



# Proteinlerin tarihsel kullanım geçmişi

- Üretim süreçlerinde proteinlerin kullanımı oldukça eskiye dayanmaktadır.
- Fermentasyon süreçlerinde (bira, şarap v.b. yapımı) enzimatik reaksiyonların önemi büyüktür.
- Bakteriler sayesinde gerçekleştirilen peynir yapımı için de enzimler gereklidir.



# Proteinlerin tarihsel kullanım geçmişi

- Rekombinant DNA teknolojisi 1970'li yıllarda ortaya konulmuştur.
- Her ne kadar proteinlerin üretimsel süreçlerdeki önemleri bilinse de, bu tarihe kadar onlar hakkında detaylı bilgilere ulaşılammıştır.

# Enzimler

- Biyoteknolojik uygulamaların birçoğu, gücünü, enzimler adı verilen proteinlerden almaktadır.
- Amilaz, proteaz ve lipazlar gibi enzimler, çeşitli endüstrilerde yiyecek ve içecek üretiminde kullanılmaktadır.
- Biyoteknolojik proteinlerin kullanıldığı endüstriyel alanlara göz atmakta fayda vardır.

# Hormonlar-Antikorlar

- Kimyasal mesaj taşıyıcıları olan hormonlar ile organizmayı hastalıklara karşı koruyan antikorlar, proteinler önemli iki grubudur.
- Başta tıp ve tarım olmak üzere çeşitli endüstriyel sektörlerde bu proteinlere sıklıkla ihtiyaç duyulmaktadır.

# Biyoteknolojik ilaç üretimi

- Piyasada yaygın olarak bulunan diğer pek çok ilaçtan farklı olarak biyoteknolojik ilaçlar sentetik değildir.
- Bu ilaçlar mikrobiyal fermentasyon ya da memeli hücre kültürleri yoluyla üretilir.
- Bugün üretim hattında çok sayıda aday biyoteknolojik ilaç bulunmaktadır.
- Bunların tamamı testlerden başarı ile geçerse, şu ana kadar kullanılanlara yenileri eklenmiş olacaktır.

# Biyoteknolojik ilaç üretim aşamaları

- Biyoteknolojik ilaç üretimi zaman gerektiren bir süreçtir.
- Araştırmacılar hedef proteini ve bu proteini kodlayan genin sekansını tespit etmekle işe başlarlar.
- Daha sonra ilgili genden protein üretimi için uygun bir metot tasarlanır.

# Biyoteknolojik ilaç üretim aşamaları

- Teknisyenler, büyük ölçekli kültür sistemleri kullanarak hedef genle transforme edilmiş konak hücreler yoluyla üretime geçerler.
- Kültür koşulları her aşamada sıkıca kontrol edilir.
- Daha sonra hedef protein kültür ortamından izole edilerek saflaştırılır.



# Biyoteknolojik ilaç üretim aşamaları

- Saflaştırma işleminin ardından ürün, farmakolojik açıdan aktif hale getirilir.
- Amerikan Besin ve İlaç Dairesinin (FDA) ortaya koyduğu kriterlere uymak amacıyla süreçlerin tamamı üretim teknisyenleri tarafından denetlenir.



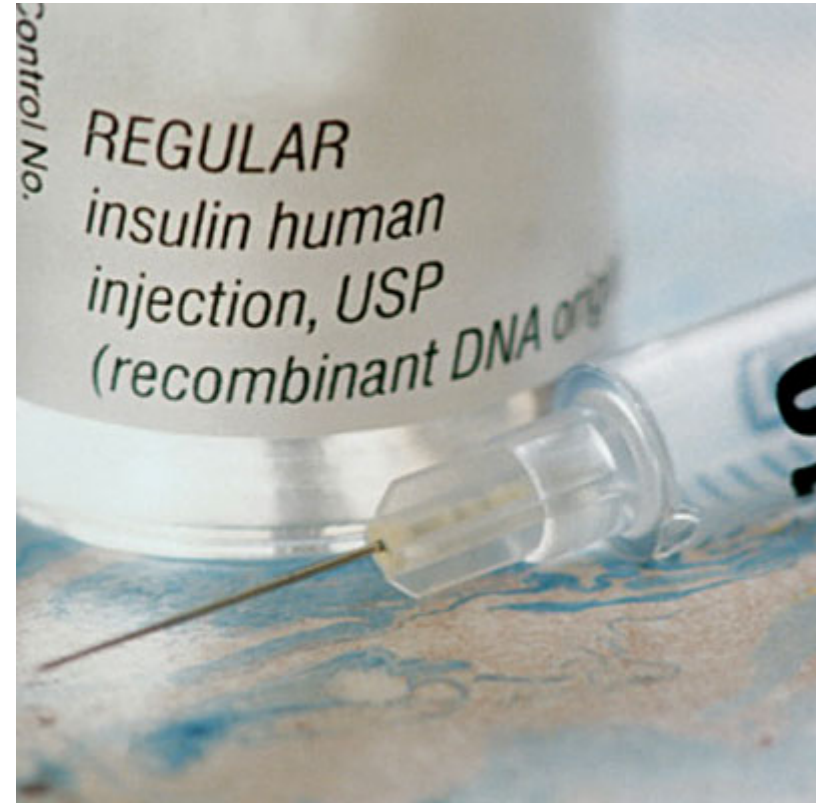
# Tıbbi uygulamalar

- Son yıllarda biyoteknolojik proteinler sayesinde farmasötik endüstrisinde önemli başarılar elde edilmiştir.
- Diyabet gibi pek çok hastalık, eksik proteinin yerine konulması ile çözülebilmektedir.



