

Escherichia coli'de Yenibileşenli İnterferon beta Salgılanmasında Sinyal Peptidi Kullanımı Üzerine bir Derleme

Mehmet ÖZTÜRK^{1*}, Yakup ERMURAT²

¹Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, BOLU
²Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Kimya Mühendisliği, BOLU
ozturk_m1@ibu.edu.tr

Öz: Rekombinant interferon beta (rIFN-β) proteini çeşitlerinden rIFN-β1a ve rIFN-β1b üretimi için benzer süreçler ile ökaryotik ve prokaryotik ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. Ökaryotik ekspresyon sistemleri ile üretilen rIFN-β1a'nın saflaştırılmasında zorlukların yaşanması ve biyolojik aktivitesinin etkilenmesi bu süreçler ile rekombinant protein üretimini güçleştirmektedir. Prokaryotik ekspresyon sistemlerinin kullanıldığı rIFN-β1b üretiminde ise saflaştırma ve aktivite sorunlarının daha az gerçekleştiği belirlenmiştir. Prokaryotik bakterilerden *Escherichia coli*'de bulunan ürün salgılama özelliğinin daha iyi kullanılması, bu sistemin rIFN-β1b üretiminde daha fazla tercih edileceğini göstermektedir. Rekombinant proteinlerin üretildikleri konakçı hücreden dışarı salgılatılacak şekilde yapı tasarlanması durumunda, saflaştırma sırasında *E. coli* konakçı hücreler parçalanmayacağından ürün saflaştırma işlemlerini kolaylaştıracağı öngörülmektedir. Tip I ve tip II salgılama sistemine sahip olan *E. coli*'nin rIFN-β1b proteinlerinin üretiminde kullanımı, bu konakçıda üretilen rIFN-β1b'nin hücre dışına salgılatılmasında saflaştırma ve aktivite sorunlarını azaltacağı, ayrıca rIFN-β1b'nin konakçı hücreye yapacağı toksik etkininde ortadan kalkacağı tahmin edilmektedir. Bu amaçla *E. coli* üretim sistemindeki dezavantajları gidermek için Sec sinyal peptidi olan PelB sinyal peptidine ilave olarak Tat tipi sinyal peptidi olan DmsA sinyal peptidi'nin pET22b ifade vektörüne aktarılmasıyla rIFN-β1b proteinlerinin hücre dışına salgılatılması işlemi gibi çeşitli yaklaşımlar tasarlanmaktadır. Bu derlemede, IFN'ların özelliklerine, rIFN-β'nin klinik uygulamalarına ve rIFN-β1b üretim yöntemleri ile ilgili yapılmış araştırmalara dayalı bilgi ve ve rIFN-β1b'nin *E. coli* konakçı hücrelerinde üretilmesi sürecinde sinyal peptidlerinin kullanımı ile ilgili bilgilere dikkat çekilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Rekombinant interferon beta salgılanması, sinyal peptidler, periplazmik protein

A Review on the Use of the Signal Peptide in Recombinant Interferon beta Secretion in *Escherichia coli*

Abstract: Eukaryotic and prokaryotic expression systems are used with similar processes for the production of rIFN-β1a and rIFN-β1b which are from the recombinant interferon beta (rIFN-β) protein varieties. The difficulties in purification of the produced rIFN-β1a by eukaryotic expression systems and the influence of its biological activity make recombinant protein production difficult with these processes. In the production of rIFN-β1b, where prokaryotic expression systems were used, purification and activity problems were found to be less frequent. Better use of product secretion capability in *Escherichia coli* from prokaryotic bacteria indicates that this system will be preferred in the production of rIFN-β1b. If the construct is designed to secrete recombinant proteins out of the host cell from which the recombinant proteins are produced, it is envisaged that the host cells will not fragment during purification, thereby facilitating product purification processes. The use of *E. coli* with type I and type II secretion in the production of rIFN-β1b proteins will reduce the purification and activity problems in the secretion of rIFN-β1b produced in this host, as well as the toxic effect of rIFN-β1b to the host cell is expected to diminish. To this end, various approaches are contemplated to overcome the disadvantages of the *E. coli* production system, such as transferring the DmsA signal peptide, the Tat-type signal peptide, to the expression vector pET22b, in addition to the PelB signal peptide, the Sec signal peptide. In this review, information about the properties of IFNs, the clinical applications of rIFN-β and the researches based on the investigations of rIFN-β1b production methods, and information about the use of signal peptides in the process of producing rIFN-β1b in *E. coli* host cells were highlighted.

