *et al.* 2014).

Örneğin *H. pylori* ve *Escherichia coli*'de enzim sentezi anaerobik koşullar altında aerobik koşullara göre 100 ile 1000 kat daha yüksek olduğu bildirilirken, aynı bakteri ile yapılan başka bir çalışmada L-asparajinaz sentezinin çözünmüş oksijen seviyesinin artmasına paralel olarak arttığı gösterilmiştir (Nawaz *et al.* 1994).

Kanser kemoterapisinde sıklıkla kullanılan birincil enzim, bu araştırmanın konusu olan L-asparaginazdır. Bu aktiviteye sahip sadece az sayıda gram negatif bakteride bulunan enzim, kanser hücrelerini bu yabancı amino asitten mahrum bırakarak işlev görmektedir. Tipik hücreler aktif L-asparajin sentetaz enzimine sahip olduğundan, bu amino asit için prototroflardır ve böyle bir uygulamadan etkilenmezler. Çalışmamızda, son derece değerli bir ticari ürün olan L-asparaginazın aynı grup içindeki çeşitli bakteriler tarafından üretimini optimize etmek için gerekli kimyasal ve fiziksel faktörlere odaklandık ve bunu yapmak için, *E. coli* HB101 [pAHZ12] ve *Enterobacter aerogenes*'ten [pB -PGA] vgb genini klonladık. Bu bakteriler bu enzimi üretme yetenekleriyle ünlüdür. Ayrıca ansB genini de klonladık. Spesifik olarak, enzimin karbon ve oksijen kataboliti tarafından inhibisyonuna ilişkin tamamen farklı bulgular belgelenmiştir. Örneğin, yakından ilişkili bakteri türleri üzerinde yapılan araştırmalar, oksijenin bu enzimin sentezini engellediğini göstermiştir, ancak diğer araştırmalar oksijenin enzim sentezini desteklediğini bulmuştur. Hiç şüphesiz etkili bir oksijen emilim sistemine sahip rekombinant bakteriler bu tartışmalı konuya ışık tutacaktır. Bu çalışmada, enzim sentezini kontrol eden faktörleri araştırmak amacıyla bakteriler, çeşitli karbon ve nitrojen kaynaklarına sahip, zengin ve eksik besin ortamlarında, değişen pH değerlerinde ve çeşitli sıcaklıklarda kültürlenmiştir. Ayrıca rekombinant mikroplarda bu sürecin düzenlenmesinin karşılaştırmalı bir analizi yapılmıştır.

2.1 Çalışma Tasarımı

Önceki çalışmalar, *E. coli*'nin ansB geninin ekspresyon plazmidi pET28a'da klonlanmasını başarılı bir şekilde sağlamış ve çözünür ve fonksiyonel bir L-asparajinazın bakteriyel sistem (*E. coli*) tarafından ekspresyonuna yol açmıştır (Caetano *et al.* 2017). Daha sonra, bu enzim enzimatik, kinetik ve sitotoksik aktivitesi açısından biyokimyasal

olarak karakterize edilmiştir. Yukarıda bahsedilen çalışmalarda elde edilen sonuçlar, bu çalışmanın geliştirilmesi için temel oluşturmuştur.

Yukarıda bahsedilen rekombinant protein, N-terminal kısmında, Porath *et al.* (1975) tarafından geliştirilen immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) ile bir saflaştırma aracı olarak yaygın olarak kullanılan basit bir 2 kDa etiketi olan 6 ardışık histidinden (6xHis) oluşan bir kuyruk (etiket) ifade eder. Bu kuyruğun kullanımı, üretim maliyetinde tasarruf (tek adımda saflaştırma) sağlamasının yanı sıra, ifade edilen protein ile kromatografik kolon arasında doğrudan etkileşimden kaçındığı için (verimi artırır) protein üretim aşamasında avantajlar sağlar, çünkü yalnızca Histag, kromatografik reçineyi oluşturan mikrokürelerde hapsolmuş Ni^{2+} ve Co^{2+} metalik iyonlarıyla etkileşime girer (Li 2010). Sockolosky and Szoka (2013) tarafından açıklandığı üzere, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *H. pylori*, memeli hücreleri ve baculovirus ile enfekte edilmiş böcek hücreleri gibi çeşitli ifade sistemlerinde ifade edilen enzimlerin elde edilmesinde kullanımı başarılı olmuştur.

Bununla birlikte, polihistidin etiketiyle ilişkili rekombinant proteinler, küçük bir boyuta (3 ile 10 histidin) sahip olmasına rağmen, örneğin Histag bir epitop antijeni olarak tanımlanabileceğinden ve Krupka *et al.* (2016) tarafından bildirildiği gibi Anti-His antikorlarının etkisiyle bozulma riski taşıyacağından, immünojenikliği değerlendirmek için in vivo deneyler için sınırlıdır.

Bunu bilerek, ansB geni pET-28a ekspresyon vektörüne subklonlandı ve rekombinant plazmid pET-28a-ansB, Histag'ı ortadan kaldırmak ve sonuç olarak mutajenik PCR adımlarını başlatmak için ideal şablon DNA olarak seçilmiştir. Bunun nedeni, rekombinant proteinin N-terminal kısmındaki Histag (PET-28A-Histag) ile ilişkili PET-28A kuyruk ifadesinin, amino asit dizisinin bölünmesini sağlamasıdır, çünkü bu etiket Ulp1 sumoproteaz için katalitik alanlara sahiptir. PET-28A ile ilişkili ilgilenilen enzimleri ifade etmenin bir başka avantajı da ubiquitin ile olan yapısal benzerliğidir, bu da rekombinant protein katlanması hızını ve verimliliğini ifade eder.

E. coli'den elde edilen l-Asparaginazın antijenik epitoplarının in silico analiz yoluyla tanımlanması ve sıralanmasından, Dr. Raphael Trevizani liderliğindeki ekip, immünojenik dereceyi azaltmak için söz konusu doğal proteinin amino asit dizisinde beş spesifik mutasyon önermiştir. Söz konusu grubun onayı ve iş birliği ile bu çalışma, belirlenen mutantları in vitro olarak üretmeyi ve in vivo deneylerde immünojenik potansiyellerini belirlemede bir ön adım olarak sitotoksisiteleri açısından biyokimyasal olarak karakterize etmeyi amaçlamıştır.

2.2 Uygunluk

Kamu sağlık sisteminin evrensel yönü göz önünde bulundurulduğunda, hükümet ilaç piyasasında aktif bir alıcı olarak hareket edebilir, fiyat ve sözleşme şartlarını müzakere etme gücünü artırabilir. Bu nedenle, bu ürünlerin devlet kurumları tarafından satın alınması, amacı stratejik ilaçların ulusal gelişimi ve üretimi için gerekli teknolojinin transferini gerçekleştirmek olan Üretken Kalkınma Ortaklıklarının kurulması için bir yol oluşturur. Bu tür bir davranış, halka sağlık ürünleri tedarikinin maliyetleri ve bürokrasisi ile uluslararası laboratuarlara üretken bağımlılık açısından ülkenin kırılganlığını azaltacaktır. Üretimi millileştirme ve ulusal tedariki garanti altına alma girişimlerine rağmen, L-ASP projesi 2014 yılında sonlandırılmış ve ilaç bir kez daha yeni ortaklıklar için aday olarak diğer 56 proje arasında listelenmiştir.

O zamandan bu yana Irak, antineoplastik L-ASP'nin satın alınmasında bürokratik engellerle karşılaşmış, bu da bir tedarik krizi yaratmış ve daha fazla vakada önemli bir sağkalım faktörü olarak bilindiği için lösemi ve lenfomadan etkilenen hastaların tedavi protokolleri üzerinde olumsuz etkilere neden olmuştur. 2018 yılında, ilacın satın alınmasına yönelik tartışmalı uluslararası açık artırmanın ve klinik ve farmakovijilans çalışmalarından veri sunmayan ve Anvisa tarafından ruhsat listesine dahil edilmeyen Leuginase®'in üreticisi Çinli Beijing SL Pharmaceutical laboratuvarının zaferinin ardından, federal hükümet L-asparaginase'in satın alınmasının SUS tarafından yetkilendirilen hastanelerin sorumluluğunda olacağını ve bunun için yalnızca finansal maliyetlerin aktarılabilceğini bildirmiştir. İthal bir ilaç olduğu için, ulusal bölgede bir distribütör bulunmasına rağmen, Irak mevzuatı tüzel kişilerin (hastaneler ve klinikler)

farmasötik ürünleri edinmesini hala zorlaştırmaktadır. Hükümetin aldığı son kararlar, L-ASP'nin birçok tedavi biriminin kanser tedavi protokollerinde kullanımının kesintiye uğraması teşvik edilmiş, bazıları da proteinin ALL ve diğer lösemilerin tedavisinde bir adjuvan olarak antineoplastik etkinliğine rağmen klinik kullanımının zorla geri çekildiğini belirtmiştir.

Buna ek olarak, karaciğer fonksiyon bozukluğu, geçici diabetes mellitus, pankreatit, bulantı, baş dönmesi ve nöbetler gibi çeşitli ciddi yan etkilerin eşlik ettiği şiddetlenmiş bir bağışıklık tepkisinin ortaya çıkması nedeniyle protein direncinin tetiklenmesine ilişkin literatürde bildirilen sabitler de bulunmaktadır (El-Naggar *et al.* 2014).

Terapötik proteinler, kökeni çok faktörlü olan çeşitli immünojenik potansiyele sahiptir (Deehan *et al.* 2015) ve immünodominant epitoplar olarak adlandırılan önemli amino asit dizileri sunar (Jawa *et al.* 2013). Bu epitopların tanımlanması, immünojenisite derecelerine göre sıralanmalarını sağlayan rafine algoritmaların ve yazılımların geliştirilmesi gibi hesaplama araçları ile optimize edilebilir. Bu araçlar sayesinde antijenik potansiyele sahip proteinleri bağışıklıktan arındırmak için çeşitli stratejiler önerilmiştir. Bunlardan biri, spesifik epitopların çıkarılması veya kamufle edilmesi, antikor tepkilerinin azaltılması ve terapötik proteinin etkinliğinin artırılmasıdır (Zhao *et al.* 2015).

Bu tür *in silico* araçların bölgeye yönelik mutajenez gibi Moleküler Biyoloji teknikleriyle birleştirilmesi, immünodominant ve yüksek epitopların hızlı bir şekilde taranması, DNA'da spesifik modifikasyonların üretimine bağlı özgüllük kullanıldığından, farmasötik olarak ilgili proteinlerin deimmünizasyonu için önemli bir biyoteknoloji modeli oluşturur.

2.3 Gerekçe

Literatür bilgilerine dayanarak, mevcut çalışma, *H. pylori* ve *Escherichia coli* L-ASP varyantlarının üretilmesi ve biyokimyasal olarak karakterize edilmesi, bu mutantların in

vivo immünojenitesinin değerlendirilmesinde bir ön adım olarak gerekçelendirilmiştir. Bu çalışma, biyokimyasal ve yapısal soruların yanı sıra in silico araçlardan elde edilen verilerle in vivo veriler arasındaki iletişimin derecesine ilişkin soruları yanıtlayacak verilerle sonuçlanacak ve çok farklı ancak birbirini son derece tamamlayıcı iki platform arasındaki etkileşime ışık tutacaktır. Ayrıca, bu enzimin burada önerilen epitoplarının immünojenik potansiyelinin ve bunun sonucunda söz konusu terapötik proteine karşı toleransın etkisinin araştırılmasının da yolunu açmaktadır.

2.4 Hedefler

2.4.1 Genel amaç

İmmünojenite potansiyelini belirlemek için, öncelikle *Psychrobacter cryohalolentis*'ten L-asparaginazın *H. pylori* ve *Escherichia coli*'de ansB genindeki belirli mutasyonlardan moleküler klonlanması, heterolog ekspresyonu ve yapısal modellemesi üzerinde çalışılması gerekmektedir. Bu süreçleri, tasarlanan bu proteinlerin bakteriyel sistemde ifadesi, biyokimyasal karakterizasyonu ve sitotoksitesinin değerlendirilmesi izleyecektir.

2.4.2 Özel hedefler

- *Psychrobacter cryohalolentis*'ten elde edilen L-asparajinin aktif bölgesinin *H. pylori* ve *Escherichia coli*'de modellenmesi.
- *Psychrobacter cryohalolentis*'ten L-asparaginazın aktif bölgesinin *H. pylori* ve *Escherichia coli*'deki stabilitesinin incelenmesi.
- Asparajin substratının *Psychrobacter cryohalolentis*'in aktif bölgesi ile etkileşimini *H. pylori* ve *Escherichia coli*'de incelenmesi.
- *Psychrobacter cryohalolentis*'ten L-asparaginazın *H. pylori* ve *Escherichia coli*'deki stabilizasyonunun yapısal belirleyicileri hakkında bilgi edinmek için protein stabilize verilerini karşılaştırılması.

- *H. pylori* ve *Escherichia coli*'de *Psychrobacter cryohalolentis*'ten elde edilen L-asparaginazın katalitik bölgesinin yapısal bakımına katılan veya müdahale eden kalıntıları olan ilmeklerin stabilitesinin karşılaştırılması.
- ansB gen dizisinde spesifik mutasyonların teşvik edilmesi.
- Doğal JM103 L-ASP ve modifiye edilmiş varyantların ifade edilmesi ve saflaştırılması.
- Asparajin ve glutamin aktivitelerini değerlendirilmesi.
- Doğal JM103 L-ASP'nin maksimum aktivitesinin optimum sıcaklığının ve pH'sının belirlenmesi.
- Doğal JM103 L-ASP'nin kinetiğinin karakterize edilmesi.
- Doğal JM103 L-ASP ve modifiye varyantlarının ikincil yapısının belirlenmesi.
- Doğal JM103 L-ASP'nin tümör hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesi.
- JM103 L-ASP primer sekansına eklenen mutasyonlar tarafından üretilen katalitik bölge kalıntıları ve l-Asn substratı arasındaki potansiyel etkileşim üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi.

3. MATERYAL VE METOT

H. pylori ile enfekte 70 hasta ve 20 kontrolden alınan mide biyopsilerindeki histopatolojik değişiklikler Sydney skorum sistemi ile değerlendirilmiş ve bu değişikliklerin virölans faktörleri ile korelasyonu incelenmiştir. Histopatolojik verilerin karşılaştırılması için Mann-Whitney testi kullanılmıştır. Her bir patolojik indeksin varlığı ya da yokluğu, χ^2 testi kullanılarak enfekte eden *H. pylori* suşunun virölans faktörlerine sahip olması açısından değerlendirilmiştir.

3.1 Genetik Materyalin Elde Edilmesi, L-Asparaginaz (L-ASP) Gen Manipülasyonu ve Bakteri Suşları

Psychrobacter cryohalolentis'ten (Pcryo_0631) L-asparaginaz (L-ASP) geni PCR kullanılarak çoğaltılmıştır. ORF, 919 bp'lik genin tamamını içermektedir. HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri için bölgeler ORF'nin uçlarına eklenmiştir. Başlangıçta, CloneJET PCR klonlama kiti kullanılarak PCR ürününü klonlamak için pET-28a plazmid vektörü kullanılmıştır. Bakteri kolonileri etkili bir şekilde dönüştürüldükten sonra, LB besiyerinde mililitre başına 50 µg kanamisin eklenmiştir. Rekombinant plazmid, aynı zamanda geni kısıtlayan ve klonlayan PET28a (+) tarafından kolonilerden elde edilmiştir. Başarılı transformasyonu garantilemek için, mililitre başına 50 µg kanamisin içeren LB agardan yapılmış agar plakaları analiz edilmiştir. Rekombinant plazmid, restriksiyon analizi ve PCR kolonisi ile doğrulanmıştır.

L-asparaginaz için *H. pylori* ve *Escherichia coli* JM103 bakterilerinin ansB geninin dizisi GenBank aracılığıyla elde edilerek ID 947454 ile kaydedilmiştir., GenScript® şirketinden, ticari vektör pET-28a'da BamHI ve HindIII temin edilmiştir. *H. pylori* ve *Escherichia coli* JM103 ve Rosetta bakteri suşlarının alikotları Bağdat Üniversitesi Mikrobiyoloji Bölümü Başkanı tarafından sağlanmıştır. Irak Bölgesi. DNA ekstraksiyon ve saflaştırma kitleri Promega® şirketinden, primerler ise Invitrogen® şirketinden temin edilmiştir. Şekil 3.1'de, ilgili gen tarafından kodlanan proteinin amino asit dizisi, artı sinyal peptidine karşılık gelen dizi (kırmızı) gösterilmiştir.

MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTAG
KVGVENLVNAVPQLKDIANVKGEQVNVNIGSQDMNDDVWLTAKKINTDCD
KTDGFVITHGTDTEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFN
LYNAVVTAAADKASANRGVLVVMNDTVLDGRDVTKTNTTVDVATFKSVNYGP
LGYIHNGKIDYQRT PARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVVNYANASDLPA
KALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKTVFDTLATAAKNGTAVVRSSRVPTGAT
TQDAEVDDAKYGFVASGTLNPQKARVLLQLALTQTKDPQQIQQIFNQ

Şekil 3.1 Protein amino asit dizisi

Yalnızca Histag (JM103 L-ASPHis) içeren *E. coli*'den L-asparaginaz, önceki bir çalışmadan pET28a-asnB rekombinant vektöründen elde edilmiştir. pET28a vektörü, pET-28A-Histag'ın saflaştırılmasını kolaylaştıran aynı prensiple eksprese edilen proteinin N-terminal kısmına 6 histidin (Histag) dizisi eklemektedir.

3.2 L-Asparaginaz Üretiminin İndüksiyonu

Teyit edilen *H. pylori* bakterisi ve *Escherichia coli* hücreleri 50g/mL kanamisin içeren LB besiyerinde kültüre alınmış ve L-asparajinaz geniyle bağlanmış pET28a plazmidıyla (pET28- Asn+) transformasyona tabi tutulmuştur. Kapasitesi 250 mL olan ve 25 mL besiyeri içeren konik cam şişeler, % 1'lik bir gece boyunca dönüştürülmüş hücre kültürü ile aşılanmıştır. İkinci kültür 200 rpm ve 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı bir inkübatörde inkübe edilmiş ve bakteri kültürü 600 nm'de 0,5 ile 0,6 absorbansa ulaştığında L-asparajinaz geninin ifadesi 0,5 mM IPTG (isopropyl-D-thiogalactopyranoside) eklenerek uyartılmıştır. Paralel bir negatif kontrol deneyinde, pET28a (+) ile dönüştürülmüş ancak L-asparajinaz geni (pET28-Asn-) içermeyen *H. pylori* bakterileri ve *Escherichia coli* hücreleri kullanılmıştır. Bakteri hücreleri 4°C'de 5 dakika boyunca 2,000 g'de santrifüj edilmeden önce gen ifadesi 3 saat boyunca indüklenmiştir. Hasat edilen hücre çökeltisi buz gibi soğuk 20 mM fosfat tamponu pH 7,5 içinde süspanse edilmiş ve buz üzerinde 1 dakikalık inkübasyonun ardından 30 saniyelik ılımlı darbe maruziyeti ile 5 ile 7 dakika boyunca sonike edilmiştir (MTI şirketi tarafından MSK-USP3N Modeli). 15,000 x g / 10

dakika/4°C'de santrifüjleme hücre kalıntılarını uzaklaştırmış ve süpernatant daha ileri araştırmalar için kullanılmıştır.

3.3 Primer Tasarımları

İki tip primer tasarlanmıştır: mutajenik ve *H. pylori* ve *Escherichia coli* bakterilerinin ansB genini pET-28a vektörüne klonlamak için olanlar. İkincisi, aşağıda kırmızı ile gösterildiği gibi, PCR ile HindIII ve BamHI enzimleri için kısıtlama bölgelerini tanıtmak üzere tasarlanmıştır:

pSUM (Fw):5` - ATCGGATCCTTACCCAATATCACCATT - 3`

pSUM (Rv): 5` - GCGAAGCTTTTAGTACTGATTGAAGAT - 3`

3.4 Enzim Aktivitesi

Nessler Reaktifi, serbest amonyak nitrojen tespit testlerinde kullanılan bir potasyum tetraiyodomerkürat (II) çözeltisidir. JM103 L-ASP'nin enzimatik aktivitesini değerlendirme yöntemi, L-Asn (0,189 mM), 50 mM Tris tamponu ve 300 mM NaCl (pH 8,0) içeren bir çözeltinin bir Biometra® termocycler'da 37°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmesini içermektedir. İnkübasyonun ardından reaksiyonu bloke etmek için 1,5 M trikloroasetik asit (TCA) ilave edilmiştir. Bloke edilen reaksiyon karışımı daha sonra suda seyreltilmiş 240 µL Nessler Reaktifine (10 µL) eklenerek (25 µL Nessler ve 215 µL MiliQ su), ardından bir Synergy™ HTX Çoklu mikropılaka okuyucu Modunda 436 nm'de absorbans okunmuştur.

Standart Eğri: Standart eğri, 180 µL nihai çalışma hacmi için konsantrasyonları 0,216 ile 2,4 µM amonyum iyonu (NH₄⁺) arasında değişen 50 mM Tris tamponu ve 300 mM NaCl (pH 8,0) içinde 12 mM amonyum sülfat çözeltisi ((NH₄)₂SO₄) kullanılarak oluşturulmuştur. Aliquotlar 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiş, ardından reaksiyonu bloke etmek için 1,5 M TCA eklenmiştir.

Testin kolorimetrik adımı 96 kuyucuklu bir mikrolakada gerçekleştirilmiştir; burada her bir seyreltmeden 10 µL ve 240 µL seyreltilmiş Nessler reaktifi (1:8,6 oranında) eklenmiş, ardından mikrolaka okuyucu Synergy™ HTX Multi-Mode'da 436 nm'de absorbans okunmuştur.

Glutamin aktivitesi: JM103 L-ASP'nin glutamin aktivitesini tahmin etmek için, reaksiyon için bir substrat olarak amino asit L-glutamin (189 mM) kullanılarak enzimatik aktivite yöntemi uyarlanmıştır.

3.5 pH Dalgalanmasının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

pH değişiminin JM103 L-ASP enziminin aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için pH 3 ile 11 aralığında farklı tamponlar kullanılmıştır. Bu analiz kolorimetrik Nesslerizasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Sitrat tamponu (0,2 mM) Fosfat (0,1 mM) pH 3 ile 6, Tris tamponu (50 mM) pH 7 ile 9 ve Glisin tamponu pH 10 ve 11'i kapsamaktadır. Test, daha önce açıklanan enzimatik aktivite protokolünü takip etmiştir.

3.6 Sıcaklık Değişiminin Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

JM103 L-ASP'nin enzimatik aktivitesi için ideal sıcaklığı bulmak amacıyla, 20 ile 90 santigrat derece aralığında bir sıcaklık yükseltme rampası uygulanmasını içeren prosedür kullanılmıştır.

3.7 Enzim Kinetiği

Yukarıda açıklanan enzim aktivitesi deneyi, JM103 L-ASP enziminin kinetik mekanizmasını değerlendirmek için modifiye edilmiştir. Kademeli L-asparajin dozları, 62,5 µM ile 9,91 mM varyasyon aralığına sahip 10 noktalı bir eğri oluşturmak için kullanılmıştır. Eğri üzerindeki her nokta üç kopyadan oluşmuştur. Elde edilen veriler, kinetik parametreleri belirlemek için Leone *et al.* (2005) göre SigrafW programına uygulanmıştır.

3.8 Agaroz ve Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE Analizi)

Gen örneklerinin elektroforetik çalışması için 100 mL Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu içerisinde 1 g agaroz kullanılarak %1 agaroz jel hazırlandı ve çalışma 120 V ve 100 mA altında gerçekleştirildi. Rekombinant JM103 L-ASP'nin heterolog ifadesini analiz etmek için kullanılan denatüre edici koşullar (SDS-PAGE) altında elektroforez için, %12'lik bir akrilamid yürütme jeli hazırlanarak; 3,15 mL su, 2,1 mL %40 bis akrilamid, 1,75 mL Alt Tris çözeltisi (4x) ve TEMED ve %10 APS'li 80 µL karışım. %3,5'lik istifleme jeli için şunlar kullanıldı: 2,17 mL damıtılmış su, 0,33 mL %40 bisakrilamid, 0,83 mL Üst Tris 4x ve 100 µL TEMED ve %10 APS eklenmiştir.

3.9 Eksize Edilmiş Agaroz Jelden veya Çözeltiden Gen Örneğinin Saflaştırılması

ReliaPrep DNA Temizleme ve Konsantrasyon Sistemi ticari kitinin üreticisinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış numunelerin miktarı, NanoDrop ekipmanı (ThermoScientific®) kullanılarak spektrofotometri ile belirlenmiştir.

3.10 Moleküler Dinamikler

3.10.1 Moleküler dinamik sistemler ve parametreler

JM103 L-ASP'nin kristalografik koordinatları, bu çalışmanın in silico aşamasında kullanılan sistemleri oluşturmak için substrat l-Asn ile kristalize edilen PDB kodu 3ECA'dan elde edilmiştir. Üç sistem bir araya getirilmiştir: doğal protein, çift mutant ve dörtlü mutant. Doğal sistem (vahşi protein) JM103 L-ASP tetramer, dört l-Asn, her monomerin her katalitik bölgesinde, 42,461 su molekülü ve 0,15M fizyolojik iyonik konsantrasyonu korumak için gerekli Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarından oluşur. İkili mutant sistem, G113D mutasyonları ve S118E'ye ek olarak, her monomerin her katalitik bölgesinde bir tane olmak üzere dört l-Asn, 43.964 su molekülü ve 0,15M fizyolojik iyonik konsantrasyon için Na⁺ ve Cl⁻ iyonları miktarından oluşuyordu. Üretilen tüm varyantlarda ortak olan G113D tersine çevrildiğinde diğer mutasyonların neden olacağı

rahatsızlığı gözlemlmek için kurulan dörtlü mutant sistemde, önceki sistemlerde olduğu gibi dört l-Asn, 43.967 su molekülü ve 0,15M fizyolojik iyonik konsantrasyonu koruyan Na⁺ ve Cl⁻ iyonları vardır. Mutasyonlar Pymol 2.3.4 kullanılarak yapılmıştır.

Başlangıçta, histidinlerin protonasyonunu doğrulamak için tüm yapılar H⁺⁺ programına (Anandakrishnan *et al.* 2012) gönderilmiştir. Tüm proteinlerin u kısımları yüklenmiştir. GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulation) paketi (Abraham *et al.* 2015, Hess 2008), sürüm 5.1.3, minimizasyon, DM simülasyonları ve analiz için kullanılmıştır. Tüm sistemler aynı enerji minimizasyonu, termalizasyon ve DM yörünge edinme aşamalarına tabi tutulmuştur. Enerji minimizasyonu en dik iniş algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hem termalizasyon hem de yörünge edinme aşaması için kullanılan parametreler arasında V-lek algoritması ile 310K'de kontrol edilen sıcaklık, basınç kontrol algoritması kullanılarak 1atm'de basınç bulunmaktadır (Berendsen *et al.* 1984); kuvvet alanı: GROMOS53a6; integratör: Leap-frog; kesme yarıçapı (rcut): 1,3 nm; SPC tipi su molekülleri (Berendsen *et al.* 1981). Protein (LINCS) ve su moleküllerinin (SHAKE) geometrisini korumak için LINCS algoritmaları (Hess, 2008). Periyodik sınır koşulları uygulanmıştır. Elektrostatik etkileşimleri düzeltmek için PME yöntemi (Essmann *et al.* 1995) kullanılmıştır. Yörüngeler her 1000 adımda bir toplanmıştır. Simülasyon kutusu, protein kenarları ve tüm eksenlerdeki kutu kenarları arasında 1,2 nm mesafe ile dodekahedraldir.

Termalizasyon adımı, proteinin etrafındaki su moleküllerinin organizasyonuna izin vermek için proteinin "dondurulmuş" atomik pozisyonları ile başlamıştır. İlk olarak, parçacık sayısının ve hacmin sabit tutulduğu ve sıcaklığın kontrol edildiği NVT'de 3 adım gerçekleştirilmiştir. İlk adım 5 bin adım ve her adım 0,0005 ps (dt), ikincisi 10 bin adım ve dt 0,001 ps ve üçüncüsü 10 bin adım ve dt 0,002 ps olarak gerçekleştirilmiştir. NVT'den sonra iyonlar eklenerek sonraki 3 adımda proteinlerin atomik pozisyonları "zld" ve kısıtlanmıştır (posre). Parçacık sayısının sabit olduğu, basınç ve sıcaklığın kontrol edildiği NPT'de, yukarıda NVT için açıklanan aynı adım sayısı ve dt protokolü izlenerek üç adım daha yapılmıştır. Daha sonra, yörünge edinme adımı 50 milyon adım ve 0,002 ps dt ile toplam 100 ns simülasyon içeren bir NPT topluluğunda gerçekleştirilmiştir.

Atomlar Arası Etkileşim Potansiyeli: GROMACS paketindeki gmx enerji programı, 1,3 nm'lik bir kesme yarıçapında simülasyon süresi boyunca sistemin Atomlararası Etkileşim Potansiyelini (PII) hesaplamak için kullanılmıştır. Toplam potansiyel, Lennard-Jones potansiyeli ve Coulomb elektrostatik potansiyelinin toplamından elde edilmiştir. l-Asn substratının katalitik bölge kalıntılarını (Thr12, Tyr25, Thr89, Asp90 ve Lys162) oluşturan mutasyona uğramış ve doğal atom grupları arasındaki PII'ler hesaplandı ve iki sistemin etkileşim enerjileri karşılaştırılmıştır.

3.10.2 Mutajenik primerler

Mutajenik primerler, pET-28a ekspresyon vektörüne klonlandıktan sonra doğal ansB genine mutasyonlar eklemek için tasarlanmıştır (Edelheit *et al.* 2009). Mutajenik primer tasarımı, nükleotidin tavlama sıcaklığını 5 ile 10°C artıran ve istenen mutasyonları içeren iki bölgeden oluşur (Liu and Naismith 2008).

Bu teknikle, geleneksel gen amplifikasyon tekniklerine göre daha uzun primerler üretilir. Mutajenik oligonükleotidlerin tamamlayıcı dizisi, eklenen mutasyonların genellikle yerleştirildiği yerdir, ancak alternatif olarak tek, çift, üçlü, dörtlü veya beşli mutasyonlar üretmek için her iki bölümde de düzenlenebilirler.

Fiocruz gruplarının fikri mülkiyeti olan ve kısa süre içinde patentlenecek olan mutajenik primerlerin nükleotid dizileri, bu çalışma için özel olarak oluşturulduğundan açıklanmayacaktır.

3.11 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

10 µM ileri ve ters primerler, 200 mM dNTP, 1 U GoTaq® DNA polimeraz enzimi ve tampon (5x) ve 10µL genomik DNA (~150 ng) kullanılarak, pET-28a'da üretilen ticari gen PCR ile çoğaltılarak ve 50 µL'lik nihai hacimle sonuçlandırılmıştır. Aşağıda listelenen denatürasyon, DNA renatürasyonu ve primer tavlama şemaları, 29 döngü için termo döngü parametrelerini belirlemek için kullanılmıştır:

- İki dakika boyunca 95°C.
- 60 saniye boyunca 95°C.
- 60 saniye boyunca 52°C.

Mutajenik PCR: Mutantların oluşturulması için reaksiyona 25 µL HF tamponu (5x), her biri 2,5 µL olan ileri ve ters primerler(10 µM), 4 µL dNTPs Karışımı, 1,5 µL dimetilsülfoksit (DMSO) ve 0,5 µL Phusion enzimi (1 U) eklenerek 50 µL nihai reaksiyon hacmi elde edilmiştir. Bu işlem ansB-pET-28a şablonu kullanılarak yapılmıştır. Primer tavlama, DNA renatürasyonu ve denatürasyon için aşağıdaki yaklaşım, 12 döngü için termo döngü ayarlarını ayarlamak için kullanılmıştır:

- Yarım dakika 98°C.
- Yarım dakika için 60°C.
- Otuz saniye veya üç dakika boyunca 72°C.

3.12 Kısıtlama Enzimi ile Plazmid Sindirimi

3.12.1 DpnI enzimi ile sindirim

Mutajenik PCR'dan sonra, yaklaşık 12 µL sonlandırılmış plazmid şablonu (pET-28a-ansBm) elde edilmiştir. Toplam 20 µL reaksiyon hacmi için bir mikrolitre endonükleaz enzimi DpnI (1 U), BSA (10x) ve Multicore tamponu (10x) eklenmiştir. Bu reaksiyon kombinasyonu 37 °C'de iki saat inkübe edildikten sonra enzim 70°C'de 15 dakika süreyle inaktive edilmiştir. İlgilenilen örnek daha sonra jelden saflaştırılmış ve 5 µL sindirilmiş DNA'nın tamamı artı Gel-Red (5x seyreltilmiş) içeren 1 µL örnek tamponu, 7 µL 1 Kb moleküler ağırlık işaretleyicisi ile %1 agaroz jel elektroforezine (madde 5.6) gönderilmiştir.

