



REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ VE KULLANIM ALANLARI

Öğr. Gör. Fatma Beril KOÇYİĞİT
Dr. Öğr. Üyesi Güzde ARKALI

ISBN 978-625-5923-86-8
Ankara -2025

REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ VE KULLANIM ALANLARI*

YAZARLAR

Öğr. Gör. Fatma Beril KOÇYİĞİT¹

Dr. Öğr. Üyesi Gözde ARKALI²

¹Harran Üniversitesi, Birecik Meslek Yüksekokulu, Şanlıurfa, Türkiye

ozgurberil@harran.edu.tr

ORCID ID: 0000-0001-5659-394X

²Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Elazığ, Türkiye

garkali@firat.edu.tr

ORCID ID: 0000-0002-0850-7557

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.16881238>



Copyright © 2025 by UBAK publishing house

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, distributed or transmitted in any form or by

any means, including photocopying, recording or other electronic or mechanical methods, without the prior written permission of the publisher, except in the case of brief quotations embodied in critical reviews and certain other noncommercial uses permitted by copyright law. UBAK International Academy of Sciences Association

Publishing House®

(The Licence Number of Publicator: 2018/42945)

E mail: ubakyayinevi@gmail.com

www.ubakyayinevi.org

It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.

UBAK Publishing House – 2025©

ISBN: 978-625-5923-86-8

August / 2025

Ankara / Turkey

ÖNSÖZ

Bilim ve teknolojinin gösterdiği hızlı gelişim, biyoteknoloji alanında devrim niteliğinde ilerlemelere yol açmıştır. Bu ilerlemelerin başında, genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak elde edilen rekombinant proteinlerin üretimi ve çok çeşitli alanlarda kullanımı gelmektedir. Rekombinant protein teknolojisi, sadece temel bilimlerde değil; tıp, eczacılık, tarım, gıda ve endüstriyel üretim gibi pek çok disiplini doğrudan etkileyen, çok yönlü ve uygulamaya dönük bir alandır.

Bu kitap, rekombinant protein üretiminin temel prensiplerinden başlayarak, uygulama alanlarına kadar geniş bir çerçevede bilgi sunmayı amaçlamaktadır. Okuyucunun bu alandaki bilimsel temelleri kavraması ve güncel uygulamaları anlayabilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, ilaç geliştirme süreçlerinden tarımsal biyoteknolojiye, enzim üretiminden moleküler teşhise kadar rekombinant proteinlerin katkı sağladığı başlıca alanlara kitapta yer verilmiştir.

Bu eserin, özellikle lisansüstü öğrenciler, akademisyenler, araştırmacılar ve biyoteknoloji endüstrisinde çalışan profesyoneller için faydalı bir başvuru kaynağı olması amaçlanmıştır. Kitabın hazırlanmasında, alanla ilgili güncel bilimsel yayınlar ve uygulamalar dikkate alınmış; okuyucunun hem temel bilgiye ulaşması hem de ileri düzeyde içeriğe erişebilmesi için dengeli bir yapı kurulmuştur.¹

* Bu kitap Fatma Beril KOÇYİĞİT'in doktora seminerinden derlenmiştir.

Kitabın hazırlanmasında emeği geçen tüm araştırmacı, akademisyen ve katkı sağlayanlara teşekkür eder, bu eserin biyoteknoloji literatürüne ve bilimsel bilgiye katkı sağlamasını temenni ederiz.

14/08/2025

Öğr. Gör. Fatma Beril KOçYİğİT

Dr. Öğr. Üyesi Gzde ARKALI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
GİRİŞ	1
1. PROTEİN SENTEZİ	4
1.2. Translasyon	8
1.3. Translasyon Sonrası Modifikasyon	10
2. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ	12
3. REKOMBİNANT PROTEİN	22
3.1. Rekombinant Protein Üretimi için Plazmid Seçimi	23
3.2. Rekombinant Protein Üretimi için Uygun Konakçı Seçimi	34
3.3. Rekombinant Proteinlerde Üretim Zorlukları	44
4. REKOMBİNANT PROTEİNLERİN KULLANIM ALANLARI	47
4.1. Rekombinant Proteinlerin Araştırmalarda Kullanımı	48
4.2. Rekombinant Proteinlerin Tıpta Kullanımı	48
4.3. Rekombinant Proteinlerin Endüstriyel Kullanımı	50
4.4. Rekombinant Proteinlerin Tarım ve Hayvancılıkta Kullanımı	50
KAYNAKÇA	52

REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ VE KULLANIM ALANLARI

Öğr. Gör. Fatma Beril KOÇYİĞİT, Dr. Öğr. Üyesi Gözde ARKALI

GİRİŞ

Proteinler, hem canlı organizmaların hücresel faaliyetlerinde kritik roller üstlenmekte hem de insan sağlığı açısından vazgeçilmez bir molekül grubunu temsil etmektedir. Yaşam için önemli fonksiyonlara sahip proteinler, vücutta yapısal veya mekanik işlevleri olan amino asit adı verilen küçük moleküllerin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Her protein, kendine özgü bir amino asit dizisine sahiptir ve bu dizi, proteinin üç boyutlu şeklini ve işlevini belirlemektedir. Proteinler hücredeki işlevsel ihtiyaca bağlı olarak sentezlenmektedir. Protein sentezi, hücrelerin ihtiyaç duyduğu proteinleri üretmek için gerçekleştirdiği karmaşık ama düzenli bir biyolojik süreçtir. Bu süreç, hücre çekirdeğinde başlamakta ve ribozomlarda devam etmektedir. Mesajcı RNA (mRNA), DNA’da bulunan genetik bilgiyi hücre çekirdeğinden sitoplazmaya taşıyan moleküldür. Mesajcı RNA, sentezlenecek proteinin aminoasit dizisini karşılayan kimyasal şifreyi taşımaktadır. DNA’daki bilgi, protein sentezinin gerçekleştiği ribozomlara ulaştırılmak üzere mRNA’ya kopyalanır. Böylece mRNA, genetik kodu nükleotit dizisi şeklinde ribozomlara ileterek, hangi amino asitlerin hangi sırayla bir araya geleceği belirlenmektedir. Ribozomda translasyon sürecinin sonucunda RNA polimerindeki bilgiyle amino asit polimeri oluşmaktadır. Nükleik asitlerde (mRNA ve DNA) bulunan her üç bazlık dizi, bir amino aside karşılık gelmektedir ve bu üçlü

dizilere 'kodon' adı verilmektedir. Her kodon belirli bir amino asidi kodlarken, bazı özel kodonlar da protein sentezinin sonlandığını bildiren 'durdur' (stop) sinyali görevi görmektedir (Carter & Houlihan, 2001).

Proteinlerin organizmanın ihtiyacına göre sentezlenmelerine homolog gen ifadesi, belirli genleri doğal ifade ortamlarının dışında sentezlemelerine ise heterolog gen ifadesi denilmektedir. Heterolog gen ifadesi, bir organizmanın kendi doğal genomunda bulunmayan, başka bir canlıdan alınmış bir genin genetik mühendislik yöntemleriyle o organizmaya aktarılması ve burada aktif hale getirilip ürününün üretilmesi sürecidir. Bu yöntem, genellikle istenilen proteinin büyük miktarda ve kontrollü şekilde üretilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Heterolog gen ifadelerinin oluşturulmasında rekombinant üretim teknolojileri kullanılmaktadır. Rekombinant protein, manipüle edilmiş bir protein şekli olup protein üretimini iyileştirmek, faydalı ticari ürün elde etmek ve gen sekanslarını değiştirmek amacıyla değişik şekillerde üretilmektedir.

Gen ekspresyonu ve mRNA'nın translasyonunun desteklendiği bir sistemde klonlanmış rekombinant DNA tarafından rekombinant protein kodlanmaktadır. Hedef proteinin cDNA sekansı, iyi karakterize edilmiş bir promotörün kontrolünde olacak ve yüksek seviyeli protein ekspresyonu elde etmek amacıyla seçilen konak hücre içindeki hedef proteini eksprese edecek şekilde rekombinant DNA molekülleri tasarlanmaktadır. Genetik rekombinasyon teknolojisi aracılığıyla genin modifiye edilmesiyle bir mutant protein veya büyük miktarda proteinin ekspresyonu gerçekleştirilebilmektedir. Protein ekspresyon sistemi

genellikle bakteri, maya, bakulovirüs ve memeli ekspresyon sistemini kapsamaktadır. Biyoteknolojik çalışmalarda üretilen rekombinant proteinin çözünür ve fonksiyonel özellikte olması arzu edilmektedir. Bu doğrultuda üretilecek proteine uygun organizma ve uygun büyüme koşulları seçimi büyük önem taşımaktadır. *Escherichia coli* (*E. coli*), en yaygın rekombinant protein ekspresyon sistemi olup laktik asit ve psikrofilik bakteriler gibi prokaryotik ekspresyon sistemleri de sık olarak kullanılmaktadır. Ekspresyonu zor olan bazı rekombinant proteinlerin üretiminde ise mikroalgler, fungus, maya, memeli ve böcek hücreleri gibi ökaryot ekspresyon sistemlerden de faydalanılmaktadır (Ferrer-Miralles et al., 2015). Bahsedilen ekspresyon sistemlerinden *E. coli*, yüksek verim ve hızlı büyüme oranı sunarken; *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris* gibi maya sistemleri de proteinlere translasyon sonrası modifikasyonları (PTM) sağlamaktadır. Klinik kullanım için onaylanmış rekombinant terapötiklerin çoğunda memeli ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. 2015-2019 yılları arasında kullanılan protein bazlı biyofarmasötik ajanların %84'ü memeli hücre hatlarında eksprese edilmektedir (Dangi et al., 2018).

Rekombinant proteinler, biyofarmasötik alanda protein-protein etkileşimlerinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca moleküler biyoloji, hücre biyolojisi, biyokimya ve diğer araştırma alanlarında (aşı üretimi gibi) kullanılmaktadır. ELISA, Western Blot, immünohistokimya vb. gibi laboratuvar tekniklerinde önemli uygulamalar arasında yer almaktadır. Kanser, diyabet, miyokard infarktüsü, multiple skleroz, konjestif kalp yetmezliği ve Crohn hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan enzimler, büyüme

faktörleri, interferonlar, rekombinant hormonlar, trombolitik ilaçlar, kan pıhtılaşma faktörleri ve interleokinler klinikte kullanım sahası bulan rekombinant proteinler arasında yer almaktadır. Rekombinant insan insülini, 1982 yılında tedavide kullanılan ilk rekombinant proteindir. İki bin on dört yılında 200'ü aşkın rekombinant protein molekülünün ilaç olarak kullanıldığı bilinmekte olup, bu sayı her geçen gün artmaktadır. 2018 yılına kadar 130'dan fazla rekombinant protein FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından klinik kullanım için onay almıştır (Pham, 2018). Rekombinant protein üretimindeki gelişmeler sayesinde yüksek verim ve düşük maliyetli protein üretimi mümkün hale gelmektedir. Bu durum aynı zamanda proteinlerin endüstriyel ölçekte üretilmesini ve pek çok hastalığın tedavi edilmesini sağlamaktadır (Tripathi & Shrivastava, 2019).

Rekombinant protein teknolojisi, genetik mühendisliğinin en önemli uygulamalarından birisi hâline gelmiştir. Canlılardan izole edilmesi zor veya miktarı az olan proteinlerin hızlı, ekonomik ve güvenli bir şekilde üretilmesine olanak sağlamaktadır. Özellikle tıbbi tedavilerde devrim yaratmakta, modern biyoteknolojinin temel taşlarından biri olmaktadır.

1. PROTEİN SENTEZİ

Proteinler tüm canlıların temel parçalarıdır. Hormonlar, antikorlar, enzimler, kas, ligament, kıkırdak gibi vücut parçalarının tümü DNA'mızın kodladığı proteinlerden yapılmaktadır. Protein sentezi, hücrelerin ihtiyaç duyduğu proteinlerin sentezlediği karmaşık bir süreçtir. Proteinler gen ekspresyonunun son ürünüdür. Hücrede

meydana gelen biyosentez olaylarında harcanan enerjinin %90'ı protein sentezinde kullanılmaktadır. Proteinler, hücrenin sitoplazmasında bulunan ribozomlarda üretilmektedir. Ribozomlar genetik materyali talimat alarak okumakta ve aminoasitleri doğru sırayla bir araya getirmektedir. Aminoasitler proteinlerin yapı taşları olan organik moleküllerdir. Aminoasitler dehidrasyon sentezi süreciyle peptit bağlarıyla birbirine bağlanmaktadır. Bu nedenle ribozomlar hücrenin protein üretim makinasıdır (Carter & Houlihan, 2001).

Komplike olaylar olmasına karşın proteinler oldukça hızlı sentez edilmektedir. Protein sentezinin transkripsiyon, translasyon ve translasyon ardından modifikasyon olmak üzere aşamaları bulunmaktadır. Transkripsiyon sırasında DNA, mRNA'ya kopyalanmaktadır. Translasyon sırasında ise mRNA bir protein oluşturmak için okunmakta ve translasyon sonrası modifikasyonda protein modifiye edilmektedir (Katz & Ashley, 2005).

DNA zincirinde bulunan kodların RNA molekülündeki tamamlayıcı biçimi şöyledir;

1.1. Transkripsiyon

Protein sentezinin ilk aşaması transkripsiyondur. Bu basamakta DNA üzerindeki genetik bilgi mRNA'ya aktarılmaktadır. RNA polimeraz adı verilen enzim aracılığıyla transkripsiyon gerçekleştirilmektedir. DNA ipliğini şablon olarak kullanan RNA polimeraz, nükleotidleri birbirine bağlamakta ve bir RNA ipliği oluşturmaktadır. Daha net bir ifadeyle, RNA polimeraz, 5'-3' yönde bir RNA ipliği sentezlemekte ve bu esnada her yeni nükleotidi, ipliğin 3'

ucuna eklemektedir. Bu işlem hücre çekirdeğinde gerçekleşmekte ve protein üretimi için gerekli olan mesajın oluşturulması sağlanmaktadır.

Transkripsiyon, kalıba bağlanma ve başlama, zincir uzaması ve sonlanma basamaklarından oluşmaktadır (Katz & Ashley, 2005).

Kalıba Bağlanma ve Başlama (İnisiyasyon); Bir genin okunmaya başladığı bölgenin ön kısmında yer alan DNA dizisi "promotör" olarak adlandırılmaktadır. RNA polimeraz enzimi, genin bu promotör bölgesini tanır ve bu bölgedeki DNA sarmalı açılarak, enzimin DNA zincirinin bir ipliğine bağlanması sağlanmaktadır. Transkripsiyonun yönüne bağlı olarak bu bölgeler için “yukarı” (upstream) ve “aşağı” (downstream) terimleri kullanılmaktadır. Promotör bölgesi, gen ekspresyonunu düzenleyen çeşitli DNA dizilerini içermektedir. Ökaryotik hücrelerde RNA polimeraz II’nin bu bölgeleri tanınması, transkripsiyonun başlatılabilmesi için zorunludur. Ökaryotlarda RNA polimeraz II’nin etkin şekilde transkripsiyonu başlatabilmesi için en az üç adet cis-acting element (aynı DNA ipliğinde bulunan düzenleyici öğe) görev yapar: TATA kutusu, CAAT kutusu ve Enhancer dizileri. **TATA kutusu**, transkripsiyon başlangıç noktasının yaklaşık 30 nükleotid yukarısında yer alır ve çoğunlukla adenin (A) ve timin (T) bazlarından oluşmaktadır. Bu dizinin görevi DNA sarmalının çözülmesini kolaylaştırmak ve transkripsiyon başlangıç noktasını belirlemektir. **CAAT kutusu**, başlangıç noktasının yaklaşık 80 nükleotid yukarısında yer almakta ve tipik olarak GGCCAATCT dizisini içermektedir. TATA kutusu ile çalışarak promotörün RNA polimeraz II tarafından verimli bir şekilde tanınmasını ve transkripsiyonun başlamasını sağlamaktadır. **Enhancer**

dzileri ise genin oldukça uzağında, yukarısında, aşağısında ya da genin içinde bulunabilmektedir. RNA polimerazın promotöre bağlanmasına doğrudan katkı sağlamazlar ancak transkripsiyonun etkin şekilde başlatılmasında önemli rol oynamaktadır.