Keywords: Recombinant interferon beta secretion, signal peptides, periplasmic protein

1. Giriş

Bu derleme çalışmasında rIFN- β 1b terapötik proteinin çeşitli sinyal peptidi kullanımı ile *E. coli*'de salgılatılması ile ilgili yapılmış olan çalışmaların önemini ortaya koyarak ülkemizdeki bilim insanlarının bu konuya dikkatlerini çekmek amaçlanmaktadır.

IFN'lar bağışıklık tepkisinin hayati düzenleyici araçları olarak hareket ederler ve çeşitli enfeksiyonlara karşı savunma mekanizmaları olarak kabul edilirler (Goodbourn ve ark., 2000; Smeekens ve ark., 2013). Bulaşıcı maddeler tarafından uyarıldıklarında bağışıklık sisteminin hücreleri de dâhil olmak üzere vücudun hemen her hücre tipi tarafından salgılanabilen IFN'lar ayrıca bazı tümör hücreleri tarafından da üretilebilirler (Chevaliez ve Pawlotsky, 2009; vanBeers ve ark., 2011). IFN'lar metabolizma, farklılaşma ve homeostaz üzerinde etkili olmaktadır (Stefan ve ark., 2009). IFN'lar konakçı mikroorganizmaların kullanıldığı sistemler ile rekombinant olarak üretilmektedirler. Rekombinant interferon beta (rIFN- β) türlerinden rIFN- β 1b, hepatit, genital kondilomata, artrit, multipl skleroz (MS) ve kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılan tedavi edici terapötik ilaçlardandır (Sorensen, 2003).

rIFN- β 'nın klinik uygulamaları göz önüne alındığında, bu terapötik proteinin verimli olarak üretilmesini sağlayan üretim

sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için, daha verimli üretim yöntemleri geliştirme girişimleri halen devam etmektedir.

Genel olarak, herhangi bir rekombinant protein üretimini etkileyen parametreler, kullanılan ekspresyon sisteminin seçilimi, rekombinant hücrelerin büyüme koşullarının belirlenmesi ve rekombinant proteinin saflaştırılma standartlarını oluşturma olarak belirlenmiştir. Ülkemizde kullanılan rekombinant proteinler ithalat yolu ile elde edilen ilaçlardır. Türkiye'de yüksek fiyatlarla ithal edilen rekombinant proteinlerin ruhsatlandırılmış yerli üretimi henüz gerçekleştirilememiştir.

Yapısal olarak IFN'lar sarmal sitokin grubundan olan dört-sarmal demet topolojisi gösterirler ve hematopoietik büyüme faktörü ailesine aittirler (Pestka ve ark., 1987; Pestka ve ark., 2004). Sitokinler, hücre ve hücrelerin kendi çevreleri arasındaki iletişim aracı olarak görev yapmak için salgılanan protein ailesidir. IFN'lar, kemokinler, lenfokinler, monokinler, interlökinler ve tümör nekroz faktörü şuna kadar bilinen sitokinlerdir (Chelbi-Alix ve Wietzerbin, 2007). Doğal glikoprotein olan IFN'lar vücutta enfeksiyonlara yanıt olarak üretilirler (Tayal ve Kalra, 2008). IFN'lar, aminoasit sekansları, fiziksel ve biyolojik özellikleri ve reseptör özgüllüğüne göre tip I, tip II ve tip III olmak üzere üç farklı alt

aileye ayrılmıştır. İnsanlarda tip I İFN'ları kodlayan genler 9. kromozomun p kolu üzerinde bulunmaktadır (Pestka ve ark., 2004). İFN-beta (İFN- β) (fibroblast interferon) ve İFN-omega (İFN- ω) sırasıyla 166 ve 172-174 aminoasit uzunluğunda polipeptidlerdir. Tip II İFN'lar ağırlıklı olarak bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilir ve "bağışıklık İFN'ları" olarak da ifade edilirler (Chevaliez ve Pawlotsky, 2009). Tip III İFN alt ailesi sadece bir üye, İFN-lambda (İFN- λ) içerir (Chevaliez ve Pawlotsky 2009). İFN- λ 'nın mukozal varlıkların korunması görevini yaptığı düşünülmektedir (Hermant ve Michaels, 2014). Faydalı özelliklerinden ötürü, tip I İFN'lar insanlardaki çeşitli terapötik uygulamalar arasına dâhil edilmiştir (Parker ve ark., 2016). Tip I İFN türünden olan insan İFN- β , tek bir gen tarafından kodlanır ve viral enfeksiyona tepki olarak vücuttaki birçok hücre tipi tarafından üretilir (Conradt ve ark., 1987; Randall ve Goodbourn, 2008).

