



**MANYETİK KOBALT FERRİT
NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE HİSTİDİN
ETİKETLİ REKOMBİNANT PREPROMELİTTİNİN
SAFLAŞTIRILMASI**

Hacer KARABULUT

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Yağmur ÜNVER

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet MAVİ

2024

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**MANYETİK KOBALT FERRİT NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE HİSTİDİN
ETİKETLİ REKOMBİNANT PREPROMELİTTİNİN SAFLAŞTIRILMASI**

(Synthesis of Magnetic Cobalt Ferrite Nanoparticles and Purification of Histidine-Tagged
Recombinant Prepromelittin)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hacer KARABULUT

Danışman: Doç. Dr. Yağmur ÜNVER
İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet MAVİ

Erzurum
Eylül, 2024



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

**MANYETİK KOBALT FERRİT NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE HİSTİDİN
ETİKETLİ REKOMBİNANT PREPROMELİTTİNİN SAFLAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Yağmur ÜNVER danışmanlığında, Hacer KARABULUT tarafından hazırlanan bu çalışma, 02/12/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Gen Mühendisliği Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.**

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Danışman:	Doç. Dr. Yağmur ÜNVER <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Ahmet MAVİ <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Aslı YILMAZ <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Adem KARA <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
İkinci Tez Danışmanı	Prof. Dr. Ahmet MAVİ <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
		Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Alper NUHOĞLU
Enstitü Müdürü
Aslı ıslak imzalıdır

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Doç. Dr. Yağmur ÜNVER danışmanlığında sunulan “Manyetik Kobalt Ferrit Nanoparçacıkların Sentezi ve Histidin Etiketli Rekombinant Prepromelittinin Saflaştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	%1	30
Kuramsal Temeller	%0	30
Materyal ve Metot	%14	35
Araştırma Bulguları	%2	20
Tartışma ve Sonuç	%1	20
Tezin Geneli	%7	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Hacer KARABULUT	Doç. Dr. Yağmur ÜNVER
2.12.2024	2.12.2024
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca bana desteklerini esirgemeyen kıymetli hocalarım Sayın Doç. Dr. Yağmur ÜNVER ve Sayın Prof. Dr. Ahmet MAVİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımnda her zaman bana destek olan, bilgi birikimlerinden faydalandığım kıymetli ekip arkadaşlarım Sayın Dr. Kübra SOLAK'a, Sayın Şeyda YILDIZ ARSLAN'a, Sayın Fatma TURHAN'a, Sayın Melek ACAR'a ve Sayın İbrahim DAĞCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) bünyesinde çalışan hocalarıma ve orada bulunan kıymetli arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca beni her zaman destekleyen ve manevi olarak yanımda olan sevgili aileme ve çok kıymetli dostlarım Nurbanu, Büşra ve Nurdan ve Hilal'e teşekkürlerimi sunarım.

Hacer KARABULUT

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MANYETİK KOBALT FERRİT NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE HİSTİDİN ETİKETLİ REKOMBİNANT PREPROMELİTTİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Hacer KARABULUT

Danışman: Doç. Dr. Yağmur ÜNVER

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet MAVİ

Amaç: Bu tez çalışmasında *Komagataella phaffii* tarafından rekombinant olarak üretilen ve potansiyel terapötik protein olan prepromelittinin (ppMEL) manyetik nanopartiküller (MNP) kullanılarak düşük maliyetli, hızlı ve etkili bir şekilde saflaştırılması amaçlandı.

Yöntem: Manyetik özelliğe sahip CoFe_2O_4 manyetik nanopartiküller (MNP) birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlendi. MNP'lerin karakterizasyonu için TEM (Transmisyon elektron mikroskobu) ve XRD (X ışını kırınımı) kullanıldı. Diğer yandan, genomunda ppMEL geni taşıyan *K. phaffii* hücreleri ile histidin etiketli rekombinant prepromelittinin (rppMEL) ekstraselüler üretimi gerçekleştirildi. 72 saatlik inkübasyon boyunca üretim ortamına 24 saatte bir %0,5 metanol ilave edildi. Sentezlenen CoFe_2O_4 MNP'ler ile rppMEL'in saflaştırılması için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu bağlamda, MNP konsantrasyonu, MNP'lere protein bağlama (inkübasyon) süresi, saflaştırma tamponuna eklenen EDTA ve imidazol konsantrasyonu çalışıldı. Saflaştırma sonucu elde edilen proteinler SDS-PAGE'de yürütülerek gümüş boyama ile görüntülendi.