Transkripsiyon sürecinde cis-acting düzenleyicilere ek olarak trans-acting faktörler de görev almaktadır. Bunlar, protein yapısında olan ve genellikle transkripsiyon faktörleri olarak adlandırılan moleküllerdir. RNA polimeraz II, bu transkripsiyon faktörleri olmaksızın ökaryotik promotör bölgelerine doğrudan bağlanamaz ve bu nedenle transkripsiyona başlayamaz. Transkripsiyonun ilk adımı, TFIID adlı transkripsiyon faktörünün TATA kutusuna bağlanmasıyla başlamaktadır. TFIID, yaklaşık on polipeptid alt biriminden oluşmaktadır. Bu bağlanmayı takiben diğer transkripsiyon faktörleri (örneğin TFIIA, TFIIB) de DNA'ya ve TFIID'ye bağlanarak, RNA polimeraz II'nin tutunacağı büyük bir ön başlangıç kompleksi oluşturmaktadırlar. TFIIF, ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyle DNA'nın iki ipliğini transkripsiyon başlangıç noktasında açmaktadır. Aynı zamanda RNA polimeraz II'yi fosforile ederek, bu enzimin yapısında konformasyonel bir değişikliğe neden olmaktadır. Bu fosforilasyon sonucu polimeraz üzerindeki bazı transkripsiyon faktörleri ayrılır ve RNA polimeraz senteze başlamaya hazır hale gelmektedir.

Uzama (Elongasyon); RNA polimeraz, DNA ipliğini kalıp olarak kullanarak karşısına gelen nükleotitlere uygun ribonükleotitleri yerleştirmekte ve böylece mRNA zinciri sentezlenmektedir. Bu süreçte DNA çift sarmalı geçici olarak açılmakta ve yalnızca tek bir iplik RNA

sentezi için kullanılmaktadır. Her yeni nükleotid, RNA zincirinin 3'-hidroksil grubuna bağlanarak 5'-3' yönünde fosfodiester bağlarıyla uzamaktadır. Geçici olarak DNA-RNA hibrit iplik oluşmakta, ancak RNA sentezi tamamlandıkça DNA tekrar kapanarak orijinal çift sarmallı yapısına dönmektedir (Taanman, 1999).

Sonlanma (Terminasyon); RNA polimeraz, genin sonuna ulaştığında sonlandırıcı DNA dizilerini tanımaktadır. Bu tanımayla birlikte enzim kararsız hale gelmekte ve DNA ile yeni sentezlenen RNA ipliği enzimden ayrılmaktadır (Taanman, 1999). Böylece mRNA sentezi tamamlanmış olmaktadır. Transkripsiyon, DNA'daki kalıcı genetik bilginin, protein sentezine temel oluşturacak geçici bir RNA kopyasına çevrilmesini sağlamaktadır. Elde edilen mRNA, çekirdekten sitoplazmaya taşınmakta ve ribozomlarda translasyon süreciyle protein sentezi başlatılmaktadır. Bu mekanizma sayesinde hücreler, ihtiyaç duydukları proteinleri doğru zamanda ve doğru miktarda üretebilmektedir.

1.2. Translasyon

Translasyon, protein sentezinin ikinci ve en kritik aşamasıdır. Bu süreçte, mRNA üzerinde taşınan genetik bilgi, amino asit dizisine çevrilerek işlevsel bir protein oluşturulmaktadır. Translasyon, hücre sitoplazmasında ribozomlarda gerçekleşmektedir. Translasyon, transkripsiyon sonunda meydana gelen mRNA'daki koda göre ribozomlarda oluşturulan polipeptid sentezidir. Zincirin katlanmasıyla etkin bir protein meydana gelmektedir ve translasyonun birçok komponenti mevcuttur. Bunlar arasında oldukça önemli olan

komponent ribozom ve taşıyıcı RNA (tRNA)'dır. Ribozom, biri büyük diğeri küçük olmak üzere iki alt birimden oluşur ve protein ile ribozomal RNA'dan (rRNA) meydana gelmektedir. Translasyon sürecinde görev alan taşıyıcı RNA (tRNA), amino asitleri ribozomlara taşıyan ve antikodon bölgeleri aracılığıyla mRNA'daki kodonları tanıyan bir moleküldür. Böylece tRNA, mRNA ile sentezlenecek protein arasında bir tür "çevirmen" görevi görmektedir.

tRNA molekülleri 75–90 nükleotid arasında değişen yapıya sahiptir ve hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda oldukça benzerlik göstermektedir. RNA türleri arasında en küçük yapıya sahip olanlardır. Translasyon sırasında ribozomlarla aynı anda birden fazla tRNA'nın etkileşime geçebilmesi için bu küçük moleküler yapı büyük avantaj sağlamaktadır. Her biri belirli bir amino asidi tanıyan ve taşıyan en az 20 farklı tRNA türü hücrede bulunmaktadır. Yapı olarak tüm tRNA'ların 5' fosfat (P) uçları her zaman guanin (G) bazı ile başlamakta, 3' hidroksil (OH) uçları ise daima CCA dizisi ile sonlanmaktadır. Bu son CCA dizisi, amino asidin bağlandığı yerdir ve translasyon için kritik öneme sahiptir. (Carter & Houlihan, 2001). Translasyonun da başlama, uzama ve sonlanma olarak 3 aşaması bulunmaktadır.

Başlama (İnisiyasyon): mRNA, ribozomun küçük alt birimine bağlanmaktadır. Daha sonra, özel bir başlama tRNA'sı (başlama tRNA) üzerinde taşıdığı metiyonin amino asidi ile birlikte ribozoma gelmekte ve büyük alt birim eklenerek fonksiyonel ribozom kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks, mRNA üzerindeki ilk kodon olan AUG kodonunu tanımaktadır.

Uzama (Elongasyon): Ribozom, mRNA üzerindeki kodonları tek tek okumaktadır. Her kodon, taşıyıcı RNA (tRNA) molekülleri tarafından uygun amino asit ile eşleştirilmektedir. tRNA üzerindeki antikodon, mRNA'daki kodonla baz eşleşmesi yapmaktadır. Amino asitler peptit bağlarıyla birbirine bağlanarak polipeptit zinciri uzamaktadır.

Sonlanma (Terminasyon): Ribozom, mRNA üzerinde sonlanma kodonuna (UAA, UAG veya UGA) ulaştığında, protein sentezi durmaktadır. Polipeptit zinciri ribozomdan ayrılır ve katlanarak işlevsel bir protein haline gelmektedir.

Translasyon, genetik bilginin amino asit dizisine çevrilmesiyle proteinlerin sentezlenmesini sağlamaktadır. Proteinler, hücre içindeki yapısal ve fonksiyonel görevleri üstlenen temel moleküllerdir. Bu süreç sayesinde hücreler, büyüme, onarım ve metabolizma gibi yaşamsal fonksiyonlarını sürdürebilmektedir.

1.3. Translasyon Sonrası Modifikasyon

Protein sentezinin tamamlanmasının ardından, yeni oluşan polipeptit zinciri çoğu zaman doğrudan işlevsel hale gelmemektedir. Hücre içerisinde bu polipeptitler, çeşitli kimyasal değişikliklerle yani translasyon sonrası modifikasyonlarla işlevsel ve stabil proteinlere dönüştürülmektedir. Bu modifikasyonlar, proteinin yapısını, aktivitesini, lokalizasyonunu ve etkileşimlerini düzenlemektedir. Protein, translasyon sonrası modifikasyonları (PTM'ler), fonksiyonel grupların veya proteinlerin kovalent eklenmesi, düzenleyici alt bölümlerin proteolitik bölünmesi veya tüm proteinlerin parçalanması

gibi yollarla proteomun fonksiyonel çeşitliliğini arttırmaktadır. Çoğu protein faaliyet ortaya koyabilmesi amacıyla PTM olarak adlandırılan işlem gerçekleştirilmektedir. PTM, hem ökaryotik hem de prokaryotik hücrelerde kullanılan bir mekanizma olup, proteinlerin zamansal ve mekânsal düzenlenmesinde ve bu proteinler aracılığıyla yürütülen hücresel aktivitelerin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Bir proteinin yaşam döngüsü boyunca maruz kaldığı PTM türleri ve sayısı oldukça fazla olabilmektedir. Özellikle ökaryotik hücrelerde sık rastlanan ve detaylı biçimde araştırılan başlıca PTM türleri arasında fosforilasyon, glikozilasyon, asetilasyon, açılasyon, prenilasyon, metilasyon, ubiquitinasyon ve proteolitik parçalanma yer almaktadır. Bu modifikasyonların gerçekleştirilmesinde binlerce farklı enzim görev almaktadır. PTM'lerin ve bu süreçte rol oynayan enzimlerin iyi anlaşılması, hücre biyolojisinin temel dinamiklerinin kavranması açısından olduğu kadar, hastalıkların önlenmesi ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi bakımından da kritik öneme sahiptir (Karsdal et al., 2010).

Fosforilasyon: Proteinlere fosfat grubu eklenmektedir (genellikle serin, treonin veya tirozin amino asitlerine). Bu modifikasyon, proteinlerin aktivitesini açıp kapatmada önemli rol oynamakta ve sinyal iletim yollarında kritik bir adım olmaktadır (Ramazi & Zahiri, 2021).

Glikozilasyon: Proteinlere karbonhidrat (şeker) molekülleri bağlanmaktadır. Özellikle hücre dışına salgılanan veya zar proteinlerinde yaygın olmaktadır. Proteinlerin stabilitesini,

katlanmasını ve hücreler arası iletişimi etkilemektedir (Ramazi & Zahiri, 2021).

Metilasyon: Proteinlerde belirli amino asitlere metil grubu eklenmektedir. Genellikle gen ifadesinin düzenlenmesinde ve protein-protein etkileşimlerinde rol oynamaktadır (Duan & Walther, 2015).

Asetilasyon: Proteinlerin N-terminal uçlarına veya lizine asetil grupları eklenmektedir. Bu modifikasyon protein stabilitesi ve fonksiyonu üzerinde etkili olmaktadır (Duan & Walther, 2015).

Ubiquitinasyon: Proteine ubiquitin adlı küçük bir protein eklenir. Bu genellikle proteinin yıkımı için işaret olarak kullanılmaktadır (Lee et al., 2023).

Proteolitik Kesim: Bazı proteinler, işlevsel hale gelmek için belirli bölgelerinden kesilir. Örneğin, insülin sentezinde öncül protein (preproinsülin) kesilerek aktif insülin oluşmaktadır (Lee et al., 2023).

2. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

Rekombinant DNA teknolojisi bir türün genlerini veya DNA'sını diğer bir türün genleri veya DNA'sı ile birleştirme esasına dayalı bir teknolojidir. Kavram itibarıyla rekombinant DNA (rDNA) ayrı iki türün, DNA'larının birleştirilmesi sonucu ortaya çıkan DNA molekülü olarak tanımlanmaktadır. Bu teknoloji öncelikle en kritik proteinlerin üretimi için kullanılmaktadır. Moleküler biyolojinin kökenlerinin atılmasında önemli fayda sağlayan ve günümüzdeki moleküler biyolojisinin gelişimine rekombinant DNA teknolojisinin katkısı çok fazladır. Rekombinant DNA'nın bulunmasının ardından moleküler biyoloji alanı çok hızlı şekilde büyüyerek devam etmektedir. Kısacası

rekombinant DNA teknolojisi ile hedeflenen bir genin, başka bir hücrede RNA veya proteini üretmesi amaçlanmaktadır (Roberts, 2019).

Rekombinant DNA teknolojisinde birçok adım bulunmakla birlikte, ilk basamak istenilen proteini kodlayan genin klonlanmasıdır. Bu işlemde, hedef DNA parçası restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmekte ve gen taşıyıcısı (vektör) olarak kullanılan plazmit veya virüs DNA'sı ile ligaz enzimleri aracılığıyla birleştirilmektedir. Böylece rekombinant DNA elde edilmektedir. Bu yapı, uygun bir konakçı hücreye aktarılarak istenilen proteinin yüksek miktarda üretimi sağlanmaktadır (Lau & Dunn, 2018). Rekombinant DNA için kullanılan genetik materyal, genomik DNA ya da komplementer DNA (cDNA) olabilir. Bakteri, virüs, bitki ya da hayvan kökenli DNA örnekleri kullanılabilir. Bu örnekler genellikle DNA kütüphaneleri veya gen bankaları adı verilen koleksiyonlarda yer almaktadır. Genomik DNA kütüphaneleri, bir organizmanın tüm genomunu temsil eden DNA dizilerinin kopyalarını içermektedir. cDNA kütüphaneleri ise sadece mRNA'lara karşılık gelen DNA dizilerini içermektedir. Bu kütüphaneler, genellikle belirli bir hücre veya dokudan elde edilen mRNA'ların revers transkriptaz ve DNA polimeraz enzimleri ile çift sarmallı cDNA'ya dönüştürülmesiyle oluşturulmaktadır. Seçilen DNA dizisinin çoğaltılması, biyolojik ortamda klonlama ya da polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile yapılabilir. PCR yöntemi, istenilen nükleotid dizisinin milyonlarca kopyasını birkaç saat içinde üretme olanağı sağlamaktadır. Rekombinant DNA uygulamalarında genellikle ökaryotik bir proteinin bakteriyel bir sistemde üretilmesi hedeflenmektedir. Ancak bakteriler,

ökaryotik genlerde bulunan intron adı verilen kodlamayan bölgeleri işleyememektedir. Bu nedenle genomik DNA yerine cDNA kullanımı tercih edilmektedir (Schwab, 2005).

Yüksek verimde protein üretimi için genellikle iki aşamalı bir strateji uygulanmaktadır. Birincisi hücrelerin çoğaltılmasıdır. Öncelikle konakçı hücreler optimum koşullarda çoğaltılmaktadır. İkincisi gen ifadesinin başlatılmasıdır. Klonlanmış genin ekspresyonunu başlatmak için uygun bir promoter seçilmektedir. Bu promotere uygun sıcaklık ve kimyasal uyarıcılar (indüktörler) uygulanarak genin ifade edilmesi sağlanmaktadır. Üretilen rekombinant protein, genellikle konakçı ortamına salgılanmaktadır. Bu protein, biyolojik olarak aktif kalacak ve dayanıklılığını koruyacak şekilde saflaştırılmakta ve formüle edilmektedir (Schwab, 2005). Bu süreçte kullanılan konakçı sistemler genellikle üç gruba ayrılmaktadır: Bakteriler; özellikle ilaç endüstrisinde sık kullanılmaktadır. Mayalar; endüstriyel enzimlerin ve rekombinant Hepatit B aşısı gibi ürünlerin üretiminde tercih edilmektedir (Garnick et al., 1988). Hayvan hücreleri; genellikle karmaşık, post-translasyonel modifikasyon gerektiren proteinlerin üretiminde, ilaç geliştirmede kullanılmaktadır (Emtage, 1986).

Üretilen birçok ilacın temelinde rekombinant DNA teknolojisi yatmaktadır. 1928 yılı itibarıyla İngiliz Frederick Griffith, Londra’da zatürreye neden olan bakterilerle çalışmıştır ve bu bakterilerin hücreler arasında iletilerek yeni genetik bilgiye dönüştürülmesine “**genetik transformasyon**” olarak adlandırmıştır. Stanley Cohen ve Annie Chang 1973 yılında ilk defa in vitro plasmid rDNA teknolojisini temellendirmişlerdir (Kiermer, 2007; Krebs et al., 2017; Pray, 2008).

Rekombinant DNA teknolojisinde kullanılan temel araçlar; restriksiyon enzimleri, ligaz enzimleri, vektörler ve konak hücrelerdir. Restriksiyon enzimleri, DNA'yı belirli noktalardan kesmektedir. Ligaz enzimleri, DNA parçalarını birleştirmektedir. Vektörler, gen taşıyıcılarıdır (plazmid, virüs vb.). Konak hücreler, genin işlendiği ve proteinin üretildiği canlılardır (bakteri, maya, memeli hücreleri) (Lodish, 2008).

Rekombinant DNA, vektör plasmidi ve hedef genin DNA bölümü olarak iki ana bileşenden oluşmaktadır. Plazmid, bakterilerde doğal olarak bulunan küçük, halka şeklinde ve bağımsız olarak çoğalabilen DNA molekülleridir. Plazmidlerin boyutu 1 ila 400 kbp'nin üzerinde değişir ve tek bir hücredeki özdeş plazmidlerin sayısı birden binlere kadar değişebilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisinde plazmidler, genellikle vektör (taşıyıcı) olarak kullanılmaktadır.