rİFN'lar ökaryotik veya prokaryotik ekspresyon sistemleri kullanılarak üretilen protein ilaçlardır ve antiviral, antibakteriyel, antitümör, antiproliferatif, proapoptotik ve sitotoksik etki de dâhil olmak üzere geniş bir yelpazede yararlı etkileri olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, rİFN'lar çeşitli hastalıkların tedavisi için klinik olarak kullanılmaktadırlar (Parker ve ark., 2016).

rİFN- β protein ilaçları rİFN- β 1a ve rİFN- β 1b olmak üzere iki farklı formda

üretilmektedir. rİFN- β 1a, ökaryotik ekspresyon sistemleri kullanılarak üretilen ve doğal olarak oluşan rİFN- β 'ya özdeş aminoasit sekansı olan glikozillenmiş proteindir (Kagawa ve ark., 1988, Runkel ve ark., 1998). rİFN- β 1b ise prokaryotik ekspresyon sistemleri kullanılarak üretilen rİFN- β 'nın glikozillenmemiş şeklidir (Mark ve ark., 1984). rİFN- β 1b'nin biyolojik açıdan aktif olduğu ve glikozillenmiş muadiline benzer aktiviteler sergilediği gösterilmiştir (Dissing-Olesen ve ark., 2008).

rİFN- β 1a ve rİFN- β 1b, multiple skleroz (MS) tedavisinde kullanılmak üzere onaylanan ilk protein ilaçlardır (Rodriguez ve ark., 2010; Kieseier ve ark., 2015). Buna ilaveten, araştırmalar rİFN- β 'ların viral enfeksiyonlar ve çeşitli kanserler gibi diğer insan hastalıklarının tedavisi için kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Sasaki ve ark., 2015).

rİFN- β 'lar prokaryotik ve ökaryotik konakçı mikroorganizmalar kullanılarak benzer süreçler ile rekombinant olarak üretilmektedirler (Allen, 2015). Prokaryotik bakteri ve ökaryotik maya veya Çin hemstırı yumurta (Chinese Hamster Ovary, CHO) hücreleri kullanılarak rekombinant insan interferonu protein türleri üretilmektedir (Conradt ve ark., 1987; Dorin ve ark., 1998; Skoko ve ark., 2003; Mattanovich ve ark., 2004; Schumann ve

Ferreira 2004; Rodriguez ve ark., 2005; Zhuang ve ark., 2008; Zago ve ark., 2009; Kakeshita ve ark., 2011; Madhavan ve Sukumaran, 2016). CHO hücrelerinde glikolizasyonlu rekombinant İFN- β 'ların üretimi, *E. coli* üretimine göre daha yüksek maliyetli ve daha uzun zaman alan işlemler gerektirmektedir.

Bunlar arasında, prokaryotik *E. coli*, sinyal peptidine ve periplazmik salgı düzenine sahip olması nedeni ile tercih edilen üretim konakçısı olmaktadır. *E. coli* ekspresyon sistemi kullanarak salınabilir ve aktif olan rİFN- β 1b üretilmesi, rİFN- β 1b'nin konakçı bakterideki ölümcül etkilerini ortadan kaldıracak ve saflaştırma basamaklarını azaltacağı öngörülmektedir. Bu özelliklerin olmadığı ökaryotik konakçıların kullanıldığı sistemlerde rİFN- β 1a üretim maliyeti çok yüksek, verimi daha düşüktür. Bununla beraber, diğer ökaryotik sistemlere göre maya hücrelerinin kullanıldığı rİFN- β üretim süreçlerinde basit kültür ortamında kısa bölünme süresi ile hızlı büyümesi, kolay genetik manipülasyonu ve protein ürünleri post-translasyonel olarak değiştirme mekanizmasının varlığı üstünlük sunmaktadır (Feizi ve ark., 2013). Bununla birlikte, yabancı bir proteinin mayalarda yüksek seviyede ekspresyonu, ya substratları için rekabet ederek diğer hücresel süreçleri doğrudan sınırlayabilir ya da üretimi bloke etmek için metabolizmaya dolaylı olarak

müdahale edebilir, böylece hücrenin bir stres reaksiyonunu indükler (Mattanovich ve ark., 2004).

rİFN- β üretmek için memeli hücrelerinin kullanımı, rekombinant hücrelerin yavaş büyüme oranı, saflaştırılmış protein preparatlarında kanserojen veya viral DNA'nın kontaminasyon ihtimali, düşük ürün verimi ve kompleks kültür gereksinimi gibi bazı kısıtlamalara sahip olması ve ürün maliyetinin yüksek olması gibi eksikliklere sahiptir (Villela ve ark., 2010).

rİFN- β üretiminde böcek hücrelerinin kullanımı, hücrelerin yavaş büyümesi ve böcek hücrelerinin genetik manipülasyonunun zor olması, pahalı kültür koşulları ve viral transfeksiyonun kullanılması nedeniyle önemli toksikolojik ve ekonomik dezavantajlara sahiptir (Stifter ve ark., 2014).