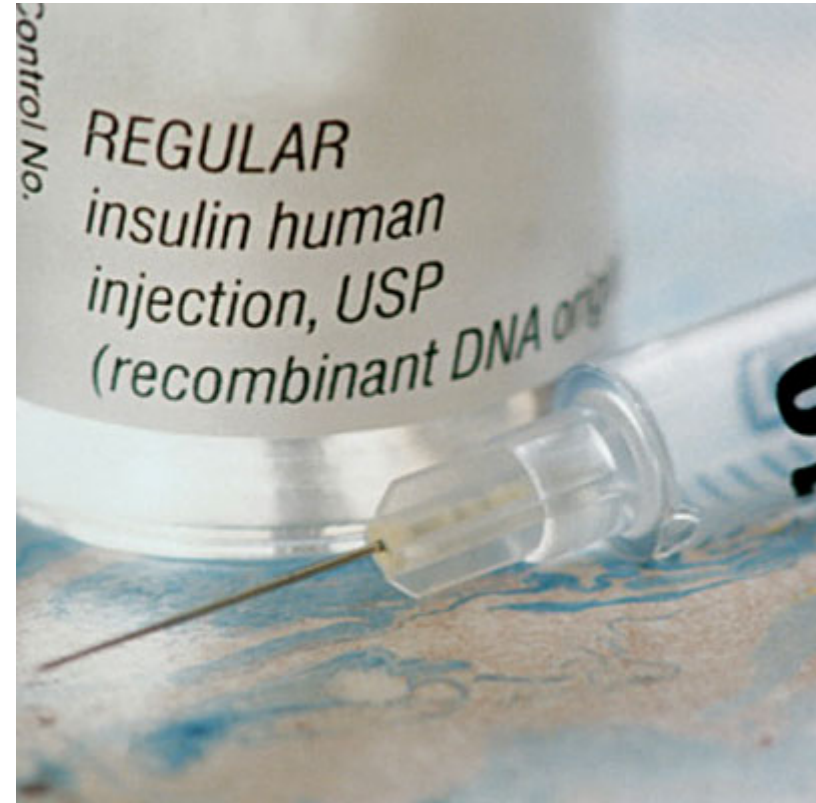
# Tıbbi uygulamalar

- Önceleri insülin, sığır ve domuz pankreasından çok az miktarlarda elde edilebiliyordu.
- Ayrıca sıklıkla bağışıklık sistemi yanıtlarına yol açıyordu.



# Tıbbi uygulamalar

- Araştırmacılar insan insülin genini E. coli'ye yerleştirerek bu soruna çözüm buldular.
- FDA ilk rekombinant DNA ilacı olan insülinin üretimine 1982 yılında onay vermiştir.



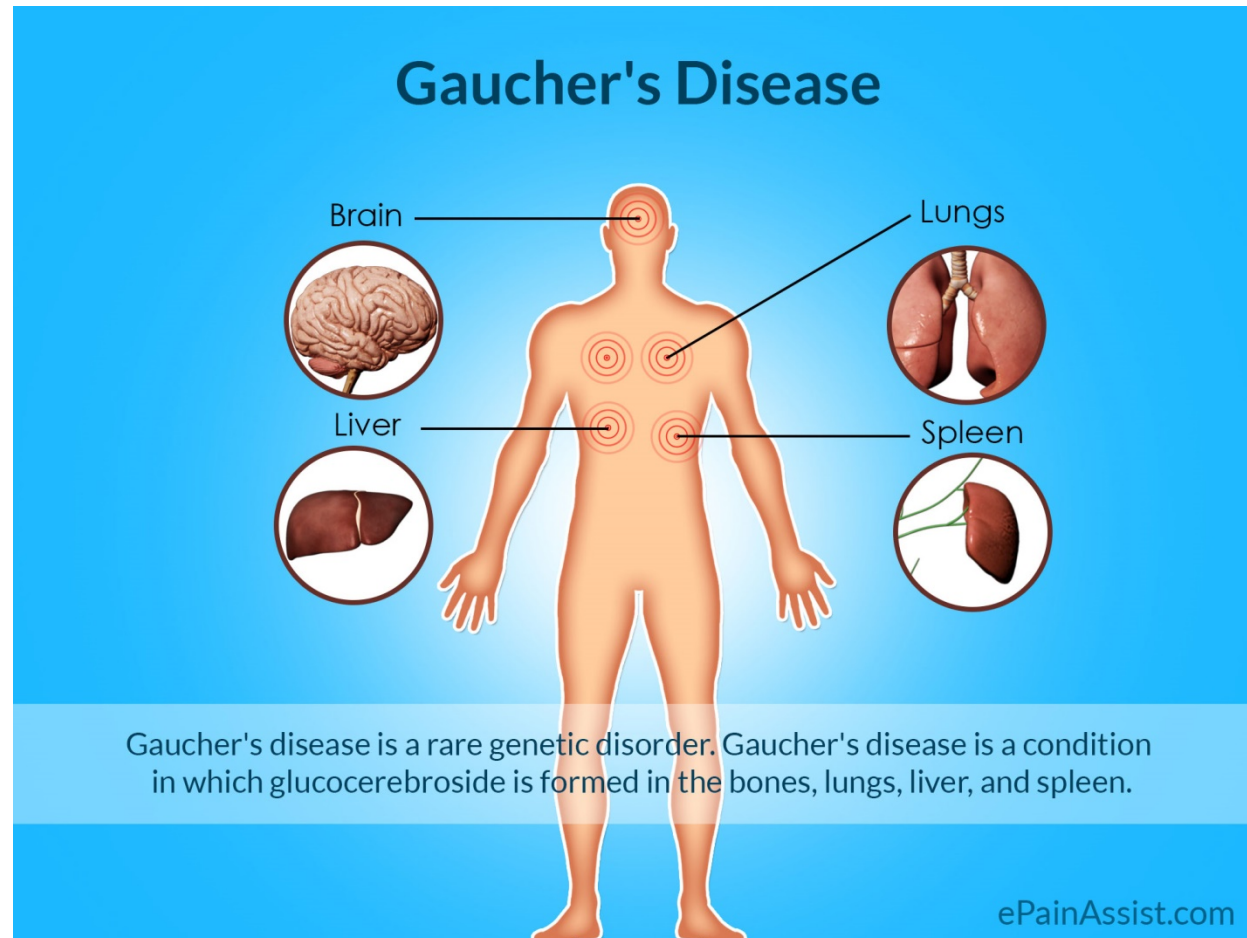
# Protein bazlı farmasötik ürünlerden bazıları

Eritropoietinler	Anemi
İnterlökinler	Kanser, AIDS, radyasyon veya ilaçla indüklenmiş kemik iliği baskılanması
Monoklonal antikolarlar	Kanser, romatizma
İnterferonlar	Kanser, allerji, astım, artrit, enfeksiyon hastalıkları
Koloni uyarıcı faktörler	Kanser, kan hücre sayısı düşüklüğü, kemoterapi, AIDS
Kan pıhtılaşma faktörleri	Hemofili ve benzeri pıhtılaşma bozuklukları
İnsan büyüme faktörü	Çocuklarda gelişme geriliği
Epidermal büyüme faktörü	Yara, cilt ülserleri ve kanser
İnsülin	Diyabet
İnsülin benzeri büyüme faktörü	Tip-II diyabet
Doku plazminojen faktörü	Kalp krizi
Tümör nekroz faktörü	Kanser
Aşılar	Hepatit B, sıtma, uçuk

# Gaucher hastalığı

- Ender görülen bu hastalıkta tek bir mutasyon sonucunda beyin dahil pek çok organda yağ birikimi olur.
- Tedavi edilmez ise ölümcüldür.
- Tedavi amacıyla kullanılacak enzimin yaşa boyu alınması çok pahalıdır.