Plazmidler bağımsız olarak çoğalabildikleri için, hücre içinde çok sayıda kopya üretilmektedir. Bu sayede hem genetik materyal çoğaltılabilmekte hem de gen ürünü olan rekombinant protein yüksek miktarda üretilmektedir. Plazmidlerde genellikle antibiyotik direnç genleri gibi seçici işaretleyici genler bulunmaktadır. Böylece plazmid taşıyan bakteriler, antibiyotik içeren ortamlarda hayatta kalmakta, taşıma başarılı olmuş hücreler kolayca seçilmektedir. Plazmidler, araştırmacının eklediği farklı DNA'lara sahip olabilmektedir. pRB322, pGEM ve pUC18 plazmidleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Plazmid	Direnç Geni	Özellik	Kullanım
pBR322	Amp, Tt	İlk jenerasyon	Gen klonlama
pUC19	Amp	LacZ (mavi-beyaz seçim)	Klonlama
pET Serisi	Amp / Kan	Yüksek ekspresyon	Protein üretimi
pGEM-T Easy	Amp	T-uçlu, PCR uyumlu	PCR ürün klonlama
pBluescript	Amp	T7/T3 promotör	Klonlama + RNA sentezi

Tablo 1: Yaygın Kullanılan Plazmidler, Özellikleri ve Kullanım Alanları

Kaynak: Chen et al., 2009; Godiska et al., 2005; Mayer, 1995; Sambrook et al., 1989; Shilling et al., 2020

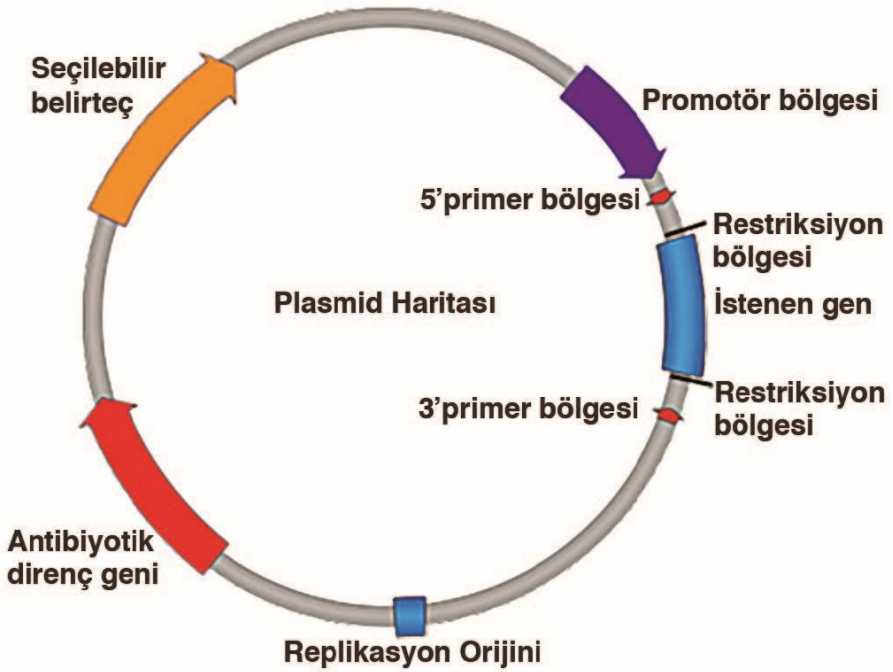
Kromozomlar büyük boyutlu olup normal koşullar altında yaşamak için gereken tüm genetik bilgileri içerirken, plazmidler genellikle çok küçüktür ve özel durumlar için ek genler içermektedir (Carattoli, 2013; Saati-Santamaría, 2023; Smillie et al., 2010). Yapay plazmidler, moleküler klonlamada vektör olarak yaygın olarak kullanılmakta ve konak organizmalar içinde rekombinant DNA dizilerinin replikasyonunu yönlendirmeye hizmet etmektedir. Laboratuvarda, plazmidler bir hücreye transformasyon yoluyla aktarılmaktadır. Sentetik plazmidler, genellikle yazılımla tasarlanmış gönderilen dizileri kullanarak çeşitli firmalar tarafından tedarik edilebilmekte; eğer bir tasarım işe yaramazsa, firma gönderimden ek

düzenlemeler yapabilmektedir. Plazmidler, konakçı hücre genomundan bağımsız olarak replikasyon yapabilen ve bu nedenle replikon olarak sınıflandırılan ekstrakromozomal DNA molekülleridir. Ancak, virüsler gibi plazmidler de genellikle canlı olarak sınıflandırılmaz. Plazmidler, çoğunlukla konjugasyonla bir bakteriden başka bir bakteriye (başka bir türe bile) aktarılmaktadır. Genetik materyalin bu konakçıdan konakçıya aktarımı, yatay gen aktarımının bir mekanizmasıdır ve plazmidler mobilomun bir parçası olarak kabul edilmektedir. Virüsler genetik materyallerini kapsid denilen koruyucu bir protein kılıfına sararken; plazmidler "çıplak" DNA'dır ve kendi başlarına protein kılıfı oluşturmazlar, genetik materyallerini paketleyip taşımak için gerekli olan genleri kodlamazlar. Ancak, bazı plazmid sınıfları kendi aktarımları için gerekli olan konjugatif "seks" pilusunu kodlamaktadır. Çalışılacak gene göre vektör sıralaması büyükten küçüğe doğru maya yapay kromozom (yeast artificial chromosome, YAC), bakteriyel yapay kromozom (bacterial artificial chromosome), kosmidler ve fajlar olarak sıralanabilmektedir. Bu vektörlerin en küçüğü plazmidlerdir (Lodish, 2008). Klonlama vektörleri, içerdikleri elementler bakımından shuttle vektörleri, ifade vektörleri, gen knockdown vektörleri, reporter plazmidler ve viral plazmidler olarak birkaç türe ayrılmaktadır. Belirli bir DNA kısmının, hücre içi çoğaltılmasında klonlama plazmidleri kullanılmaktadır. İfade vektörleri belli geni ifade etmek için tasarlanırken, shuttle vektörleri ise birden fazla hücrede kullanılma amacıyla tasarlanmaktadır. Gen knockdown vektörleri, bir genin ifadesini azaltmak için tasarlanmaktadır. Başka genlerin ifadesini incelemek için reporter plazmidler kullanılmaktadır. Viral kapsid

retiminde ve hedefleme çalışmaları içi viral plasmid kullanılmaktadır (Monroe, 2020).

Bir vektörün temel yapısal bileşenleri arasında; seçici işaretleme amacıyla kullanılan antibiyotik direnç geni, vektörün konak hücrede çoğalmasını sağlayan replikasyon orijini (origin of replication) ve hedef DNA'nın eklenmesini kolaylaştıran çoklu klonlama bölgesi yer almaktadır. Bakterilerin kltr içerisinden antibiyotik direnç genleri kullanılmaktadır. Antibiyotik direnç geni yalnızca bakteriler içerisinden hücre seçilimini gerçekleştirmektedir. Hücre kültürlerinde seçimi kolaylaştırma amacıyla seçilebilir belirteçler (selectable marker) kullanılabilmektedir. Belirteçler seçili bazı maddelerle hücre kültürüne tabi tutulduğunda çalışmakta ve vektörü bünyesinde barındıran hücrelerin rahatça seçilmesini sağlamaktadır. Replikasyon orijiniyse, plasmid reaksiyonun başlaması için gerekli DNA bölgesidir ve fonksiyonu ise replikasyon başlamasını sağlayan gerekli proteinleri bağlamaktır. Çoklu klonlama bölgesi (MCS), bir vektör (rneğin plazmid) zerinde yer alan, birden fazla farklı restriksiyon enzimi tanıma bölgesini içeren kısa bir DNA dizisidir. Bu bölgenin iki temel işlevi bulunmaktadır. Birincisi, yabancı DNA'nın vektöre eklenmesini kolaylaştırmaktır. Yani, genetik mühendisliğiyle bir gen veya DNA parçası vektöre aktarılmak istendiğinde, MCS'deki özgül restriksiyon bölgeleri sayesinde bu parça uygun şekilde kesilip DNA ligaz enzimi ile birleştirilebilir. İkincisi, istenilen DNA parçasının daha sonra çıkarılmasını sağlamaktır. Aynı restriksiyon enzimleri kullanılarak, eklenen DNA parçası gerektiğinde vektörden yeniden kesilip çıkarılabilmektedir.

Vektörlerin ayrılmaz parçası ise promotör bölge olarak adlandırılan bölgelerdir. Bu bölge, DNA üzerindeki belirli bir dizidir ve kendinden sonra gelen genin transkripsiyonunun başlaması için gereklidir. Promotörün temel işlevleri RNA polimeraz enziminin bağlanmasını sağlamak ve transkripsiyon faktörlerinin tanıyıp bağlanabileceği dizileri içermektir. Bu sayede RNA polimeraz, hedef geni tanır ve mRNA sentezi başlamaktadır (Alberts et al., 2002; Pray, 2008).



Şekil 1: Plasmid vektör haritası.

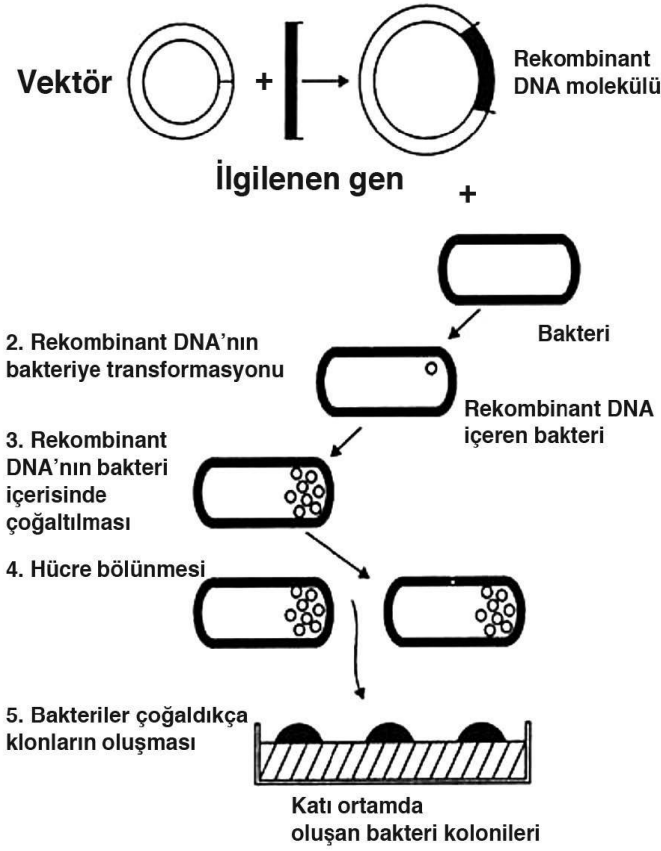
Kaynak: Bolivar et al., 1977; Monroe 2020.

Vektör, DNA ligaz enzimi ve DNA parçasıyla birleştirilmesinin ardından rekombinant DNA hücre için hazır haldedir. rDNA kimyasal

veya fiziksel yollar kullanılarak hücreye verilmesine transformasyon olarak isimlendirilmektedir. Konakçı hücre ökaryot ise transfeksiyon, rDNA'nın hücre içine girişi virüsler sayesinde oluyorsa transdüksiyon adı verilmektedir. Bu işlemler uygulanan hücreye ise transgenik hücre denilmektedir. Bu hücreler bünyesinde barındırdığı rDNA'yı vektör tipine bağlı olarak klonlama, ifade etme veya farklı rDNA özelliklerini gösterebilmektedir (Griffiths, 2005; Lodish, 2008).

rDNA medikal, ilaç sektöründe yoğun olarak kullanılmakta ve günümüzde de benzer amaçlara hizmet etmektedir. İnsan protein veya hormonların üretiminde kullanılan bu teknoloji aşı ve gen terapileri gibi geniş çalışma alanları bulmaktadır. Bunlar verilecek en değerli örneklerden birisi insülin ilaçları sayılabilmektedir (Cederbaum et al., 1984; Niri et al., 2016). Tip 1 ve tip 2 diyabetin tedavisi için ilk olarak 1978-1981 yılların ilk defa insülin üretiminde rDNA kullanılmıştır. Hormonun sentezlenmesinin ardından rDNA kullanılarak insülin geni *E. coli*'de ifade edilmiştir (Crea et al., 1978; Keefer et al., 1981). *E. coli* ifade edildikten sonra, bakteride ifade edilen insülin hormonu, insan insülin reseptörleri ile etkileşime girmiş ve ilaç olarak kullanılabileceği keşfedilmiştir. İlaçların ardından aşı üretiminde de rDNA kullanılmıştır. Viral kapsidlerin üretilmesiyle virüsün patojenik genomunun silinmesini gerçekleştirilmiştir (Jackwood et al., 2008). Hepatit B virüsü için önceden hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) elde edilerek aşı üretimi gerçekleştirilmekteydi. 1984 yılında rDNA ile *Saccharomyces cerevisiae* mayası üzerinde, HBsAg gen dizisi içeren vektör hazırlanmış ve rekombinant HBsAg üretimi yapılmıştır. HBsAg içeren aşının Hepatit B virüsüne karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir

(McAleer et al., 1984). Aşının güvenle insanlar üzerinde kullanılabileceği kanıtlanmış ve rDNA ile oluşturulan ilk aşı olmuştur (Zajac et al., 1986). İlk serum albümin ise *Pichia pastoris* mayası kullanılarak 1998 yılında klinik olarak denenmiştir ve çalışma neticesinde rekombinant insan serum albüminin güvenilirliği ispatlanmıştır (Chen et al., 2013). rDNA, moleküler biyoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. 2015 yılında rekombinant teknoloji kullanılarak insülin benzeri büyüme faktörü bağlayan proteinleri (IGFBPs) embriyonik böbrek hücre kültürü (HEK293) hücre hattında ifade edilmiştir ve yapılan çalışmanın proteinlerin yapı ve işlevlerinin daha iyi anlaşılacağı ayrıca yeni ilaçlar geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Wanscher et al., 2015).



Şekil 2: Rekombinant DNA teknolojisinin temel basamakları
Kaynak: Cohen et al., 1973; Soydemir ve Aksoy,2017.

3. REKOMBİNANT PROTEİN

Rekombinant proteinler, rekombinant DNA veya RNA teknolojisi kullanılarak üretilen proteinleri ifade etmektedir. Rekombinant protein, ekzojen genin ifadesini desteklemek için yabancı bir ifade sisteminde klonlanmış rekombinant DNA tarafından kodlanan bir proteinin manipüle edilmiş biçimidir. Bu rekombinant DNA yapısı, büyük miktarlarda yararlı protein ürünleri üretmek için

kullanılabilmektedir. Rekombinant DNA, genellikle hedef proteinin cDNA dizisi, yüksek düzeyde protein ifadesi elde etmek için hedef proteini seçilen konak hücre içinde ifade etmek üzere iyi karakterize edilmiş bir promotörün kontrolü altında olacak şekilde tasarlanmıştır. Rekombinant proteinler, hastalık tedavisiyle ilişkili antikörelara ve ilaç dağıtımını için protein bazlı polimerlere modifiye edilebilmektedir. Doku mühendisliğinde daha önemli uygulamaları ve tıbbi mühendislik alanlarında kapsamı vardır.

3.1. Rekombinant Protein Üretimi için Plazmid Seçimi

Rekombinant protein üretimi için uygun plazmid seçimi, başarılı bir gen ekspresyonu ve protein verimi açısından kritik öneme sahiptir.

Plazmitlerin bir hücre içinde bağımsız olarak çoğalabilmesi için, çoğalmanın kaynağı olarak işlev görebilen bir DNA parçasına sahip olmaları gerekmektedir. Kendini çoğaltan birim replikon olarak adlandırılmaktadır. Tipik bir bakteriyel replikon, plazmit-spesifik çoğaltma başlatma proteini (Rep) geni, iteronlar adı verilen tekrarlayan birimler, DnaA kutuları ve bitişik AT açısından zengin bir bölge gibi bir dizi öğeden oluşmaktadır. Daha küçük plazmitler, kendilerinin kopyalarını yapmak için konak replikatif enzimlerini kullanırken, daha büyük plazmitler bu plazmitlerin replikasyonuna özgü genler taşıyabilmektedir. Birkaç tip plazmid de konak kromozomuna yerleşebilmekte ve bu bütünleştirici plazmidlere bazen prokaryotlarda epizomlar denilmektedir. Kısacası yaygın olarak kullanılan ifade plazmidleri replikon, promotör, seçim belirteçleri, çoklu klonlama bölgeleri, affinite etiketleri ve kaldırma etiketleri kombinasyonlarını

içermektedir. Çok miktarda ifade vektörü bulunmaktadır. Bunlardan en uygun olanı seçerken bireysel ihtiyaçlar göz önünde bulundurulmalıdır (Rosano & Ceccarelli, 2014a).