3.12.2 *Bam*HI ve *Hind*III kısıtlama enzimleriyle sindirim

1 μ L *Bam*HI ve *Hind*III endonükleazları (her biri 10 U), 20 μ L son hacim, 2 μ L 10x Sığır Serum Albümini (BSA), 2 μ L Multicore tamponu (10x) ve 1 μ g plazmid DNA ile, bir PET-28A-Histag ifade eden proteinin N-terminal kısmına eklenen ifade vektörü pET-28 bir sindirim reaksiyonundan geçirilmiştir. Reaksiyon daha sonra bir su banyosunda 37°C'de üç saat boyunca ve buna ek olarak Restriksiyon enzimlerini inaktif hale getirmek için 70°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.

Sindirimin ardından, plazmid alkalın fosfataz (5U) ile enzimatik olarak muamele edilmiş, 20 μ L sindirim işlemine 1 μ L enzim ve 10x fosfataz tamponu (10x) eklenerek toplam 25 μ L reaksiyon hacmi elde edilmiştir. 37°C'de bir saatlik inkübasyon ve 65°C'de on beş dakikalık enzim inaktivasyonundan sonra reaksiyon karışımı dinlenmeye bırakılmıştır.

Bundan sonra, sindirilmiş DNA'nın tamamı beş kez seyreltilmiş Gel-Red içeren bir örnek tamponuna eklenmiş ve daha sonra bir kilobaz içeren yedi mikrolitre moleküler ağırlık işaretleyicisi kullanılarak %1 agaroz jel elektroforezinden geçirilmiştir. İlgilenilen numune bir transluminatörde hızla görülmüş ve ardından jelden saflaştırılmıştır.

3.13 Plazmid Vektörüne Bağlantı Ekleme

DNA ligaz A enziminin üreticisi, bir pET-28a vektör bağlama reaksiyonu için ne kadar doğal ansB eki kullanılacağını belirlemek için aşağıdaki denklemin kullanılmasını tavsiye etmiştir.

Bu hesaplama dayanarak, 3 μ L ansB insertine (80 ng), 2 μ L ligaz tamponuna (10x) ve 1 μ L ligaz enzimine (1U) yaklaşık 100 ng'ye eşdeğer olan 7 μ L pET-28a vektörü eklenerek 20 μ L'lik bir nihai hacim elde edilmiştir. 4°C'de bir gecelik inkübasyon süresinden sonra, ligaz enzimi 65°C'de 15 dakikalık bir ısı işlemiyle inaktif hale getirilmiştir.

3.14 Plazmid DNA'nın Ekstraksiyonu (Miniprep)

Üreticinin kılavuzundaki talimatlar takip edilerek, bu çalışmada kullanılan plazmit vektörlerinin ekstrakte edilmesi için Promega® Wizard Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma Sistemleri'nden ticari olarak temin edilebilen bir kit kullanılmıştır. Ayrıca, bu deneysel aşamayı takiben, plazmitlerin miktarını belirlemek için bir NanoDrop cihazı (ThermoScientific ®) kullanılmıştır.

3.15 Kimyasal Yöntemle Bakteriyel Yeterlilik

Kimyasal yeterlilik *H. pylori*, *Escherichia coli* JM103 ve *Rosetta* bakteri suşları üzerinde 0,1 M ve 0,1 M magnezyum ve kalsiyum klorür içeren tuzlu su çözeltileri kullanılarak test edilmiştir. İzole edilen kolonilerden elde edilen her suşun ön inokulumları antibiyotiksiz Luria Bertani Broth Miller (LB) besiyerinin 5 mL'lik hacimlerinde yapılmış ve tüm gece boyunca 37°C'de 200 rpm çalkalama ile inkübe edilmiştir. Her bir ön inokulumdan 5 mL, 300 mL antibiyotiksiz LB'ye eklenmiş ve karışım daha sonra ön inokulum 600 µm'de 0,5 optik yoğunluğa (OD) ulaşana kadar (yaklaşık 3 saat) 37°C ve 200 rpm'de inkübe edilmiştir.

O.D. elde edildikten sonra, bakteri hacmi kültürü 4°C'de 5000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve hücre peleti (pellet) 40 mL buz gibi magnezyum klorür içinde hücre resüspansiyonu için ayrı tutulmuştur. Süpernatant daha sonra 4°C'de ve 3000 x g'de on dakika boyunca gerçekleştirilen bir başka santrifüj işleminden sonra atılmıştır. Bakteriler 20 dakika buz üzerinde dinlendirildikten sonra, pelet bir kez daha, bu kez 2 mL soğuk CaCl₂ ile yeniden süspanse edildi. Ardından 1 mL %25 gliserol eklenmiştir. 100 µL'lik alikotlar, daha önce soğutulmuş olan 1,5 mL'lik tüplerde -80 °C'de tutulmuştur.

3.16 Kemoterapiye Uygun Bakterilerin Dönüşümü

Yerli ve mutant pET-28a-ansB vektörleri, 100 uL'lik nihai hacim için negatif kontrol olarak ultra saf su kullanılarak 50 uL bakteri *H. pylori* ve *Escherichia coli* JM103'ü

dönüştürmek için kullanılmıştır. Buz üzerinde 30 dakika kaldılar, ardından 42°C'de kuru bir banyoda 1 dakika bırakıldıktan sonra termal şok uygulamak için 2 dakika daha buzda bekletilmiştir. 900 µL LB ortamı, 37°C'de ve 200 rpm'de 1 saat boyunca çalkalama altında bir rejenerasyon süresi boyunca bakterilere ilave edilmiştir. Daha sonra bakteriler 5 dakika boyunca 7000 x g'de santrifüjlendikten sonra, süpernatanın bir kısmı atıldı ve pelet, kalan çözeltinin yaklaşık 50 µL'sinde yavaşça homojenleştirilmiştir.

Homojenat, ilgili antibiyotiği kanamisin (40 µg/mL) içeren 10 mL LB agar ortamına yerleştirildikten sonra bakteriyolojik bir inkübatörde gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Plazmid DNA ekstraksiyonu ve miktarının belirlenmesinden sonra genomik materyal, Recife'deki Fiocruz PE ünitesine otomatik nükleotid dizilimi için gönderilmiştir. Sıralama analizinden sonra yukarıda bahsedilen ansB-pET-28a vektörleri, önceki paragrafta açıklanan protokolü benimseyerek *H. pylori* ve *Escherichia coli* ve *Rosetta* ekspresyon suşlarını dönüştürmek için kullanılmıştır. Mutasyonlar ve doğal gen için pozitif olan *H. pylori* ve *Escherichia coli* JM103 ve *Rosetta* bakterilerinin 1 mL'lik alikotları, %25 gliserol ile -80°C'de saklanmıştır.

3.17 Klonlama Tanısı için Dönüştürülmüş Kolonilerin PCR'si

Kemoterapiye uygun bakteriler *H. pylori* ve *Escherichia coli* JM103'ün rekombinant plazmit ansB-pET-28a ile dönüştürülmesinden sonra koloniler seçilmiş ve 22,5 µL Master Mix (tampon karışımı, dNTP'ler, magnezyum ve DNA polimeraz) kullanılarak bir koloni PCR'ye gönderilmiştir. Biometra® termocycler'da kullanılan parametreler şunlardır:

- 95°C'de 2 dakika
- 95°C'de 30 saniye
- 55°C'de 30 saniye
- 72°C'de 30 saniye
- 72°C'de 10 dakika

Adımlar II ile IV, toplam 30 döngü olmak üzere 29 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra bantları UV ışığıyla görselleştirmek için bir agaroz jel elektroforezi (%0,8 h/h) yapılmış ve ardından kanamisin dirençli antibiyotik (40 µg/mL) içeren LB ortamında (5 mL) ön inokulum hazırlanarak gece boyunca 37°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Rekombinant DNA'nın ekstraksiyonu belirlenerek Recife'deki Fiocruz-PE ünitesinde otomatik nükleotid dizilimi için gönderilmiştir. Pozitif koloniler -80°C'de %20 gliserol içerisinde saklanmıştır.

3.18 Bakteri Sisteminde Heterolog İfade

AnsB-pET-28a yerli vektörleri ve mutantlar kullanılarak dönüştürülen LB agar plakaları üzerindeki bakteri kolonileri, 34 ug/mL kloramfenikol ve 40 ug/mL kanamisin ile birlikte 5 mL LB ortamına eklenmiştir. Karışım daha sonra bütün gece boyunca 37°C'de 200 rpm inkübe edilmiştir. İfade tahlili için, 1 mL yetiştirilen bakteri kültür ortamına, 50 mL LB ortamına %1 (h/h) MgCl₂ (0,1 M), ayrıca 80 µL kanamisin (40 µg/mL), 50 µL kloramfenikol (34 µg/mL) eklenmiştir. Bu kültür hacmi, 0,5 ile 600 nm arasında DO'ya ulaşana kadar 37°C'de ve 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Ekspresyon indüksiyonu, kültür ortamının 30°C'de 4 saat boyunca 200 rpm rotasyon altında inkübe edilmesiyle 0,5 mM izopropil-p-D-tiyogalaktopiranoz (IPTG) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Testin her saatinde, 600 nm'de OD ölçümüne ek olarak 1 mL'lik kısımlar çıkarılmış, ardından oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 7,000 x g'de santrifüj yapılmıştır. Daha sonra, süpernatant atılarak pelet -20°C'de saklanmıştır.

3.19 Hücre Lizizi

Hücre lizizi, Hielscher Ultrasonics GMBH©'dan bir ultrasonik işlemci UP50H kullanılarak sonikasyon yoluyla (%50 genlik, döngü 1) mekanik olarak gerçekleştirilmiştir. Pelete yaklaşık 10 mL lizis tamponu (50 mM Tris ve 20 mM İmidazol (pH 8,0) içeren 300 mM NaCl), 20 µL Triton X100 ve 100 ul PMSF (0,03 mM) ilave edilmiştir. *E. coli*, doğal ansB-pET-28a ile dönüştürülmüştür, yavaşça yeniden süspansiyon edildikten sonra prosedüre uygun olarak buz banyosunda dinlendirilmiştir.

Numune, homojen bir hücre karışımı elde edilene kadar 30 saniyelik döngüler ve 20 tekrarlamayla sonikasyon adımıyla ilerlemiştir. Hücre lizatı, hücre kalıntılarını ayırmak ve protein ekstraktını (çözünür fraksiyon) kurtarmak için 4°C'de 30 dakika boyunca 10,000 xg'de santrifüjlenmiş ve lizatın 100 uL'lik bir kısmı, elektroforezde (SDS-) kullanılmak üzere ayrı olarak santrifüjlenmiştir.

3.20 Rekombinant L-Asparaginazın Saflaştırılması

3.20.1 Hareketsizleştirilmiş metaller için afinite kromatografisi (IMAC)

Rekombinant L-asparaginazın saflaştırma işlemi için, 3 yıkama tamponu (300 mM NaCl ve 25, 50, 100 mM imidazol içeren 50 mM Tris) ve elüsyon tamponu (300 mM NaCl, 50 mM Tris) hazırlanmıştır. Tris ve 250 mM imidazol, her ikisi de pH 8,0'da. Nikel iyonu (Ni²⁺) ile konjuge edilmiş agarozdan oluşan yaklaşık 2 mL HisTrapTMHP (GE®) kolonu, içinde saklandığı kalıntı alkolün uzaklaştırılması için 5 mL MilliQ su ile yıkandıktan sonra lizis tamponu ile dengelenmiş ve yaklaşık olarak inkübe edilmiştir. 10 mL protein ekstraktı 1 saat boyunca bir buz banyosunda ve 100 rpm'de yörüngesel çalkalama altında bırakılmıştır.

Daha sonra, bu hacim plastik bir desteğe yerleştirilmiş ve ilk olarak 25, 50 ve 100 mM imidazolden oluşan hilal şeklinde bir gradyan içinde yaklaşık 35 mL yıkama tamponu ile kromatografik işlem başlatılmıştır. 250 mM imidazol ile elüsyon yapılarak yaklaşık 7 mL saflaştırılmış fraksiyonun kurtarılmıştır. Denatüre edici poliakrilamid jelde uygulamaya kadar 4°C'de saklanmıştır. 300 mM imidazol içeren tampondaki elüsyon fraksiyonu, 50 mM Tris tamponu ve 300 mM NaCl (pH 8,0) içerisinde diyalize edilmiş ve 10 kDa membranlı Vivaspın (GE Healthcare®) yardımıyla yaklaşık 5 mL'de konsantre edildikten sonra 100 mM'de -80°C'de saklanmıştır.

3.21 Protein Ölçümü

Protein ölçümü, üreticinin kılavuzunda belirtildiği gibi ticari tampon ve florofordan oluşan bir reaksiyon karışımına (üçlü reaksiyonlar) 5 µL protein örneğinin eklendiği Invitrogen® Quibit Protein Test kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Okuma bir Qubit® Florometre ekipmanında yapılmıştır.

3.22 Dairesel Dikroizm

JM103 L-ASP CD analizi, bir Jasco® dairesel dikroizm spektrofotometresinde, protein 20 mM fosfat tamponunda (pH 7) yaklaşık 200 ug/mL konsantrasyonda olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan CD spektrumu, proteinin ikincil yapısının çoğunu sağlayan bir aralık olan 190 ile 240 nm arasındaki "uzak-UV" toplama sapmaları olarak belirlenmiştir.

3.23 Ökaryotik Hücrelerin Yetiştirilmesi

Bu çalışmada sitotoksosite ve hücre canlılığı değerlendirme analizlerinde benimsenen tümör hücre çizgileri Raji (insan B lenfosit) ve HL60 (insan miyeloid lösemik) hücreleridir. Raji ve HL60 hücreleri, l-glu ve l-Asn (2 mM), HEPES (10 mM), sodyum piruvat (1 mM), 4500 mg glukoz, 1500 mg sodyum bikarbonat, %10 fetal sıgır içeren RPMI 1640 ortamında kültürlenmiştir. Kültürler, her 2-3 günde bir kültür ortamı değiştirilerek muhafaza edildikten sonra, 1200 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve konsantrasyon sırasıyla 4 x 10⁵ ve 3 x 10⁵ hücre/mL'ye ayarlanmıştır.

3.24 Sitotoksosite Değerlendirmesi

L-asparaginazın tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, sarımsı renkli bir tuz olan 3-(4,5-dimetil-2-tiyazol) 2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) ile oksidasyon tahlili ile tahmin edilmiştir.

Kültürlenen HL60 ve Raji tümör hücreleri, iki farklı L-asparaginaz konsantrasyonuna (40 ve 100 µg/mL kültür ortamı) tabi tutulmuştur. 100 uL hücrenin $0,3 \times 10^6$ hücre/mL konsantrasyonda inkübasyonu, 96 oyuklu plakalarda 37°C'de ve %5 CO₂'de 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Bu sürenin sonunda 200 µL MTT solüsyonu eklenerek plak 3 saat fırında inkübe edildikten sonra 20°C'de 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant atılmış ve pelet, 200 uL DMSO içerisinde yeniden süspansiyon edilerek plaka, 20 dakika boyunca bir homojenleştiricide tutulmuştur.