Bulgular: Birlikte çöktürme metoduna göre sentezlenen CoFe_2O_4 MNP'lerin boyutlarının yaklaşık 20-25 nm arasında olduğu TEM ile belirlenirken kristal yapısı XRD ile belirlendi. Rekombinant *K. phaffii* hücrelerinin 72 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilen kültür sıvısı saflaştırma çalışmalarında kullanıldı. MNP'lerle protein saflaştırma için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda MNP konsantrasyonunun 10 mg/mL, protein bağlama (inkübasyon) süresinin 2 dakika olarak kullanılabileceği belirlendi.

Sonuç: Bu tez çalışmasında CoFe_2O_4 MNP'leri başarılı bir şekilde sentezlendi. Kültür sıvısına salgılanan rppMEL'in, CoFe_2O_4 MNP'ler ile tek adımda ve kısa sürede kısmi olarak saflaştırılabildiği görüldü.

Anahtar Kelimeler: Rekombinant prepromelittin, histidin, manyetik nanopartikül, CoFe_2O_4 , saflaştırma

Aralık 2024, 52 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

SYNTHESIS OF MAGNETIC COBALT FERRITE NANOPARTICLES AND PURIFICATION OF HISTIDINE-TAGGED RECOMBINANT PREPROMELITTIN

Hacer KARABULUT

Supervisor: Assoc. Prof. Yağmur ÜNVER

Co-Supervisor: Prof. Dr. Ahmet MAVİ

Purpose: In this thesis, it was aimed to purify prepromelittin (ppMEL), a potential therapeutic protein produced recombinantly by *Komagataella phaffii*, in a low-cost, rapid and effective manner using magnetic nanoparticles (MNP).

Method: Magnetic CoFe_2O_4 magnetic nanoparticles (MNP) were synthesized by co-precipitation method. TEM (Transmission electron microscope) and XRD (X-ray diffraction) were used for the characterization of MNPs. On the other hand, extracellular production of histidine-labeled recombinant prepromelittin (rppMEL) was performed with *K. phaffii* cells carrying ppMEL gene in their genome. 0.5% methanol was added to the production medium every 24 hours during 72 hours of incubation. Optimization studies were performed for the purification of rppMEL with the synthesized CoFe_2O_4 MNPs. In this context, MNP concentration, protein binding (incubation) time to MNPs, EDTA and imidazole concentration added to the purification buffer were studied. The proteins obtained as a result of purification were run on SDS-PAGE and visualized with silver staining.

Findings: The dimensions of CoFe_2O_4 MNPs synthesized according to the co-precipitation method were determined to be approximately 20-25 nm by TEM, while the crystal structure was determined by XRD. The culture fluid obtained as a result of 72 hour incubation of recombinant *K. phaffii* cells was used in purification studies. As a result of optimization studies conducted for protein purification with MNPs, it was determined that the MNP concentration could be used as 10 mg/mL and the protein binding (incubation) time as 2 minutes.

Results: In this thesis study, CoFe_2O_4 MNP was synthesized successfully. It was seen that rppMEL secreted into the culture fluid could be purified in a single step and in a short time with CoFe_2O_4 MNP.

Keywords: Recombinant prepromelittin, histidine, magnetic nanoparticle, CoFe_2O_4 , purification

December 2024, 52 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	x
GİRİŞ.....	1
Rekombinant Proteinler	1
Saflaştırma ve Önemi.....	4
Manyetik Nanopartiküller ile Saflaştırma.....	6
KURAMSAL TEMELLER.....	9
MATERYAL VE METOT	13
Kullanılan Cihazlar	13
Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerler	13
Çalışmada kullanılan besiyeri, çözelti ve tamponların hazırlanışı.....	13
CoFe ₂ O ₄ MNP'lerin Sentezi ve Karakterizasyonu	15
CoFe ₂ O ₄ MNP'lerin sentezi	15
CoFe ₂ O ₄ MNP'lerin karakterizasyonu	16
Rekombinant Prepromelittin (rppMEL) Üretimi	17
Rekombinant Proteinin Manyetik Nanopartiküllerle Saflaştırılması ve Optimizasyon Çalışmaları.....	17
SDS-PAGE analizi	18
Ticari Nanopartikül Saflaştırma Kiti ile Protein Saflaştırma	20
Ticari Nikel Şelatlayıcı Reçine ile Protein Saflaştırma.....	20
ARAŞTIRMA BULGULARI	22
CoFe ₂ O ₄ MNP Sentezi ve Karakterizasyonu	22
CoFe ₂ O ₄ MNP'lerin sentezi	22
CoFe ₂ O ₄ MNP'lerin karakterizasyonu	22
rppMEL Üretimi.....	23