3.1.1. Replikon

Replikon, konakçı bakteriye plazmidi çoğaltma emri vermekte ve kopya sayısının kontrolünü sağlamaktadır. Klonlama sadece ilgilenilen rekombinant gen bölgesinde olmayıp aynı zamanda bu genin aşağı ve yukarıdaki DNA bölgeleri de klonlanabilmektedir (Summers, 2009).

Vektör seçimi yapılırken kopya sayısı dikkate alınmalıdır. Sanılanın aksine yüksek plazmid dozajı protein verimini arttırmamaktadır. Kopya sayısının artmasıyla birlikte konakçı bakteride rekombinant protein sentezi ve plazmid DNA replikasyonu gibi olaylar için gerekli metabolit ve enerji nedeniyle metabolik yük miktarı artmaktadır. Hücresel stres seviyelerinin metabolik yük nedeniyle arttığı bilinmekte olup bakteri bu yükü ortadan kaldırmak için plazmid DNA'yı ortadan kaldırmakta bu da rekombinant protein üretiminin azalmasına neden olmaktadır. Plazmid instabilitesi, bakterinin plazmidi kaybetmesi ya da kararsız bir şekilde taşımaya devam etmesi anlamına gelmektedir. Plazmid instabilitesi metabolik yük, toksik gen ürünlerinin artması ve uygun olmayan büyüme koşullarında meydana gelmektedir. Bu durum da protein sentezi için sağlıklı organizma sayısı düşmektedir. Sonuç olarak yüksek rekombinant protein ekspresyonu için kopya sayısı ile metabolik yük arasında optimizasyon sağlanmalı ve bakteri konakçısının uyumlu replikasyon kökenlerine sahip olmaları gerekmektedir (Bentley et al., 1990; Birnbaum & Bailey, 1991; Del Solar & Espinosa, 2000).

3.1.2. Promotör

Rekombinant protein üretimine başlamadan önce ifade vektörünün özellikleri belirlenmelidir. Bu özellikler arasında ilgili rekombinant geni ifade etmekle görevli promotör, ifade sistemleri için önem taşımaktadır. Promotör, ekspresyon düzeyini ve regülasyonu etkilemektedir. Promotörler, heterolog genlerin ekspresyonunda indüksiyon meydana gelmeden önce baskılayanın sıklığını ve indükleyici eklendikten sonra transkripsiyon hızını düzenleyerek protein verimini etkilemektedir. İdeal bir promotör indüksiyondan sonra çok miktarda mRNA'nın sentezine izin verirken indüklenmediği sürece neredeyse hiç bazal (arka plan) gen ifadesine izin vermez. Ayrıca indüksiyon seviyesini düzenleyerek RNA seviyelerini kontrol altında tutmaktadır. Rekombinant protein üretiminde tek bir promotör sistem kullanılmamaktadır. Hedef proteine uygun promotör sistem seçilmelidir. Bu seçimde uyarlanabilir ve yüksek düzeyde rekombinant protein üretimini sağlayan sistemlerden faydalanılması gerekmektedir (Brautaset et al., 2009). Rekombinant protein ekspresyonunda kullanılan promotörler, araştırmacının tercihi göre güçlü/zayıf, ayarlanabilir/yapısal, kimyasal ya da termal olarak indüklenebilir karakterde olmaktadır. T7 promotörü, bilinen en güçlü promotör olup rekombinant protein üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır. lac promotörü, indüklenebilir sistemdir. CMV promotörü: Memeli hücrelerinde güçlü ekspresyon sağlamaktadır. PLICing (Phage λ Integrase-based Cloning) ve ReToAd (Recombineering-assisted Transcriptional Optimization and Adjustment) gibi yöntemler kullanılarak, hedef proteini kodlayan gen dizisine uygun promotörlerin

seçimi ve yerleştirilmesi mümkün hale gelmektedir. (Cheng et al., 2018; Marschall et al., 2017; Rosano & Ceccarelli, 2014a; Terpe, 2006).

Promotörün düzenlenmesi kültüre eklenen kimyasal indükleyiciler tarafından olup bu ajanların eklenmeleriyle transkripsiyon aktive olmaktadır. İndükleyici moleküllerin konsantrasyonuna bağlı olarak promotörün ifade seviyeleri de değişmektedir. Bu durum hem protein üretiminin süresel olarak kontrolünü hem de hücre büyüme ve protein üretim aşamalarının birbirinden ayrılmasını sağlamaktadır.

Rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan pET vektör sistemi, T7 promotörü bulunmaktadır. Sistem ayrıca *E. coli* lac promotörü ve T7 RNA polimeraz (T7RNAP) geni içermektedir. Bu sistemde hedef protein, toplam hücre proteininin %50'sini oluşturmaktadır. İlgi duyulan gen, T7RNAP'ın tanıdığı promotörün arkasına klonlanmaktadır. Ardından T7 promotöründen transkripsiyon başlamaktadır. Sistem, laktoz veya IPTG tarafından indüklenmektedir. Bazal ekspresyon kontrolü lacIQ tarafından lac-indüklenebilir. T7 RNAP geninin sıkı baskılanması, T7 lizozim tarafından T7 RNAP inhibisyonu veya T7 promotöründen sonra bir lacO operatörünün varlığı yöntemleriyle ile sağlanabilmektedir (Baneyx, 1999; Dubendorf & Studier, 1991; Graumann & Premstaller, 2006; Moffatt & Studier, 1987). Yaygın olarak kullanılan pET sisteminin avantajlarına ilaveten dezavantajları da bulunmaktadır. Hücrede üretilen T7 RNAP seviyesinin yüksekliğinden kaynaklı ilgilenilen rekombinant protein ekspresyonu fazla olabileceği bildirilmektedir. Bununla birlikte IPTG molekülünün mevcut olmadığı durumda düşük miktarda T7 RNAP

retimi meydana gelmesi başlıca dezavantajlarındandır (Reznikoff, 1992; Studier, 1991).

Prokaryotik promotör araştırmalarının temel bileşeni olan lac promotörü, laktoz sisteminin indüksiyonuna sebep olmaktadır. Böylelikle laktoz protein üretimi için kullanılmaktadır. Ortamda glikoz gibi kolayca metabolize olan karbon kaynaklarının varlığında laktoz sisteminin indüksiyonu zor olmaktadır. Ortamda hem laktoz hem de glukozun varlığında glukozun tamamı kullanılmadan lac promotöründen ekspresyon tam olarak indklenmemektedir. Böyle bir durumda lac operonunun tam aktivasyonu için gerekli siklik adenozin monofosfat (cAMP) retilmektedir. Bu duruma katabolit baskılama adı verilmektedir. Katabolit düzenleme duyarlılığını azaltan fakat tamamen ortadan kaldırmayan bir mutant olan lacUV5 promotörü sayesinde ortamda glukoz varlığında ifade elde edilebilmektedir. Çok kopyalı plazmidlerde hem lac hem de lacUV5 promotörünün olduğu durumda lac promotör baskılayıcı protein LacI'nin düşük seviyesinden dolayı yüksek ekspresyon seviyelerine sahip olabilmektedirler. LacI'nin yüksek ekspresyon seviyesine neden olan lacIQ promotörünün eklenmesi sonucu bazal ekspresyon kontrolü sağlanmaktadır. Lac promotörü ve onun türevi lacUV5, zayıf olduklarından dolayı rekombinant protein üretimi için kullanışlı değillerdir. Bu yüzden protein üretimi için lac promotöründen yaklaşık 10 kat güçlü ve diğer promotörlerin güçlü özelliklerinin birleştirildiği sentetik hibrit olan tac promotörü kullanılmaktadır. Ticari plazmidlerden pUC serisi (Thermo Scientific) protein ifadesini yönlendiren lacUV5 promotörü kullanırken; pMAL serisi vektörler ise tac promotörünü kullanmaktadır

(Calos, 1978; De Boer et al., 1983; Deuschle et al., 1986; Lanzer & Bujard, 1988; Makoff & Oxe, 1991; Müller-Hill et al., 1968; Müller-Hill & Oehler, 1996; Postma & Lengeler, 1985; Silverstone et al., 1970; Wanner et al., 1978).

pBAD vektörlerinde araBAD promotörü yer almaktadır. Sistemi indüklemek için arabinoz gerekli olmaktadır. AraC proteininin hem baskılayıcı hem de aktivatör olmak üzere 2 rolü mevcuttur. Bu protein, arabinoz yokluğunda translasyonu baskılayarak; arabinoz eklenmesi durumunda aktivasyon moduna geçmekte ve ara promotöründen transkripsiyonu başlatmaktadır (Guzman et al., 1995; Schleif, 2000, 2010). Tüm bu sistemlere ek olarak fiziksel uyarılara (sıcaklık, PH vb) yanıt veren pL promotörüne sahip ekspresyon vektörleri de bulunmaktadır (Guzman et al., 1995). IPTG güçlü bir indükleyici ajan olmasından dolayı BL21(DE3)/pET vektör sisteminde rekombinant protein seviyelerini kontrol altında tutmak güç olduğu için bu vektör sisteminde araBAD promotörü kullanılmaktadır. Translasyon başlatma bölgesinde başlangıç kodonuna bağlandığı bölge ve bir Shine-Dalgarno dizisi bulunmaktadır. Ekspresyon vektörlerinde protein üretmek amacıyla bu dizilerin optimizasyonu sağlanmıştır. Ancak promotör ile ilgili genin başlangıcı arasında klonlama süreci nedeniyle klonlama izleri oluşmaktadır. Klonlama izi meydana gelmeden genin klonlanmasına izin veren yeni klonlama yöntemleri oldukça popülerdir (seamless cloning) (Mirzadeh et al., 2015; Van Den Ent & Löwe, 2006).

3.1.3. Seçim Markeri

Konakçı bakteri için plazmidlerin korunması yük kaynağının önemli bir kısmını oluşturması nedeniyle plazmidlerin seçimi

yapılırken üzerlerinde antibiyotik ve buna karşı gelen direnç geni kullanılmaktadır. Plazmid iskeletine seçim markerı eklenmektedir. Plazmidlerin genellikle antibiyotik direnci sağlayan genleri taşıdıkları bilinmektedir. Bu sayede plazmid çoğalması sağlanıp plazmid içermeyen hücrelerin büyümesi engellenmektedir. *E. coli*'de bu doğrultuda antibiyotik direnç genlerinden faydalanılmaktadır. Ampisilin, kloramfenikol, kanamisin ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere direnç sağlayan genler, bakteriye aktarılmaktadır. Ardından bakteriler antibiyotik içeren ortamda büyütülmektedir. Aktarılan ekzojen DNA'yı başarıyla eksprese eden bakteri hücreleri hayatta kalmakta ve koloniler meydana getirmektedirler. Antibiyotik içeren seçim belirteçleri, laboratuvarlarda protein sentezlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Büyük ölçekli fermentasyon ve biyoproseslerde antibiyotik kullanımı, maliyet ve antibiyotik direncinin meydana gelmesinden dolayı endişe oluşturmaktadır. Bundan dolayı antibiyotik içermeyen plazmid stabilizasyon sistemlerinin geliştirilmesi için çalışılmaktadır. Bu sistemler plazmid bağımlılığı kavramına dayanmaktadır. Başka bir ifade ile bakterinin hayatta kalması için plazmidi mutlaka taşıması gerektiği prensibiyle açıklanabilir. Böylece, bakteriler plazmidi kaybetmek yerine korurlar. Plazmid bağımlılık sistemleri de işlevlerine göre toksin/antitoksin tabanlı sistemler, metabolizma tabanlı sistemler ve operatör baskılayıcı titrasyon sistemleri olmak üzere farklı alt türlere ayrılmaktadır. Bu sistemler büyük ölçekli fermentörlerde başarıyla kullanılmalarına rağmen hala yaygın olarak kullanılmamaktadır. Örneğin; antibiyotik içermeyen ortamlarda kültüre edilen pET28 vektörünü taşıyan hücrelerin sadece

%5'inin plazmidi koruduğu bildirilmektedir (Ali et al., 2015; Corchero & Villaverde, 1998; Korpimäki et al., 2003; Kroll et al., 2010; Peubez et al., 2010; Rugbjerg et al., 2018; Voss & Steinbüchel, 2006; Zielenkiewicz & Ceglowski, 2001).

3.1.4. Afinite Etiketleri

Aktif bir rekombinant proteini saf ve çözünür halde elde etmek için, ekspresyon ve saflaştırma aşamalarının tespiti, maksimum çözünürlük seviyesine ulaşma ve *E.Coli*'yi kolayca saflaştırmak için ekipmanlara ihtiyaç duyulmaktadır. İlgi duyulan proteinin affinite etiketlerine ve füzyon partnerlerine füzyonu sonucunda proteinin aşırı üretilmesi engellenip tespiti, saflaştırılması ve aşağı akış işlemesi kolaylaştırılmaktadır. Aktif bir rekombinant proteini saf ve çözünür halde elde etmek için ilgi duyulan protein ile bir peptit etiketi veya bir füzyon partneri birlikte eksprese edilmelidir. Proteinle birleşen peptit etiketleri, proteinle etkileşime girmezler fakat kimerik proteinin üçüncül yapısı veya biyolojik aktivitesi üzerinde olumsuz etkiler oluşturmaktadırlar. Etiketler, vektörler aracılığıyla proteinin C-terminal veya N-terminal ucuna yerleştirilirler. Poli-Arg-, FLAG-, poli-His-, c-Myc-, S- ve Strep II yaygın bir şekilde kullanılan etiketler arasında yer almaktadırlar. Rekombinant proteinin etiketlenmesiyle sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile tespit edilemeyecek kadar düşük seviyedeki proteinin tespiti sağlanmaktadır. Bu etiketler, harici olarak etiketlere özgü yüksek afiniteli reçinelere sıkıca bağlanarak, rekombinant proteinin tek adımda affinite saflaştırılmasını sağlamaktadır. His-etiketli proteinler, Ni^{2+} veya Co^{2+} yüklü nitrilotriasetik asit (NTA) agaroz reçineleri kullanılarak affinite

kromatografisi ile saflaştırılabilmektedir. Bu yöntem sayesinde metal iyonları reçine üzerinde tutularak His-etiketli proteinlere bağlanma sağlanmaktadır. (Bornhorst & Falke, 2000; Bucher et al., 2002; Chant et al., 2005; Khan et al., 2012; Klose et al., 2004; Nilsson et al., 1997; Terpe, 2003).

Protein çözünürlüğü, peptit olmayan bir füzyon etiketi eklenerek arttırılabilmektedir. Maltoz bağlayıcı protein (MBP), N-kullanım maddesi protein A (NusA), tiyoredoksin (Trx), glutasyon S-transferaz (GST), ubikitin ve SUMO gibi füzyon etiketleri sık olarak kullanılmaktadırlar. Bu füzyon etiketlerinden NusA, MBP ve Trx en iyi çözünürlük arttırıcı özelliklere sahipken; GST daha düşük çözünürlük arttırıcılığına sahiptir. Ancak en iyi çözünürlük arttırıcı füzyon etiketlerden NusA, MBP ve Trx, büyük boyutlara sahip olmaları nedeniyle çözünürlüğün hatalı değerlendirilmelerine sebep olmaktadır. Yakın zamanda *Fasciola hepatica*'dan 8-kDa büyüklüğünde bir kalsiyum bağlayıcı protein olan Fh8 elde edilmektedir. Buna ek olarak Fh8, diğer etiketlerden daha fazla çözünürlük arttırma yeteneğine sahip olduğu keşfedilmiştir (Costa et al., 2013; Davis et al., 1999; Hammarström et al., 2002; Kapust & Waugh, 1999) (Rosano & Ceccarelli, 2014a).

3.1.5. Etiket Kaldırma (Tag Removal)

Etiketler, rekombinant proteine ekspresyonu arttırmak, saflaştırmayı kolaylaştırmak, çözünürlüğü arttırmak veya izleme/deteksiyon yapmak amacıyla eklenen kısa aminoasit dizileridir. Yaygın kullanılan etiketler; His-tag; (6xHis) → metal iyonlarına (Ni^{2+}) bağlanarak saflaştırma yapılmaktadır. GST-tag; Glutathione ile

bağlanmaktadır. MBP-tag; çözünürlüğü artırmaktadır. FLAG-tag, HA-tag; antikorla tanımlama sağlamaktadır. Rekombinant protein üretiminde etiket kaldırma (tag removal), üretim ve saflaştırma sürecinde proteine eklenen etiketlerin (tags) üretim tamamlandıktan sonra enzimatik yollarla kesilerek proteinden uzaklaştırılması işlemidir.