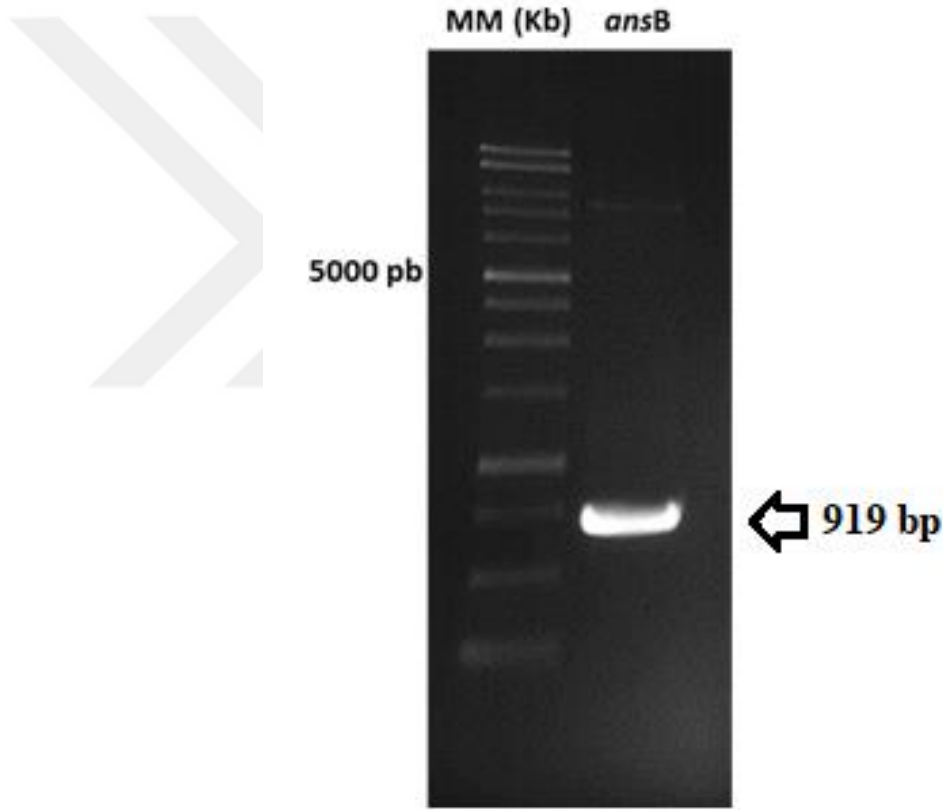
Absorbans okuması bir BeckmanCoulter® Multimode Detector DTX 880 spektrofotometresinde 595 nm dalga boyunda (λ) alınmış ve veriler GraphPad Prism v 5.0 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

JM103 L-ASP'nin sitotoksik gücüne en duyarlı tümör hattının belirlenmesinin ardından, 40 µg/mL'lik (üç kopya) başlangıç konsantrasyonundan başlayarak hücre büyümesinin önleyici gücünü değerlendirmek için proteinin seri seyreltmeleri benimsenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Yerli ansB Geninin bir Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

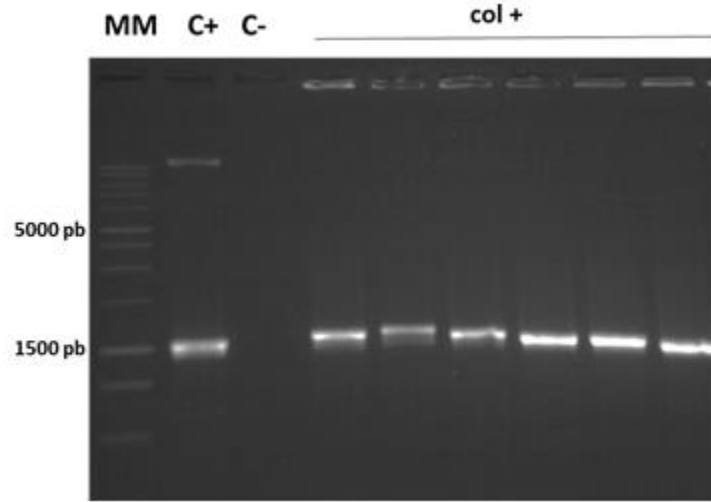
Genbank'ta belirtildiği gibi, ansB genini kodlayan L-ASP proteini (JM103 L-ASP) 919 bp'ye (gen ID: 947454) sahiptir. Yaklaşık boyut, pET28a vektöründe ansB genini güçlendiren PCR reaksiyonunu kanıtlayan %1 agaroz jel l'deki bant gösteriminden açıkça görülmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Elektroforetik analiz ve sB gen amplifikasyonu

Kemoterapiye uygun dönüşümün ardından *H. pylori* ve *Escherichia coli* JM103 bakterisi ile ansB geninin pET-28a vektörüne ligasyon ürünü ile test edilmiştir. Genin plazmide doğru şekilde yerleştirildiğini doğrulamak için büyütülmüş 6 koloninin PCR'si gerçekleştirilmiştir. T7 Fw ve Rv primerleri, yakındaki bir plazmit bölgesinde genin

yanında yer alır, bu nedenle amplifiye genomik ürünün, yaklaşık 1500 bp'lik ansB geninden biraz daha büyük bir boyuta sahip olması beklenir (Şekil 4.2)

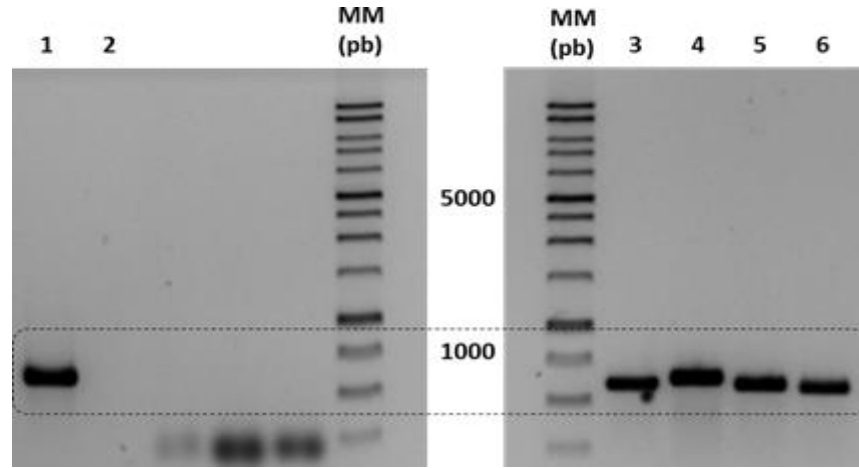


Şekil 4.2 pET-28a vektöründe ansB gen ligasyonu ile dönüştürülmüş kolonilerin elektroforetik PCR analizi

Daha önce belirtilen prosedür izlenerek altı pozitif koloninin rekombinant plazmidi (ansB-pET-28a) ekstre edilmiştir. Genomun dizilenmesinin ardından doğru nükleotid dizisi doğrulanmış ve JM103 L-ASP varyantlarının üretimindeki sonraki adımların kalıp plazmidi kullanılarak gerçekleştirilmesine olanak sağlanmıştır.

4.2 Bakterilerden L-Asparaginaz Mutantlarının Üretimi

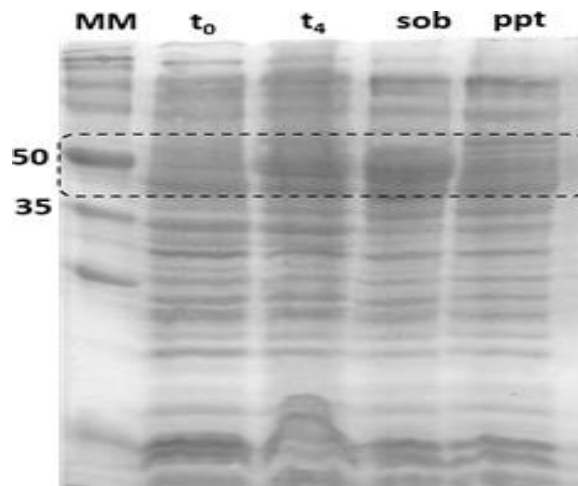
JM103 L-ASP'nin dört varyantı, önceki bölümde açıklandığı gibi mutajenik PCR'den üretilmiştir. İlgili mutasyonların eklenmesi, otomatik nükleotid dizilimi ile doğrulanmıştır. Şekil 4.3'te klonlar için ansB-pET-28a'nın rekombinant plazmitleri ile dönüştürülmüş pozitif kolonilerin elektroforetik profili gösterilmektedir.



Şekil 4.3 PET28a vektöründe klonlanan mutasyona uğramış ve B genleri ile dönüştürülmüş kolonilerin elektroforez PCR analizi

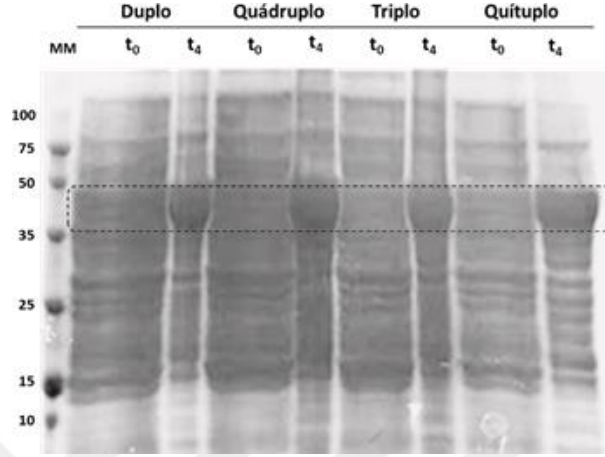
4.3 Prokaryotik Sistemde Heterolog Ekspresyon ve Doğal ve Mutant L-Asparaginazın Saflaştırılması

KEGG veritabanında öngörülen JM103 L-ASP'nin birincil dizilimi 348 amino asite sahiptir, bu da 36,85 kDa'lık belirgin moleküler ağırlığına karşılık gelir. PET28AHis'in 16,65 kDa'sı olduğunu düşünürsek, bu çalışmada kullanılan doğal protein yaklaşık 53 kDa'ya sahiptir. Şekil 4.4'te, JM103 L-ASPET 28a'nın ifadesine karşılık gelen profil görülmektedir



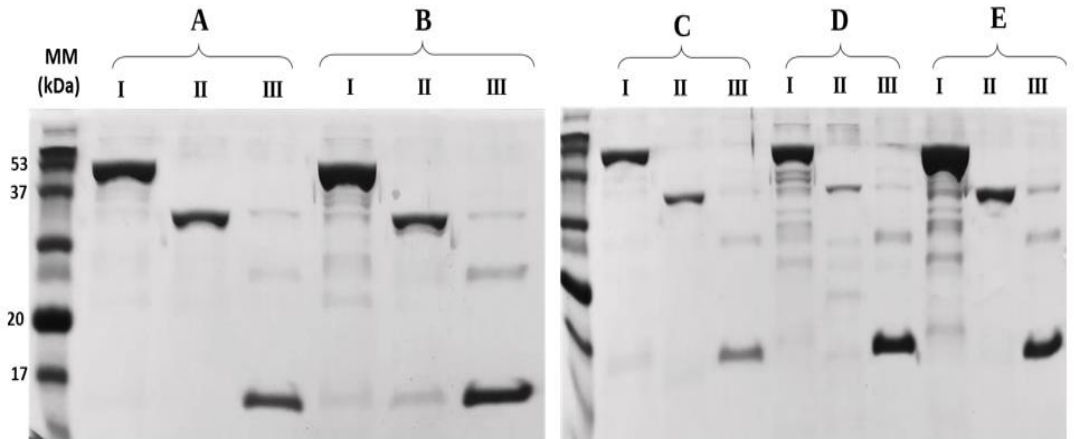
Şekil 4.4 Bakteriyel sistemde PET-28A-Histag ile ilişkili JM103 L-ASP'nin heterolog ekspresyonuna sahip poliakrilamid jel

Doğal enzimin ifadesinin yanı sıra, dört mutant JM103 L-ASP pET-28a -Hi'ler aynı bakteri sisteminde eksprese edilmiştir ve Şekil 4.5'te gösterildiği gibi doğal olanla aynı görünen boyuta (yaklaşık 50 kDa) sahiptir.



Şekil 4.5 JM103 L-ASPPET-28A- His'in dört varyantının heterolog ekspresyonunun poliakrilamid jeli

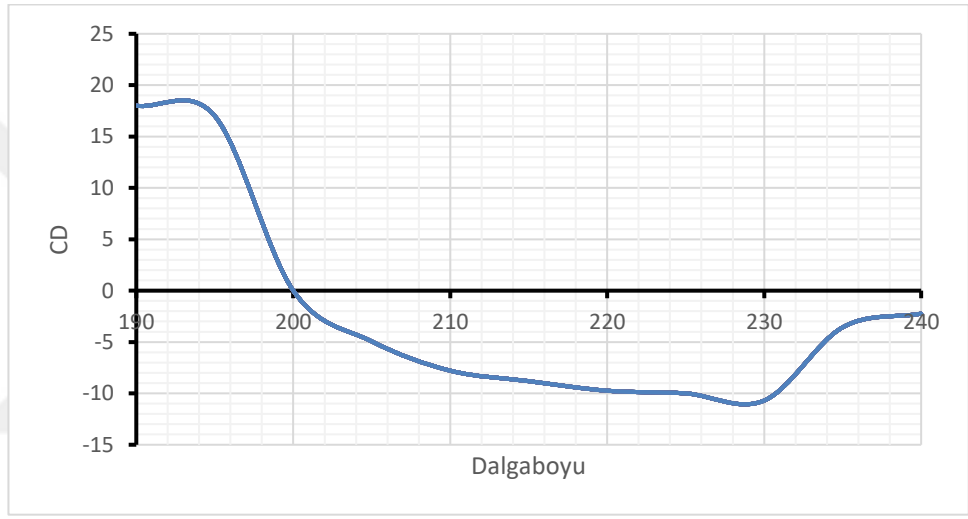
PET-28A-His'in saflaştırılmasından sonra protein, 35 kDa civarında görünür bir boyut sergileyerek PET-28A kuyruğunun Ulp1 tarafından enzimatik bölünmesine tabi tutulmuştur. Doğal formundaki rekombinant protein gibi, mutasyona uğramış dört varyantının da PET-28A- His kuyruğu Ulp1 tarafından enzimatik olarak yarılmıştı ve JM103 L_ ASPPET-28A-His'e benzer bir boyut modeli göstermiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Yerli JM103 L-ASP PET-28A-His poliakrilamid jeli ve varyantları

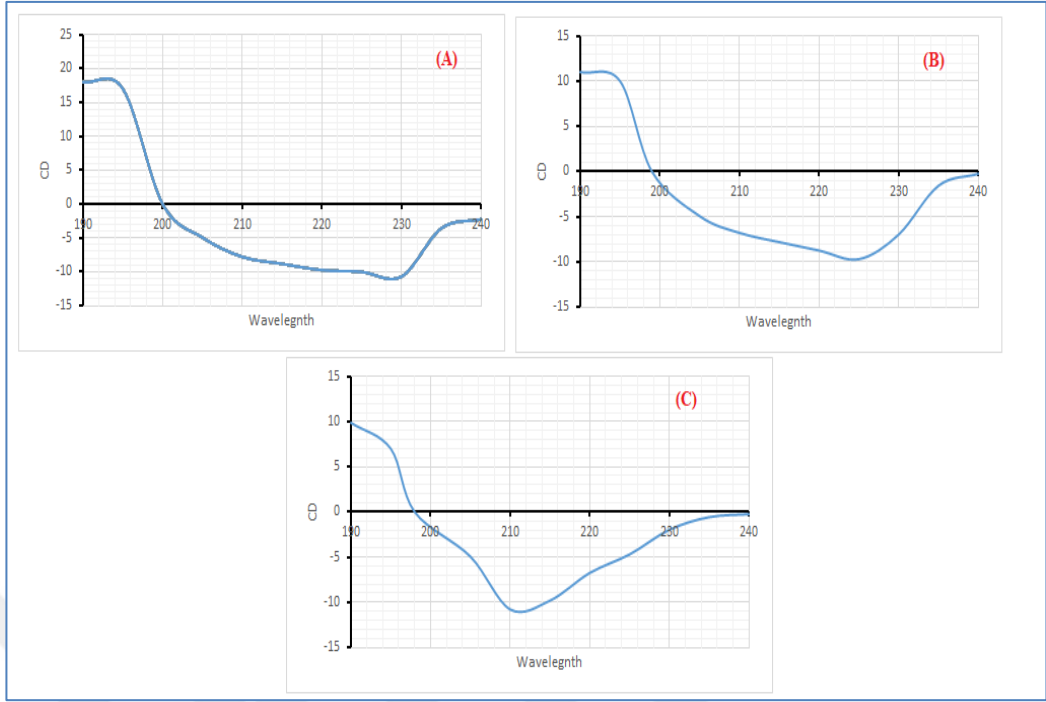
4.4 Dairesel Dikroizm

Dairesel Dikroizm (CD), proteinlerin konformasyon ve stabilitesini analiz etmek için yaygın olarak kullanılan ve ikincil yapıları hakkındaki verileri açığa çıkaran bir spektroskopi tekniğidir (Greenfield 2006). Yerel LASP ile yapılan CD analizi, çözeltideki proteinin ikincil yapısını tanımlamıştır. Şekil 4.7'de gösterilen spektrum, 208 ve 22 nm'de iki negatif eliptik dalga boyunu ve 195 nm'de pozitif eliptik bandı göstermektedir. Bu sonuç, Yao *et al.* (2020) tarafından belirlenen sonuçlar ile uyumluluk göstermektedir.