CoFe ₂ O ₄ MNP ile rppMEL Saflaştırma Optimizasyon alışmaları	23
CoFe ₂ O ₄ MNP konsantrasyonu	23
Protein bağlama süresi optimizasyon alışması	24
Yıkama tamponuna eklenen imidazol ve EDTA'nın etkisi	25
Ticari Nanopartikül Saflaştırma Kiti ile Protein Saflaştırma	26
Ticari Nikel Reçine (Invitrogen, K85001) ile Protein Saflaştırma	27
TARTIşMA VE SONUÇ	29
Sonuçlar	32
KAYNAKLAR	33
ÖZGEçMİş	40



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kullanılan Cihazların İsimleri ve Markaları.....	13
Tablo 2. Kullanılan Çözeltiler, Besiyerleri ve Tamponların Hazırlanışı	14



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nanopartikül sentez yöntemlerini gösteren şema (Jain <i>et al.</i> 2024)'den Türkçe'ye çevrildi.....	7
Şekil 2. Tez çalışmasının şematik gösterimi	15
Şekil 3. CoFe ₂ O ₄ MNP sentez sistemi.....	16
Şekil 4. Hazırlanan Bradford standart eğrisi	19
Şekil 5. CoFe ₂ O ₄ MNP'lere ait TEM görüntüsü (Skala: 100 nm).	22
Şekil 6. CoFe ₂ O ₄ MNP'lere ait X ışını kırınım deseni.....	23
Şekil 7. Artan konsantrasyonlarda CoFe ₂ O ₄ MNP denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü.....	24
Şekil 8. Artan konsantrasyonlarda CoFe ₂ O ₄ MNP denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü.....	24
Şekil 9. CoFe ₂ O ₄ MNP ile ppMEL bağlama süresi denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü...	25
Şekil 10. CoFe ₂ O ₄ MNP'lerin yıkama basamağında tampona eklenen imidazol konsantrasyonunun saflaştırma üzerine etkisi denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü	25
Şekil 11. Saflaştırma tamponuna eklenen EDTA ve imidazol konsantrasyonunun saflaştırma üzerine etkisi ve karşılaştırılması denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü	26
Şekil 12. Ticari saflaştırma kiti kullanarak rppMEL içeren kültür sıvısından saflaştırma denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü	27
Şekil 13. Ticari nikel şelatlayıcı reçine kullanarak yapılan saflaştırma denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü	27
Şekil 14. rppMEL'in MNP'lerle saflaştırılmasına ait SDS-PAGE görüntüsü	28

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

MNP	Manyetik nanopartikül
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
XRD	X Işını Difraksiyonu

Simgeler

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
Co	Kobalt
Fe	Demir
gr	Gram
kDa	Kilodalton
Da	Dalton
l	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre

GİRİŞ

Rekombinant Proteinler

Doğal şartlarda kendiliğinden bir araya gelmesi mümkün olmayan genlerin, farklı canlılardan alınarak genetik mühendisliği yöntemleriyle bir araya getirilmesi rekombinant DNA teknolojisi olarak adlandırılır. Elde edilen ürüne ise rekombinant protein denir. Rekombinant protein üretimi, genetik mühendisliğinin de gelişmesiyle beraber 1980'lerin başında ortaya çıkmıştır. Bu sayede bakterilerden memeli hücrelerine kadar farklı konakçılarda yüksek miktarda heterolog protein ifadesi mümkün hale gelmiştir. Günümüzde rekombinant protein üretimi, özellikle ilaç keşfi açısından bir dönüm noktası olarak kabul edilmektedir. Çünkü ilaç keşfi rekombinant protein pazarının sürekli büyümesi için itici bir güç olarak kabul edilir. İlaç dışında rekombinant proteinlerin kullanım alanları olarak gıda, deterjan, kâğıt, kimyasal ve kozmetik sektörleri de sayılabilir (Gomes *et al.* 2018).