Rekombinant proteinde yapısal veya biyokimyasal çalışmalar yapılmak istendiğinde üzerinde bulunan füzyon ortağı ve etiketler kaldırılmalıdır. Çünkü füzyon ortakları ve etiketler, hem protein aktivitesini hem de yapısını etkilemektedirler. Enzimatik sindirim veya kimyasal bölünme yardımıyla etiketler ve füzyon ortakları çıkarılmaktadırlar. Etiket ve hedef protein arasına proteaz tanıma bölgesi yerleştirilmektedir. Ekspresyon sonrası bu bölgeye özgü proteaz kullanılarak etiket kesilmektedir. Enterokinaz, trombin, faktör Xa ve TEV proteaz gibi proteazlar etiketleri kaldırmada oldukça başarılıdır. (Blommel & Fox, 2007; Jenny et al., 2003; Parks et al., 1994; Perron-Savard et al., 2005; Tropea et al., 2009; Waugh, 2011; Wu & Filutowicz, 1999).

Proteaz	Tanım Dizisi	Avantaj
TEV proteaz	ENLYFQ↓G	Spesifik, yaygın
Thrombin	LVPR↓GS	Küçük dizilerde etkili
Factor Xa	IEGR↓	Orta derecede spesifik
Enterokinaz	DDDDK↓	pH duyarlı işlemler

Tablo 2: Yaygın kullanılan Proteazlar ve Avantajları

Kaynak: Blommel & Fox, 2007; Jenny et al., 2003; Luke et al., 2011; Parks et al., 1994; Perron-Savard et al., 2005; Tropea et al., 2009; Wu & Filutowicz, 1999

Etiket kaldırmaya yarayan diğer yöntem olan kimyasal parçalamada, etiket kimyasal bir reaktif ile muamele edilmektedir. Bu yöntemi reaksiyon karışımından kolayca elimine edilebilmeleri ve proteolitik enzimlerden ucuz olmaları gibi nedenler avantajlı kılmaktadır. Ancak yöntemin arzu edilmeyen protein modifikasyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. Siyanojen bromür (CNBr), sık olarak kullanılan kimyasal bir parçalanma reaktifidir. CNBr, denatüre edici koşullarda (6 M guanidinyum klorür) veya %70 formik asit veya trifloroasetik asitte etiket kaldırma işlemini gerçekleştirmektedir (Andreev et al., 2010; Hwang et al., 2014; Rais-Beghdadi et al., 1998).

Etiket kaldırma sonrası, genellikle yeni bir saflaştırma adımı (örn. Ni-NTA tekrar) ile etiket ve proteaz uzaklaştırılmaktadır. Kalan protein doğal haliyle elde edilmiş olmaktadır. (Blommel & Fox, 2007; Jenny et al., 2003; Parks et al., 1994; Perron-Savard et al., 2005; Tropea et al., 2009; Waugh, 2011; Wu & Filutowicz, 1999).

3.2. Rekombinant Protein Üretimi için Uygun Konakçı Seçimi

Rekombinant protein üretiminin başarısını ilgili rekombinant geni içeren plazmid seçimi ve konakçı bakterinin suşu etkilemektedir. Suş seçimi yapılırken plazmidin gereklilikleri göz önünde bulundurulmalıdır (Rosano & Ceccarelli, 2014).

3.2.1. Rekombinant Protein Üretimi İçin Kullanılan Ekspresyon Sistemleri

Rekombinant protein elde etmek için sırasıyla ilgilenilen rekombinant proteini kodlayan gen, ifade vektörüne klonlanıp seçilen konakçıya transforme edilir ardından indüklenip saflaştırma ve karakterizasyon adımları uygulanmaktadır. Üretilmek istenen rekombinant proteinin kimyasal özellikleri dikkate alınarak konakçı sistemi seçilmektedir. Konakçı sistemi seçimi, rekombinant protein üretimdeki ilk aşamadır. Proteinde glikozilasyon ve post-translasyonel modifikasyonlar mevcutsa ökaryotik ekspresyon sistemleri seçilirken; disülfid bağı gibi oluşumlar mevcut ise bakteriyel ekspresyon sistemleri seçilmektedir (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Rekombinant protein üretmek amacıyla bakteriler, memeli hücreleri, maya, böcek hücreleri, transgenik hayvanlar ve transgenik bitkiler gibi çeşitli ekspresyon sistemlerinden faydalanılmaktadır (Amann et al., 2019; Dangi et al., 2018; Gupta & Shukla, 2018; McKenzie & Abbott, 2018; Owczarek et al., 2019; Puetz & Wurm, 2019).

Konak hücrenin seçimi protein üretim sürecinin moleküler araçlar, ekipmanlar veya reaktifler gibi ana hatlarını etkilemektedir. Konak sistemlerinin güçlü ve zayıf yönleri olup konak sistemi seçimi,

ilgilenilen proteine göre olmaktadır. Örneğin prokaryotik ifade sistemleri ökaryotik post-translasyonel modifikasyonlar için uygun değildir (Adrio & Demain, 2010; Demain & Vaishnav, 2009).

3.2.1.1.Bakteriyel Konakçılarda Rekombinant Protein Üretimi

Mikrobiyal sistemlerde rekombinant protein üretimi sayesinde belli bir proteinin küçük miktarlarının saflaştırılması için büyük miktarlarda hayvan, bitki veya biyolojik sıvıya ihtiyaç duyulmamaktadır. İlgili rekombinant proteinin yüksek miktarda ekspresyonu ve saflaştırılmasıyla proteinin biyokimyasal karakterizasyonu ve endüstriyel düzeyde kullanılması sağlanmaktadır. Bakteriler mükemmel bir ekspresyon sistemi olup sentezlerinde glikolizasyon ve post-translasyonel modifikasyonlara ihtiyaç duyulmayan proteinler bu sistemlerde üretilmektedirler. Daha kısa sürece sahip olmaları ve ucuz olmalarıyla ökaryot sistemlerden ayrılmaktadırlar. Tüm genomu dizilenmiş ilk organizmalar arasında yer alan *E. coli*, fizyolojik ve metabolik olarak iyi karakterize edilmiş ve daha az maliyete sahip olması gibi sebeplerden dolayı rekombinant protein eksprese etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Somatostatin, *E. coli*'den üretilen ilk rekombinant insan proteinini olma özelliği taşımaktadır. Bu bakteriden ayrıca antikor fragmentleri, interferonlar, büyüme faktörleri, hormonlar ve trombolitikler gibi pek çok rekombinant ilaç sentezlenmiştir. 2014 yılında klinik uygulamalarda kullanılan rekombinant ürünlerin yaklaşık olarak %30'u *E. coli*'den sentezlendiği bildirilmektedir. Ayrıca *Bacillus* gibi bakteri

türleri de rekombinant biyofarmasötik üretiminde kullanılmakta olup *Lactococcus lactis*'in de bu amaç doğrultusunda önemli bir aday olabileceği öngörülmektedir (Blattner et al., 1997; Chen, 2012; Collet et al., 2002; Ferrer-Miralles et al., 2009; Huang et al., 2012; Itakura et al., 1977; Morello et al., 2008; Pohl & Harwood, 2010; Terpe, 2006; Walsh, 2010)

Ancak bu süreçte konakçının zayıf büyümesi, inklüzyon cisimciği oluşumu, protein inaktivitesi ve hatta protein elde edilememesi gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. Tüm bu zorluklara rağmen rekombinant protein ekspresyonu ve saflaştırılmasına yönelik ilerlemeler meydana gelmeye devam etmektedir (Apfel et al., 2000; Baneyx, 1999; Jana & Deb, 2005; Makrides, 1996; Sørensen & Mortensen, 2005).

Bir promotörün kontrolü altında üretilmek istenen proteini kodlayan gen, ifade vektörünün çoklu klonlama bölgesine klonlanmaktadır. Bakteriler gende mevcut olan intronları kesip çıkaramadığından genler, cDNA (tamamlayıcı/komplementer DNA) kompleksinden klonlanmaktadır. Rekombinant protein üreten *E. coli* suşuna transformasyon gerçekleştirildikten sonra transformantlar sıvı kültür içinde büyütülmektedir. Büyümenin belli aşamasında eklenen kimyasal, ekspresyon vektörü üzerindeki promotörü aktifleştirilerek rekombinant protein üretimini indüklenmektedir. Bu olaylar sonucunda oluşan gen ifadesi ve rekombinant polipeptit katlanmasıyla rekombinant protein meydana gelmektedir. Ardından rekombinant protein hücreden salınabilmekte ya da saflaştırılabilmektedir (Apfel et al., 2000).

Protein farmasötiklerin geliştirilmesinde seçilen proteinin ticari ölçekte üretilip üretilmeyeceği dikkate alınmalıdır. İlaç geliştirme çalışmalarının ilk zamanlarında az miktarda rekombinant protein üretiminde karşılaşılan problemler ilerleyen aşamalarda daha büyük sıkıntılara yol açacaktır. İlaç geliştirmenin başlangıcından ticari üretime kadar geçen süre içerisinde bakteriyel üremenin miktarı değişmektedir. Rekombinant protein ekspresyon çalışmalarının erken aşamalarında, proteinler genellikle düşük konsantrasyonlarda üretilir; bu aşamada temel öncelik, proteinin doğru katlanması ve biyolojik olarak aktif formda olup olmadığının değerlendirilmesidir. İfade ve tarama gibi ilk aşamalarda sadece rekombinant protein üretimini değil aynı zamanda saflaştırma gibi işlenebilirlik aşamalarını kontrol eden otomatik sistemlerden ve manuel olarak çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiş küçük şişelerden yararlanılmaktadır. Biyoreaktörlerde yapılan kültürlerde, hücre büyümesi ve protein üretim miktarları ilaç geliştirme sürecinin aşamasına göre değişiklik göstermektedir. Pilot ölçekten üretim ölçeğine geçiş yapıldığında hem hücre yoğunluğu hem de rekombinant protein üretim miktarı genellikle artış göstermektedir (Balasundaram et al., 2009; Peti & Page, 2007).

Konak organizmalardan biri olan *E. coli*, optimum çevresel koşullarda yaklaşık 20 dakikada 2 katına çıkması, yüksek hücre yoğunluklu kültürlerin kolayca elde edilebilmesi, kompleks ortamların kolay bulunabilmesi ve ucuz bileşenlerden yapılabilmesi, eksojen DNA ile transformasyonun hem hızlı hem de kolay olması gibi avantajları nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca rekombinant protein üretiminde gen klonlamadan saflaştırmaya kadar olan tüm

aşamalarda gerekli hücresel ve moleküler araçlara erişimin kolay olması da *E. coli*'nin tercih edilmesini sağlamaktadır. Ancak bazen protein toksisitesi ve inklüzyon cisimciklerinin agredasyonu gibi çeşitli faktörlerden kaynaklı işlevsel protein elde edilememektedir. Bu durum rekombinant proteinlerin optimizasyonu sağlayan sistemleri araştırmaya yöneltmektedir (Baeshen et al., 2015; Choi et al., 2006; Eisenstein et al., 2005; Gileadi, 2017; Jia & Jeon, 2016; Lebendiker et al., 2014; Lee et al., 1996; Rosano & Ceccarelli, 2014b; Shiloach & Fass, 2005).

Kültür koşullarının değişimi *E. coli*'nin büyümesini ve rekombinant protein verimini direkt olarak etkilemektedir. *E. coli* yetiştirmek için yaygın olarak kullanılan Luria-Bertani (LB) mediumun aşırı protein üretmek için uygun ortam olmadığı bildirilmiştir. Besleyiciliği yüksek bir bakteri ortamı olan Terrific Broth medium, rekombinant *E. coli* suşlarının yüksek yoğunlukta büyümesi ve bakımını sağlamaktadır. Son yıllarda popülerleşen otoindüksiyon ortamında da başarılı bir şekilde protein üretimi gerçekleşmiştir. Bu ortam glikoz ve laktoz olmak üzere en az 2 karbon kaynağından oluşmaktadır. Tercih edilen karbon kaynağı olan glukoz, tüketildikten hemen sonra laktoz tüketilmeye başlayıp lac promotöre dayalı sistemlerden protein üretilmektedir. Bu ortamın kullanımı sonucunda yüksek yoğunlukta bakteri elde edilmektedir. Ayrıca IPTG (izopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid) eklenmesi için kültürün durdurulması gerekmemektedir. Bir grup araştırmacı otoindüksiyonun ayrıca hücre metabolizmasının değişimiyle de oluşabileceğini saptamışlardır. Bu durumun mekanizması, kültürde bulunan hücrelere kompleks ortam

çok miktarda ulaşılabilir besin sağlamasına rağmen metabolik durumlarına çok az miktarda etki etmektedir, şeklinde açıklanmaktadır. Büyüme hızının düşürölmesiyle sentez ve katlanma arasında denge sağlanmaktadır. Bu da protein üretimine fayda sağlamaktadır. Büyüme hızının manipölasyonu költür sıcaklığının değişimiyle kolay bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Biyoreaktörlerde sıcaklığın kontrolöl maliyetlidir. Bu yüzden büyüme hızı kontrol araçları yardımıyla sıcaklık kontrol edilmektedir (Krause et al., 2016; Rosano & Ceccarelli, 2014a; Studier, 2005).

3.2.1.2. Memeli Hücrelerinde Rekombinant Protein Üretimi

Memeli ekspresyon sistemleri, onaylanmış rekombinant protein bazlı biyofarmasötikler içerisinde diğer ekspresyon sistemlerine göre daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Memeli sistemlerinde büyük ve komplike rekombinant proteinler eksprese edilmektedir. Mikrobiyal sistemlerle karşılaştırıldığında bu sistemde gen tanıtımı ve klon seçimi daha uzun sürede gerçekleşmektedir. Hücre hattının geliştirilmesi ekspresyon konakçısının, vektörlerin, transfeksiyon ve hücre hattı seçimi gibi temel aşamalardan meydana gelmektedir. Hücre hattının geliştirilmesi ve taranması amacıyla çeşitli cihazlardan yararlanılmaktadır. Klon seçiminde yüksek düzeyde protein ekspresyonu, genetik stabilite ve istenen post translasyonel modifikasyonlar gibi temel kriterlere dikkat edilmektedir. Çeşitli teknikler aracılığıyla yüksek verimli klonların izolasyonu sağlanmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda memeli ekspresyon sistemlerinde terapötik protein üretiminde kodon optimizasyonunda

meydana gelebilecek potansiyel riskler tartışılmaktadır. Rekombinant biyofarmasötiklerin ekspresyonunda CHO, NS0 ve Sp2/0 gibi hücre hatları kullanılmaktadır. Klinik kullanım için onaylanmış biyofarmasötiklerin %84'ü CHO hücre tabanlı sistemlerde eksprese edilmiştir. Memeli hücre hatlarında post translasyonel modifikasyonlar bulunmasına rağmen glikolizasyonun insan hücre hatlarından farklı olduğu bildirilmektedir. Ek olarak protein ekspresyonu için HEK293, HKB11, PER.C6, HeLa ve CAP gibi insan hücre hatları da çalışılmaktadır. Ancak bu hücre hatlarının hayvan virüsleri ile kontaminasyonuna yatkınlığı ve henüz büyük ölçekteki sistemlerde geliştirilememesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Bandaranayake & Almo, 2014; Dumont et al., 2016; Dyson, 2016; Gupta et al., 2019; Gupta & Shukla, 2017; Gupta et al., 2017; Hunter et al., 2019; Mauro, 2018; Owczarek et al., 2019; Priola et al., 2016).

CHO hücre hattının, CHO-K1, CHO-S, CHO-DG44 ve CHO-DXB11 gibi farklı soy hatları mevcuttur. Reinhart ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada CHO-K1, CHO-S ve CHO-DG44 soy hatlarında monoklonal antikor (mAb) ekspresyonu incelendi. Çalışmanın sonucunda mAb'ın özelliklerinin hücre hattı ve ortamından etkilendiği belirlenmiştir (Kim & Lee, 2007; Reinhart et al., 2019).

Hücre mühendisliği, laktat ve amonyum birikimini engelleyip buna ek olarak hücre büyümesini iyileştirmiştir. Diğer yaklaşımlar ve kodon optimizasyonu aracılığıyla hücre hattının optimizasyonu sağlanmaktadır. Gliko mühendislik aracılığıyla ilgilenilen proteinin istenen gliko formu elde edilmekte olup ayrıca ürün kalitesi ve

biyoaktivitesi arttırılmaktadır (Heffner et al., 2021; Lalonde & Durocher, 2017; Tejwani et al., 2018; Wang et al., 2017).

