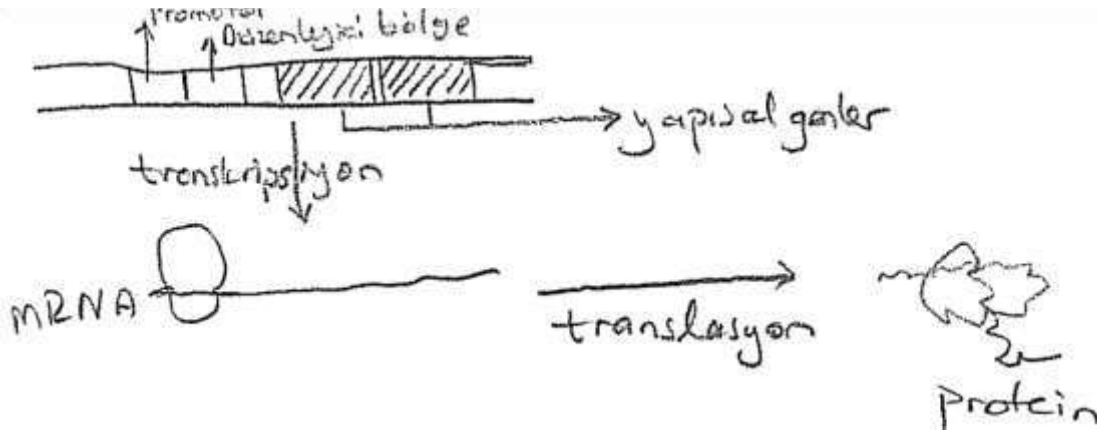


5 BAKTERİLERDE YABANCI PROTEİNLERİN ÜRETİLMESİ

Endüstriyel ve tıbbi amaçlarla diğer organizmalara ve özellikle insana ait birçok protein bakteriler, özellikle de *Escherichia coli* hücreleri içinde üretilmektedir. Bu proteinlerin üretimi için öncelikle bu proteinleri kodlayan genlerin klonlanmış olması veya *in vitro*'da sentezlenmiş olması gerekmektedir. Bu aşamadan sonra klonlanmış gendeki bilgi konak bakteri hücresinin gen ekspresyon sistemlerinde proteinlere aktarılır. Klonlanmış genler genelde daha güçlü ekspresyon sinyalleri üreten **ekspresyon vektörlerine** nakledilir. Bu vektörlerin taşıdığı gene ait genetik bilgi, hücrenin (*E. coli*) transkripsiyon ve translasyon sistemlerinde proteinlere çevrilir.

5.1 *E. coli* 'nin Gen Ekspresyon Sistemi

E. coli'de gen ekspresyonu (transkripsiyon ve translasyon) özel enzim sistemleriyle gerçekleştirilir. Bu enzim sistemleri genomik veya plazmit genlerinin ekspresyonunu yürütür. Ancak transkripsiyon ve translasyon safhasında enzim sistemlerine ekspresyonu yapılacak ilgili gen bölgesinden ve mRNA molekülünden transkripsiyon ve translasyon sinyalleri gelmesi gerekir (Şekil 5.1). Bu sinyaller gerçekte özgül DNA dizilerinin varlığına bağlıdır.