Rekombinant protein üretimine yönelmenin başlıca sebeplerinden biri bu proteinlerin doğada sınırlı miktarda bulunmasıdır. İstenildiği zaman istenilen miktarlarda elde edilmesi zor olan proteinler rekombinant olarak üretildiğinde hem yüksek miktarlarda üretilebilmekte hem de istenilen modifikasyonlar yapılabilmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, rekombinant protein üretimi için üretilmek istenen proteine göre de değişebilmekle birlikte, konakçı olarak mayaların kullanımı birçok açıdan avantajlı olmaktadır. Yapılarında bulunan hücre duvarı sayesinde büyük ölçekli üretim yapılan biyoreaktörlere daha dayanıklı, kısmen basit ortama ihtiyaç duyan, istenilen translasyon sonrası modifikasyonları yapmanın daha basit olduğu ve genetik manipülasyonlara açık bir organizma olması oldukça ideal bir seçim olmasını sağlar (H. Kim *et al.* 2015; Mattanovich *et al.* 2012).

Rekombinant protein üretimi için sıklıkla tercih edilen organizmalardan birisi *Escherichia coli* bakterisidir. Bulunabilirliğinin yüksek olması, hızlı büyüme ve basit büyüme ortamına ihtiyaç duyması gibi özelliklerinden dolayı sıklıkla tercih edilir. Tarihte ilk ticari ilaçlar olan insülin ve büyüme hormonunun üretiminde *E. coli* bakterisi konakçı olarak kullanılmıştır (Gomes *et al.* 2018). *Saccharomyces cerevisiae* mayası rekombinant protein üretimi için oldukça avantajlı bir konakçı olarak kullanılmaktadır. En önemli avantajları olarak endüstriyel ölçekli üretimlere dayanıklı olması ve biyolojik olarak aktif ökaryotik proteinleri doğru şekilde üretme yeteneğine sahip olması sayılabilir. Rekombinant protein üretimi için farklı bir maya olarak *Komagataella phaffii* (eski adıyla *Pichia pastoris*), *S. cerevisiae* mayası

ile karşılaştırıldığında daha yüksek biyokütle ve daha fazla rekombinant protein eldesi sağlar. Bunun ana sebebi, *K. phaffii*'nin karbon kaynağı olarak metanolü kullanabilen zorunlu aerobik maya olmasıdır. Bu nedenle solunum koşulları altında etanol üreterek karbon tüketmez, böylece daha fazla biyokütle oluşumu ve dolayısıyla da daha fazla rekombinant protein eldesiyle sonuçlanır (Gomes *et al.* 2018; Kurtzman, 2009; Mattanovich *et al.* 2012).

Salgı faktörleri proteinlerin N-terminal bölgesinde bulunan peptid sinyalleridir. Görevleri rekombinant proteini golgi kompleksinden hücre dışına yönlendirmektir. Mayalarda en çok kullanılan salgı faktörü α -eşleşme faktörü peptididir. Bu peptid, pre ve pro olmak üzere sırasıyla 19 ve 67 aminoasit içeren diziden oluşur. Bu α -eşleşme faktörü *S. cerevisiae* ve *K. phaffii* için farklı seviyelerde üretilir. Bu faktörün mayalarda üretiminin rekombinant protein ifadesinin artmasına sebep olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Gomes *et al.* 2018; Lin-Cereghino *et al.* 2013).

K. phaffii endüstriyel olarak önemli proteinlerin üretimi için konakçı ekspresyon sistemi olarak kullanılmaktadır. Bu sistemde üretilen rekombinant proteinin hücre dışına salgılanması için pre-pro- α faktörü kullanılır. Bu salgı faktörünün genetik olarak manipülasyonu ile hücre dışına salgılanan proteinin miktarı artırılabilir (Barrero *et al.* 2018). Biyoteknoloji mayası olarak da bilinen *K. phaffii* hücre dışına protein salgılama konusunda oldukça verimlidir. Çünkü kendi ürettiği proteinlerden çok az bir kısmını hücre dışına salgılar. Bu nedenle hücre dışı ortamdaki proteinlerin çoğunu salgılanan rekombinant protein oluşturur (Bernauer *et al.* 2021). Kültür sıvısına salgılanan protein doğru bir şekilde katlanmış ve posttranslasyonel modifikasyonları tamamlanmış halde bulunur (Ahmad *et al.* 2014).