Şekil 4.7 JM103 L-ASP dairesel dikroizm spektrumu

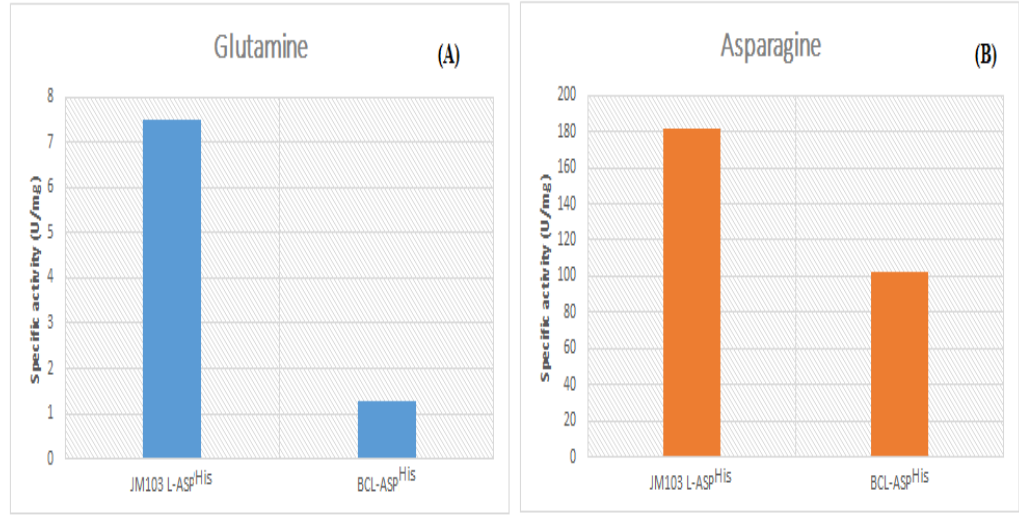
Yukarıda açıklanan spektrum profili, Şekil 4.8'de gösterildiği gibi JM103 L-ASP'nin çift, üç ve beş kat varyantlarını tekrarlamış ve Yao *et al.* (2020) tarafından belirlenen sonuçlarla uyumluluk göstermiştir. Bu nedenle, proteinin amino asit dizisine eklenen mutasyonlar ikincil yapısını etkilemeyerek α -heliks zenginliğini korumuştur.



Şekil 4.8 Mutasyona uğramış üç JM103 L-ASP varyantının dairesel dikroizm spektrumu

4.5 Asparaginaz ve Glutamin Aktivitesi

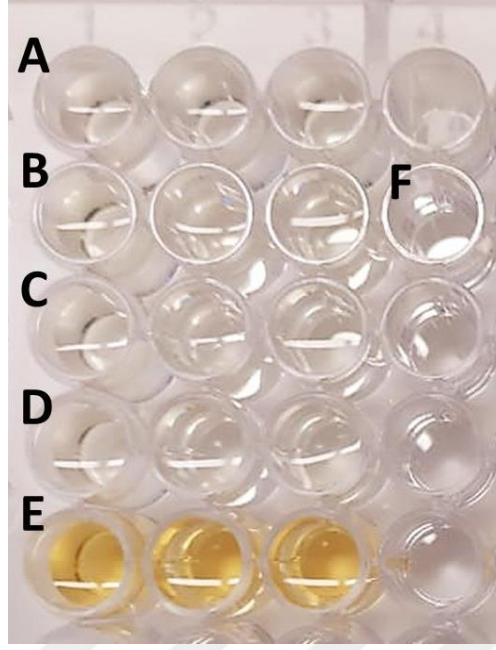
L-asparaginazın glutamin aktivitesinin, bu biyofarmasötiği sürekli kullanan hastalarda aşırı duyarlılık reaksiyonları ve pankreatit gelişimi ile ilişkili sitotoksik etkinin faktörlerinden biri olduğu belirlenmiştir (El-Naggar *et al.* 2014). JM103 L-ASP His'in spesifik glutamin aktivitesi 7,14 U/mg ve asparajinaz aktivitesi ise 183,5 U/mg proteindi. Şekil 4.9'da gösterilen *Bacillus subtilis*'ten (BCL-ASP His) L-ASP'nin spesifik aktivitelerine ilişkin Gomes (2019) tarafından elde edilen verilerle karşılaştırıldığında, rekombinant proteinin hem asparajin hem de glutamin substratı açısından *B. subtilis*'ten elde edilen rekombinant proteinden daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.9 Asparajin ve glutamin substratları için JM103 L-ASP'ye spesifik aktivitesi

ASP His ile glutamin katalizine ilişkin veriler, Narta *et al.* (2007) tarafından elde edilen sonuçları desteklemektedir. L asparaginaz tarafından glutamin kullanımının enzimin toplam aktivitesinin yaklaşık %2 ile 10'unu temsil ettiğini belirtmektedir. Bu çalışmada JM103 L-ASP His'in oranı %4'e olarak belirlenmiştir.

Bu sonuç, mutasyona duyarlı amino asitlerin belirli sıcak noktalarını belirleyen ve azalmayı ima eden in silico tahminlerine dayanan işletim araçları olarak sahaya yönelik mutajenez yaklaşımlarını kullanarak, daha düşük immünojenik potansiyele sahip bir L-asparaginazın geliştirilmesine yönelik araştırmanın önemini güçlendirmiştir. Kullanılan her mutantın konsantrasyonu 3,42 ile 19,56 µg/mL arasında değişen JM103 L-ASP PET-28A-His varyantlarının işlevselliğini doğrulamak için bir başlangıç enzim aktivite deneyi yapılmıştır. Şekil 4.10'da görülebileceği gibi, yalnızca doğal enzim L-Asn'yi katalize etmiş ve Nesslerizasyon kolorimetrik tahlili ile tespit için yeterli amonyum iyonu üretmiştir. Kuyucuklardaki kolorimetrik dönüşümsüzlük ise ikili (A), üçlü (B), dörtlü mutantlar (C) ve beş kat (D) mutasyona uğramış amilohidrolazların katalizinin olmadığını kanıtlamıştır.



Şekil 4.10 JM103 L-ASP PET-28A-His enzim aktivite testi ve Nesslerizasyon ile dört varyantı. (A) Çift mutant; (B) Üçlü mutant; (C) Dörtlü mutant; (D) beşli mutant; (E) yerli JM103 L-ASP PET-28A-His ve (F) negatif kontrol

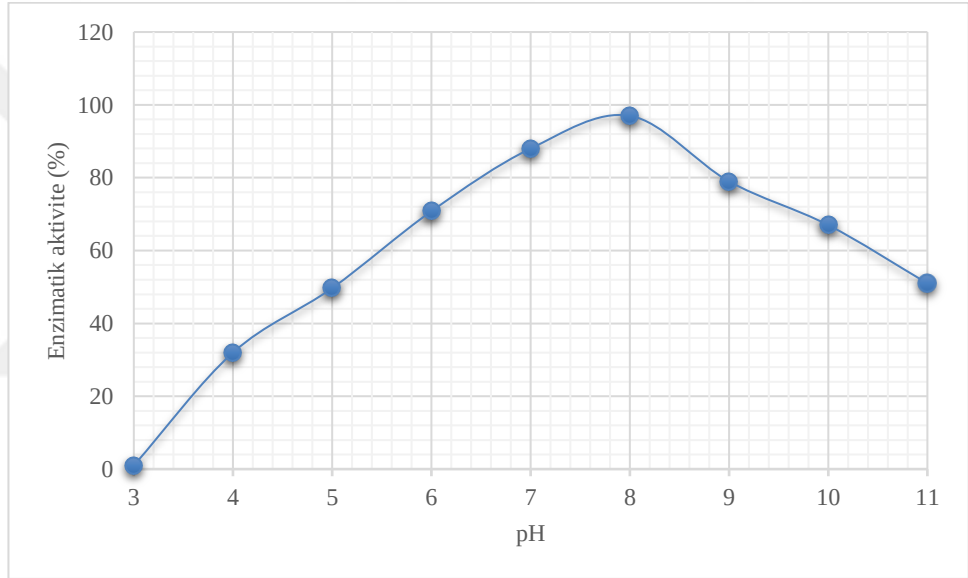
Çift mutantın, JM103L-ASP'nin diğer üç varyantıyla G113D mutasyonunu paylaştığı göz önüne alındığında, katalitik aktivitenin yokluğuna ilişkin hipotez, bu modifikasyonun, enzimin aktif bölgesini, etkiyi etkileyecek şekilde olumsuz yönde etkileyeceği şeklinde olacaktır. Bu noktadan itibaren JM103 L-ASP'nin protein yapısının, çift mutantta mevcut olan iki mutasyonun yanı sıra üretilen diğer mutasyonlarla birlikte *in silico* değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir.

4.6 pH ve Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Bir proteinin maruz kaldığı pH (veya bir pH aralığı) ve sıcaklık, onun katalitik aktivitesinde önemli faktörlerdir. Aktif cebin veya yapısının korunmasında önemli rol oynayan proteinin hem aktif bölgesinden hem de diğer lokasyonlarından gelen amino asit yan zincirleri, belirli bir iyonizasyon durumunun korunması için zayıf asitler veya bazlar olarak işlev görebilir (Nelson *et al.* 2008). Minimal sıcaklık değişimleri, atmosferik basınç (1 atm) altındayken, sulu reaksiyon sistemleri gibi bir kimyasal sistemin entropisini etkiler. Enzimleri içeren reaksiyonlar, kendilerini oluşturan amino asitlerin atomları arasındaki bağlanma enerjisi gibi özellikler göz önüne alındığında, bu tür

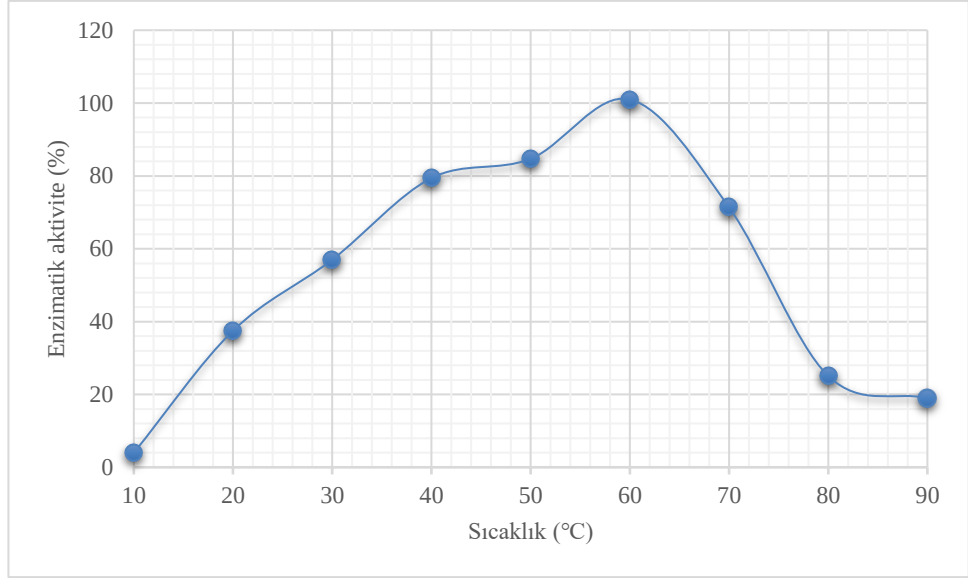
Çevresel bozukluklara karşı özellikle hassastır, dolayısıyla katalitik verimliliklerini etkileyebilir.

Şekil 4.11'de görülebileceği gibi, JM103 L-ASP His, Vidya *et al.* (2011) tarafından elde edilen sonuçlardan farklı olarak pH 8,5'te maksimum katalitik aktivite göstermiştir. Optimal pH'ı 6,0 olarak belirlemiştir. Buna karşın, Khushoo *et al.* (2004) tarafından pH 7,0 olarak tespit edilmiştir. Bu tür farklılıkların, diğerlerinin yanı sıra, analizlerde kullanılan tamponların etkisiyle, enzimatik aktiviteyi lme yöntemiyle, proteinlerdeki modifikasyonların ve etiketlerin varlığıyla açıklanabilir.



Şekil 4.11 Farklı pH değerlerinde JM103 L-ASP enzimatik aktivitesi

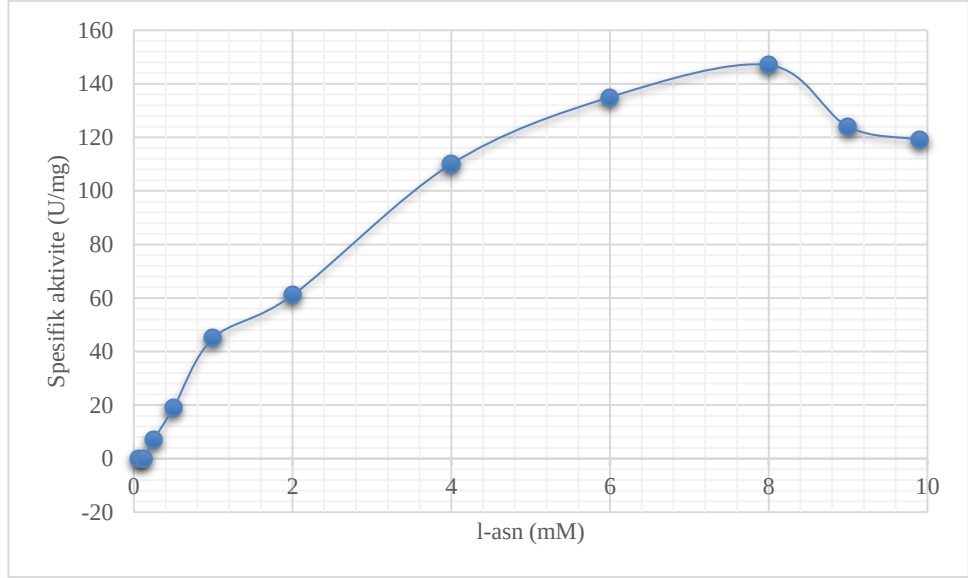
ASPHis aktivitesi üzerindeki etkisi ile ilgili olarak, Şekil 4.12, ulaşılan 60°C'lik ideal sıcaklığı göstermektedir. Bu sonuç Vidya *et al.* (2011), muhtemelen daha önce bahsedilen nedenlerin bir sonucu olarak 40°C'nin ideal sıcaklık olduğunu bulmuştur.



Şekil 4.12 Farklı sıcaklıklarda JM103 L-ASP enzimatik aktivitesi

4.7 Enzim Kinetiği

Kinetik eğri tahlili, katalitik bölgelerin tamamen doymuş olduğu noktaya kadar çeşitli substrat konsantrasyonlarına karşı sabit sıcaklıkta ve ideal pH'da enzimin hidrolitik kapasitesini belirlemeyi amaçlar. Nelson *et al.* (2008)'a göre, belirli bir substratın K_m 'si, başlangıçtaki enzimatik reaksiyon hızının maksimum hızın yarısına eşit olduğu konsantrasyondur. Siegel (2016), bu fikrin iki farklı enzimin katalitik etkinliğini karşılaştırmak için de kullanılabileceğini, K_m değerinin ne kadar büyük olursa substrat afinitesinin daha düşük olduğunu gösterdiğini belirtir. Şekil 4.13'te görülebileceği gibi, JM103 L-ASPHis 8 mM L-asparajinde platoya ulaşır, bu da substratın enzimin tüm katalitik ceplerini doyurduğunu gösterir. Sonuç olarak, kinetik hesaplamaları yapmak için Sigraf yazılımı kullanıldı; bu, Willis and Woolfolk (1974)'un gösterdiğine benzer şekilde, 168,2 $\mu\text{mol/dak/mg}$ 'lik bir V_{max} ve 3 mM'lik bir K_m değeri ortaya çıkarmıştır.



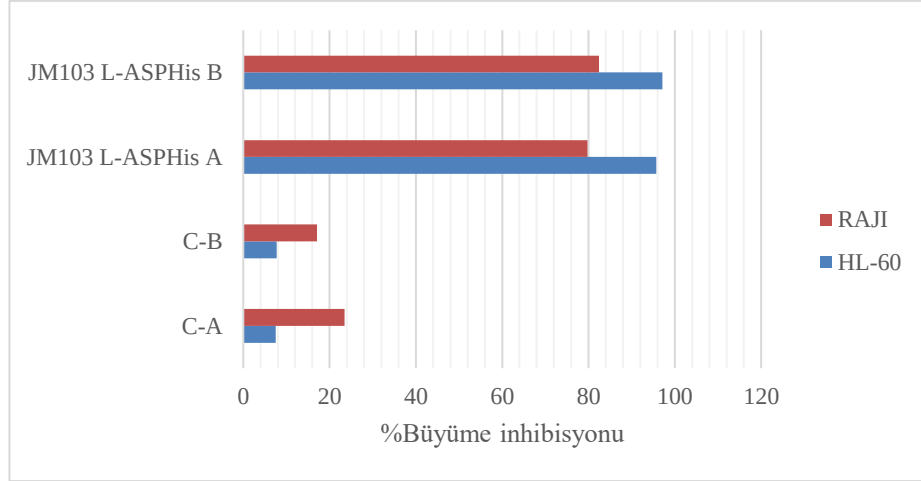
Şekil 4.13 JM103 L-ASP enziminin kinetik eğrisi

4.8 İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (IC50)

IC50, hücre büyümesini %50 oranında azaltan belirli bir bileşiğin konsantrasyonu olarak tanımlanır (Brody and Dixon 2018). Bu denemede IC50, en az iki bağımsız denemenin ortalamasından ölçülmüştür. HL60 hücre hattı için JM103 L-ASP His'in inhibitör etkisi Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi Raji hücrelerine uygulanan ortalama %80'lik bir önleyici etkiye sahipken, %95'in üzerindeki oranlara ulaşmıştır. Bu çalışmada test edilen hatlar arasındaki toksisite farkı (Şekil 4.14), ASNS enziminin Raji hücreleri tarafından artan ekspresyonuyla açıklanabilir (Yan *et al.* 1998), bu da bu hücrelerin L-Asn geri bildirimine yol açarak sonuç olarak bir l-Asn geri bildirimine yol açacaktır.