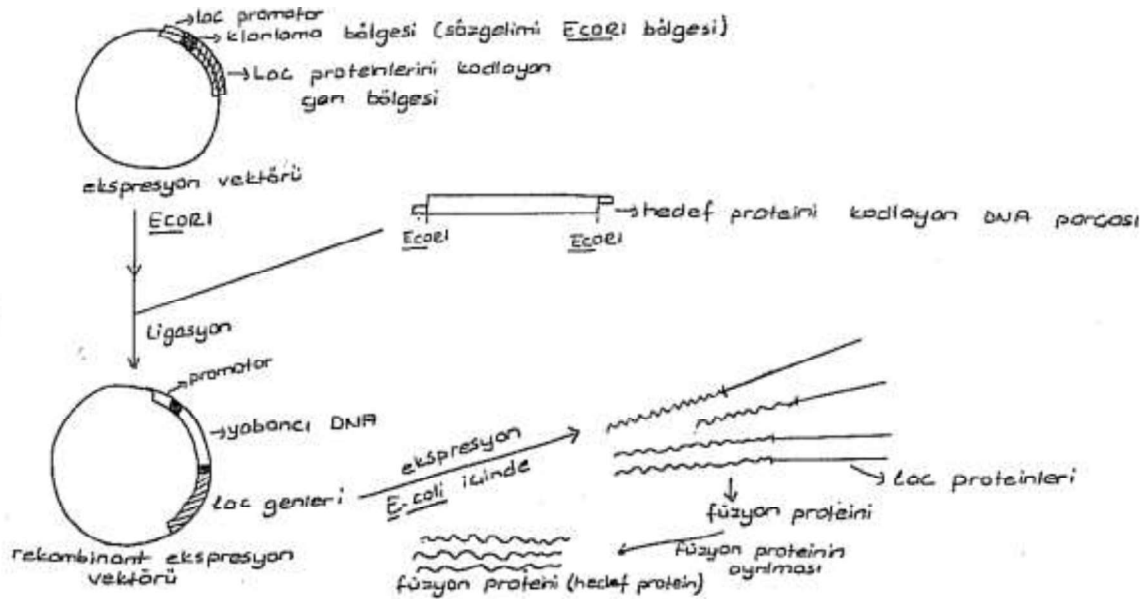
Şekil 5.1: *E. coli*'de gen ekspresyon modeli.

Üretilen proteini kodlayacak genin bulunduğu bölge transkripsiyon ile mRNA'ya dönüştürülür. Tipik bir prokaryotik DNA molekülü üzerinde proteinin amino asit dizisini belirleyen yapısal gen bölgesi ve bu bölgenin 5' ucunda bir kontrol bölgesi mevcuttur. Yapısal gen bölgesindeki kodonlar üzerinden, proteinin (polipeptitin) translasyon sistemi tarafından sentezlenebilmesi için, **promotor** bölgesinden sinyaller gelmesi gerekir. Bu transkripsiyon sinyalinin sıklığına göre promotorlar **güçlü ve zayıf promotorlar** olarak

gruplandırılabilir. Promotorun sinyal göndermesini başlatan, durduran veya hızlandıran mesajlar promotorun içindeki veya hemen bitişiğindeki nükleotit dizileri tarafından belirlenir. Bu kontrol dizilerine özel fonksiyonlu kontrol proteinleri bağlanarak veya ayrılarak promotorun faaliyeti denetlenir.

E. coli'de yabancı proteinlerin üretilmesi için gereken güçlü transkripsiyon ve translasyon sinyalleri *lac* ve *trp* promotorları tarafından sağlanır. Prokaryotlarda bir promotor ve kontrol bölgesi tarafından kontrol edilen bir veya birden fazla yapısal gen bölgesi vardır. Kontrol bölgeleriyle beraber bu genlerin tamamı operon olarak adlandırılır. Bir operondan bir veya birden fazla protein sentezlenebilir. Her bir operonun bir promotor dizisi vardır. *lac* ve *trp* operonunun promotor denilen dizileri ekspresyon vektörlerinde yaygın olarak kullanılır. T7 gibi güçlü viral promotorlar da ekspresyon vektörlerinde kullanılmaktadır. Bu tip vektörlerin transfer edileceği konak hücrelerde viral RNA polimeraz enziminin mevcut olması gerekmektedir.

Böyle güçlü promotor dizileri bazı klonlama ve ekspresyon vektörleri içine yerleştirilmiştir. Dolayısıyla eğer üretilmek istenen proteini kodlayan bir gen, sözgelimi *lac* promotorunun hemen 3' tarafındaki bir yapısal gen (*lacZ'*) içinde, doğru bir pozisyona klonlanır ve bu vektör *E. coli* hücresi içine transfer edilirse, protein sanki laktoz metabolizmasının bir enzimi imiş gibi bu hücreler içinde sentezlenir. Bu tip proteinlere **füzyon proteinleri** denir. Endüstriyel ve tıbbi önemi olan proteinler bakteriler içinde füzyon proteinleri şeklinde üretilir (Şekil 5.2).