Heterolog protein üretimi için ifade sistemi olarak *K. phaffii*'nin tercih edilmesinin birden fazla sebebi vardır. Özellikle genetik düzeyde kolayca manipüle edilebilmesi başlıca sebeptir. Bunun dışında fermentasyona uğramaması, birçok posttranslasyonel modifikasyonu yapabilmesi ve heterolog ifade için güçlü promotörlere sahip olması tercih sebepleridir (Lin-Cereghino *et al.* 2013; Macauley-Patrick *et al.* 2005). *K. phaffii*'de heterolog protein ifadesi hücre içinde kalacak şekilde veya hücre dışına salgılanarak yapılabilir. Söz konusu mayada endojen protein miktarı çok az olduğu için hücre dışına salgılanan rekombinant protein, ortamdaki toplam proteinin çoğunluğunu oluşturur. İstenilen proteinin saflaştırılması düşünüldüğünde, bu durum avantajlı bir ilk adım olarak değerlendirilir (Lin-Cereghino *et al.* 2013).

Rekombinant protein üretimi için seçilen konakçı organizmada en çok istenen özelliklerin başında yüksek miktarda nihai protein üretebilmesi gelir. Bununla birlikte istenilen proteinin konakçıda üretildikten sonra kolaylıkla saflaştırılabilmesi de önemli bir konudur.

İstenilen proteinin özelliğine göre üretimin yapılacağı konakçı seçilmelidir. Üretilen proteinin sonrasında glikozile olması veya kimyasal olarak modifiye edilmesi gerekirse bu durum maliyeti artıracığı için pek tercih edilmez. Bu gibi durumlara alternatif olarak farklı konakçılar da protein üretimi için önerilmiştir. Bunların başında en çok kullanılan organizmalar olarak mayalar önerilmiştir. Mayalar, böcek ve memeli hücre hattı konakçılarına göre daha düşük besin gereksinimi olması ve ökaryotik canlı olması dolayısıyla birçok avantaja sahiptir. Mayalar tek hücreli, ökaryotik canlılardır. Ayrıca biyolojik olarak aktif bir rekombinant protein için gerekli transkripsiyon sonrası modifikasyonları yapabilme yeteneğine de sahiptirler. Bu avantajlarından dolayı farklı farmasötik proteinlerin üretimi için sıklıkla kullanılmaktadır (Gomes *et al.* 2018; Mattanovich *et al.* 2012; Nielsen, 2013). Biyofarmasötik özellikteki rekombinant proteinlerin biyoaktif olabilmesi genellikle proteolize uğraması, glikozile olması ve doğru katlanması gerekir. Bu modifikasyonların ifade seviyesi ise üretildiği konakçıya bağlıdır. Bu salgılama miktarları hem saflaştırma aşamasında gerekli basamakları azaltır, hem de üretilen rekombinant proteinin ifadesini etkiler. Mayaların rekombinant protein üretimi için konakçı olarak kullanılması oldukça avantajlıdır (Gomes *et al.* 2018).

Günümüzde kanser özellikle sanayileşmiş ülkelerde başlıca ölüm nedenidir. Geleneksel kanser tedavileri, ilaç direnci, tümör seçiciliği gibi nedenlerle tedavi etkisini yitirmeye başlamıştır. Bununla birlikte cerrahi, kemoterapi, radyasyon, biyolojik ve hormonal olarak kanser tedavileri uygulanır. Bu tedavilerin hem maliyeti yüksektir hem de hasta üzerinde olumsuz yan etkilere neden olabilmektedir. Bu olumsuzluklar değerlendirildiğinde, terapötik peptidler oldukça umut verici bir yaklaşım olarak son zamanlarda dikkat çekmektedir. Terapötik peptidler, kanser de dâhil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde yeni ve umut verici bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer tedavi yöntemlerinin aksine özellikle biyolojik yapılar oldukları için vücut tarafından yabancı olarak algılanmazlar. Bunun yanında sentezlenmelerinin kolay olması, hedef özgüllüğünün yüksek olması ve seçiciliğe sahip olmaları, ayrıca düşük toksisiteye sahip olmaları da diğer önemli avantajları olarak sayılabilir (Marqus *et al.* 2017).