# Gaucher hastalığı



# Gaucher hastalığı

- İnsan plasentası bu enzimin tek kaynağıdır.
- Tek bir doz enzim uygulaması için 400-2000 arasında plaseenta gereklidir.
- Ancak biyoteknoloji sayesinde bu gen, tütün bitkisinde ifade edilebilmektedir.





# Biyoteknolojik enzimlerin kullanım alanları

- Biyoteknoloji ürünü enzimler pek çok alanda kullanılmaktadır:
  - Daha kaliteli deterjanların yapımı,
  - Petrol çıkarılması sırasında akış hızının artırılması
  - Kontakt lenslerin temizlenmesi v.b.

## Bazı enzimler ve endüstriyel uygulamaları

Amilazlar	Fermentasyon sürecinde nişastanın parçalanması
Proteazlar	Deterjan yapımında proteinlerin sindirilmesi, et, deri, peynir, mayalama, pişirme süreçleri
Lipazlar	Süt üretiminde ve sebze yağı ürünlerinde lipitlerin sindirilmesi
Pektinazlar	Meyve suyu ve lapalarda pektinlerin sindirilmesi
Laktazlar	Süt şekerinin sindirilmesi
Glokoz izomeraz	Yüksek fruktoz şuruplarının yapımı
Sellülazlar/Hemisellülazlar	Hayvan besini, meyve suları ve mayalayıcı ajanların üretimi
Penisilin asiklaz	Penisilin üretimi

# Besin endüstrisi

- Biyoteknolojik enzimlerin besin endüstrisinde kullanıldığına dair pek çok örnek sunmak mümkündür.
- Ekmeğin daha iyi mayalanmasını, yoğurdun kaymağının daha kıvamlı olmasını, içeceklerin yarı ömrünün daha uzun olmasını ve dondurmanın daha pürüzsüz olmasını sağlayan bu enzimlerdir.

# Tekstil ve deri endüstrisi

- Enzimler, kumaşları daha parlak ve daha yumuşak yapabilmek için uygulanan kimyasalları uzaklaştırmada kullanılmaktadır.
- Enzimatik çamaşır sularının kullanımı, klasik çamaşır sularının kullanımını azaltmakta ve çevresel zarar en aza indirilmektedir.

# Tekstil ve deri endüstrisi

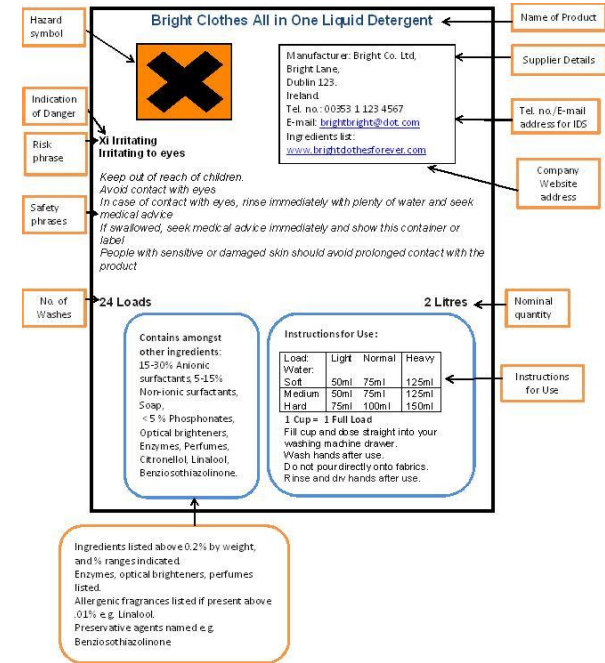
- Gardrobunuzdaki yünlü elbiseler de enzimatik reaksiyonlardan geçirilmişlerdir.
- Yünün temizlenmesi amacıyla uygulanan kimyasalların uzaklaştırılması da yine enzimlerce gerçekleştirilir.
- Kullandığınız deri ceket, ayakkabı ya da kemer dahi muhtemelen enzimatik süreçlerden geçirilmiştir.

# Tekstil ve deri endüstrisi

- Ham deri üzerinden saç ve kıl kalıntılarının uzaklaştırılabilmesi ve işlenebilecek yumuşaklığa getirilmesi için enzimler kullanılır.
- Bir başka biyoteknolojik ürün olan elyaf fiber günümüzde arabalarda gürültü azaltıcı panellerin yapımında kullanılmaktadır.
- Yakın gelecekte arabanızda kullanılan hava filtrelerinin enzimatik süreçlerden geçirilmiş fiberlerden yapılması muhtemeldir.

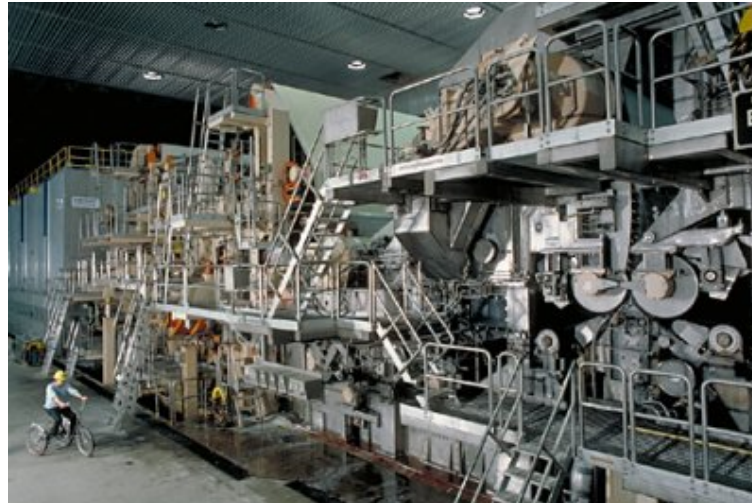
# Deterjanlar

- Deterjanlara enzimatik solüsyonların eklenmesi onların temizleme gücünü daha da artırmaktadır.
- Proteaz, lipaz ve amilaz katkıları ile soğuk suda leke çıkarma güçleri artırılabilir.
- Deterjan ambalajlarına göz gezdirecek olursanız, kullanılan enzimlerin bir listesini görebilirsiniz.