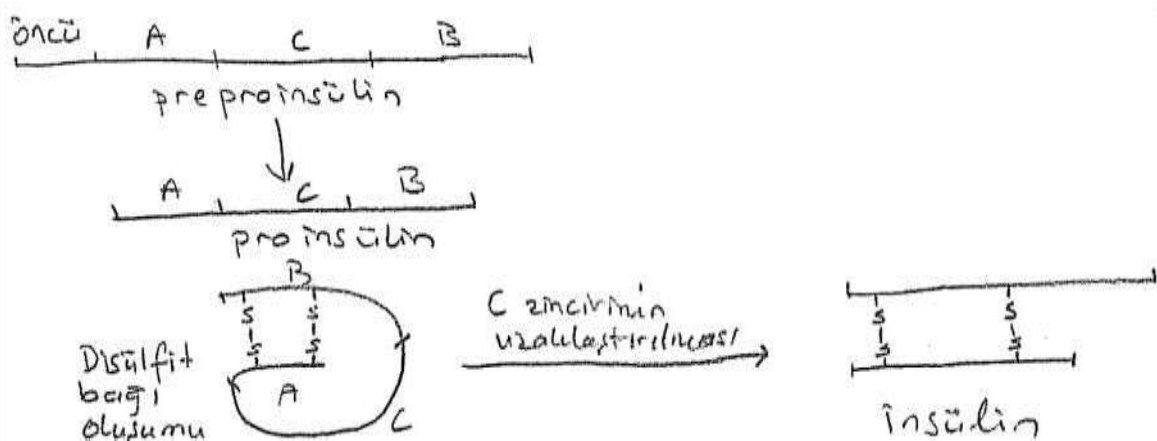


Şekil 5.2: Bir hedef proteinin füzyon proteini şeklinde *lac* promotoru altında *E. coli* içinde üretimi.

5.2 İnsan İnsülininin Bakteri Hücrelerinde Üretilmesi

İnsülin pankreastan salgılanan ve kan şeker seviyesini düzenleyen protein yapısında bir hormondur. Milyonlarca insanda insülin eksikliğine bağlı şeker hastalığı (diabetes mellitus) görülür. Bu hastalığın çoğu formu dışardan insülin enjeksiyonunu gerektirmektedir ve insülin enjeksiyonu belli aralıklarla tekrarlanmak zorundadır. Dolayısıyla milyonlarca şeker hastası için önemli miktarlarda insüline ihtiyaç duyulmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinden önceki zamanlarda bu insülin ihtiyacı, dana ve domuz pankreaslarından elde edilmekteydi. Ancak bu yöntem bir çok bakımdan etkili insülin üretimi için yeterli olmamaktaydı. Dana ve domuzdan elde edilen insülin insan insülinine çok benzemekte, aynı fonksiyonu göstermekte ancak küçük yapısal farklılıklar bazı yan etkiler ve immünolojik reaksiyonlar oluşturmaktaydı. Pahalıya mal olmakta ve büyük miktarlarda pankreastan, küçük miktarlarda insülini saflandırmak için karmaşık işlemler uygulanmaktaydı. Bütün bu işlemler zaman alıcı olmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesinden sonra insan insülin geninin klonlanması veya in vitro'da kimyasal olarak sentezlenmesi ve bu genin daha sonra *E. coli* hücreleri içinde ekspresyonu fikri gelişti. İnsülin hormonunun amino asit dizisi biliniyordu. Dolayısıyla teorik geri translasyon ve geri transkripsiyon ile, hormonu kodlayan bir sentetik DNA parçası sentezlenebilirdi. Bu yöntem uygulanarak insan insülini *E. coli* hücreleri içinde üretilmiş ve piyasaya sürülen ilk moleküler biyoteknolojik ürün olmuştur.