Çizelge 4.1 İki tümör hücre hattında L-asparaginazın inhibisyon profili

Örnek	HL-60	RAJI
Kimlik	İnhibisyon yüzdesi ±standart sapma	İnhibisyon yüzdesi ±standart sapma
CA- C-B	7,48±3,50 7,75±4,04	23,46±7,3 17,07±11,0
JM103 L-ASP ^{His} A	95,72±0,94	79,79±2,11
JM103 L-ASP ^{His} B	97,16±0,27	82,45±1,25

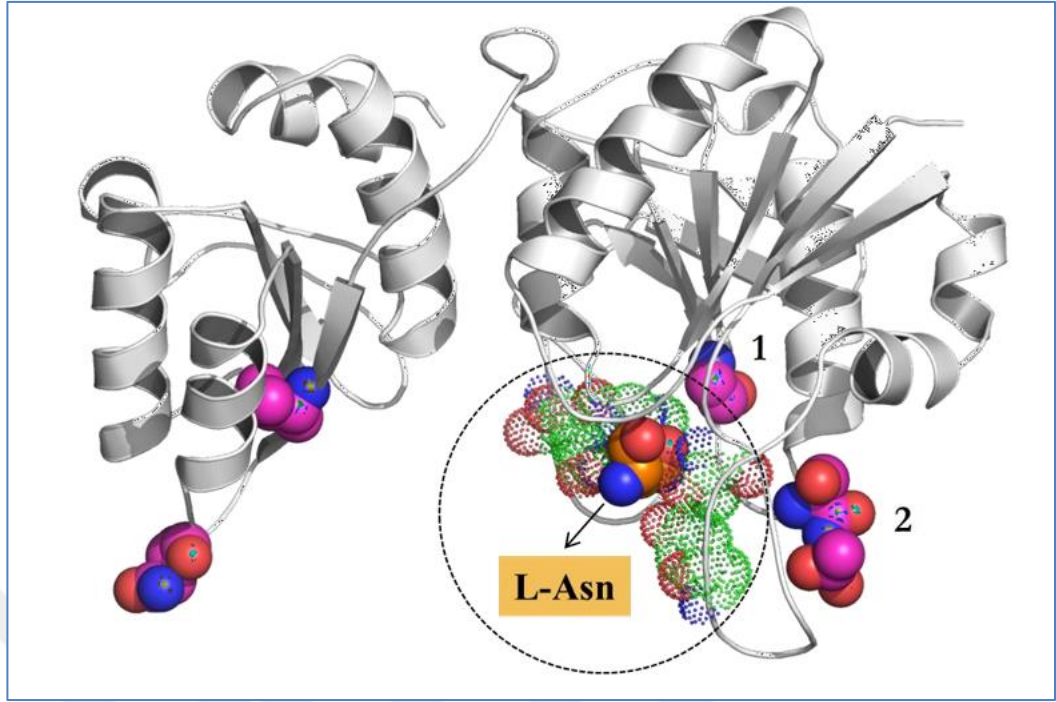


Şekil 4.14 Tümör hücrelerinde JM103 L-ASP'nin inhibitör yüzdesi

Yüksek hücre büyümesi inhibisyonu oranlarına rağmen, tahlili doğrulamak ve doğal enzimin neden olduğu hücre ölümü mekanizmalarını anlamak için daha fazla teste ihtiyaç vardır.

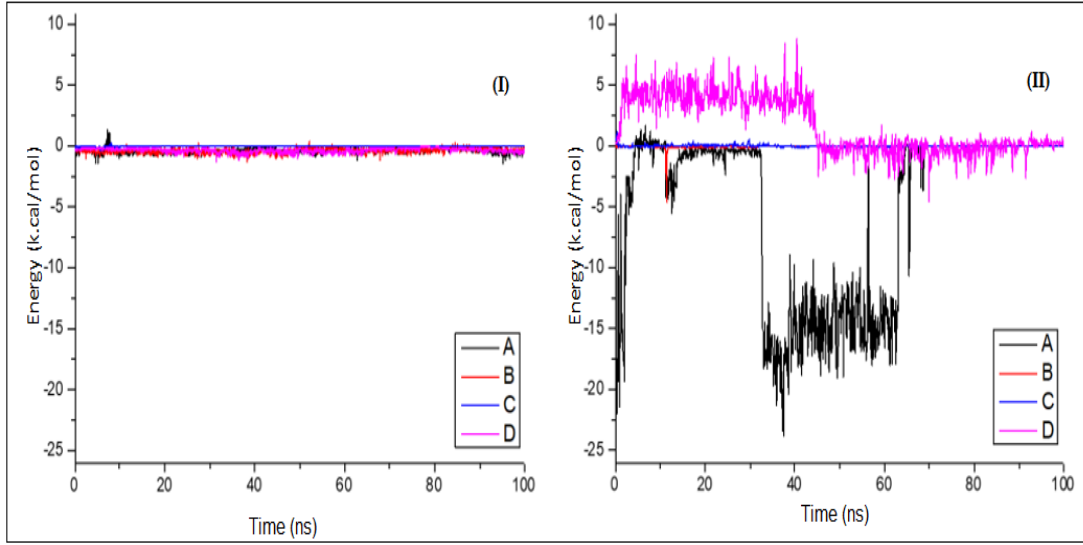
4.9 Moleküler Dinamik

Şekil 4.15'te proteinin monomerik yapısında yapılan dört mutasyonun yerleri gösterilmektedir. Üretilen çift mutanlığı oluşturan iki mutasyonun, katalitik bölgeye diğer mutasyonlara göre daha yakın olduğu görülmektedir. Sonuç olarak substrat, mutasyon 1 ve 2 kalıntıları ve katalitik bölgenin amino asitleri arasındaki atomlar arası etkileşim potansiyeli (PII) hesaplanmıştır.



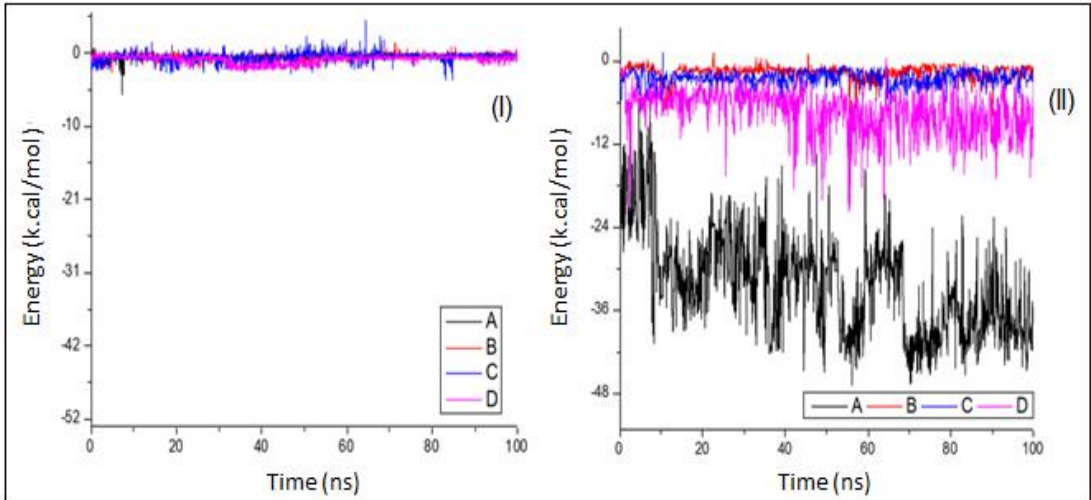
Şekil 4.15 JM103 L-ASP monomeri uzayda mutasyon pozisyonları

Şekil 4.16, L-Asn alt katman ile Ben (G113D) arasındaki PII profili için çift mutant sistemi onun bir monomeri (A, B, C ve D) göstermektedir. Simülasyon boyunca glisinin (G113) doğal sistemdeki bırakıldıkları L-Asn alt katman ile iklimlendirme girmediği varsayılabilir. Grafik 2II'deki siyah eğriler (monomer A) ve pembe eğriler (monomer D), aynı konumdaki bir aspartik asit (D113) değişiminin çift mutant sistemi bölge substratıyla nasıl önemli ölçüde iklimlendirme paketini göstermektedir. Siyah ve pembe eğrilerin görünüşte karşıt profilleri, L-Asn ile etkileşimin ne kadar döngüsel, bazen de itici ve çekici olduğunu göstermektedir. Bu durum, substratın aktif bölgedeki uygun yönelimini bozar ve enzimin katalitik aktivitesini azaltır.



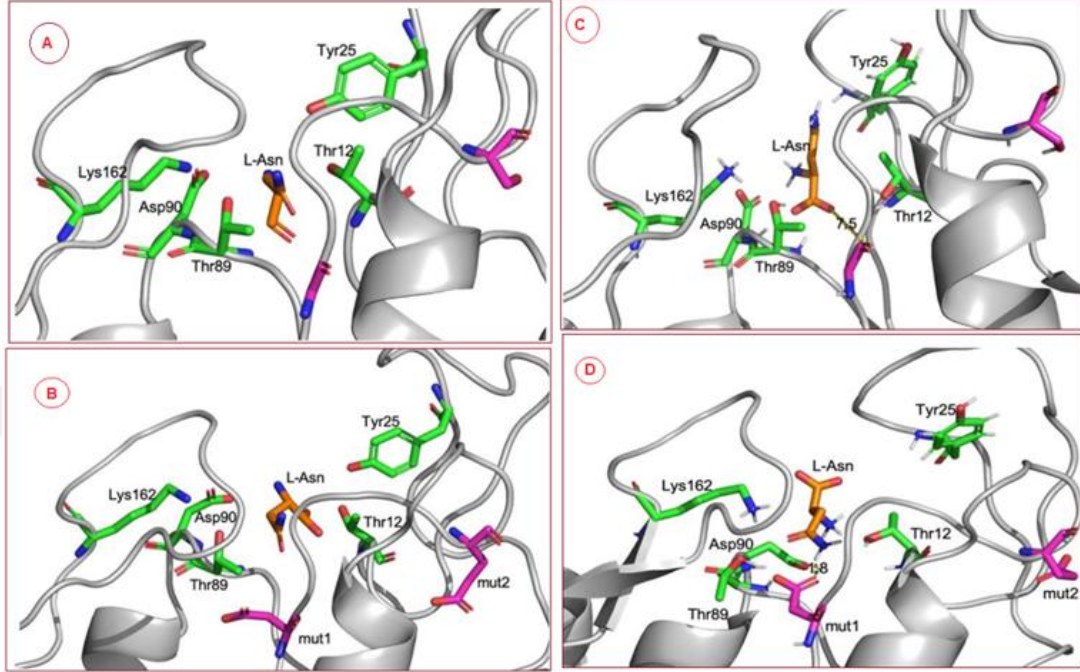
Şekil 4.16 Her bir JM103 L-ASP monomerinin mutasyon 1 kalıntısı ile L-Asn substratı arasındaki atomlar arası etkileşim potansiyeli

Sırasıyla normal sistemdeki katalitik bölge kalıntıları ve çift mutant arasındaki PII profilini gösteren Şekil 4.17'nin incelenmesi bu karışıklığı daha da açıklığa kavuşturur. Çift mutant sistemde glisinin yerine geçen aspartik asit, kendisi ile bölge kalıntıları arasında çekici bir temas sağlamış ve bu, monomer A'da kabaca $-36 \text{ kcal/mol}^{-1}$ enerjiye karşılık gelmiştir.



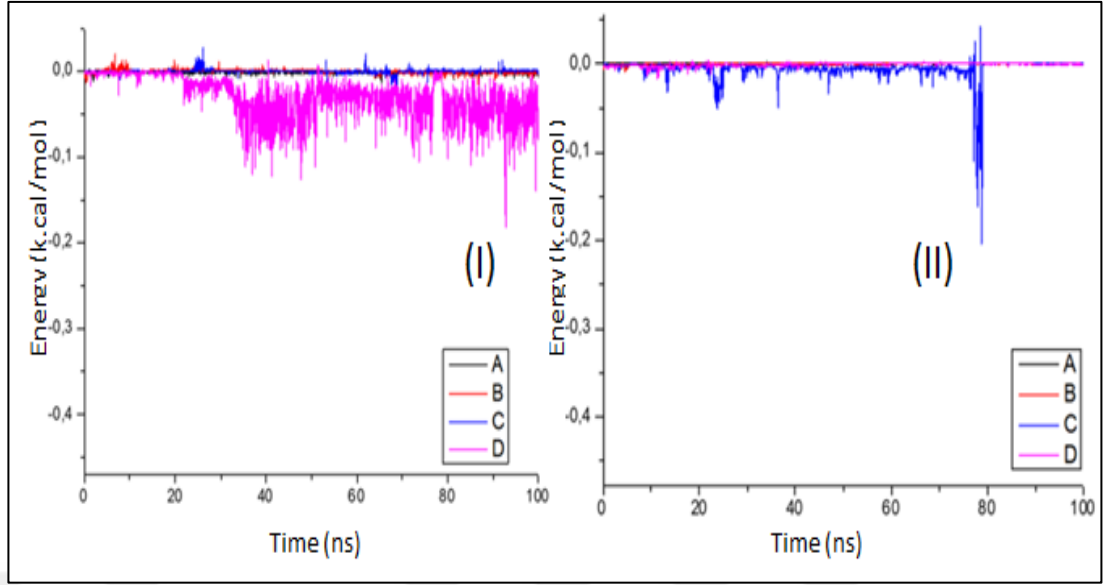
Şekil 4.17 Mutasyon 1 ile JM103 L-ASP'nin katalitik bölge kalıntıları arasındaki, substratın katalitik bölge kalıntılarıyla nasıl etkileşime girdiğini etkileyen atomlar arası etkileşim potansiyeli eğrisi

JM103 L-ASP aktif bölgesi hem doğal hem de çift mutant sistemlerde Şekil 4.18'te gösterilmiştir



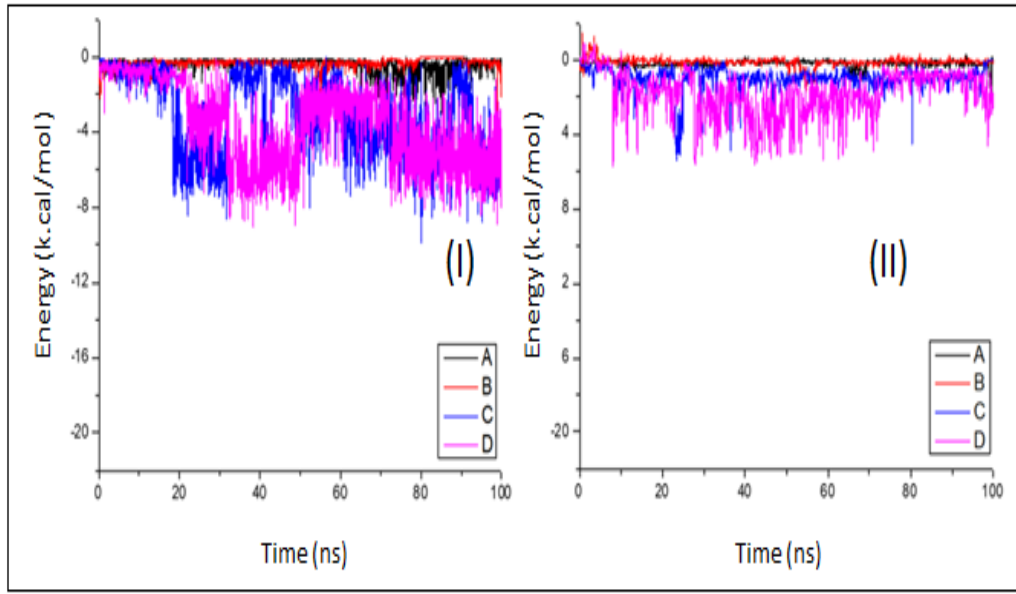
Şekil 4.18 Alt tabaka L-Asn geldiğinde bir JM103 L-ASP monomerindeki katalitik kalıntıların uzamsal düzeni (A) İlk doğal sistem Kurulumu. (B) Çift mutant sisteminin ilk dengesi. (C) Doğal sistem L-Asn alt katman ile G113 yatırımı arası 7,5 Å'luk bölgelerdeki vurgulayan konfigürasyonu (D) L-Asn alt katman ile D113 yatırımı arası 1,8 Å'luk bölgelerdeki vurgulayan konfigürasyon

Şekil 4.19, S118E mutasyonunun (mutasyon 2) katalitik bölge bölgesinde de bozulmaya neden olup olmayacağını görmek için L-Asn substratı ile ikame amino asit arasındaki PII'nin hem doğal hem de çift mutant sistemlerde hesaplandığını göstermektedir. Özellikle, mutasyon 2 substrat ile etkileşim potansiyelini enzim katalitik etkisini etkileyecek kadar değiştirememiştir, çünkü her iki grafikte de potansiyel simülasyon boyunca sıfıra yakın kalmaktadır. Bu durum, JM103 L-ASP'nin doğal konfigürasyonunda bulunan Serin amino asidi ile ikame edilmiş glutamik asit tarafından gösterilen etkileşim profili karşılaştırıldığında açıkça görülmektedir. Sonuç olarak, mutasyon 2'nin varlığının kataliz üzerinde veya bölgedeki l-Asn'nin oryantasyonu üzerinde hiçbir etkisi yoktur.