# Kağıt üretimi ve geri dönüşüm

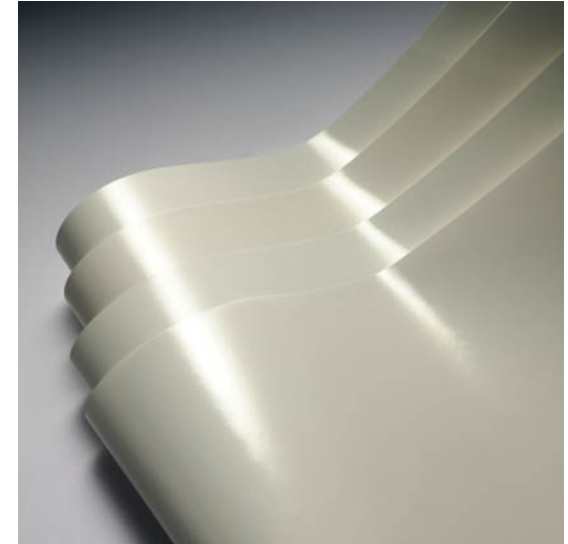
- Kağıt makinalarının hareketli parçaları üzerinde biriken sellüloz kalıntıları temizlenmez ise üretim verimi düşer.
- Ancak protein bazlı ürünlerin kullanımı ile makinaların aksamadan çalışması sağlanır.





# Kağıt üretimi ve geri dönüşüm

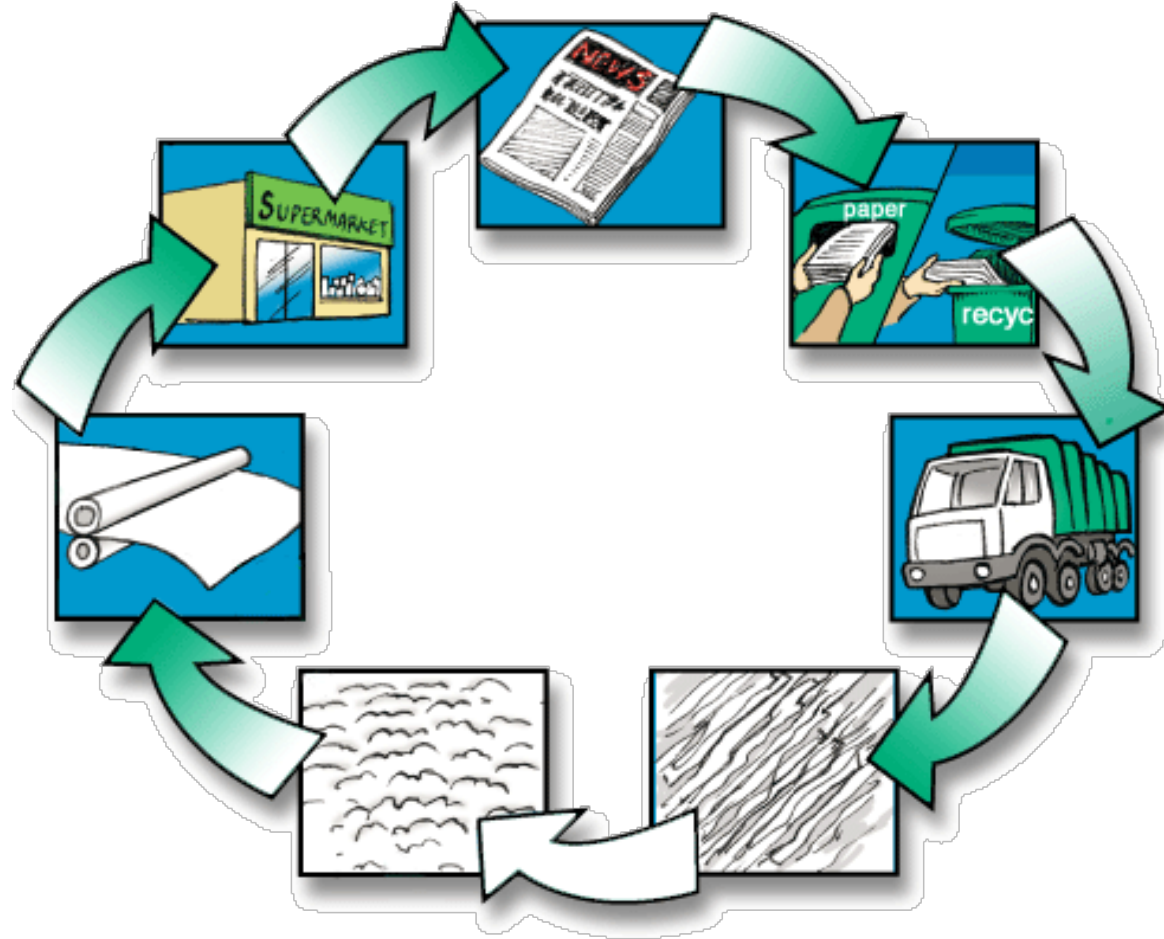
- Geçmiş yıllarda üretilen kağıdın parlaklaştırılması için (kuşe kağıt), klorin bazlı çamaşır suları kullanılmakta idi.
- Günümüzde enzimler bu işi çevreye daha az zarar vererek yapabilmektedir.



# Kağıt üretimi ve geri dönüşüm

- Kağıtların geri dönüşümü konusunda da enzimlerden faydalanılmaktadır.
- Geri dönüşüm sırasında kağıtların mürekkepten arındırılması işlemi enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir.
- Böylelikle kağıdın maliyeti daha da aşağılara çekilebilmektedir.

# Kağıt üretimi ve geri dönüşüm



# Doğal yapıştırıcılar

- Daha önce hiç bir midyeyi tutunduğu kaya üzerinden koparmayı denediniz mi?
- Midyeyi kayaya yapıştıran, suya dayanıklı yapışkan proteinleridir.
- Çok sayıda doğal yapışkan protein, çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır.