İnsan insülini insan hücrelerinde preproinsülin şeklinde üretilir. Preproinsülin bir **öncü bölge**, **A zinciri**, **B zinciri** ve A ve B zincirlerini bağlayan **bağlayıcı polipeptit** bölgesinden oluşur. Öncü bölge translasyon tamamlandıktan sonra yapıdan uzaklaştırılır. Sonra A, B ve bağlayıcı polipeptit bölgelerinden oluşan proinsülin yapısında disülfid bağları oluşarak A ve B zincirleri birbiriyle birleşir. Bu birleşmeden sonra bağlayıcı polipeptit yapıdan uzaklaştırılır ve sadece A ve B zincirlerinden oluşmuş fonksiyonel insülin proteini meydana gelir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3: Pankreasta fonksiyonel insülin sentez modeli.

Bu gün için bakterilerde (*E. coli*) insülin üretimi için iki yaklaşım mevcuttur:

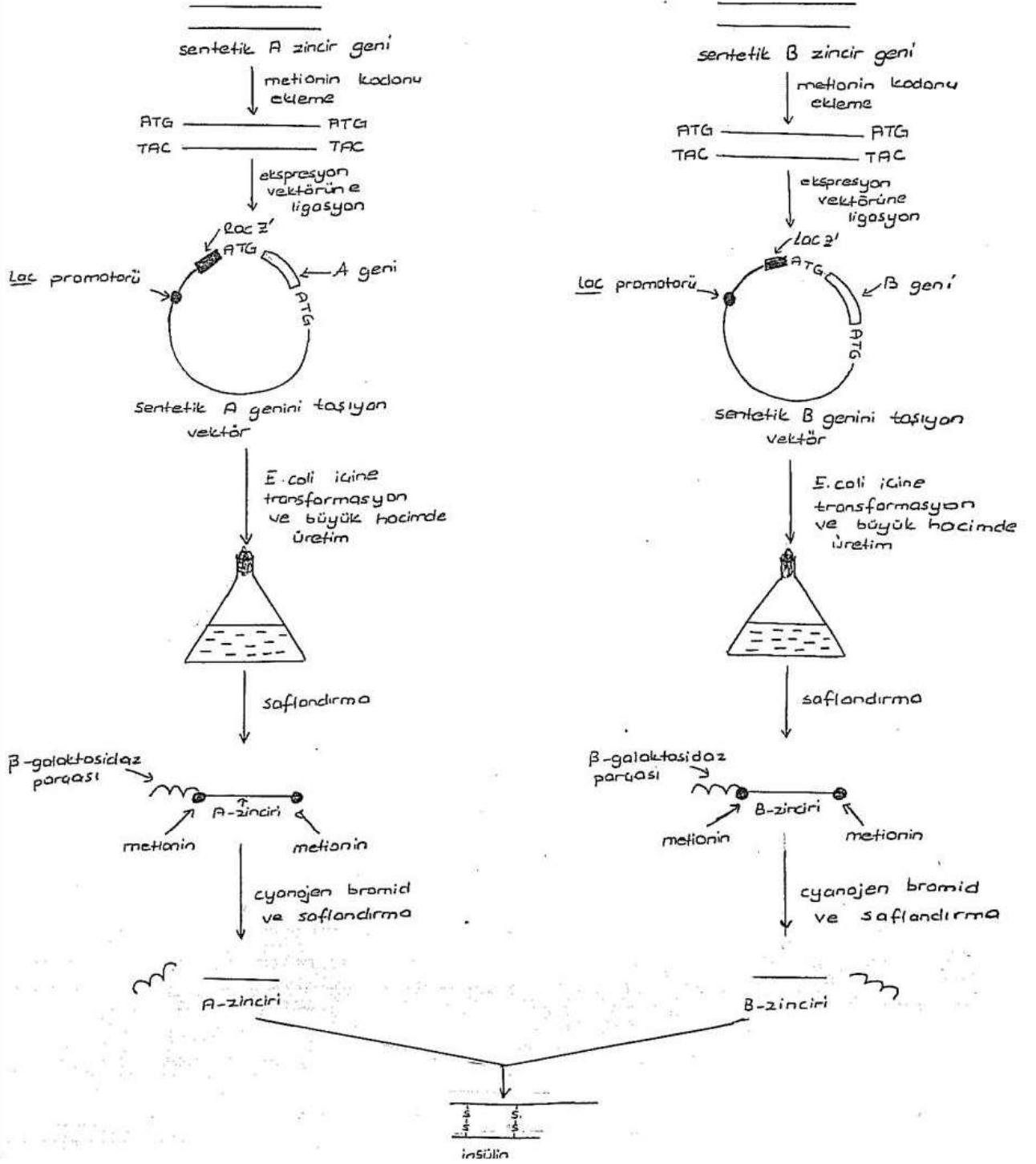
1. A ve B zincirlerini iki ayrı bakteri kültüründe üreterek iki polipeptiti insülin oluşturmak üzere birleştirmek.
2. Proinsülin üretilmesi ve kimyasal işlemlerle insüline dönüştürülmesi.