3.2.1.3. Mayalarda Rekombinant Protein Üretimi

Çeşitli amaçlar için kullanılan rekombinant proteinlerin üretiminde mayalardan sıklıkla faydalanılmaktadır. Her bir rekombinant protein için proteinin, ifade vektörlerinin ve organizmanın özelliklerine göre uygun ifade sistemlerinin belirlenip bunların optimizasyonu sağlanmalıdır. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica* ve *Arxula adenivorans* türleri gibi değişik karakterlere sahip çeşitli maya ifade konakçıları bulunmaktadır. Maya sistemleri genetik manipülasyon kolaylığı, ökaryotik sistemlere kıyasla daha ekonomik olmaları, pirojenler, patojenler veya viral inklüzyonlar içermemeleri, hızlı büyüme ve ökaryotik post translasyonel modifikasyon gerçekleştirebilme yetenekleri bu organizmayı son yıllarda popüler duruma getirmiştir. Rekombinant protein üretmek amacıyla uygun sistemin tasarlanması uygun katlanma ve translasyon sonrası modifikasyonun meydana geldiği konakçı suşun seçimi, uygun promotör-seçilebilir işaretleyici-vektörün seçimi, kodonun optimize edilmesi, rekombinant proteinin saflaştırılması ve tespitini sağlayan genin epitop etiketi ile birleştirilmesi, rekombinant proteini hücre içi ya da hücre dışı ortama hedeflemek amacıyla sinyal dizisinin seçimi, ürünün proteolitik bölünmesinin engellenmesi, karbon ve nitrojen kaynakları, indüksiyon koşulları gibi fermentasyon ortamının

tasarlanması, sıcaklık, pH ve oksijen transferi gibi biyoproses parametrelerinin ayarlanması gibi aşamalardan meydana gelmektedir. 1980'lerde geliştirilen ve ilk karakterize edilmiş maya sistemlerinden olan *Saccharomyces cerevisiae* düşük protein verimi, plazmid kararsızlığı ve proteinlerin hiperglikozilasyonu gibi çeşitli sorunlara neden olmaktadır. Bundan dolayı *Saccharomyces cerevisiae*'den başka maya sistemleri geliştirilmiştir. Ayrıca *P. pastoris* ve *H. Polymorpha* suşları N-glikozilasyon gerçekleştirecek bir şekilde tasarlanmıştır. Farklı maya türlerinde yapılan çalışmalarda mayaların terapötik proteinler için başlıca endüstriyel konakçılar olabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak rekombinant protein üretimi için istenen özelliklerin tümünü hiçbir maya ekspresyon sistemi sağlayamamaktadır. Bu durumdan dolayı istenilen özellikleri sağlayabilecek en uygun maya ekspresyon sisteminin araştırılması gerekmektedir (Buckholz & Gleeson, 1991; Gellissen et al., 2005; Goffeau et al., 1996; Hamilton et al., 2006; Ramezani-Rad et al., 2003; Wood et al., 2002).

3.2.1.4. Böceklerde Rekombinant Protein Üretimi

Rekombinant proteinlerin üretimi böcek hücrelerinde bakulovirus aracılı ekspresyon ile gerçekleştirilmektedir. Böcek ifade sistemi hem sitoplazmik hem de salgılanan proteinleri üretmeye uygun olması, proteinlerdeki disülfür bağlarını verimli olarak üretebilmesi, memeli hücrelerinde yer alan translasyon sonrası modifikasyonların çoğunluğunu sağlaması ve rekombinant proteinlerin hücre lizisi öncesinde litik döngünün son evrelerinde yüksek seviyelerde eksprese edilmeleri gibi avantajlara sahip olmaktadır. Buna rağmen sistemin

Üretilen proteinlerin karakteristik N-bağlı glikan yapıları memeli proteinlerinden farklı olması, masraflı ve leklendirmelerini oldukça zor gerçekleşmesi gibi de dezavantajları bulunmaktadır. Bakulovirus oldukça büyük boyutta olan litik bir çift sarmallı DNA virusudur. Bakulovirus izolatı için genellikle *Autographa californica* virüsü kullanılmaktadır. Bakulovirus, *Spodoptera frugiperda*'dan (Sf 9, Sf 21) köken almış böcek hücre hatlarında çoğaltılmaktadır. Böcek kaynaklı proteinler üzerinde sialillenmiş oligosakkaritlerin üretiminde, galaktoziltransferazların ve sialiltransferazların fazla miktarda ekspresyonu başarılı olarak üretilmektedir. Ek olarak yüksek oranda sialillenmiş protein üretimi için başka sınırlamalarda mevcuttur. N-asetilglukozaminiltransferaz II enziminin az olması ve sitidin monofosfat-NeuAc öncülünün üretimi ve konağa has etkilerinin olması sayılmaktadır (Hitchman et al., 2009; Kost et al., 2005).

3.2.1.5. Diğer Sistemlerde Rekombinant Protein retimi

Farklı rekombinant proteinlerin üretimi için bitki doku kültürleri ve transgenik bitki ve hayvanlar kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda bitkilerde rekombinant protein üretimi için glikozilasyondaki sınırlar ve proteoliz sorunları rapor edilmektedir. Dizinlerin yüksek verimli ekspresyonu alanlarında böcek hücreleri kullanılmaktadır. Son dönemlerde tamamen sialile edilen ve kompleks oligosakkaritlere sahip protein üretmeleri çalışmalarına başlanmıştır (Doran, 2000; Giddings et al., 2000; Kim & Swartz, 2001; Larrick & Thomas, 2001; Sharp & Doran, 2001).

Konakçı	Maliyet	Süre	PTM
Bakteri (E. coli)	Düşük	Kısa	Sınırlı
Maya (Pichia pastoris)	Orta	Orta	Var
Memeli (Hek293, CHO)	Yüksek	Uzun	Var
Böcek (sf9, sf21)	Yüksek	Uzun	Var

Tablo 3: Ekspresyon sistemlerinin karşılaştırılması

Kaynak: Andersen & Krummen, 2002.

3.3. Rekombinant Proteinlerde Üretim Zorlukları

Rekombinant protein ekspresyonu geniş uygulamaları olan güçlü bir teknolojidir, ancak eksprese edilen proteinin etkinliğini, verimini ve kalitesini etkileyebilecek çeşitli zorluklarla birlikte gelmektedir. Bu zorlukları anlamak, üstesinden gelmek için etkili stratejiler geliştirmek açısından çok önemlidir (Assenberg et al., 2013).

3.3.1. Protein Çözünürlüğü

Bakteriyel sistemlerde, özellikle de E. coli'de ifade edilen birçok rekombinant protein, inklüzyon cisimcikleri adı verilen çözünmeyen agregatlar oluşturma eğilimindedir. Proteinlerin inklüzyon cisimlerinden çözündürülmesi ve yeniden katlanması genellikle karmaşık ve verimsizdir, bu da protein aktivitesinin kaybına neden olabilmektedir (Singhvi et al., 2021).

Ayrıca Rekombinant proteinlerin aşırı ekspresyonu konak hücrenin katlanma mekanizmasını zorlayarak agregasyona yol açabilmektedir (örn. C43(DE3), C41(DE3) ve BL21(DE3)). Moleküler

şaperonların birlikte ekspresyonu, ekspresyon koşullarının optimize edilmesi (örn. sıcaklık, indüksiyon süresi) ve füzyon etiketlerinin kullanılması çözünürlüğün iyileştirilmesine yardımcı olabilmektedir (Dumon-Seignovert et al., 2004).

3.3.2. Post-Translasyonel Modifikasyonlar (PTM'ler)

E. Coli; Glikozilasyon, fosforilasyon ve uygun disülfid bağı oluşumu gibi birçok ökaryotik PTM için makineden yoksundur. Bu modifikasyonları gerektiren proteinler, bakteriyel sistemlerde ifade edildiğinde işlevsel olmayabilir veya doğru şekilde katlanmayabilmektedir. Maya, böcek ve memeli hücreleri ise daha karmaşık PTM'ler gerçekleştirebilmektedirler. Ancak bu ekspresyon sistemlerinin yüksek maliyetler, yavaş büyüme oranları ve daha karmaşık kültür gereksinimleri vardır. Ökaryotik konakçılarda bile glikozilasyon modelleri insanlardakinden farklı olabilir ve potansiyel olarak protein işlevini etkileyebilmektedir (Bastos et al., 2017; Sisila et al., 2023).

3.3.3. Verim Optimizasyonu

Rekombinant proteinlerin aşırı ekspresyonu konakçı hücre için toksik olabilir, hücre ölümüne ve verimin düşmesine yol açabilmektedir. İndüklenebilir promotörler kullanarak ekspresyon seviyelerini ayarlamak, kültür koşullarını optimize etmek ve rekombinant protein ekspresyonuna karşı gelişmiş toleransa sahip konakçı suşları kullanmak bu durumu düzeltebilmektedir. Rekombinant proteinlerin üretimi kaynakları temel hücresel

süreçlerden uzaklaştırarak konak hücreleri strese sokabilmektedir (Hoffmann et al., 2018; Rajacharya et al., 2024).

3.3.4. Protein Saflaştırma

Rekombinant proteinlerin saflaştırılması genellikle birden fazla adım içermektedir. Bu adımlar zaman alıcı ve maliyetli olabilmektedir. Her saflaştırma adımı protein veriminde kayba yol açarak sürecin genel verimliliğini etkileyebilmektedir (Patil & Walther, 2017).

Füzyon etiketleri saflaştırmayı kolaylaştırırsa da proteinin işlevsel veya terapötik kullanıma uygun olması için çıkarılmaları gerekebilmektedir. Etiketin çıkarılması için kullanılan proteazın ilgilenilen proteini parçalamamasını veya istenmeyen etkiler oluşturmamasını sağlamak gerekmektedir (Mishra, 2020).

3.3.5. Konakçı Hücre ile ilgili Sınırlamalar

E. coli'nin hızlı büyüme, uygun maliyetli, kolay genetik manipülasyon gibi avantajları olmasına rağmen; sınırlı PTM'ler, protein çözünürlüğü ile ilgili sorunlar, terapötik uygulamalarda potansiyel endotoksin kontaminasyonu gibi dezavantajları da bulunmaktadır.

Maya ise bazı PTM'leri gerçekleştirebilir, kültürü nispeten kolaydır. Ancak farklı glikozilasyon modelleri, bakterilerden daha yavaş büyüme eğilimi gösterebilmektedir.

Böcek hücreleri yüksek seviyeli ifade, karmaşık proteinler için uygun olma gibi avantajları varken diğer ifade sistemlerine göre daha pahalı ve karmaşık kültür koşulları mevcuttur.

Memeli Hücreleri; uygun katlanma ve PTM'ler, terapötik proteinler için idealdir. Ancak yüksek maliyet, daha yavaş büyüme, katı

düzenleyici gereklilikler gibi dezavantajları bulunmaktadır (Mattanovich et al., 2012; Schwarzer & Skorokhod, 2024).

3.3.6. Tekrarlanabilirlik

Üretilen rekombinant proteinlerde partiden partiye varyasyon farklılıkları görülebilmektedir. Farklı üretim partileri arasında tutarlı kalite ve verim sağlamak zordur. Özellikle terapötik uygulamalar için rekombinant proteinlerin saflığını, gücünü ve güvenliğini sağlamak için titiz kalite kontrol önlemlerinin alınması gerekmektedir. İyi Üretim Uygulamalarına (GMP) bağlı kalmak terapötik proteinlerin üretimi için esastır ve katı protokoller ve dökümantasyon gerektirmektedir. Ayrıca rekombinant proteinler için ruhsatlandırma onayı almak zaman alıcı ve maliyetli olabilen kapsamlı test ve doğrulamayı içermektedir (Fischer et al., 2012).

4. REKOMBİNANT PROTEİNLERİN KULLANIM ALANLARI

Rekombinant proteinler araştırmalarda vazgeçilmez araçlar haline gelmiştir. Kullanım alanları hücre biyolojisi, farmakoloji, tıp ve biyokimya, moleküler biyolojiden tarım ve veteriner sağlık araştırmalarına kadar uzanmaktadır. İn vitro ve in vivo çalışma tasarımları için kullanılmaktadır. Western Blot veya ELISA gibi yaşam bilimlerinde önemli olan popüler tekniklerde kullanılmaktadır. Ayrıca ilaç keşfinde inhibitörlerin etki mekanizmalarını incelemek için reseptör proteinlerinin yönlendirilmiş mutasyonları şeklinde de kullanılmaktadır (Pope & Medzhitov, 2018).

Rekombinant protein ekspresyonu, artan verimliliği, ölçeklenebilirliği ve kullanım çeşitliliği nedeniyle teknoloji geliştikçe daha da önemli duruma gelecek önemli bir biyoteknolojik araç haline gelmiştir. Rekombinant protein ifadesi endüstri, araştırma, tarım ve tedaviler için hayati önem taşıyan proteinlerin geniş ölçekte üretilmesini mümkün kıldığından birçok alanda devrim yaratmıştır. Rekombinant protein ifadesinin verimliliği, ölçeklenebilirliği ve kullanım çeşitliliği, teknolojik ilerlemeyle birlikte artacak ve temel bir biyoteknoloji aracı olarak konumunu sağlamlaştıracaktır (Zhang et al., 2013).

4.1. Rekombinant Proteinlerin Araştırmalarda Kullanımı

Kriyo-elektron mikroskobu, NMR spektroskopisi ve X-ray kristalografisinde rekombinant proteinler kullanılarak üç boyutlu yapılar tespit edilebilmektedir. Bu durum protein yapılarının anlaşılması ilaç tasarımına ve fonksiyonel analize yardımcı olmaktadır. Fonksiyonel çalışmalarda, rekombinant proteinlerin ifade edilmesi, hücresel süreçleri ve sinyal yollarını anlamak için çok önemli olan etkileşimlerin incelenmesine olanak tanımaktadır. Genetik çalışmalarında, rekombinant proteinler gen düzenleme mekanizmalarını, transkripsiyon faktörlerini ve epigenetik modifikasyonları incelemek için kullanılabilir (Zhang et al., 2013).

4.2. Rekombinant Proteinlerin Tıpta Kullanımı

Rekombinant proteinler, araştırma uygulamalarının yanı sıra tıbbın teşhis dalında ve tahlillerde yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Rekombinant insan insülini, terapötik kullanım için onaylanan ilk biyofarmasötiktir ve diyabet tedavisinde devrim yaratmıştır. *E. coli* veya mayada üretilen bu ilaç, günümüzde diyabet tedavisinde temel dayanak noktasıdır. Monoklonal Antikorlar (mAb'ler); kanserlerin, otoimmün hastalıkların ve bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Örnek olarak meme kanseri için trastuzumab (Herceptin) ve romatoid artrit için adalimumab (Humira) verilebilmektedir. Rekombinant protein teknolojisi, hepatit B aşısı ve daha yeni HPV aşısı gibi güvenli ve etkili aşılarn üretilmesini sağlamaktadır. Gaucher Hastalığında rekombinant glukoserebrosidaz lizozomal depolama bozukluğunu tedavi etmek için kullanılmaktadır. Rekombinant DNaz, kistik fibrozis hastalarının akciğerlerindeki mukusu parçalamak için kullanılmaktadır (Baeshen et al., 2015; Zhang et al., 2024).

Rekombinant proteinlerin hastalara uygulanmasını içeren tüm uygulamalarda, CHO hücreleri gibi memeli hücrelerinden yüksek kaliteli hedef proteinlerin elde edilmesi için büyük özen gösterilmelidir. Prokaryotik ekspresyon sistemleri veya uygun olmayan hücre hatları, glikozilasyon modelleri gibi hatalı post-translasyonel modifikasyonlara yol açmakta ve DNA dizisinin kendisi optimizasyondan geçmiş olsa bile immünojenisiteye ve ciddi yan etkilere neden olmaktadır. FDA, uygun ökaryotik hücre kültürü, uygun ekspresyon vektörleri, yeterli protein saflaştırması kullanılmasını sağlar ve ürünlerin derinlemesine karakterize edilmesini talep etmektedir (Zhang et al., 2013).

4.3. Rekombinant Proteinlerin Endüstriyel Kullanımı

Proteazlar, lipazlar ve amilazlar çamaşır deterjanlarında lekeleri parçalamak ve temizlik verimliliğini artırmak için kullanılmaktadır. Selülozlar ve hemiselülozlar gibi enzimler, bitki biyokütlesinden biyoetanol üretiminde biyoyakıt olarak kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde Rennet (kimozen) gibi rekombinant enzimler peynir üretiminde, amilazlar ise fırıncılık ve bira yapımında kullanılmaktadır. Biyoremediasyon alanında rekombinant mikroorganizmalar, petrol sızıntıları ve ağır metaller gibi çevresel kirleticileri parçalayabilen enzimler üretmek üzere tasarlanmıştır (Ali et al., 2023; Patel et al., 2019).