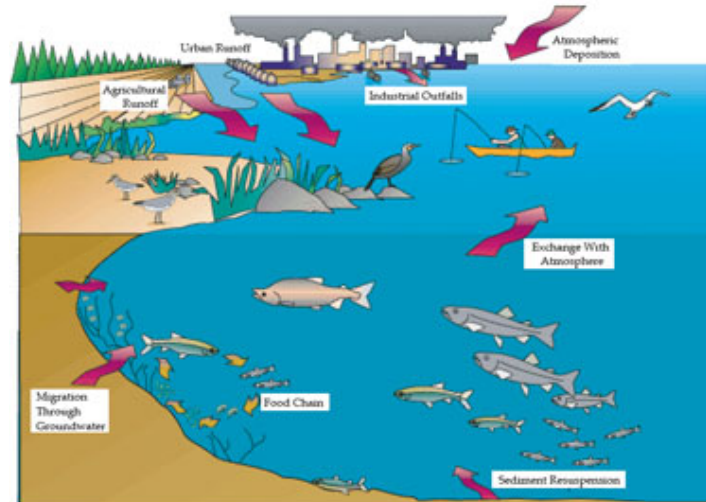


# Doğal yapıştırıcılar

- Bu doğal yapıştırıcılar toksik değildir, biyolojik olarak parçalanabilirler ve nadiren immün yanıt oluştururlar.
- Bu nedenle kopan tendon ve dokuların birbirine yeniden yapıştırılmasında, diş çürüklerinin doldurulmasında ve kırılan kemiklerin tedavisinde kullanılmaktadırlar.

# Proteinler ve biyoremediasyon (çevre kirliliği ile mücadele)

- Organik atıklar, sucul ekosistemler başta olmak üzere çevre için ciddi bir sorundur.
- Enzimler sayesinde organik atıklar doğaya bırakılmadan önce sindirime uğratılabilir.



# Proteinler ve biyoremediasyon (çevre kirliliği ile mücadele)

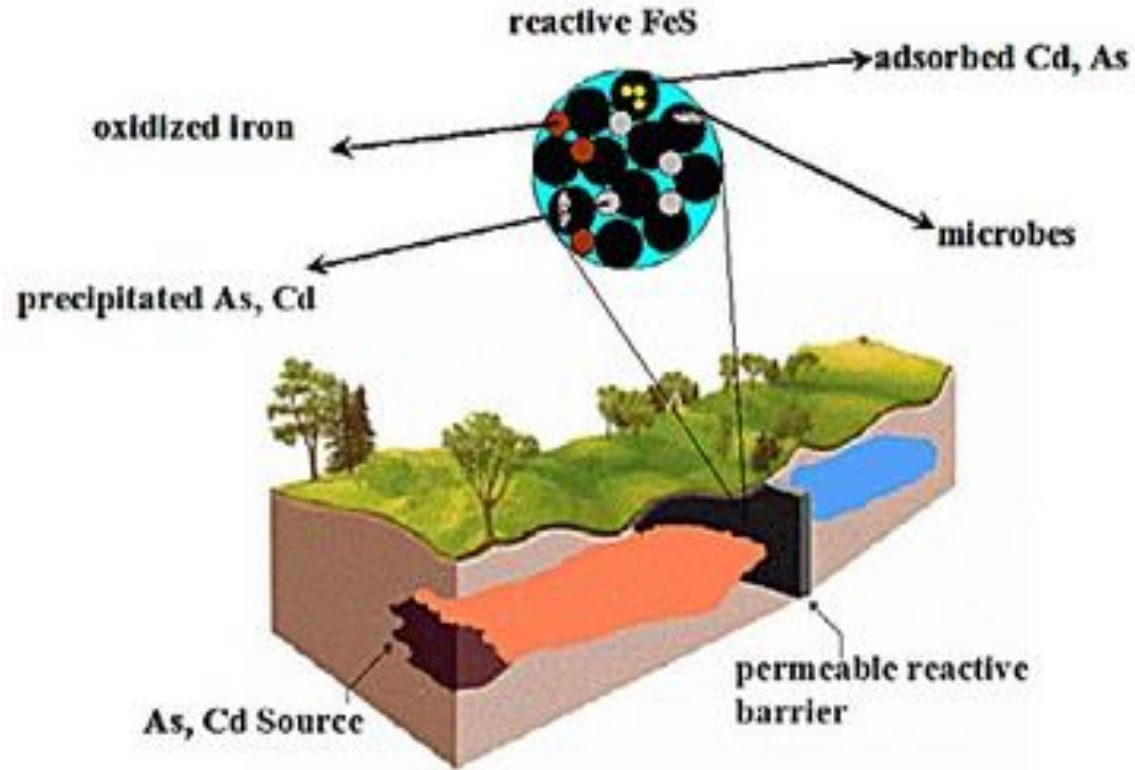
- Civa ve kadmiyum gibi ağır metaller, doğada uzun süre kalan ve besin zinciri yoluyla organizmalarda hasara yol açan maddelerdir.
- Bu metaller enzimatik yıkıma karşı da dayanıklısıdır.
- Biyomühendislik teknikleri sayesinde bu sorun aşılabılır.

# Proteinler ve biyoremediasyon (çevre kirliliği ile mücadele)

- Biyomühendislik yöntemleri ile yapışkan metallothionein kılıfa sahip mikroorganizmalar üretilir.
- Bu proteinler ağır metalleri üzerlerine bağlayabilmektedir.
- Bu yöntemde toksik metaller parçalanamazlar, ancak bakterilere bağlandıklarında bitki ve hayvanlar için daha az zarara yol açarlar.



# Proteinler ve biyoremediasyon (çevre kirliliği ile mücadele)



# Protein üretimi

- Proteinlerin biyoteknolojik yöntemlerle üretimi sırasında iki temel aşama gerçekleştirilmektedir.
  - Upstream processing: Proteinin hücre içinde ifade edilmesi.
  - Downstream processing: Proteinin diğer hücresel parçalardan ayrılması ve diğer proteinlerden izole edilmesi.

# Upstream processing

- Bu işlemde ilk adım protein kaynağı olarak kullanılacak hücrenin seçilmesidir:
  - Mikroorganizmalar
  - Funguslar
  - Bitki hücreleri
  - Hayvan hücreleri

# Mikroorganizmalar

- Mikroorganizmaların protein kaynağı olarak seçilmelerinin bazı nedenleri vardır.
  - Mikroorganizmaların fermantasyon süreçleri oldukça iyi bilinmektedir.
  - Mikroorganizmalar kültürde kısa zamanda büyük miktarlarda yetiştirilebilmektedir. Endüstriyel uygulamalarda bu özellikle önemlidir.
  - Genetik olarak manüple edilmeleri daha kolaydır.