Geçmişten günümüze kadar hastalıklar doğadaki kaynaklar ve geleneksel bilgiler kullanılarak tedavi edilmiştir. Doğal ürünler, hem kanser tedavisinde hem de insanların yaşam kalitesini iyileştirmek için yeni ilaç keşfinde ve keşfedilmiş olanları geliştirmek için en güvenilir kaynak olarak görülmektedir (Bačkorová *et al.* 2012; A. Varol *et al.* 2022; M. Varol, 2018). Bal arılarının ürünlerinin tıbbi amaçla kullanımı apiterapi olarak adlandırılır. Babil, Mısır, Çin, Yunan ve Hint medeniyetlerinde arı ürünleri tedavi amacıyla kullanılmıştır. Uzun yıllar boyunca kullanılan ve etkisi görülen arı ürünleri günümüzde de bilim insanlarının büyük

ilgisini toplamıştır. Bal arısı ürünleri arasında en çok bilinen baldır. Diğer ürünler, polen, propolis, balmumu ve arı sütü günümüzde sağlığa olan faydaları nedeniyle insanlar tarafından beslenme ve tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Arı ürünlerinden en ilgi çekenini ise arı zehridir. Arı zehri potansiyel olarak terapötik etkinliğe sahiptir (Cooney *et al.* 2011; Jones *et al.* 2011; A. Varol *et al.* 2022). Arı zehri küçük protein, peptid, enzim, şeker, mineral ve aminlerden oluşur. Hücresel sistem üzerinde farklı farmakolojik, biyolojik ve fizyolojik etkilere sahiptir. Bu etkiler radyoprotektif, antitumör, antiartrit, antikarsinogenik ve antiinflamatuar etki gibi sıralanabilir (Gajski & Garaj-Vrhovac, 2009; Oršolić, 2009; A. Varol *et al.* 2022). Terapötik proteinler içerisinde arı zehrinin önemli bir bileşeni olan melittin, özellikle son zamanlarda oldukça dikkat çekmektedir. Arı zehrinin kuru ağırlığının yaklaşık %40-60'ını oluşturan melittinin şimdiye kadar antikanser, antibakteriyel, antiviral ve antifungal gibi birçok özelliği olduğuna dair çalışmalar yapılmıştır. Özellikle antikanser etkinliği üzerine fazla çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir (Ullah *et al.* 2023).

Arı zehrinin önemli bir polipeptid bileşeni olan melittin 26 aminoasitten oluşur ve 2850 Da moleküler ağırlığa sahiptir. Melittin, arının zehir bezinde 70 aminoasitten oluşan ve prepromelittin olarak adlandırılan inaktif bir öncül formda üretilir. Prepromelittinin çok adımlı aktivasyonu sonrasında 26 aminoasitlik melittin, aktif form olarak işlev görür (Ceremuga *et al.* 2020). Aktivasyonu için DPPIV (dipeptidil peptidaz IV) enzimi ile kesilmesi gerekir (Zuo *et al.* 2020). Biyolojik olarak aktif olan bu polipeptid, antioksidan ve anti-apoptotik özellikler gibi önemli etkilere sahiptir (J. Y. Kim *et al.* 2021; A. Varol *et al.* 2022).

Saflaştırma ve Önemi

Rekombinant protein üretimi için seçilecek olan konakçı, yalnızca proteinin çoğaltılmasını ve izolasyonunu değil, aynı zamanda sonrasında bu proteinin nasıl saflaştırılacağını da önemli ölçüde etkiler. Genetik mühendisliği alanında yaşanan önemli gelişmeler, konakçı hücrelerde üretilen rekombinant protein miktarında büyük bir artışa neden olmuştur. (Pina *et al.* 2014).

Proteinler organizmalarda önemli görevlere sahip olan biyolojik yapılardır. İstenilen bir proteini biyolojik kaynağından ayırmak için etkili yöntemlerin geliştirilmesi önemli bir araştırma konusudur. Protein ayırma ve saflaştırma teknolojisi temelde ikiye ayrılır. İlk yöntem, geleneksel metot olarak bilinen proteinin yapısal olarak boyutu, çözünürlüğü, ligand moleküllerine özgü ilgisi gibi doğal özelliklerine dayanan yöntemlerdir (Alpert *et al.* 2010; Hirabayashi *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2018). Diğer yöntem ise rekombinant füzyon proteinin ayrılması ve saflaştırılması, katı reçine üzerindeki metal iyonlarıyla şelatlanabilen her türlü protein etiketine dayanır (Brizzard *et al.* 1994; Ganesana *et al.* 2011; Zhou *et al.* 2018; Zhu *et*

al. 2017). Kromatografi, protein saflaştırılması için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Hem ekonomik olarak uygulanabilir olması hem de az işlem basamağı içermesi nedeniyle yüksek saflıkla geri kazanım ile sonuçlanır (Carta & Jungbauer, 2010; Milne, 2011; Pina *et al.* 2014; Walter & Gottschalk, 2010).