Tedavi edici proteinlerin üretimi için çeşitli hayvan hücresi soylarında kullanılmakta ancak bu yöntemde kültür süreçlerinin sınırlı ve hassas olması, ürün maliyetinin yüksek olmasına neden olmaktadır.

1.1. *E. coli* ile rİFN- β üretimi

E. coli ekspresyon sistemini kullanarak terapötik proteinlerin ticari üretimi diğer sistemlere göre daha tercih edilmektedir (Sivashanmugam ve ark., 2009; Moradian ve ark., 2013). Genetik

manipülasyonları kolaylaştıran iyi tanımlanmış *E. coli* genetiği ve yüksek büyüme oranı gibi özellikler *E. coli*'nin rekombinant proteinlerin yüksek verimli üretiminde yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır (Sivashanmugam ve ark., 2009; Beladiya ve ark., 2015). Ayrıca *E. coli* ekspresyon sistemleri kullanılarak üretilen glikolizasyonsuz rİFN- β 1b'lerin biyolojik aktivitesinde çok fazla bir kayıp olmamaktadır. Bu nedenle *E. coli* ekspresyon sistemi birçok terapötik protein veya İFN- β üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Walsh, 2014; Allen ve ark., 2015). Bununla birlikte, bu ifade sisteminin kullanımında birkaç döngü sonrası değişiklik oluşumu, düşük veya orta düzeyde verim ve rİFN- β 'nin çok yüksek olmayan biyolojik aktivitesi gibi durumlarla karşılaşmaktadır. Ayrıca *E. coli*'de rİFN- β 'nin yüksek ekspresyonu, yanlış katlanan proteinlerin inklüzyon badileri (IB) şeklinde toplanmasına yol açmaktadır (Kamionka, 2011). Bunun için hücre büyümesinde kültür koşulları ve hedef rekombinant protein ekspresyonunun optimizasyonu gibi konularda araştırmalar yapılmaktadır (Morowvat ve ark., 2015).

E. coli üretim sistemindeki bu dezavantajları gidermek için çeşitli yaklaşımlar tasarlanmaktadır. Bu yaklaşımlardan en önemlisi sinyal peptidlerinin rekombinant protein üretiminde kullanılmasıdır (Inouye ve ark.,

1982; Cristobal ve ark., 1999; Le Loir ve ark., 2001; Brockmeier ve ark., 2006; Natale ve ark., 2008; Palmer ve Berks, 2012; Freudl, 2018). Sitoplazmada üretilen rİFN- β 'yı hücre duvarındaki periplazmik alana taşıyabilecek konstraktların geliştirilmesi işleminin proteinin sitoplazmik ortamda üretilmesi ile ilgili problemleri bir noktaya kadar çözebileceği öngörülmektedir (Morowvat ve ark., 2014). En uygun besin derişimi ile düzenlenmiş kültür kullanımı bakteri hücrelerindeki rekombinant plazmidlerin dayanıklılığını geliştirmeye yardımcı olabileceği belirtilmektedir (Rao ve ark., 2009). İlginçtir ki, aşırı ifade edilen rİFN- β 'nin *E. coli*'de ekspresyonu sitoplazmada inklüzyon cisimcikleri oluşumuna yol açabilmektedir. Bu durumda gram negatif konakçılar kullanılarak rİFN- β 'nin translokasyon yolu ile ekstra selüler besi ortamına ya da periplazmik alana taşınmasının avantaj sağlayacağı ve bu problemi çözeceği düşünülmektedir. Konakçının bulunduğu besi ortamına salgılanabilen rekombinant protein üretilmesi proteinin daha kararlı ve daha aktif olmasına yol açabileceği (Schmidt, 2004) ve protein saflaştırma basamaklarının azaltılmasını sağlayacağı ifade edilmektedir (Choi ve Lee, 2004). *E. coli* ekspresyonu ile rİFN- β 1b üretiminde tip II salgılama yönteminin kullanılması, başta saflaştırma olmak üzere bazı üretim sorunlarını önemli ölçüde çözeceği tahmin edilmektedir. Bu

durumda sinyal peptidleri kullanılarak rIFN- β 'nın periplazmik alana taşınmasının ya da hücre dışına salgılanmasının gösterilmesi ve bu sinyal peptide bağlı olarak elde edilen sonuçların karşılaştırma analizleri ile en uygun yöntemin geliştirilmesi, *E. coli*'nin salgılama mekanizmasının rIFN- β 1b üretiminde kullanılmasını önemli hale getirecektir.