# Mikroorganizmalar

- Üretilen mikrobiyal proteinin miktarını artırmak için çeşitli rekombinant DNA teknikleri geliştirilmiştir:
  - İlgili genin konak hücreye ilave kopyalarının yerleştirilmesi
  - İlgili genin konak hücrede daha etkili bir promotörün altına yerleştirilmesi v.b.

# Mikroorganizmalar

- Bazı durumlarda yabancı gen, *E. coli* genomundaki bir gene eklenebilir.
- Bu durumda bakteri, hedef proteini, kendi geninin ürünü ile füzyon (birleşik) halde üretecektir.
- Bu durumdaki bakteriyel protein genelde bir enzimdir ve saflaştırma kolonunda substrata tutundurularak hücreden izole edilebilir.

# Mikroorganizmalar

- *E. coli* tarafından sentezlenen proteinlerin büyük bir kısmı hücre içi birikim gösterir.
- Bu proteinler çoğu durumda hücre içinde, suda çözünmeyen inklüzyon cisimcikleri halinde bulunur.
- Bu nedenle bu proteinler, kullanılmadan önce diğer hücre proteinlerinden saflaştırılmalıdır.



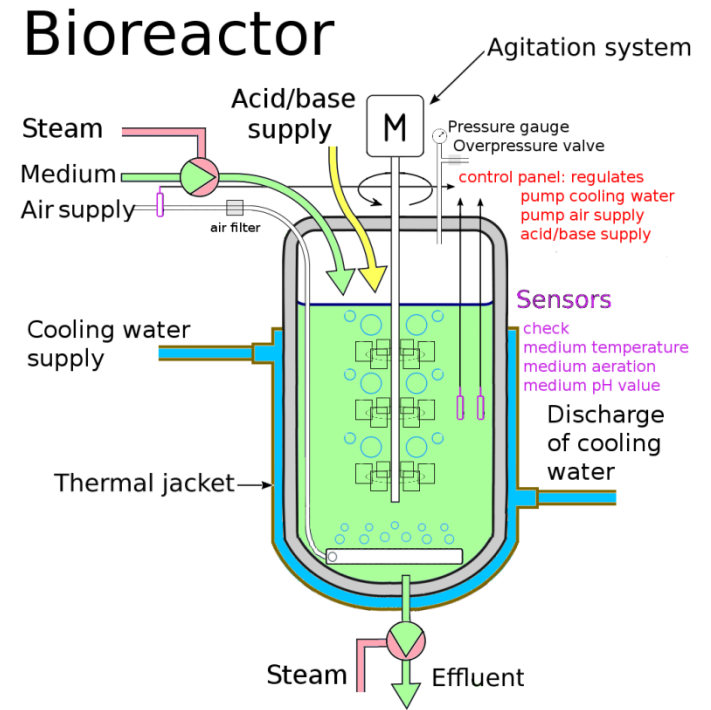
# Sınırlamalar

- Mikroorganizmalarla protein üretimine ilişkin bazı sınırlamalar vardır.
- Prokaryotlar, ökaryotların gerçekleştirdiği bazı ilave süreçleri gerçekleştiremezler (örn; sentez sonrası glikozilasyon).
- Bu tarz gereksinimleri olan proteinler yalnızca ökaryotik organizmalarla üretilir.



# Biyoreaktörler

- Genetik değişikliğe uğratılmış mikroorganizmalar daha geniş ölçekli biyoreaktörlerde üretilebilir.
- Biyoreaktörlerde kültür şartları bilgisayarlar tarafından kontrol edilir (oksijen seviyesi, sıcaklık v.b.).



# Funguslar

- Benzersiz proteinlerin kaynağı olmalarının yanı sıra funguslar aynı zamanda biyoteknolojik proteinlerin üretiminde de kullanılmaktadırlar.
- Bakterilere göre fungusların kullanımı bazı avantajlar sağlamaktadır.
- Bu ökaryotik canlılar translasyon sonrası modifikasyonları başarı ile gerçekleştirebilmektedirler.

## Bazı rekombinant fungus proteinleri

İnterferonu	<i>Aspergillus niger, A. nidulans</i>
Laktoferrin	<i>A. oryzae, A. niger</i>
Aspartik proteinaz	<i>A. oryzae</i>
Trigliserid lipaz	<i>A. oryzae</i>

# Bitkiler

- Bitkiler, doğal bileşiklerin en yaygın kaynaklarıdır.
- Günümüzde kullanılan ilaçların % 85'ini bitkisel kaynaklarda bulmak mümkündür.
- Endüstriyel ölçekte üretilen bitkisel kaynaklı proteinlere en iyi örnek proteolitik bir enzim olan papain'dir.



# Papain

- Papain (bitkisel pepsin), bir çeşit proteazdır ve et yumuşatıcı ajan olarak kullanılır.
- Papain, bağ dokuda bulunan kollajenleri ve eti sertleştiren kan damarlarını sindirir.



# Tütün bitkisi

- Bitkiler genetik açıdan modifiye edilerek istenilen proteini üretir hale getirilebilir.
- Genetiđi deđiřtirilmiř ilk bitki tütün bitkisidir.
- Bu bitkiden yaklaşık 1 milyon tohum elde edilmektedir.



# Tütün bitkisi

- Aslına bakılırsa için en zor kısmı genetik materyalin bitki hücrelerine aktarılmasıdır.
- Bu engel aşıldığında 1 milyon yeni bitkisel protein fabrikası tarlaları doldurur.



## Bitkisel protein üretiminin dezavantajları

- Tüm proteinler bitkilerde ifade edilemezler.
- Bitki hücreleri hücre duvarına sahiptir ve bu yapı proteinlerin bu hücrelerden izole edilmelerini zorlaştırır.
- Her ne kadar bitki hücreleri sentezlenen proteinleri uygun şekilde glikozile etse de, bazı durumlarda bu olay hayvan hücrelerinden farklıdır.



# Memeli hücre sistemleri

- Hayvansal hücrelerle proteinlerin kültür ortamında üretilmesi de mümkündür.
- Ancak bu hücrelerin yaşamsal gereksinimleri mikrobiyal hücrelerden daha karmaşıktır.



# Memeli hücre sistemleri

- Hayvansal hücreler ayrıca daha yavaş gelişme gösterirler.
- Bu nedenle bu kültür sistemlerinde kontaminasyon riski daha yüksektir.
- Ancak yine de spesifik bazı proteinler söz konusu olduğunda hayvansal hücreler en iyisidir.