Afinite kromatografisinde hedef proteine spesifiklik, katı desteğin istenilen afinite ligandlarıyla kimyasal olarak fonksiyonelleştirilmesi ile sağlanır. Bu ligandlar biyolojik, kimyasal ve sentetik olarak üç ana kategoriye ayrılır (Pina *et al.* 2014; Roque & Lowe, 2007).

Afinite etiketleri protein saflaştırma için oldukça etkili ve sık kullanılan araçlardır. Temelde bu araçlar, biyokimyasal özellikleri hakkında bilgi sahibi olunmadan hemen hemen her proteinin saflaştırılmasına imkân tanır. Bu aracın kullanımı, henüz karakterize edilmemiş çok sayıda proteinin biyolojik işlevini araştırma için kullanılarak yöntem yaygınlaştırılmıştır (Arnau *et al.* 2011). Afinite etiketleri farklı boyutlarda olabilir ve hedeflenen biyomolekülün N veya C terminaline genetik olarak kaynaştırılabilir. Bu etiketleri kullanmanın birçok avantajı vardır. Saflaştırma sürecini kolaylaştırmanın yanı sıra ilgili biyomolekülün çözünürlüğünü ve stabilitesini artırabilir. İfade düzeyinde artışa da neden olabilir. Hücresel lokalizasyon ve görüntüleme çalışmalarının yapılmasına olanak tanır (Pina *et al.* 2014; Young *et al.* 2012).

Afinite etiketleri arasında en yaygın olarak immobilize edilmiş Ni^{+2} veya Co^{+2} iyon komplekslerine bağlanabilen polihistidin etiketi kullanılır. Histidin etiketli proteinlerin izolasyonu genellikle Ni^{+2} kompleksleriyle modifiye edilmiş reçine içeren kolonlarda gerçekleştirilir. Bu yöntem herhangi bir protein ifade sistemine de kolaylıkla uygulanabilir (Feng *et al.* 2015; Zhou *et al.* 2018).

Endüstriyel kullanım ve araştırma için gerekli rekombinant proteinin farklı kalite ve miktarlarda olmasından dolayı saflaştırma tekniklerinin çeşitliliği artmıştır. Üretilen rekombinant proteinin verimi kullanılan ifade koşullarından etkilenir. Bu durumlar göz önüne alındığında rekombinant proteinlerin hem ekonomik üretimi ve verimli saflaştırma yöntemlerine ek olarak verimli ifade konaklarını da kullanmayı gerektirir (GE Healthcare Life Sciences, 2007; Mahmoodi *et al.* 2019). Bu ihtiyaçları karşılayabilmek ve istenen rekombinant proteinin geri kazanım oranını iyileştirmek için fizikokimyasal ve afinite saflaştırma yöntemleri de dâhil olmak üzere çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (Kimple *et al.* 2013; Kosobokova *et al.* 2016; Mahmoodi *et al.* 2019; Wingfield, 2015). Tüm bu durumlar göz önüne alındığında, rekombinant proteinlerin saflaştırılması için basit, güvenilir, hızlı ve ölçeklenebilir yeni ayırma tekniklerinin geliştirilmesi biyoayırma teknolojileri için kritik bir hedef olmaya devam etmektedir. Özellikle en az optimizasyonla hedeflenen proteinin elde edilebildiği platformlar

dikkat çekicidir. Geliştirilen bu yeni yöntemler, ürünlerin araştırma ve geliştirilmesini hızlandırmakla beraber ticari açıdan teslimat süresini de kısaltabilir (Mahmoodi *et al.* 2019).

Rekombinant proteinlerin afinite kromatografisi ile saflaştırılması en etkili ve yaygın bir yöntemdir. Bunun sebebi elde edilen ürünün saflığı ve geri kazanım verimi oldukça yüksektir. Fakat bu yöntemde her bir hedef protein için spesifik afinite ajanlarına ihtiyaç vardır. Saflaştırılacak proteinlerin çeşitliliği ihtiyaç duyulan spesifik afinite ajanlarının sayısının artmasına neden olur. Bu yüzden her ne kadar etkili ve cazip bir yöntem olsa da çoğu protein için ortak uygulanabilir bir genel yöntem daha çok tercih sebebidir (Pina *et al.* 2014).