1.2. *E. coli*'de bulunan Tip I ve Tip II salgılama yolları

Bakterilerde birçok farklı salgılama sistemi mevcuttur. Gram negatif bakterilerde rekombinant proteinlerin salgılanması için toplam 6 farklı yolak bulunmaktadır. Ancak bunlardan sadece Tip I ve Tip II yolları rekombinant proteinlerin salınımında yaygın olarak kullanılmaktadır (Cianciotto, 2005).

Tip I salgılama yolağı proteinlerin iç ve dış zardan tek basamakta transferinin gerçekleştiğı bir sistemdir (Binet ve ark., 1997). Tip II yolağından farklı olarak Tip I yolağında proteinin sitoplazmadan taşınması sonrası sinyal peptit proteinle birlikte kalmaktadır ve bu ise bir dezavantajdır (Cianciotto, 2005). Tip II yolağında salgılama iki basamakta gerçekleşmektedir. Üretilen proteinler Sec ve Tat salınım yolağı ile ilk olarak periplazmaya yönlendirilir. Ardından ikinci taşınım sistemi ile dış zara taşınır (Cianciotto, 2005). Tip II salgılama sistemi sadece dış zarda bulunduğu için, salgılatılacak proteinlerin öncelikle iç zardan

transferini gerçekleştiren Sec ve Tat salgılama yolağı ile periplazmaya taşınması gerekmektedir. Dolayısı ile Tip II taşıma sistemi Sec ve Tat yolağı ile kombine edilir ve bunlara bağımlı olarak çalışmaktadır. Genel salgılama (Sec) ve ikiz arjinin translasyonu (Tat) yolları sitoplazmik zar geçişinde *E. coli*'de en yaygın kullanılan taşıma proteinleridir. Sec yolağı katlanmamış formdaki proteinlerin taşınmasını sağlarken, Tat yolağı katlanmış formdaki proteinlerin taşınmasını sağlamaktadır.

Bu iki yolak yüksek derecede korunmuş protein salgılama mekanizmasına sahiptir. Sec ve Tat yolağı ile taşınan birçok protein ya iç zarda ya da periplazmaya taşınarak hücre içinde kalır. Bununla birlikte *E. coli* gibi gram negatif bakterilerde proteinler Sec ve Tat yolağı ile sitoplazmik zar sistemini geçerek ya periplazmada depolanır ya da başka bir taşıma sistemi yardımı ile dış zarı geçerek hücrenin dışına salınır (Cristobal ve ark., 1999; Choi ve Lee, 2004; Natale ve ark., 2008; Ni ve Chen, 2009). Sec ve Tat sinyal peptitlerini tanıyan taşıma mekanizmasına sahip olan *E. coli* rekombinant ürünleri salgılama potansiyeline sahiptir. Bununla ilgili çalışmalarda yapay IFN- β 1b geni Sec tipi sinyal peptid olan PelB sinyal peptidi taşıyan pET22b vektörüne klonlandıktan sonra elde edilen konstrak *E. coli* BLRDE3 suşuna aktarılarak *E. coli*'nin yukarıda belirtilen tip II sistemi ile rIFN- β 'nin

konakçının periplazmasında üretilmesi ya da bakterinin ürettiği besi ortamına salgılatılmasının sağlanabileceği düşünülmektedir.

1.3. Sentetik İFN-β1b geninin elde edilmesi ve klonlanması stratejisi

Prokaryotik organizmaların kodon tercihlerinin ökaryotik organizmalarınkinden farklı olması ve ökaryotik bir polipeptit olan interferonları kodlayan genomun daha verimli bir şekilde translasyonu için prokaryotik organizma konakçısının kodon tercihine bağlı olarak yeniden tasarlanmasını gerekli kılmaktadır. Buna göre prokaryotik *E. coli* konakçısında üretilecek olan rİFN-β1b proteini genomunun öncelikle *E. coli* organizmasının kodon tercihine göre tasarımının yapılması gerekmektedir.