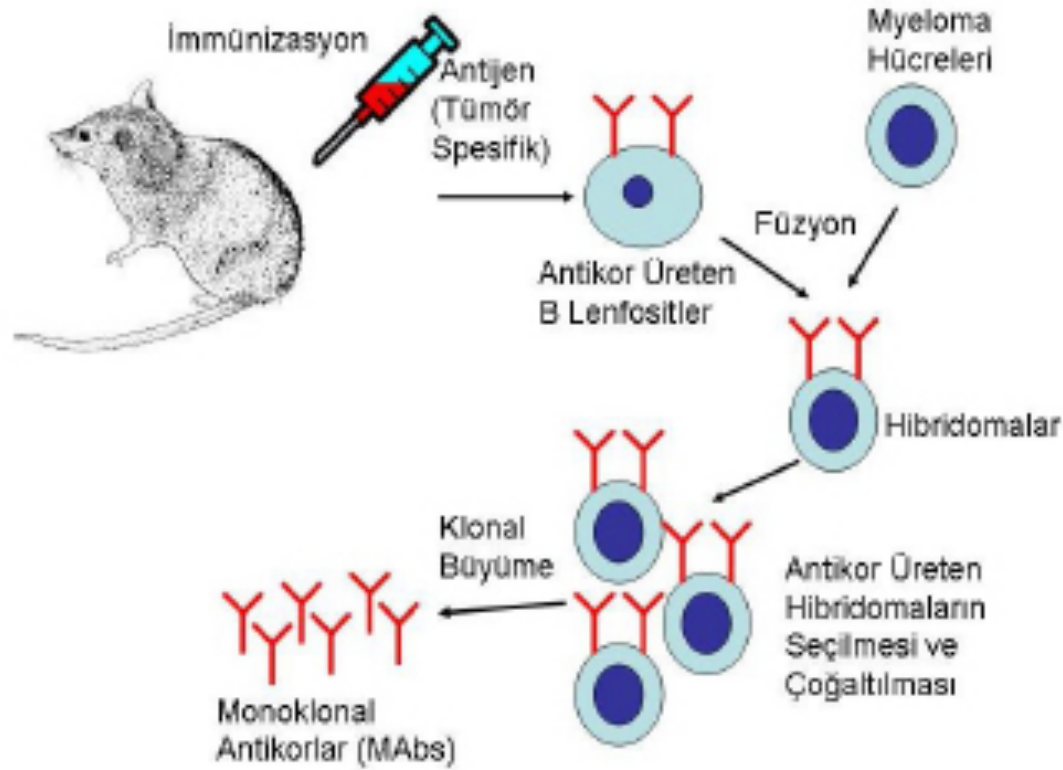
# Organizma temelinde hayvansal üretim sistemleri

- Kültürdeki hücreler protein üretimi için tek seçenek değildir.
- Bazı durumlarda canlı organizmanın kendisi hedef proteini üretmek için kullanılabilir.

# Monoklonal antikor üretimi

- Monoklonal antikorlar, yalnızca tek bir hedefe reaksiyon gösteren çok değerli proteinlerdir.
- Hedef antikorun üretilebilmesi için, o antikora özgül antijen fareye enjekte edilerek üretim sağlanır.
- Daha sonra da fare tarafından sentezlenen antikorlar izole edilir.

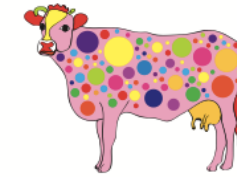
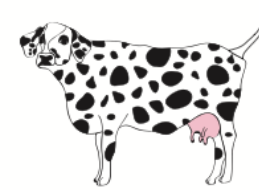
# Monoklonal antikor üretimi



**Şekil 1.** Monoklonal Antikorların Elde Edilme Metodolojisi

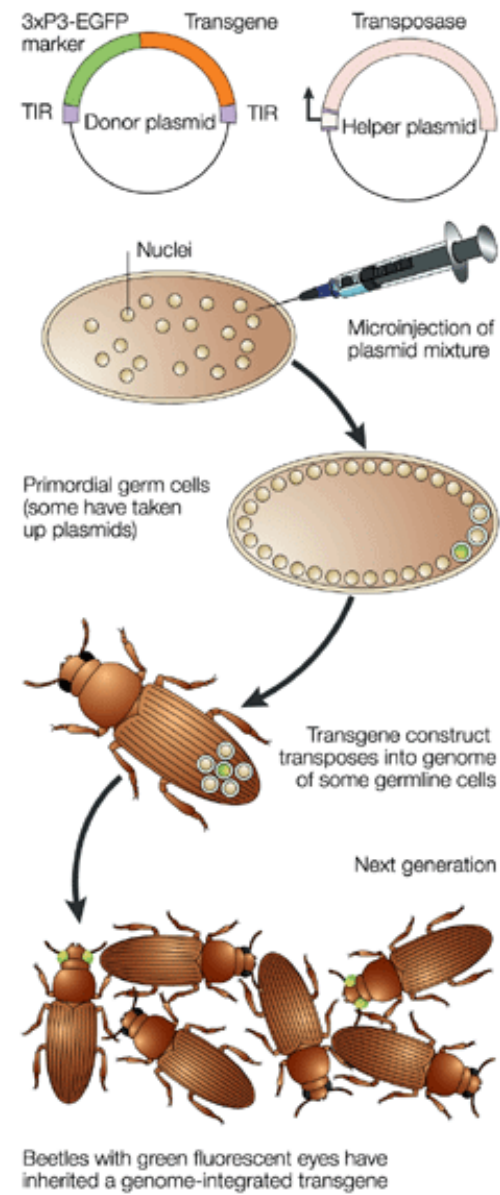
# Yumurta ya da süt proteinleri

- Bazı durumlarda da hedef proteinin, konak organizma tarafından süt ya da yumurta içerisine salgılanması sağlanır.
- Bunun için hedef gen klonlanarak ilgili organizmaya aktarılır.
- Böylesi transgenik hayvanlar görünüş ve davranış açısından hemcinslerinden pek farklılık göstermezler.



# Böcek sistemleri

- Böcekler de biyoteknolojik proteinlerin üretimi için bir başka seçenektir.
- Böcek larvalarına yabancı DNA'nın aktarılabilmesi için baculovirüs'ler kullanılmaktadır.
- Ancak bazı durumlarda böceklerdeki translasyon sonrası modifikasyonlar da insanlardakinden farklıdır.