Şekil 4.19 Her bir JM103 L-ASP monomeri için L-Asn ile mutasyon 2 arasındaki etkileşim potansiyeli eğrisi

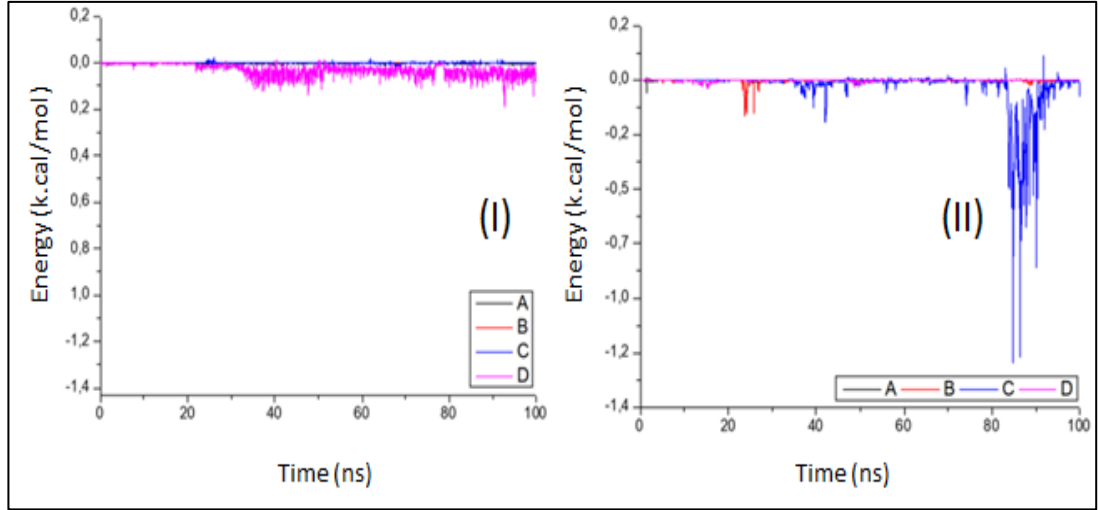
Hem doğal hem de çift mutant sistemlerde, katalitik bölge kalıntılarını oluşturan atomlar ile ikame E118 kalıntısının atomları arasındaki potansiyel Şekil 4.20'de gösterilmektedir. Glutamik asidin, $-8 \text{ kcal./mol}^{-1}$ gösteren bazı monomerlerle, konumdan amino asitlere güçlü bir çekim sergilediği gözlemlenmiştir. Yabani kalıntı olan serin de, yaklaşık -5 kcal/mol 'lük daha düşük bir değerle de olsa, çekici bir potansiyele sahiptir. Etkileşim modeli korunduğundan ve potansiyelde ani bir değişiklik olmadığından, eklenen mutasyon 2 aktivitedeki düşüşü açıklamak için yeterli olmayacaktır.



Şekil 4.20 JM103 L-ASP'nin katalitik bölgesindeki mutasyon 2'deki kalıntılar arasındaki atomlar arası etkileşim potansiyeli eğrisi

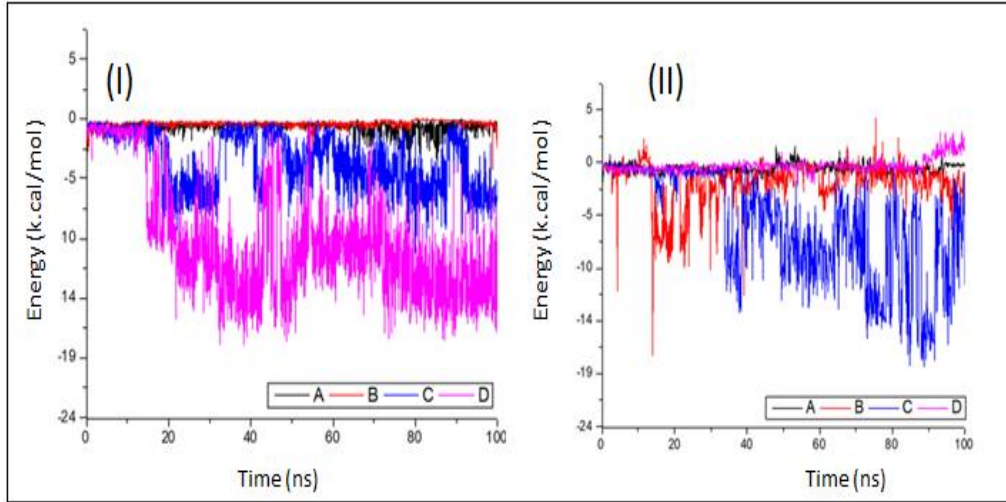
Ek olarak, Şekil 4.15'de görüldüğü gibi, glutamik asit değiştirme kalıntısının yan zinciri solvante doğru uzanır ve bu da onun kataliz için gerekli katalitik bölge etkileşimlerine müdahale etmesini önleyebilir.

Bu verilerin yardımıyla mutasyon 1'in (G113D) tersine çevrilmesinin, değiştirilmiş proteinin doğal katalitik fonksiyonunu yeniden kazanması için uygun bir seçenek olduğu doğrulanmıştır. Bunun için dörtlü mutant sistemdeki diğer mutasyonlar değerlendirilmiştir. Hem orijinal hem de dörtlü mutant sistemlerde, Şekil 4.21, L-Asn ile değiştirilmiş kalıntıları oluşturan atom seti arasındaki PII'yi göstermektedir. Yukarıda adı geçen mutantın analizi bizi bu artıklar arasındaki etkileşimde önemli bir değişiklik olmadığı sonucunu göstermektedir çünkü simülasyon süresi boyunca her iki sistemdeki etkileşim potansiyeli sıfıra çok yakın ve dörtlü sistem en düşük değeri sergilemiştir.



Şekil 4.21 L-Asn substratı ile JM103 L-ASP'nin dörtlü mutant sistemindeki her bir taşıyıcı kalıntı arasındaki etkileşim potansiyeli eğrisi

Hem doğal hem de dörtlü mutant sistemlerde, Şekil 4.22, katalitik bölge kalıntılarını oluşturan atom seti ile değiştirilen kalıntıları oluşturan atom seti arasındaki PII'yi göstermektedir.



Şekil 4.22 JM103 L-ASP'nin dörtlü mutantı, değiştirme kalıntıları ve katalitik bölge kalıntıları arasındaki etkileşim potansiyeli eğrisi

Her iki sistemde de diğerlerinden farklı bir monomer vardır: Dörtlü mutant sistemde mavi olan monomer C ve doğal sistemde pembe olan monomer D. Bununla birlikte, her iki monomer de enerjiyi yaklaşık -12 kcal/mol civarında sabit bir ortalamada tutar. Bu

varyasyon, bu mutantlardaki aktivite kaybını hesaba katmayacağından, enzimatik aktivite kaybından büyük olasılıkla sorumlu olan tek mutasyon 1 (G113D)'dir.

Gelecekteki çalışmalar mutasyon 1'i tersine çevirmeye ve ek aktivite testleri yapmaya odaklanmalıdır çünkü mutasyona uğramış kalıntılar (mutasyon 1 (G113D) dışında) bölgeye yakın alanlarda bulunmaz veya kataliz için gerekli etkileşimleri etkilemez.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

H. pylori ve *Escherichia coli* bakterilerindeki *Psychrobacter cryohalolentis*'ten alınan L-asparaginaz proteininin immünojenliğini azaltmak için önerilen mutasyonlar, DNA dizilimi ile kanıtlanmış olan pET-28a ifade vektörüne klonlanan ansB geninin nükleotit dizisine başarılı bir şekilde yerleştirilmiştir. JM103 L-ASP-PET-28A-Onun'nun hem yerel protein hem de dört varyantı ifade edilmiştir. Bununla birlikte, sadece yerli protein enzimatik ve sitotoksik aktivitelerini korumuştur. Yerel proteinin işlevsel yönü ile ilgili olarak, optimal pH değeri 8,5 ve maksimum aktivitesi 60 derece olan bir sıcaklığa sahiptir. JM103 L-ASP-PET-28A-Onun enzimatik kinetiğinden, doğal enzimin katalitik ceplerinin doygunluğuna dair platoya 8 mL-asparagine ulaşılmıştır. Sitotoksik etkisi, test edilen iki tümör türü için %80 ile %95 arasında değişen hücre büyümesini engelleme gücü açısından belirgindir.

Dairesel Dikroizm ile elde edilen veriler hem doğal proteinin hem de üretilen varyantlardan üçünün ikincil yapısının, zengin α -sarmal profilini koruduğunu göstermiştir; bu, biyoinformatik tarafından işaret edilen (Yazdi *et al.* 2020) kalıntıların in silico kanıtını güçlendirmektedir.

Sahaya yönelik mutajenez tarafından eklenen mutasyonlardan birinin, JM103 L-ASP-PET-28A-His varyantlarının katalitik gücünü olumsuz yönde etkileyeceği ve Nesslerizasyon kolimetrik tahlilinden sonra ortaya çıkan hipotez, moleküler dinamikler tarafından doğrulanmıştır. Ayrıca, 113 pozisyonundaki Glisin'in bir Aspartik Asit ile ikamesinin, bazen çekici, bazen itici olan, l-Asn substratı ve katalitik bölge kalıntıları arasındaki atom-atom etkileşim davranışını bozan atomlar arası etkileşim potansiyelinin oluşumunu sağladığı ve (Thr12), Tyr25, Thr89, Asp90 ve Lys162), JM103 L-ASP'nin dört varyantında kataliz eksikliğine yol açtığı belirlenmiştir.

Bir perspektif olarak, ANSB geninin DNA dizisine yerleştirilen G113D mutasyonunu kaldırmak ve JM103 L-ASP varyantlarının enzimatik aktivitesini geri getirmek için, bölgeye özgü yeni bir mutagenез denemesi yapmaya ihtiyaç vardır. Bundan sonra, düzeltilmiş varyantların immünojen potansiyeliyle ilgili değerlendirmelere devam etmek

mümkün olacaktır. Buna göre, bakterilerdeki *Psychrobacter cryohalolentis*'in L-asparaginaz gen dizilimine eklenen mutasyonların birikimini göz önünde bulundurursak, en immünojen epitopları hafifletilen mutant proteinin (yani, dörtlü mutant), antijenik potansiyelinin yerli proteine göre değerlendirilmesinde en ilginç varyant olduğu düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdel-Fattah, Y. R. and Olama, Z. A. 2002. L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. *Process Biochemistry*, 38(1): 115-122.
- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B. and Lindahl, E. 2015. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1(2): 19-25.
- Albanese, E. R. T. and Kafkewitz, K. 1978. Effect of medium composition on the growth and asparaginase production of *Vibrio succinogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(1): 25-30.
- Anandakrishnan, R., Aguilar, B. and Onufriev, A. V. 2012. H++ 3.0: automating p K prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Research*, 40(1): 537-541.
- Ando, M., Sugimoto, K., Kitoh, T., Sasaki, M., Mukai, K., Ando, J. and Oshimi, K. 2005. Selective apoptosis of natural killer-cell tumours by l-asparaginase. *British Journal of Haematology*, 130(6): 860-868.
- Atkinson, N. S. and Braden, B. 2016. *Helicobacter pylori* infection: diagnostic strategies in primary diagnosis and after therapy. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(6): 19-24.
- Avramis, V. I. and Panosyan, E. H. 2005. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clinical Pharmacokinetics*, 44(7): 367-393.
- Avramis, V. I. and Tiwari, P. N. 2006. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Nanomedicine*, 1(3): 241-245.
- Avramis, V. I., Sencer, S., Periclou, A. P., Sather, H., Bostrom, B. C., Cohen, L. J. and Holcenberg, J. S. 2002. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 99(6): 1986-1994.

- Bakermans, C., Ayala-del-Río, H. L., Ponder, M. A., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M. F. and Tiedje, J. M. 2006. *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(6): 1285-1291.
- Baneyx, F. and Mujacic, M. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11): 1399-1408.
- Bejger, M., Imiolczyk, B., Clavel, D., Gilski, M., Pajak, A., Marsolais, F. and Jaskolski, M. 2014. Na⁺/K⁺ exchange switches the catalytic apparatus of potassium-dependent plant L-asparaginase. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(7): 1854-1872.
- Berendsen, H. J., Postma, J. P., van Gunsteren, W. F. and Hermans, J. 1981. Interaction models for water in relation to protein hydration. In *Intermolecular forces: proceedings of the fourteenth Jerusalem symposium on quantum chemistry and biochemistry held in Jerusalem, Israel, April 13–16, 1981*. Springer, 1(1): 331-342.
- Berendsen, H. J., Postma, J. V., Van Gunsteren, W. F., DiNola, A. R. H. J. and Haak, J. R. 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8): 3684-3690.
- Brody, J. R. and Dixon, D. A. 2018. Complex HuR function in pancreatic cancer cells. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9(3): 14-69.
- Broome, J. D. 1965. Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo: clearance rates of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth. *Journal of the National Cancer Institute*, 35(6): 967-974.
- Caetano, B. A., Rocha, L. B., Carvalho, E., Piazza, R. M. F. and Luz, D. 2017. Immunogenic domains and secondary structure of *Escherichia coli* recombinant secreted protein *Escherichia coli*-secreted protein B. *Frontiers in Immunology*, 8(2): 477-479.
- Cano-Contreras, A. D., Rascon, O., Amieva-Balmori, M., Rios-Galvez, S., Maza, Y. J., Meixueiro-Daza, A. and Remes-Troche, J. M. 2018. Approach, attitudes, and knowledge of general practitioners in relation to *Helicobacter pylori* is inadequate. There is much room for improvement!. *Revista De Gastroenterología De México*, 83(1): 16-24.

- Carvalho, I., Pupo, M. T., Borges, A. D. L. and Bernardes, L. S. C. 2003. Introduction to molecular modeling of drugs in the experimental course of pharmaceutical chemistry. *New Chemistry*, 26(3): 428-438.
- Chan, W. K., Lorenzi, P. L., Anishkin, A., Purwaha, P., Rogers, D. M., Sukharev, S. and Weinstein, J. N. 2014. The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 123(23): 3596-3606.
- Charamella, L. J., Meyer, C., Thornpion, G. E. and Dimitrov, N. V. 1985. Chemotherapeutic agents and modulation of natural killer cell activity in vitro. *Journal of Immunopharmacology*, 7(1): 53-65.
- Deehan, M., Garcês, S., Kramer, D., Baker, M. P., Rat, D., Roettger, Y. and Kromminga, A. 2015. Managing unwanted immunogenicity of biologicals. *Autoimmunity Reviews*, 14(7): 569-574.
- Derst, C., Henseling, J. and Röhm, K. H. 2000. Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. *Protein Science*, 9(10): 2009-2017.
- Distasio, J. A., Salazar, A. M., Nadji, M. and Durden, D. L. 1982. Glutaminase-free asparaginase from *Vibrio succinogenes*: An antilymphoma enzyme lacking hepatotoxicity. *International Journal of Cancer*, 30(3): 343-347.
- Edelheit, O., Hanukoglu, A. and Hanukoglu, I. 2009. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnology*, 9(1): 1-8.
- El-Asmar, F. A., Greenberg, D. M. and Amand, G. S. 1966. Studies on the mechanism of inhibition of tumor growth by the enzyme glutaminase. *Cancer Research*, 26(1): 116-122.
- El-Bessoumy, A. A., Sarhan, M. and Mansour, J. 2004. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. *BMB Reports*, 37(4): 387-393.
- El-Naggar, N. E., El-Ewasy, S. M. and El-Shweihy, N. M. 2014. Microbial L-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: the pros and cons. *International Journal of Pharmacology*, 10(4): 182-199.