4.4. Rekombinant Proteinlerin Tarım ve Hayvancılıkta Kullanımı

Rekombinant teknolojisi sayesinde *Bacillus thuringiensis* (Bt) toksinini ifade eden ürünler haşere giderici olarak kullanılmaktadır. Böylece böcek zararlılarına karşı dirençli bir yapı oluşur ve kimyasal pestisitlere olan ihtiyacı azalır. Glifosat gibi herbisitlere dirençli olacak şekilde tasarlanan ürünler, daha etkili yabancı ot kontrolü sağlamaktadır. Altın pirinç, gelişmekte olan ülkelerde A vitamini eksikliğiyle mücadele etmek için provitamin A ile zenginleştirilmiş genetiği değiştirilmiş bir ürün örneğidir (Jouzani et al., 2017).

Veteriner hekimliğinde hayvan sağlığında rekombinant aşılarda ve terapötikler, çiftlik hayvanlarındaki hastalıkları önlemek ve tedavi etmek, hayvan sağlığını ve verimliliğini artırmak için kullanılmaktadır (Kamle & Ali, 2013; Raman, 2017).

Sonuç olarak, rekombinant proteinlerin üretim aşamaları, gen klonlamasından saflaştırmaya kadar titizlikle yürütülen bir süreç olup, hedef proteinin fonksiyonel ve saf halde elde edilmesini mümkün kılmaktadır. Rekombinant proteinlerin üretimi, biyoteknoloji ve tıpta çığır açıcı gelişmelere olanak sağlamış; tedavi, teşhis, aşı geliştirme ve endüstriyel uygulamalar dahil olmak üzere pek çok alanda geniş kullanım imkân sunmuştur (Hein et al., 2021).

KAYNAKÇA

- Adrio, J.-L., & Demain, A. L. (2010). Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered bugs*, 1(2), 116-131.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). From dna to rna. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science.
- Ali, S. A., Chew, Y. W., Omar, T. C., & Azman, N. (2015). Use of FabV-Triclosan plasmid selection system for efficient expression and production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *PloS one*, 10(12), e0144189.
- Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., & Lee, I.-J. (2023). The recent advances in the utility of microbial lipases: A review. *Microorganisms*, 11(2), 510.
- Amann, T., Schmieder, V., Fastrup Kildegaard, H., Borth, N., & Andersen, M. R. (2019). Genetic engineering approaches to improve posttranslational modification of biopharmaceuticals in different production platforms. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(10), 2778-2796.
- Andersen, D. C., & Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current opinion in biotechnology*, 13(2), 117-123.
- Andreev, Y. A., Kozlov, S. A., Vassilevski, A. A., & Grishin, E. V. (2010). Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions. *Analytical biochemistry*, 407(1), 144-146.

- Apfel, S. C., Schwartz, S., Adornato, B. T., Freeman, R., Biton, V., Rendell, M., Vinik, A., Giuliani, M., Stevens, J. C., & Barbano, R. (2000). Efficacy and safety of recombinant human nerve growth factor in patients with diabetic polyneuropathy: a randomized controlled trial. *Jama*, 284(17), 2215-2221.
- Assenberg, R., Wan, P. T., Geisse, S., & Mayr, L. M. (2013). Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current opinion in structural biology*, 23(3), 393-402.
- Baeshen, M. N., Al-Hejin, A. M., Bora, R. S., Ahmed, M. M., Ramadan, H. A., Saini, K. S., Baeshen, N. A., & Redwan, E. M. (2015). Production of biopharmaceuticals in E. coli: current scenario and future perspectives.
- Balasundaram, B., Harrison, S., & Bracewell, D. G. (2009). Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. *Trends in biotechnology*, 27(8), 477-485.
- Bandaranayake, A. D., & Almo, S. C. (2014). Recent advances in mammalian protein production. *FEBS letters*, 588(2), 253-260.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Current opinion in biotechnology*, 10(5), 411-421.
- Bastos, P. A. D., da Costa, J. P., & Vitorino, R. (2017). A glimpse into the modulation of post-translational modifications of human-colonizing bacteria. *Journal of proteomics*, 152, 254-275.
- Baumgarten, T., Schlegel, S., Wagner, S., Löw, M., Eriksson, J., Bonde, I., Herrgård, M. J., Heipieper, H. J., Nørholm, M. H., & Slotboom, D. J. (2017). Isolation and characterization of the E.

- coli membrane protein production strain Mutant56 (DE3). *Scientific reports*, 7(1), 45089.
- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H., & Kompala, D. S. (1990). Plasmid-encoded protein: the principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(7), 668-681.
- Birnbaum, S., & Bailey, J. (1991). Plasmid presence changes the relative levels of many host cell proteins and ribosome components in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(8), 736-745.
- Blattner, F. R., Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., & Mayhew, G. F. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453-1462.
- Blommel, P. G., & Fox, B. G. (2007). A combined approach to improving large-scale production of tobacco etch virus protease. *Protein expression and purification*, 55(1), 53-68.
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In *Methods in enzymology* (Vol. 326, pp. 245-254). Elsevier.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., & Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2(2), 95-113.

- Brautaset, T., Lale, R., & Valla, S. (2009). Positively regulated bacterial expression systems. *Microbial biotechnology*, 2(1), 15-30.
- Bucher, M. H., Evdokimov, A. G., & Waugh, D. S. (2002). Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Biological Crystallography*, 58(3), 392-397.
- Buckholz, R. G., & Gleeson, M. A. (1991). Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Bio/technology*, 9(11), 1067-1072.
- Burdette, L. A., Leach, S. A., Wong, H. T., & Tullman-Ercek, D. (2018). Developing Gram-negative bacteria for the secretion of heterologous proteins. *Microbial cell factories*, 17, 1-16.
- Calos, M. P. (1978). DNA sequence for a low-level promoter of the lac repressor gene and an 'up'promoter mutation. *nature*, 274(5673), 762-765.
- Campbell, J. L., Richardson, C. C., & Studier, F. W. (1978). Genetic recombination and complementation between bacteriophage T7 and cloned fragments of T7 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(5), 2276-2280.
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International journal of medical microbiology*, 303(6-7), 298-304.
- Carter, C., & Houlihan, D. (2001). Protein synthesis. *Fish physiology*, 20, 31-75.

- Cederbaum, S. D., Fareed, G. C., Lovett, M. A., & Shapiro, L. J. (1984). Recombinant DNA in medicine. *Western Journal of Medicine*, 141(2), 210.
- Chant, A., Kraemer-Pecore, C. M., Watkin, R., & Kneale, G. G. (2005). Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Protein expression and purification*, 39(2), 152-159.
- Chen, R. (2012). Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology advances*, 30(5), 1102-1107.
- Chen, S., Songkumarn, P., Liu, J., & Wang, G.-L. (2009). A versatile zero background T-vector system for gene cloning and functional genomics. *Plant physiology*, 150(3), 1111-1121.
- Chen, Z., He, Y., Shi, B., & Yang, D. (2013). Human serum albumin from recombinant DNA technology: challenges and strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(12), 5515-5525.
- Cheng, F., Xiang, C., Zhang, X.-J., Liu, Z.-Q., & Zheng, Y.-G. (2018). ReToAd: simple method for the rapid replacement of promoters to improve protein production. *Biotechnology Letters*, 40, 957-964.

- Choi, J. H., Keum, K. C., & Lee, S. Y. (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical engineering science*, 61(3), 876-885.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(11), 3240-3244.
- Collet, J.-F., Riemer, J., Bader, M. W., & Bardwell, J. C. (2002). Reconstitution of a disulfide isomerization system. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 26886-26892.
- Corchero, J. L., & Villaverde, A. (1998). Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(6), 625-632.
- Costa, S. J., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L., & Besir, H. (2013). The novel Fh8 and H fusion partners for soluble protein expression in *Escherichia coli*: a comparison with the traditional gene fusion technology. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 6779-6791.
- Crea, R., Kraszewski, A., Hirose, T., & Itakura, K. (1978). Chemical synthesis of genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(12), 5765-5769.
- Daegelen, P., Studier, F. W., Lenski, R. E., Cure, S., & Kim, J. F. (2009). Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21 (DE3). *Journal of molecular biology*, 394(4), 634-643.

- Dangi, A. K., Sinha, R., Dwivedi, S., Gupta, S. K., & Shukla, P. (2018). Cell line techniques and gene editing tools for antibody production: a review. *Frontiers in pharmacology*, 9, 630.
- Davis, G. D., Elisee, C., Newham, D. M., & Harrison, R. G. (1999). New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(4), 382-388.
- De Boer, H. A., Comstock, L. J., & Vasser, M. (1983). The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(1), 21-25.
- Del Solar, G., & Espinosa, M. (2000). Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Molecular microbiology*, 37(3), 492-500.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3), 297-306.
- Derman, A. I., Prinz, W. A., Belin, D., & Beckwith, J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, 262(5140), 1744-1747.
- Deuschle, U., Kammerer, W., Gentz, R., & Bujard, H. (1986). Promoters of *Escherichia coli*: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures. *The EMBO journal*, 5(11), 2987-2994.
- Duan, G., & Walther, D. (2015). The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. *PLoS computational biology*, 11(2), e1004049.

- Dubendorf, J. W., & Studier, F. W. (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of molecular biology*, 219(1), 45-59.
- Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., & Vuillard, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: a comparison of overexpression in BL21 (DE3), C41 (DE3), and C43 (DE3). *Protein expression and purification*, 37(1), 203-206.
- Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical reviews in biotechnology*, 36(6), 1110-1122.
- Dyson, M. R. (2016). Fundamentals of expression in mammalian cells. *Advanced technologies for protein complex production and characterization*, 217-224.
- Eisenstein, D. J., Zehavi, I., Hogg, D. W., Scoccimarro, R., Blanton, M. R., Nichol, R. C., Scranton, R., Seo, H.-J., Tegmark, M., & Zheng, Z. (2005). Detection of the baryon acoustic peak in the large-scale correlation function of SDSS luminous red galaxies. *The Astrophysical Journal*, 633(2), 560.
- Emtage, S. (1986). Biotechnology and protein production. In *Delivery Systems for Peptide Drugs* (pp. 23-33). Springer.
- Ferrer-Mirallés, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial cell factories*, 8, 1-8.

- Findık Kıyan, H., & Yaylın, İ. (2020). Rekombinant DNA Teknolojisinin Tıpta Kullanımı; Moleküler Cerrahi. *Moleküler Tıp*, 67-74.
- Fischer, R., Schillberg, S., Hellwig, S., Twyman, R. M., & Drossard, J. (2012). GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnology advances*, 30(2), 434-439.
- Garnick, R., Solli, N., & Papa, P. (1988). The role of quality control in biotechnology: An analytical perspective. *Analytical chemistry*, 60(23), 2546-2557.
- Gellissen, G., Strasser, A. W., & Suckow, M. (2005). Key and criteria to the selection of an expression platform. *Production of recombinant proteins—Novel microbial and eukaryotic expression systems*, 1-5.
- Gileadi, O. (2017). Recombinant protein expression in *E. coli*: a historical perspective. *Heterologous Gene Expression in E. coli: Methods and Protocols*, 3-10.
- Godiska, R., Patterson, M., Schoenfeld, T., & Mead, D. A. (2005). Beyond pUC: vectors for cloning unstable DNA. *DNA sequencing: optimizing the process and analysis*, 1, 55-76.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., & Johnston, M. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546-567.
- Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annual review of genetics*, 30(1), 465-506.

- Graumann, K., & Premstaller, A. (2006). Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 1(2), 164-186.
- Griffiths, A. J. (2005). *An introduction to genetic analysis*. Macmillan.
- Grodberg, J., & Dunn, J. J. (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *Journal of bacteriology*, 170(3), 1245-1253.
- Gupta, S. K., & Shukla, P. (2017). Sophisticated cloning, fermentation, and purification technologies for an enhanced therapeutic protein production: a review. *Frontiers in pharmacology*, 8, 419.
- Gupta, S. K., & Shukla, P. (2018). Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(24), 10457-10468.
- Gupta, S. K., Dangi, A. K., Smita, M., Dwivedi, S., & Shukla, P. (2019). Effectual bioprocess development for protein production. In *Applied microbiology and bioengineering* (pp. 203-227). Elsevier.
- Gupta, S. K., Srivastava, S. K., Sharma, A., Nalage, V. H., Salvi, D., Kushwaha, H., Chitnis, N. B., & Shukla, P. (2017). Metabolic engineering of CHO cells for the development of a robust protein production platform. *PloS one*, 12(8), e0181455.
- Guzman, L.-M., Belin, D., Carson, M. J., & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors

- containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of bacteriology*, 177(14), 4121-4130.
- Hamilton, S. R., Davidson, R. C., Sethuraman, N., Nett, J. H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T. A., Li, H., & Choi, B.-K. (2006). Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*, 313(5792), 1441-1443.
- Hammarström, M., Hellgren, N., van Den Berg, S., Berglund, H., & Härd, T. (2002). Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein science*, 11(2), 313-321.
- Heffner, K. M., Wang, Q., Hizal, D. B., Can, Ö., & Betenbaugh, M. J. (2021). Glycoengineering of mammalian expression systems on a cellular level. *Advances in glycobiochemistry*, 37-69.
- Hein, R., Koopman, R., García, M., Armour, N., Dunn, J. R., Barbosa, T., & Martinez, A. (2021). Review of poultry recombinant vector vaccines. *Avian diseases*, 65(3), 438-452.
- Hitchman, R. B., Possee, R. D., & King, L. A. (2009). Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. *Recent patents on biotechnology*, 3(1), 46-54.
- Hoffmann, D., Ebrahimi, M., Gerlach, D., Salzig, D., & Czermak, P. (2018). Reassessment of inclusion body-based production as a versatile opportunity for difficult-to-express recombinant proteins. *Critical reviews in biotechnology*, 38(5), 729-744.
- Huang, C.-J., Lin, H., & Yang, X. (2012). Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent

- advancements. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(3), 383-399.
- Hunter, M., Yuan, P., Vavilala, D., & Fox, M. (2019). Optimization of protein expression in mammalian cells. *Current protocols in protein science*, 95(1), e77.
- Hwang, P. M., Pan, J. S., & Sykes, B. D. (2014). Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in *Escherichia coli*. *FEBS letters*, 588(2), 247-252.
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., & Boyer, H. W. (1977). Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*, 198(4321), 1056-1063.
- Jackwood, M., Hickie, L., Kapil, S., Silva, R., Osterrieder, K., & Prideaux, C. (2008). Vaccine development using recombinant DNA technology. *Council Agric Sci Technol*, 38, 1-11.
- Jana, S., & Deb, J. (2005). RETRACTED ARTICLE: Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 67, 289-298.
- Jenny, R. J., Mann, K. G., & Lundblad, R. L. (2003). A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein expression and purification*, 31(1), 1-11.
- Jeong, H., Barbe, V., Lee, C. H., Vallenet, D., Yu, D. S., Choi, S.-H., Couloux, A., Lee, S.-W., Yoon, S. H., & Cattolico, L. (2009). Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21 (DE3). *Journal of molecular biology*, 394(4), 644-652.

- Jia, B., & Jeon, C. O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open biology*, 6(8), 160196.
- Jouzani, G. S., Valijanian, E., & Sharafi, R. (2017). *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied microbiology and biotechnology*, 101, 2691-2711.
- Kamle, S., & Ali, S. (2013). Genetically modified crops: detection strategies and biosafety issues. *Gene*, 522(2), 123-132.
- Kapust, R. B., & Waugh, D. S. (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein science*, 8(8), 1668-1674.
- Karsdal, M. A., Henriksen, K., Leeming, D. J., Woodworth, T., Vassiliadis, E., & Bay-Jensen, A.-C. (2010). Novel combinations of post-translational modification (PTM) neo-epitopes provide tissue-specific biochemical markers—are they the cause or the consequence of the disease? *Clinical biochemistry*, 43(10-11), 793-804.
- Katz, L., & Ashley, G. W. (2005). Translation and protein synthesis: macrolides. *Chemical reviews*, 105(2), 499-528.
- Keefer, L. M., Piron, M.-A., & De Meyts, P. (1981). Human insulin prepared by recombinant DNA techniques and native human insulin interact identically with insulin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(3), 1391-1395.