5.2.1 A ve B zincirlerinin ayrı ayrı üretimi

Fonksiyonel insülinin yapısında bulunan A zinciri 21 ve B zinciri de 30 amino asitten meydana gelmektedir. Dolayısıyla A zinciri 63 ve B zinciri 90 nükleotit büyüklüğünde DNA molekülleri tarafından kodlanır. Bu DNA molekülleri *in vitro*'da sentetik olarak üretilen kadar küçüktür. Bu sentetik DNA molekülleri iki ekspresyon vektörüne ayrı ayrı ligasyonla bağlanıp farklı *E. coli* hücrelerinde füzyon proteini olarak ekspresyonları gerçekleştirilebilir.

Bu noktada bir problemin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Bir füzyon proteini (burada A veya B zinciri) bir operonun parçası olarak üretilir ve sonuçta o operonun normal bir proteinine bitişik olarak sentezlenir. Translasyondan sonra bu füzyon proteininin diğer proteinden ayrılması gerekir. Bu işlemi füzyon proteininin her iki ucuna bir metionin amino asiti ekleyerek başarmak mümkündür (Şekil 5.4). Bir polipeptit içindeki metionin amino asitleri siyanojen bromid tarafından koparılmaktadır. Geçekte insülin içinde hiç metionin amino asiti yoktur. Dolayısıyla eğer zincirlerin her iki ucuna birer metionin ekleyerek üretim gerçekleştirilirse, sonuçta oluşan rekombinant protein siyanojen bromid ile muamele edildiğinde füzyon proteini saf olarak elde edilebilir. Bir füzyon proteinine (burada A ve B zinciri) metionin eklemek için proteini kodlayan DNA parçasının her iki ucuna metionin kodonlarının (ATG) eklenmesi gerekir. Bu işlem kimyasal DNA sentezi sırasında gerçekleştirilebilir.

lac promotörü tarafından gönderilen transkripsiyon sinyalleri ile *E. coli* hücreleri içinde, fazla miktarda üretilen rekombinant protein, saflandırılır ve siyanojen bromid ile muamele edilir. Hedef füzyon proteinleri (A veya B zinciri) tekrar saflandırılarak birbirleriyle karıştırılır ve iki disülfit bağının oluşumuyla fonksiyonel formda insülin oluşumu tamamlanır.



Şekil 5.4: A ve B zincirlerinin ayrı ayrı sentezi ile insülin üretim modeli.