- Epp, O., Steigemann, W., Formanek, H. and Huber, R. 1971. Crystallographic evidence for the tetrameric subunit structure of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 20(3): 432-437.
- Erenler, S. O., Gencer, S., Geckil, H., Stark, B. C. and Webster, D. A. 2004. Cloning and expression of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Enterobacter aerogenes*: effect on cell growth and oxygen uptake. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(3): 241-248.
- Erva, R. R., Rajulapati, S. B., Potla Durthi, C., Bhatia, M. and Pola, M. 2016. Molecular dynamic simulations of *Escherichia coli* L-asparaginase to illuminate its role in deamination of asparagine and glutamine residues. *Biotech*, 6(3): 1-7.
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H. and Pedersen, L. G. 1995. A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(19): 8577-8593.
- Forghieri, F., Paolini, A., Morselli, M., Bigliardi, S., Bonacorsi, G., Leonardi, G. and Potenza, L. 2015. NPM1 mutations may reveal acute myeloid leukemia in cases otherwise morphologically diagnosed as myelodysplastic syndromes or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia & Lymphoma*, 56(11): 3222-3226.
- Friedman, M. 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16): 4504-4526.
- Gaofu, Q., Rongyue, C., Dan, M., Xiuyun, Z., Xuejun, W., Jie, W. and Jingjing, L. 2006. Asparaginase display of human cholesteryl ester transfer protein (CETP) B cell epitopes for inducing high titers of anti-CETP antibodies in vivo. *Protein and Peptide Letters*, 13(2): 149-154.
- Geckil, H., Gencer, S. and Uckun, M. 2004. *Vitreoscilla* hemoglobin expressing *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* respond differently to carbon catabolite and oxygen repression for production of L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2): 182-189.
- Gomes, D. C. 2019. Biochemical and kinetic characterization of bacterial L-asparaginases and evaluation of their cytotoxic potential. MSc. Thesis, Federal University of Ceará, 154 pages, Fortaleza.

- Goulding, C. W. and Perry, L. J. 2003. Protein production in *Escherichia coli* for structural studies by X-ray crystallography. *Journal of Structural Biology*, 142(1): 133-143.
- Gouzy, A., Larrouy-Maumus, G., Bottai, D., Levillain, F., Dumas, A., Wallach, J. B. and Neyrolles, O. 2014. *Mycobacterium tuberculosis* exploits asparagine to assimilate nitrogen and resist acid stress during infection. *PLoS Pathogens*, 10(2) 1003-1028.
- Greenberg, D. M., Blumenthal, G. and Ramadan, M. E. A. 1964. Effect of administration of the enzyme glutaminase on the growth of cancer cells. *Cancer Research*, 24(1): 957-963.
- Greenfield, N. J. 2006. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6): 2876-2890.
- Harrison, C. J. 2015. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 125(9): 1383-1386.
- Hess, B. 2008. P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(1): 116-122.
- Hill, J. M., Roberts, J., Loeb, E., Khan, A., MacLellan, A. and Hill, R. W. 1967. L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms: remission in human leukemia. *Jama*, 202(9): 882-888.
- Ho, P. P., Milikin, E. B., Bobbitt, J. L., Grinnan, E. L., Burck, P. J., Frank, B. H. and Squires, R. W. 1970. Crystalline l-asparaginase from *Escherichia coli* B: I. purification and chemical characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 245(14): 3708-3715.
- Holcenberg, J. S., Schmer, G. and Teller, D. C. 1975. Biologic and physical properties of succinylated and glycosylated *Acinetobacter* glutaminase-asparaginase. *Journal of Biological Chemistry*, 250(11): 4165-4170.
- Hussein, N. R., Mohammadi, M., Talebkhan, Y., Doraghi, M., Letley, D. P., Muhammad, M. K. and Atherton, J. C. 2008. Differences in virulence markers between *Helicobacter pylori* strains from Iraq and those from Iran: potential importance of regional differences in *H. pylori*-associated disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5): 1774-1779.

- Hussein, N. R., Robinson, K. and Atherton, J. C. 2008. A study of age-specific *Helicobacter pylori* seropositivity rates in Iraq. *Helicobacter*, 13(4): 306-307.
- Hymavathi, M., Sathish, T., Rao, C. S. and Prakasham, R. S. 2009. Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159(2): 191-198.
- Inada, Y., Furukawa, M., Sasaki, H., Kodera, Y., Hiroto, M., Nishimura, H. and Matsushima, A. 1995. Biomedical and biotechnological applications of PEG-and PM-modified proteins. *Trends in Biotechnology*, 13(3): 86-91.
- Iuchi, S. and Lin, E. C. C. 1991. Adaptation of *Escherichia coli* to respiratory conditions: regulation of gene expression. *Cell*, 66(1): 5-7.
- Jaffe, N., Traggis, D., Das, L., Moloney, W. C., Hann, H. W., Kim, B. S. and Nair, R. 1971. L-asparaginase in the treatment of neoplastic diseases in children. *Cancer Research*, 31(7): 942-949.
- Jawa, V., Cousens, L. P., Awwad, M., Wakshull, E., Kropshofer, H. and De Groot, A. S. 2013. T-cell dependent immunogenicity of protein therapeutics: preclinical assessment and mitigation. *Clinical Immunology*, 149(3): 534-555.
- Kafkewitz, D. and Bendich, A. 1983. Enzyme-induced asparagine and glutamine depletion and immune system function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 37(6): 1025-1030.
- Khushoo, A., Pal, Y., Singh, B. N. and Mukherjee, K. J. 2004. Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. *Protein Expression and Purification*, 38(1): 29-36.
- Kiriyama, Y., Kubota, M., Takimoto, T., Kitoh, T., Tanizawa, A., Akiyama, Y. and Mikawa, H. 1989. Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. *Leukemia*, 3(4): 294-297.
- Kotzia, G. A. and Labrou, N. E. 2007. L-Asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization. *Journal of Biotechnology*, 127(4): 657-669.
- Krupka, M., Masek, J., Barkocziova, L., Turanek Knotigova, P., Kulich, P., Plockova, J. and Raska, M. 2016. The position of his-tag in recombinant OspC and application

- of various adjuvants affects the intensity and quality of specific antibody response after immunization of experimental mice. *PLoS One*, 11(2): 1484-1497.
- Kumar, K. and Verma, N. 2012. The various sources and application of L-asparaginase. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 2(3): 197-205.
- Lang, S. 1904. *Über desamidierung im Tierkörper. Beitrage zur Chemischen Physiologie und Pathologie*, 5(1): 321-345.
- Leone, T. C., Lehman, J. J., Finck, B. N., Schaeffer, P. J., Wende, A. R., Boudina, S. and Kelly, D. P. 2005. PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biology*, 3(4): 101-106.
- Li, Y. 2010. Commonly used tag combinations for tandem affinity purification. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55(2): 73-83.
- Liu, H. and Naismith, J. H. 2008. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnology*, 8(1): 1-10.
- Majeed, P. D. and Khoshnaw, K. J. S. 2020. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection among patients with gastroduodenal disorders in Erbil city. *Diyala Journal of Medicine*, 18(1): 91-101.
- Mashburn, L. T. and Wriston, J. C. 1964. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 105(2): 450-453.
- Mauro-Lizcano, M. and López-Rivas, A. 2018. Glutamine metabolism regulates FLIP expression and sensitivity to TRAIL in triple-negative breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, 9(2): 205-206.
- McCoy, T. A., Maxwell, M. and Neuman, R. E. 1956. The amino acid requirements of the Walker carcinosarcoma 256 in vitro. *Cancer Research*, 16(1): 979-984.
- Mehvar, R. 2000. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *Journal of Controlled Release*, 69(1): 1-25.
- Michalska, K. and Jaskolski, M. 2006. Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations. *Acta Biochimica Polonica*, 53(4): 627-640.
- Mohan Kumar, N. S. and Manonmani, H. K. 2013. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(6): 577-587.

- Mukherjee, J., Majumdar, S. and Scheper, T. 2000. Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(6): 180-184.
- Müller, H. J. and Boos, J. 1998. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 28(2): 97-113.
- Narta, U. K., Kanwar, S. S. and Azmi, W. 2007. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 61(3): 208-221.
- Nawaz, M. S., Khan, A. A., Seng, J. E., Leakey, J. E., Siitonen, P. H. and Cerniglia, C. E. 1994. Purification and characterization of an amidase from an acrylamide-degrading *Rhodococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(9): 3343-3348.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L. and Cox, M. M. 2008. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 1158 pages, London.
- Obama, K., Tara, M. and Niina, K. 2003. L-asparaginase-based induction therapy for advanced extranodal NK/T-cell lymphoma. *International Journal of Hematology*, 78(7): 248-250.
- Ohnuma, T., Holland, J. F. and Meyer, P. 1972. *Erwinia carotovora* asparaginase in patients with prior anaphylaxis to asparaginase from *E. coli*. *Cancer*, 30(2): 376-381.
- Panosyan, E. H., Seibel, N. L., Martin-Aragon, S., Gaynon, P. S., Avramis, I. A., Sather, H. and Avramis, V. I. 2004. Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 26(4): 217-226.
- Patel, N., Krishnan, S., Offman, M. N., Krol, M., Moss, C. X., Leighton, C. and Saha, V. 2009. A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(7): 1964-1973.
- Porath, J., Carlsson, J. A. N., Olsson, I. and Belfrage, G. 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258(5536): 598-599.

- Prakasham, R. S., Rao, C. S., Rao, R. S., Lakshmi, G. S. and Sarma, P. N. 2007. L-asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp.-6A: design of experiment considering interaction effect for process parameter optimization. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5): 1382-1391.
- Reddy, V. S., Jayaram, H. N., Sirsi, M. and Ramakrishnan, T. 1969. Inhibitory activity of L-asparaginase from *Mycobacterium tuberculosis* on Yoshida ascites sarcoma in rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 132(1): 262-267.
- Reshetnyak, V. I., Burmistrov, A. I. and Maev, I. V. 2021. *Helicobacter pylori*: Commensal, symbiont or pathogen?. *World Journal of Gastroenterology*, 27(7): 545-550.
- Rozalska, M. and Mikucki, J. 1992. Staphylococcal L-asparaginase: catabolic repression of synthesis. *Acta Microbiologica Polonica*, 41(4): 145-150.
- Sabbagh, P., Mohammadnia-Afrouzi, M., Javanian, M., Babazadeh, A., Koppolu, V., Vasigala, V. R. and Ebrahimpour, S. 2019. Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infection: ideals, options, and limitations. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(7): 55-66.
- Salzer, W. L., Asselin, B. L., Plourde, P. V., Corn, T. and Hunger, S. P. 2014. Development of asparaginase *Erwinia chrysanthemi* for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1329(1): 81-92.
- Sanches, M., Barbosa, J. A. A. R., De Oliveira, R. T., Abrahão Neto, J. and Polikarpov, I. 2003. Structural comparison of *Escherichia coli* L-asparaginase in two monoclinic space groups. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 59(3): 416-422.
- Sanches, M., Krauchenco, S. and Polikarpov, I. 2007. Structure, substrate complexation and reaction mechanism of bacterial asparaginases. *Current Chemical Biology*, 1(1): 75-86.
- Schwartz, J. H., Reeves, J. Y. and Broome, J. D. 1966. Two L-asparaginases from *E. coli* and their action against tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 56(5): 1516-1519.

- Sharma, R. K. 1973. Benefit-cost analysis and public health: a case study of the tuberculosis control program in Ontario, 1948-1966. PhD. Thesis, The University of Western Ontario, 235 page, Ontario.
- Shrivastava, A., Khan, A. A., Khurshid, M., Kalam, M. A., Jain, S. K. and Singhal, P. K. 2016. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 100(2): 1-10.
- Siegel, D. J. 2016. *Mind: A journey to the heart of being human* (Norton series on interpersonal neurobiology). W. W. Norton & Company, 400 pages, New York.
- Silverman, L. B., Supko, J. G., Stevenson, K. E., Woodward, C., Vrooman, L. M., Neuberg, D. S. and Sallan, S. E. 2010. Intravenous PEG-asparaginase during remission induction in children and adolescents with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 115(7): 1351-1353.
- Sockolosky, J. T. and Szoka, F. C. 2013. Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. *Protein Expression and Purification*, 87(2): 129-135.
- Stefano, K., Rosalia, A., Chiara, B., Federica, G., Marco, M., Gioacchino, L. and Gian, L. D. A. 2018. Non-invasive tests for the diagnosis of helicobacter pylori: state of the art. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, 89(8), 58-64.
- Sutow, W. W., Garcia, F., Starling, K. A., Williams, T. E., Lane, D. M. and Gehan, E. A. 1971. L-asparaginase therapy in children with advanced leukemia The Southwest cancer chemotherapy study group. *Cancer*, 28(4): 819-824.
- Swain, A. L., Jaskólski, M., Housset, D., Rao, J. K. and Wlodawer, A. 1993. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(4): 1474-1478.
- Tallal, L., Tan, C., Oettgen, H., Wollner, N., McCarthy, M., Helson, L. and Murphy, M. L. 1970. *E. coli* L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children. *Cancer*, 25(2): 306-320.
- Tosa, T., Sano, R., Yamamoto, K., Nakamura, M., Ando, K. and Chibata, I. 1971. L-Asparaginase from *Proteus vulgaris*. *Applied Microbiology*, 22(3): 387-392.

- Tsuji, S., Ito, K. and Oshima, S. 1957. The role of humoral factors in native and acquired resistance to tuberculosis. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases*, 76(1): 90-102.
- Van Den Berg, H. 2011. Asparaginase revisited. *Leukemia & Lymphoma*, 52(2): 168-178.
- Verma, N., Kumar, K., Kaur, G. and Anand, S. 2007. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1): 45-62.
- Veronese, F. M. and Pasut, G. 2005. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today*, 10(21): 1451-1458.
- Vidya, J., Vasudevan, U. M., Soccol, C. R. and Pandey, A. 2011. Cloning, functional expression and characterization of L-asparaginase II from *E. coli* MTCC 739. *Food Technology and Biotechnology*, 49(3): 286-290.
- Vinci, R. M., Mestdagh, F. and De Meulenaer, B. 2012. Acrylamide formation in fried potato products—Present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chemistry*, 133(4): 1138-1154.
- Vuddaraju, S. P., Nikku, M. Y., Chaduvula, A. I. R., Dasari, V. R. R. K. and Donthireddy, S. R. R. 2010. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of L-Asparaginase by *Serratia Marcescens*. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 2(5948): 89-94.
- Warrell, R. P., Arlin, Z. A., Gee, T. S., Chou, T. C., Roberts, J. and Young, C. W. 1982. Clinical Evaluation of Succinylated *Acinetobacter* Glutaminase-Asparaginase in Adult Leukemia 1, 2. *Cancer Treatment Reports*, 66(7): 1479-1485.
- Wei, D. Z. and Liu, H. 1998. Promotion of L-asparaginase production by using n-dodecane. *Biotechnology Techniques*, 12(1): 129-131.
- Willis, R. C. and Woolfolk, C. A. 1974. Asparagine utilization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 118(1): 231-241.
- Wise, D. R. and Thompson, C. B. 2010. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(8): 427-433.
- Wriston, J. C. and Yellin, T. O. 1973. L-asparaginase: a review. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology Journal*, 39(7): 185-248.
- Yan, Y., Steinherz, P., Klingemann, H. G., Dennig, D., Childs, B. H., McGuirk, J. and O'Reilly, R. J. 1998. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human

- leukemias. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 4(11): 2859-2868.
- Yao, H., Wynendaele, E. and De Spiegeleer, B. 2020. Thermal sensitivity as a quality control attribute for biotherapeutics: The L-asparaginase case. *Drug Testing and Analysis*, 12(1): 67-77.
- Yazdi, M., Kolahi, M., Foroghmand, A. M. and Tabandeh, M. R. 2020. In silico assessment of plant L-asparaginase and estimating its allergenicity in comparison to bacteria asparaginase. *Hemoncim*, 19(1): 35-46.
- Young, D. C. 2001. A practical guide for applying techniques to real-world problems. *Computational Chemistry*, 9(2): 369-390.
- Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R. and Lazebnik, Y. 2007. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *The Journal of Cell Biology*, 178(1): 93-105.
- Zhao, H., Verma, D., Li, W., Choi, Y., Ndong, C., Fiering, S. N. and Griswold, K. E. 2015. Depletion of T cell epitopes in lysostaphin mitigates anti-drug antibody response and enhances antibacterial efficacy in vivo. *Chemistry & Biology*, 22(5): 629-639.
- Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K. and Villagran, M. D. 2003. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16): 4782-4787.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Husam Aldeen Khudhair NSAIF

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2021-2024
---------------	---	-----------

Lisans	Farabi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2016-2020
--------	---	-----------