İnsan interferon beta 1b (iİFN-β1b) proteininin bilinen aminoasit ve nükleotid dizilerinden yola çıkarak dizin yazılımı yardımı ile *E. coli* kodon tercihine uygun olan nükleotid dizisi elde edilebilir. Bu nükleotid dizisi *E. coli* kodon tercih tablosu kullanılarak *E. coli*'nin en fazla tercih ettiği kodonlar ile değiştirilerek, rİFN-β1b geni nükleotid dizileri yeniden tasarlanır. Yeniden tasarlanan İFN-β1b geninin oluşturacağı mRNA'nın ikincil yapısının verimli olarak translasyonunun mümkün olup olmayacağı, dizin yazılımı ile belirlenebilir. Bu programla elde edilen sonuçlara göre kodon seçimi yeniden

değerlendirilir ve en verimli translasyonun gerçekleştirileceği RNA'ları üretebilecek nükleotid dizisi oluşturulabilir. rİFN-β1b genini füzyon polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ile üretmek amacı ile büyüklükleri 50-80 nükleotidden oluşan ve birbirleri ile uçlarda eşleşebilen polinükleotidler tasarlanır ve tasarımı gerçekleştirilen polinükleotidler sentezletilip bunların farklı aşamalarda füzyon PZT ile sentezleri yapılabilir (Sambrook ve Russel, 2001).

Elde edilen sentetik rİFN-β1b geni PelB salgılama sinyal peptidi taşıyan pET temelli ekspresyon vektörüne klonlanarak *E. coli* suşunda ifadesi yapılabilir. Klonlama sonrası seçilen klonlardan izole edilen plazmid DNA'ların sekanslanması yapılarak analizi gerçekleştirilir. DNA sekanslaması ile doğruluğu kanıtlanan pET temelli ekspresyon vektöründeki rİFN-β1b geninin *E. coli* suşunda ifadesi gerçekleştirilir. pET temelli ekspresyon vektörleri klonlama bölgesinin -NH₂ ucuna yakın bölgede taşıdığı PelB sinyal peptidi ile bu vektörde üretilen rİFN-β1b peptitleri bu sinyal peptit sayesinde periplazmik alana taşınabilir. rİFN-β1b proteini *E. coli* için toksik olduğundan rİFN-β1b periplazmaya ya da hücre dışına salınımı gerçekleşir. Böylece konakçı hücre olan *E. coli* suşu hem rİFN-β1b üretimine bağlı zehirli etkiden kurtulmuş olur hem de rİFN-β1b'nin saflaştırma maliyeti düşürülmüş olur. Periplazmaya transfer edilen proteinler

sadece dış zarın parçalanması ile daha kolay elde edilebileceği ve sitoplazmik proteinlerle karışmayacağından saflaştırma basamakları ve dolayısı ile saflaştırma maliyetleri de azaltılır. Ayrıca his tag taşıyan pET temelli vektörler ile nikel içeren kolonlar kullanılarak rIFN-β1b saflaştırılabilir.

2. SONUÇ

Rekombinant terapötik protein üretim sürecinin protein ürünlerin konakçı hücreden salgılatılacak şekilde tasarlanması, saflaştırma basamaklarını ve aktivite sorunlarını azaltması beklenmektedir. Bu üretim yönteminin rIFN-β1b protein

sürecine uygulanması, terapötik protein üretimini daha verimli hale getireceği öngörülmektedir. *E. coli* ekspresyon sisteminde Sec ve Tat sinyal peptitlerinin kullanılması rIFN-β1b proteinlerinin hücre dışına salgılatılması daha yüksek saflıkta ve aktivitede protein üretime imkân sağlayabilecek, ayrıca konakçı organizmayı ürünün öldürücü etkisinden koruyabilecektir. Küçük ve büyük ölçekli terapötik protein üretimi uygulamalarında bir model olabilecek bu üretim sistemi ile üretim masrafları ve dolayısıyla ürün maliyetlerinin azalması öngörülmektedir.

Kaynaklar

- Allen J, Feng P, Patkar A, Haney KL, Chew L, Sengchanthalangsy LLP (2015). Method for producing soluble recombinant interferon protein without denaturing. US20160032345A1.
- Beladiya C, Tripathy RK, Bajaj P, Aggarwal G, Pande AH (2015). Expression, purification and immobilization of recombinant AiiA enzyme onto magnetic nanoparticles. *Protein Expression and Purification* 113: 56-62.
- Binet R, Létoffé S, Ghigo JM, Delepelaire P, Wandersman C (1997). Protein secretion by gram-negative bacterial ABC exporters—a review. *Gene* 192: 7–11.
- Brockmeier U, Caspers M, Freudl R, Jockwer A, Noll T, Eggert T (2006). Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *J Mol Biol* 362: 393–402.
- Chelbi-Alix MK, Wietzerbin J (2007). IFN, a growing cytokine family: 50 years of IFN research. *Biochimie* 89: 713–718.
- Chevaliez S, Pawlotsky JM (2009). Interferons and their use in persistent viral infections. In: Kräusslich HG, Bartenschlager R. (eds) Antiviral strategies. *Handbook of Experimental Pharmacol* 189 Springer Berlin Heidelberg. e-ISBN 978-3-540-79086-0