# Protein saflaştırma teknikleri

- Proteinin üretiminin ardından “downstream processing” süreci başlar.
- İlk olarak protein hasat edilmelidir.
- Protein hücre içi ise tüm hücre hasat edilir.
- Eğer hücre dışı ise ortama salınan protein toplanmalıdır.

# Protein saflaştırma teknikleri

- Protein ortamdan toplandıktan sonra diğer biyolojik moleküllerden arındırılmak zorundadır.
- Saflık göreceli bir kavramdır.
- FDA kriterlerine göre saflık % 99.99'luk bir ölçüyü gerektirir.

# Protein saflaştırma teknikleri

- Protein saflaştırma metotları hiyerarşik bir sıra izlenerek uygulanmalıdır:
  - Özütün saflaştırma için hazırlanması
  - Solüsyondaki proteinlerin stabil (kararlı) hale getirilmesi
  - Özüt içerisindeki bileşenlerin ayrılması

## Özüt içerisindeki bileşenlerin ayrılması

- Hücresel aktivite sonucunda üretilen maddeler yalnızca proteinler değildir.
- Lipitler, karbohidratlar, nükleik asitler ve diğer proteinler, hedef protein ile karışım halinde bulunur.
- Moleküller arasındaki fizikokimyasal farklılıklar, onların ayrılmalarını olanaklı kılar.

# Özüt içerisindeki bileşenlerin ayrılması

- Proteinlerin çöktürülmesi
- Filtrasyona dayalı ayırım metotları
  - Santrifüjleme
  - Membran filtrasyonu
  - Mikrofiltrasyon
  - Ultrafiltrasyon
  - Diyaliz

# Kromatografi

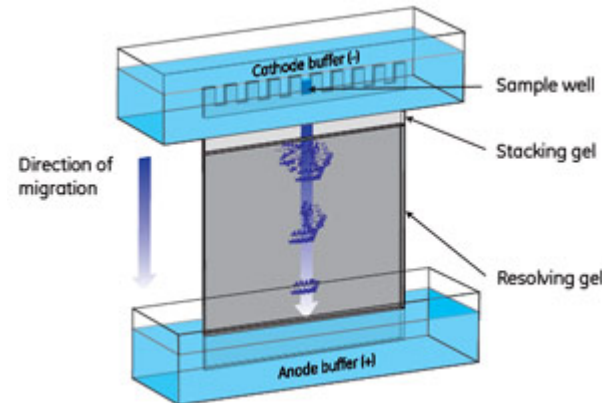
- İyon değişim kromatografisi
- Affinite kromatografisi
- Hidrofobik etkileşim kromatografisi
- İzoelektrik odaklama
- İki boyutlu elektroforez

# Analitik metotlar

- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)
- Kütle spektrometresi

# Doğrulama yöntemleri

- Saflaştırmanın her basamağında hedef proteinin kaybolmadığını ve derişiminin artırıldığını doğrulamak gerekir.
- Bunun için en sık başvurulan yöntem, poliakrilamid jel elektroforezidir (SDS-PAGE).





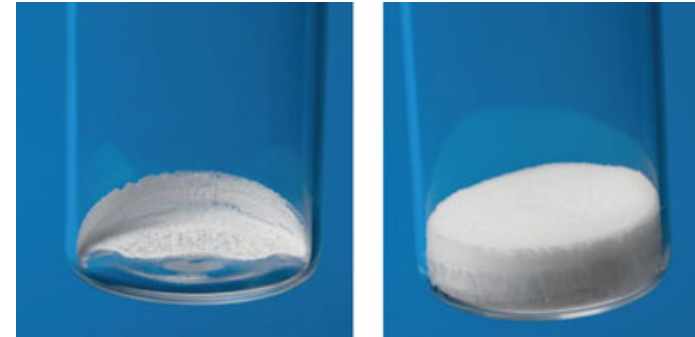
# Proteinin saklanması

- Hedef protein, saflaştırıldıktan sonra kullanıma sunulana kadar aktivite kaybı olmaksızın saklanmalıdır.
- Bunun için en sık kullanılan yöntem liyofilizasyondur.



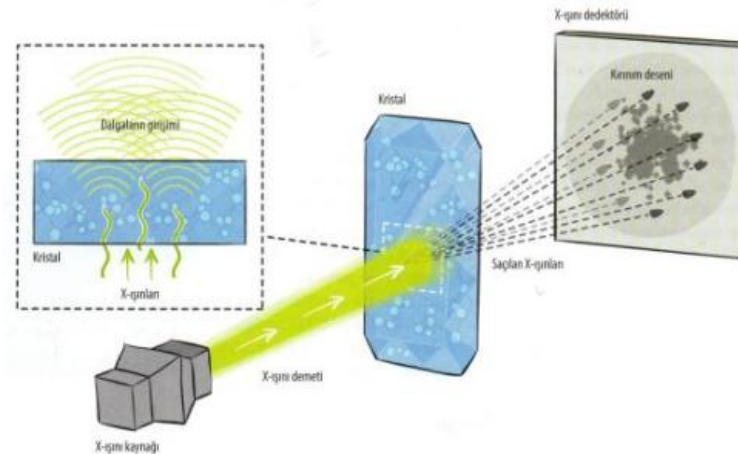
# Proteinin saklanması

- Genellikle bir solüsyon içerisinde sıvı halde bulunan protein, öncelikle dondurulur.
- Daha sonra yakum altında, buz kristalleri, erimelerine izin verilmeden uzaklaştırılır.
- Geriye toz halde protein kalır.



# Saflaştırma sonrası analiz metotları

- Araştırma süreci boyunca saflaştırılan proteini sürekli kontrol etmek gerekir.
- Bunun için başvurulan yöntemler genelde protein sekansının çıkarılması ve X-ışını kristalografisidir.



# Proteomik

- Birçok hastalık, protein ifadesindeki aksaklıklar sonucunda ortaya çıkar.
- Ancak tüm hastalıklar basit genetik mutasyonlara dayanarak açıklanamaz.

# Proteomik

- Proteinler, translasyon sonrası değişimler geçirdiği için, “puzzle”, tahmin edilenden daha karmaşıktır.
- Yeni bir bilim alanı olan ‘proteomics’, hastalıklar ve proteinler arasındaki kompleks ilişkiyi açığa çıkarmaya çalışmaktadır.