- Khan, F., Legler, P. M., Mease, R. M., Duncan, E. H., Bergmann-Leitner, E. S., & Angov, E. (2012). Histidine affinity tags affect MSP142 structural stability and immunodominance in mice. *Biotechnology journal*, 7(1), 133-147.
- Kiermer, V. (2007). The dawn of recombinant DNA. *Nature Reviews Genetics*, 8(1), S6-S6.
- Kim, S. H., & Lee, G. M. (2007). Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(1), 152-159.
- Kim, S., Jeong, H., Kim, E.-Y., Kim, J. F., Lee, S. Y., & Yoon, S. H. (2017). Genomic and transcriptomic landscape of Escherichia coli BL21 (DE3). *Nucleic acids research*, 45(9), 5285-5293.
- Klose, J., Wendt, N., Kubald, S., Krause, E., Fechner, K., Beyermann, M., Bienert, M., Rudolph, R., & Rothmund, S. (2004). Hexahistidin tag position influences disulfide structure but not binding behavior of in vitro folded N-terminal domain of rat corticotropin-releasing factor receptor type 2a. *Protein science*, 13(9), 2470-2475.
- Korpimäki, T., Kurittu, J., & Karp, M. (2003). Surprisingly fast disappearance of β -lactam selection pressure in cultivation as detected with novel biosensing approaches. *Journal of microbiological methods*, 53(1), 37-42.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*, 23(5), 567-575.

- Krause, M., Neubauer, A., & Neubauer, P. (2016). The fed-batch principle for the molecular biology lab: controlled nutrient diets in ready-made media improve production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 15, 1-13.
- Krebs, J. E., Goldstein, E. S., & Kilpatrick, S. T. (2017). *Lewin's genes XII*. Jones & Bartlett Learning.
- Kroll, J., Klintner, S., Schneider, C., Voß, I., & Steinbüchel, A. (2010). Plasmid addiction systems: perspectives and applications in biotechnology. *Microbial biotechnology*, 3(6), 634-657.
- Lalonde, M.-E., & Durocher, Y. (2017). Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *Journal of biotechnology*, 251, 128-140.
- Lanzer, M., & Bujard, H. (1988). Promoters largely determine the efficiency of repressor action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(23), 8973-8977.
- Lau, J. L., & Dunn, M. K. (2018). Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(10), 2700-2707.
- Lebendiker, M., Danieli, T., & de Marco, A. (2014). The Trip Adviser guide to the protein science world: a proposal to improve the awareness concerning the quality of recombinant proteins. *BMC Research Notes*, 7, 1-2.
- Lee, I. Y., Kim, M. K., Park, Y. H., & Lee, S. Y. (1996). Regulatory effects of cellular nicotinamide nucleotides and enzyme activities on poly (3-hydroxybutyrate) synthesis in recombinant

- Escherichia coli. *Biotechnology and Bioengineering*, 52(6), 707-712.
- Lee, J. M., Hammarén, H. M., Savitski, M. M., & Baek, S. H. (2023). Control of protein stability by post-translational modifications. *Nature communications*, 14(1), 201.
- Lodish, H. F. (2008). *Molecular cell biology*. Macmillan.
- Luke, J. M., Carnes, A. E., Sun, P., Hodgson, C. P., Waugh, D. S., & Williams, J. A. (2011). Thermostable tag (TST) protein expression system: Engineering thermotolerant recombinant proteins and vaccines. *Journal of biotechnology*, 151(3), 242-250.
- Makoff, A., & Oxeer, M. (1991). High level heterologous expression in E. coli using mutant forms of the lac promoter. *Nucleic acids research*, 19(9), 2417-2421.
- Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. *Microbiological reviews*, 60(3), 512-538.
- Marschall, L., Sagmeister, P., & Herwig, C. (2017). Tunable recombinant protein expression in E. coli: promoter systems and genetic constraints. *Applied microbiology and biotechnology*, 101, 501-512.
- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M., & Porro, D. (2012). Recombinant protein production in yeasts. *Recombinant gene expression*, 329-358.

- Mauro, V. P. (2018). Codon optimization in the production of recombinant biotherapeutics: potential risks and considerations. *BioDrugs*, 32(1), 69-81.
- Mayer, M. P. (1995). A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene*, 163(1), 41-46.
- McAleer, W. J., Buynak, E. B., Maigetter, R. Z., Wampler, D. E., Miller, W. J., & Hilleman, M. R. (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *nature*, 307(5947), 178-180.
- McKenzie, E. A., & Abbott, W. M. (2018). Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells. *Methods*, 147, 40-49.
- Miroux, B., & Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of molecular biology*, 260(3), 289-298.
- Mirzadeh, K., Martinez, V., Toddo, S., Guntur, S., Herrgard, M. J., Elofsson, A., Nørholm, M. H., & Daley, D. O. (2015). Enhanced protein production in *Escherichia coli* by optimization of cloning scars at the vector–coding sequence junction. *ACS synthetic biology*, 4(9), 959-965.
- Mishra, V. (2020). Affinity tags for protein purification. *Current Protein and Peptide Science*, 21(8), 821-830.
- Moffatt, B. A., & Studier, F. W. (1987). T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell*, 49(2), 221-227.
- Monroe, M. R. (2020). Plasmids 101: What is a plasmid. *Addgene blog*. Retrieved December, 12, 2022.

- Morello, E., Bermudez-Humaran, L., Llull, D., Sole, V., Miraglio, N., Langella, P., & Poquet, I. (2008). *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 14(1-3), 48-58.
- Müller-Hill, B., & Oehler, S. (1996). The lac operon.
- Müller-Hill, B., Crapo, L., & Gilbert, W. (1968). Mutants that make more lac repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 59(4), 1259-1264.
- Nilsson, J., Ståhl, S., Lundeberg, J., Uhlén, M., & Nygren, P.-å. (1997). Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein expression and purification*, 11(1), 1-16.
- Niri, N. M., Memarnejadian, A., Hadjati, J., Aghasadeghi, M. R., Shokri, M., Pilehvar-Soltanahmadi, Y., Akbarzadeh, A., & Zarghami, N. (2016). Construction and production of Foxp3-Fc (IgG) DNA vaccine/fusion protein. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 8(2), 57.
- Owczarek, B., Gerszberg, A., & Hnatuszko-Konka, K. (2019). A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. *BioMed research international*, 2019(1), 4216060.
- Parks, T. D., Leuther, K. K., Howard, E. D., Johnston, S. A., & Dougherty, W. G. (1994). Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Analytical biochemistry*, 216(2), 413-417.

- Patel, N., Rai, D., Shivam, Shahane, S., & Mishra, U. (2019). Lipases: sources, production, purification, and applications. *Recent patents on biotechnology*, 13(1), 45-56.
- Patil, R., & Walther, J. (2017). Continuous manufacturing of recombinant therapeutic proteins: upstream and downstream technologies. *New bioprocessing strategies: Development and manufacturing of recombinant antibodies and proteins*, 277-322.
- Perron-Savard, P., De Crescenzo, G., & Moual, H. L. (2005). Dimerization and DNA binding of the Salmonella enterica PhoP response regulator are phosphorylation independent. *Microbiology*, 151(12), 3979-3987.
- Peti, W., & Page, R. (2007). Strategies to maximize heterologous protein expression in Escherichia coli with minimal cost. *Protein expression and purification*, 51(1), 1-10.
- Peubez, I., Chaudet, N., Mignon, C., Hild, G., Husson, S., Courtois, V., De Luca, K., Speck, D., & Sodoyer, R. (2010). Antibiotic-free selection in E. coli: new considerations for optimal design and improved production. *Microbial cell factories*, 9, 1-10.
- Pham, P. V. (2018). Medical biotechnology: techniques and applications. In *Omics technologies and bio-engineering* (pp. 449-469). Elsevier.
- Phue, J. N., Noronha, S. B., Hattacharyya, R., Wolfe, A. J., & Shiloach, J. (2005). Glucose metabolism at high density growth of E. coli B and E. coli K: differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in E. coli B as

- determined by microarrays and Northern blot analyses. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(7), 805-820.
- Pohl, S., & Harwood, C. R. (2010). Heterologous protein secretion by *Bacillus* species: from the cradle to the grave. *Advances in applied microbiology*, 73, 1-25.
- Pope, S. D., & Medzhitov, R. (2018). Emerging principles of gene expression programs and their regulation. *Molecular cell*, 71(3), 389-397.
- Postma, P., & Lengeler, J. (1985). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiological reviews*, 49(3), 232-269.
- Pray, L. (2008). Recombinant DNA technology and transgenic animals. *Nature Education*, 1(1), 51.
- Priola, J. J., Calzadilla, N., Baumann, M., Borth, N., Tate, C. G., & Betenbaugh, M. J. (2016). High-throughput screening and selection of mammalian cells for enhanced protein production. *Biotechnology journal*, 11(7), 853-865.
- Puetz, J., & Wurm, F. M. (2019). Recombinant proteins for industrial versus pharmaceutical purposes: a review of process and pricing. *Processes*, 7(8), 476.
- Rais-Beghdadi, C., Roggero, M. A., Fasel, N., & Reymond, C. D. (1998). Purification of recombinant proteins by chemical removal of the affinity tag. *Applied biochemistry and biotechnology*, 74, 95-103.
- Rajacharya, G. H., Sharma, A., & Yazdani, S. S. (2024). Proteomics and metabolic burden analysis to understand the impact of

- recombinant protein production in *E. coli*. *Scientific reports*, 14(1), 12271.
- Raman, R. (2017). The impact of Genetically Modified (GM) crops in modern agriculture: A review. *GM crops & food*, 8(4), 195-208.
- Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database*, 2021, baab012.
- Ramezani-Rad, M., Hollenberg, C. P., Lauber, J., Wedler, H., Griess, E., Wagner, C., Albermann, K., Hani, J., Piontek, M., & Dahlems, U. (2003). The *Hansenula polymorpha* (strain CBS4732) genome sequencing and analysis. *FEMS yeast research*, 4(2), 207-215.
- Reinhart, D., Damjanovic, L., Kaisermayer, C., Sommeregger, W., Gili, A., Gasselhuber, B., Castan, A., Mayrhofer, P., Grünwald-Gruber, C., & Kunert, R. (2019). Bioprocessing of recombinant CHO-K1, CHO-DG44, and CHO-S: CHO Expression hosts favor either mAb production or biomass synthesis. *Biotechnology journal*, 14(3), 1700686.
- Reznikoff, W. S. (1992). The lactose operon-controlling elements: a complex paradigm. *Molecular microbiology*, 6(17), 2419-2422.
- Roberts, M. A. (2019). Recombinant DNA technology and DNA sequencing. *Essays in biochemistry*, 63(4), 457-468.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014a). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172.

- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014b). Recombinant protein expression in microbial systems. In (Vol. 5, pp. 341): Frontiers Media SA.
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein science*, 28(8), 1412-1422.
- Rugbjerg, P., Myling-Petersen, N., Porse, A., Sarup-Lytzen, K., & Sommer, M. O. (2018). Diverse genetic error modes constrain large-scale bio-based production. *Nature communications*, 9(1), 787.
- Saati-Santamaría, Z. (2023). Global map of specialized metabolites encoded in prokaryotic plasmids. *Microbiology Spectrum*, 11(4), e01523-01523.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Schlegel, S., Genevaux, P., & de Gier, J.-W. (2015). De-convoluting the genetic adaptations of *E. coli* C41 (DE3) in real time reveals how alleviating protein production stress improves yields. *Cell reports*, 10(10), 1758-1766.
- Schleif, R. (2000). Regulation of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*. *Trends in genetics*, 16(12), 559-565.
- Schleif, R. (2010). AraC protein, regulation of the l-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS microbiology reviews*, 34(5), 779-796.

- Schwab, H. (2005). Strain improvement in industrial microorganisms by recombinant DNA techniques. In *Bioprocesses including animal cell culture* (pp. 129-168). Springer.
- Schwarzer, E., & Skorokhod, O. (2024). Post-translational modifications of proteins of malaria parasites during the life cycle. *International journal of molecular sciences*, 25(11), 6145.
- Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Communications biology*, 3(1), 214.
- Shiloach, J., & Fass, R. (2005). Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development. *Biotechnology advances*, 23(5), 345-357.
- Silverstone, A. E., Arditti, R. R., & Magasanik, B. (1970). Catabolite-insensitive revertants of *lac* promoter mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 66(3), 773-779.
- Singhvi, P., Saneja, A., Ahuja, R., & Panda, A. K. (2021). Solubilization and refolding of variety of inclusion body proteins using a novel formulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 2352-2364.
- Sisila, V., Indhu, M., Radhakrishnan, J., & Ayyadurai, N. (2023). Building biomaterials through genetic code expansion. *Trends in biotechnology*, 41(2), 165-183.

- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 434-452.
- Son, Y.-J., Phue, J.-N., Trinh, L. B., Lee, S., & Shiloach, J. (2011). The role of Cra in regulating acetate excretion and osmotic tolerance in *E. coli* K-12 and *E. coli* B at high density growth. *Microbial cell factories*, 10, 1-9.
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 115(2), 113-128.
- Soydemir, E., & Aksoy, Z. B. (2017). Rekombinant DNA Teknolojisi ve Günümüzdeki Kullanımı. *Güncel Gastroenteroloji*, 21(1), 14-17.
- Soydemir, E., & Aksoy, Z. B. (2017). Rekombinant DNA Teknolojisi ve Günümüzdeki Kullanımı. *Güncel Gastroenteroloji*, 21(1), 14-17.
- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of molecular biology*, 219(1), 37-44.
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein expression and purification*, 41(1), 207-234.
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology*, 189(1), 113-130.

- Studier, F. W., Daegelen, P., Lenski, R. E., Maslov, S., & Kim, J. F. (2009). Understanding the differences between genome sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21 (DE3) and comparison of the E. coli B and K-12 genomes. *Journal of molecular biology*, 394(4), 653-680.
- Summers, D. (2009). *The biology of plasmids*. John Wiley & Sons.
- Taanman, J.-W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1410(2), 103-123.
- Tejwani, V., Andersen, M. R., Nam, J. H., & Sharfstein, S. T. (2018). Glycoengineering in CHO cells: advances in systems biology. *Biotechnology journal*, 13(3), 1700234.
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 60, 523-533.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72, 211-222.
- Tropea, J. E., Cherry, S., & Waugh, D. S. (2009). Expression and purification of soluble His 6-tagged TEV protease. *High throughput protein expression and purification: methods and protocols*, 297-307.

- Van Den Ent, F., & Löwe, J. (2006). RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 67(1), 67-74.
- Voss, I., & Steinbüchel, A. (2006). Application of a KDPG-aldolase gene-dependent addition system for enhanced production of cyanophycin in *Ralstonia eutropha* strain H16. *Metabolic engineering*, 8(1), 66-78.
- Waegeman, H., & Soetaert, W. (2011). Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(12), 1891-1910.
- Walsh, G. (2010). Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug discovery today*, 15(17-18), 773-780.
- Wang, H., Wang, F., Wang, W., Yao, X., Wei, D., Cheng, H., & Deng, Z. (2014). Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach. *PloS one*, 9(11), e112777.
- Wang, Q., Yin, B., Chung, C.-Y., & Betenbaugh, M. J. (2017). Glycoengineering of CHO cells to improve product quality. *Heterologous Protein Production in CHO Cells: Methods and Protocols*, 25-44.
- Wanner, B. L., Kodaira, R., & Neidhardt, F. C. (1978). Regulation of lac operon expression: reappraisal of the theory of catabolite repression. *Journal of bacteriology*, 136(3), 947-954.
- Wanscher, A. S. M., Williamson, M., Ebersole, T. W., Streicher, W., Wikström, M., & Cazzamali, G. (2015). Production of

- functional human insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) using recombinant expression in HEK293 cells. *Protein expression and purification*, 108, 97-105.
- Waugh, D. S. (2011). An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein expression and purification*, 80(2), 283-293.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.-A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., & Baker, S. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *nature*, 415(6874), 871-880.
- Wu, J., & Filutowicz, M. (1999). Hexahistidine (His6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. *Acta Biochimica Polonica*, 46(3), 591-599.
- Yoon, S. H., Jeong, H., Kwon, S.-K., & Kim, J. F. (2009). Genomics, biological features, and biotechnological applications of *Escherichia coli* B: "Is B for better?!". *Systems biology and biotechnology of Escherichia coli*, 1-17.
- Zajac, B., West, D., McAleer, W., & Scolnick, E. (1986). Overview of clinical studies with hepatitis B vaccine made by recombinant DNA. *Journal of Infection*, 13, 39-45.
- Zhang, C., Wei, Z. H., & Ye, B. C. (2013). Imaging and tracing of intracellular metabolites utilizing genetically encoded fluorescent biosensors. *Biotechnology journal*, 8(11), 1280-1291.
- Zhang, Z., Liu, D., Yu, Z., Xiao, Z., Zhou, K., & Li, B. (2024). Gaucher Disease Coexisting with Cytomegalovirus Infection: A Rare

Presentation in an Infant. *The American Journal of Case Reports*, 25, e943398-943391.

Zielenkiewicz, U., & Cegłowski, P. (2001). Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems. *Acta Biochimica Polonica*, 48(4), 1003-1023.

REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ VE KULLANIM ALANLARI