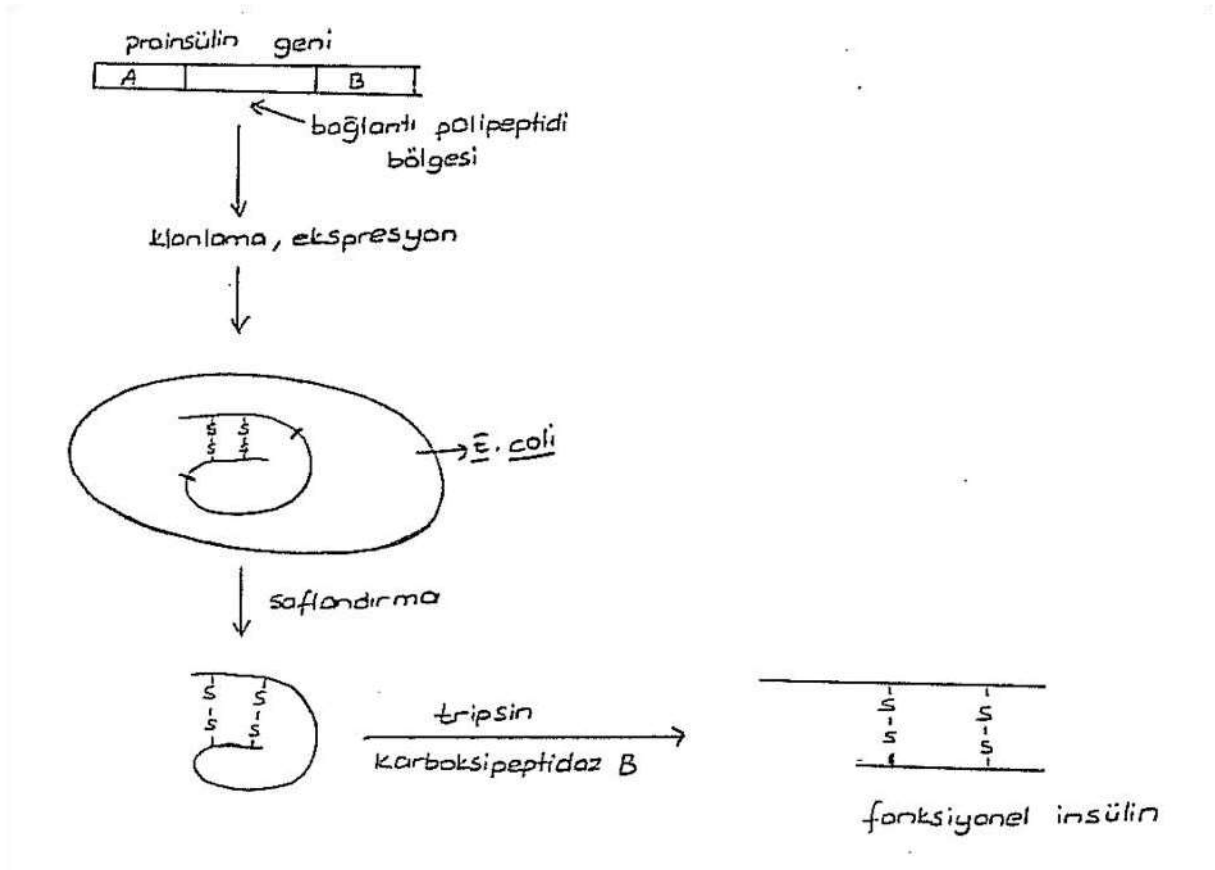
5.2.2 Proinsülin üretim yöntemi

A ve B zincirlerinin ayrı ayrı bakteri kültürlerinde üretilmesi etkili bir şekilde çalışmaktadır. Ancak son aşamada in vitro disülfid bağ oluşumu verimli olmamakta ve üretilen zincirlerin çoğu fonksiyonel insüline dönüştürülememektedir. Halbuki eğer insülini kodlayan tek bir DNA molekülü hücre içine transfer edilerek üretim gerçekleştirilse, in vivo'da bu disülfid

bağları etkili bir şekilde oluşmaktadır. Bu durumda da A ve B zincirlerini bağlayan, bağlayıcı polipeptitin uzaklaştırılması gerekmektedir.

Proinsülin üretilip (*E. coli* içinde) disülfid bağları oluşuktan sonra protein saflandırılarak tripsin ve karboksipeptidaz B gibi proteazlarla muamele edilir. Bu enzimler sadece proinsülinin bağlayıcı polipeptit zincirini parçalar, A ve B zincirine zarar vermez. Sonra fonksiyonel insülin saflandırılır (Şekil 5.5). (*E. coli* hücreleri disülfid bağ oluşturma mekanizmalarına sahip ancak insan insülininin bağlayıcı zincirini parçalayacak enzim sistemlerine sahip değildir).

Bu yollarla elde edilen insülin insan pankreasında üretilen insülin ile aynıdır ve herhangi bir yan etki veya allerjik reaksiyon göstermesi söz konusu değildir. Daha ucuza ve daha hızlı üretilmektedir.



Şekil 5.5: Proinsülin yöntemi ile insülin üretim modeli.