- Choi JH, Lee SY (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol and Biotech* 64: 625–635.
- Cianciotto NP (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *TRENDS in Microbiol* 13(12): 581–588.
- Conradt HS, Egge H, Peter-Katalinic J, Reiser W, Siklosi T, Schaper K (1987). Structure of the carbohydrate moiety of human IFN- β secreted by a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *J of Biological Chem* 262: 14600–14605.
- Cristobal S, de Gier JW, Nielsen H, von Heijne G (1999). Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J* 18: 2982–2990.
- Dissing-Olesen L, Thaysen-Andersen M, Meldgaard M, Højrup P, Finsen B (2008). The function of the human IFN- β 1a glycan determined in vivo. *J of Pharmacol and Experimental Therapeutics* 326: 338–347.
- Dorin G, Mc Alary PJ, Wong KM (1998). Production of interferon-beta (IFN-beta) in *E. coli*. *US Patent* 5814485.
- Feizi A, Österlund T, Petranovic D, Bordel S, Nielsen J (2013). Genome-scale modeling of the protein secretory machinery in yeast. *PLoS One* 8: 1–13.
- Freudl R (2018). Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microb Cell Fact* 17: 52.
- Goodbourn S, Didcock L, Randall RE (2000). Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J of General Virol* 81: 2341–2364.
- Hermant P, Michaels T (2014). Interferon- λ in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications. *J of Innate Immunity* 6: 563–574.
- Inouye S, Soberon X, Franceschini T, Nakamura K, Itakura K, Inouye M (1982) Role of positive charge on the amino-terminal region of the signal peptide in protein secretion across the membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79: 3438–3441.
- Kamionka M (2011). Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. *Current Pharmaceut Biotech* 12: 268–274.
- Kagawa Y, Takasaki S, Utsumi J, Hosoi K, Shimizu H, Kochibe N, Kobata A (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of natural human IFN- β 1 and recombinant human IFN- β 1 produced by three different mammalian cells. *J of Biological Chem* 263: 17508–17515.
- Kakeshita H, Kageyama Y, Endo K, Tohata M, Ara K, Ozaki K, Nakamura K (2011). Secretion of biologically-active human interferon- β by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters* 33(9): 1847 –1852.

- Kieseier BC, Arnold DL, Balcer LJ, Boyko AA, Pelletier J, Liu S, Zhu Y, Seddighzadeh A, Hung S, Deykin A, Sheikh SI, Calabresi PA (2015). Peginterferon beta-1a in multiple sclerosis: 2-year results from ADVANCE. *Multiple Sclerosis J* 21: 1025–1035.
- Le Loir Y, Nouaille S, Commissaire J, Brétigny L, Gruss A, Langella P (2001). Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 67: 4119–4127.
- Madhavan A, Sukumaran RK (2016). Secreted expression of an active human interferon-beta (HuIFN β) in *Kluyveromyces lactis*. *Eng Life Sci* 16: 379–385.
- Mark DF, Lu SD, Creasey AA, Yamamoto R, Lin LS (1984). Site-specific mutagenesis of the human fibroblast IFN gene. *Proc Nat Acad Sci USA*. 81: 5662–5666.
- Mattanovich D, Gasser B, Hohenblum H, Sauer M (2004). Stress in recombinant protein producing yeasts. *J of Biotech* 113: 112–135.
- Moradian C, Fazeli MR, Abedi D (2013). Over expression of the Interferon β -1b by optimizing induction conditions using response surface methodology. *J of Biology and Today's World* 2: 217–226.
- Morowvat MH, Babaeipour V, Rajabi-Memari H, Vahidi H, Maghsoudi N (2014). Overexpression of recombinant human beta interferon (rhINF- β) in periplasmic space of *Escherichia coli*. *Iranian J of Pharmaceut Res* 13: 151–160.
- Morowvat, M.H., Babaeipour, V., Memari, H.R., Vahidi, H. (2015). Optimization of fermentation conditions for recombinant human interferon beta production by *Escherichia coli* using the response surface methodology. *Jundishapur J of Microbiol* 8(4):e16236.
- Natale P, Brüser T, Driessen AJM (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1778: 1735–1756.
- Ni Y, Chen R (2009). Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 31(11): 1661–1670.
- Palmer T, Berks BC (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol* 10: 483–496.
- Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ (2016). Antitumor actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nature Rev Cancer* 16: 131–144.
- Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE (1987). Interferons and their actions. *Ann Rev of Biochem* 56(1): 727–777.

- Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202: 8–32.
- Rao DVK, Ramu CT, Rao JV, Narasu ML, Rao AKSB (2009). Cloning, high expression and purification of recombinant human interferon- β -1b in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotech* 158: 140–154.
- Randall RE, Goodbourn S (2008). Interferons and viruses: An interplay between induction, signaling, antiviral responses and virus countermeasures. *J General Virology* 89: 1–47.
- Rodriguez J, Spearman M, Huzel N, Butler M (2005). Enhanced production of monomeric interferon-beta by CHO cells through the control of culture conditions. *Biotechnol Prog* 21(1): 22–30.
- Rodriguez J, Spearman M, Tharmalingam T, Sunley K, Lodewyks C, Huzel N, Butler M (2010). High productivity of human recombinant beta-interferon from a low-temperature perfusion culture. *J Biotech* 150: 509–518.
- Runkel L, Meier W, Pepinsky RB, Karpusas M, Whitty A, Kimball K, Brickelmaier M, Muldowney C, Jones W, Goelz SE (1998). Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). *Pharm Res* 15(4): 641–649.
- Sambrook J, Russel DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA*.
- Sasaki R, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Nakamura M, Yasui S, Jiang X, Wu S, Arai M, Yokosuka O (2015). Natural interferon-beta treatment for patients with chronic hepatitis C in Japan. *World J Hepatol* 7: 1125–1132.
- Schmidt FR (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotech* 65: 363–372.
- Schumann W, Ferreira LCS (2004). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genet Mol Biol* 27: 442–453.
- Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q (2009). Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Sci* 18: 936–948.
- Skoko N, Argamante B, Grujčić NK, Tisminetzky SG, Glišin V, Ljubijankić G (2003). Expression and characterization of human interferon-beta1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem* 38: 257–265.
- Smeekens SP, Ng A, Kumar V, Johnson MD, Plantinga TS, van Diemen C, Arts P, Verwiel ET, Gresnigt MS, Fransen K, van Sommeren S, Oosting M, Cheng SC, Joosten LA,

- Hoischen A, Kullberg BJ, Scott WK, Perfect JR, van der Meer JW, Wijmenga C, Netea MG, Xavier RJ (2013). Functional genomics identifies type I IFN pathway as central for host defense against *Candida albicans*. *Nature Commun* 4: 1342.
- Sorensen PS, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K, Frederiksen JL, Jensen K, Kristensen O, Petersen T, Rasmussen S, Ravnborg M, Stenager E, Koch-Henriksen N (2003). Danish Multiple Sclerosis Study Group. Clinical importance of neutralizing antibodies against IFN β in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 362: 1184–1191.
- Stefan A, Alfarano P, Merulla D, Mattana P, Rolli E, Mangino P, Masotti L, Hochkoeppler A (2009). The regulatory elements of araBAD operon, contrary to lac-based expression systems, afford hypersynthesis of murine and human IFNs in *Escherichia coli*. *Biotech Prog* 25: 1612–1619.
- Stifter SA, Gould JA, Mangan NE, Reid HH, Rossjohn J, Hertzog PJ, de Weerd NA (2014). Purification and biological characterization of soluble, recombinant mouse IFN- β expressed in insect cells. *Protein Exp Purif* 94: 7–14.
- Tayal V, Kalra BS (2008). Cytokines and anti-cytokines as therapeutics-an update. *Eur J Pharmacol* 579: 1–12.
- vanBeers MMC, Sauerborn M, Gilli F, Brinks V, Schellekens H, Jiskoot W (2011). Oxidized and aggregated recombinant human interferon beta is immunogenic in human interferon beta transgenic mice. *Pharmaceut Res* 28: 2393–2402.
- Villela AD, Renard G, Palma MS, Chies JM, Dalmora SL, Basso LA, Santos, DS (2010). Human IFN- β 1ser17: coding DNA synthesis, expression, purification and characterization of bioactive recombinant protein. *J of Microbial & Biochemical Tech* 2: 111–117.
- Walsh G (2014). Biopharmaceutical benchmarks. *Nature Biotech* 32: 992–1000.
- Zago P, Baralle M, Ayala YM, Skoko N, Zacchigna S, Buratti E, Tisminetzky S (2009). Improving human interferon-beta production in mammalian cell lines by insertion of an intronic sequence within its naturally uninterrupted gene. *Biotechnol Appl Biochem* 52: 191–198.
- Zhuang Z, Wu Z, Chen M, Wang PG (2008). Secretion of human interferon- β 1b by recombinant *Lactococcus lactis*. *Biotechnol Lett* 30: 1819.