Şimdiye kadar yaygın bir şekilde kullanılan ve birçok avantajı olan afinite stratejileri, yüksek maliyetli bir yöntemdir. Son zamanlarda çeşitli yüzey modifikasyonu yapılmış nanopartiküller (MNP) rekombinant proteinlerin geri kazanımını ve saflaştırılmasını artırmak için tasarlanmıştır. MNP'ler; hızlı, basit, kolay ulaşılabilir ve en önemlisi düşük maliyetlidirler. Yüzey modifikasyonuna uygun, canlılar için sitotoksik olmayan (100µg/ml konsantrasyona kadar), hem ticari hem araştırma alanları için birçok uygulama alanına sahip ve avantajlı nano yapılarıdır. Hem uygulama kolaylığı hem de sayılan avantajlarından dolayı son zamanlarda MNP ilse saflaştırma prosedürleri ilgi çekmeye başlamış ve geliştirilmeye başlanmıştır (Mahmoodi *et al.* 2019).

Manyetik saflaştırma yöntemi oldukça hızlı ve verimli bir yöntem olarak son zamanlarda karşımıza çıkmaktadır. Bu yöntemin en büyük avantajı zararlı olan fiziksel ve kimyasal işlemlere maruz bırakmadan protein, hücre ve diğer biyomoleküllerin basit hızlı ve etkili bir şekilde saflaştırılmasına olanak tanınmasıdır. Ayrıca istenirse saflaştırılan ürünün konsantre edilmesine de imkân sağlar (Wu *et al.* 2014; Zhou *et al.* 2018). Nanopartiküller farklı protein tiplerinin ayrılması için etkili bir yöntem olarak son zamanlarda karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca karma protein içeren biyolojik bir örnekten tek adımda hedef proteini saflaştırmayı da mümkün kılmaktadır (Li *et al.* 2013; Zhou *et al.* 2018). Histidin etiketli proteinleri ayırmanın yolu nanopartikülün yüzeyine uygun afinite ajanlarını bağlamaktır. Nanopartiküllerin yüzeyindeki Ni^{+2} veya Co^{+2} iyonları histidin etiketli proteinin bağlanması için alan oluşturur. Ayrıca kullanılan süperparamanyetik çekirdek manyetik alan ile proteinin saflaştırılmasını da kolaylaştırır (Zhou *et al.* 2017, 2018).

Manyetik Nanopartiküller ile Saflaştırma

Boyutları 1-100 nm arasında değişen nesneler nanopartiküller olarak tanımlanır. Günümüzde oldukça çeşitli alanlarda kullanım alanına sahiptir. Örneğin tıbbi tedavilerde, enerji depolamak için güneş ve oksit yakıt pillerinin üretimi gibi endüstriyel sektörlerin yanında

kozmetik ve giyim sektöründe de kullanım alanına sahiptir. Bu kadar farklı alanlarda kullanılması, küçük parçacık boyutuna sahip olması, yüzey alanı, yüzey reaktivitesi, partikül yükü ve şekli gibi karakteristik özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Bundschuh *et al.* 2018; Hasan, 2014; Jain *et al.* 2024).



Şekil 1. Nanopartikül sentez yöntemlerini gösteren şema (Jain *et al.* 2024)'den Türkçe'ye çevrildi

Nanopartikül elde etme yöntemleri de nanopartiküller gibi oldukça çeşitlidir. MNP'lerin birden fazla elde etme yöntemi olsa da genel olarak öğütme, termal ayrıştırma, mikroemülsiyon, kimyasal buhar biriktirme, birlikte çöktürme, poliol yöntemi, kısıtlı bir ortamda reaksiyon, akış enjeksiyon sentezi ve sonoliz olarak sıralanabilir (Mehta, 2017; Minkner *et al.* 2020; Singh *et al.* 2010). Elde etme yöntemi seçerken bu malzemenin nerede kullanılacağına göre uygun yöntemin seçilmesi gerekir. Bu yöntemlerden sıklıkla kullanılan kimyasal yöntemlerdir. Kimyasal sentez yöntemlerinde çevre kirliliği, yüksek enerji tüketimi ve potansiyel sağlık riskleri gibi birçok olumsuz sonuçlara neden olur. Nanopartikül elde etmek için kimyasal yöntemlere ek olarak fiziksel yöntemler de kullanılmaktadır. Aerosoller, ultraviyole radyasyon ve termal ayrışma fiziksel yöntemlerden bazılarıdır. Bu yöntemlerin hepsi yüksek sıcaklık ve basınca ihtiyaç duyar. Fiziksel ve kimyasal yöntemlerdeki olumsuzlukları aşmak için alternatif olarak yeşil sentez geliştirilmiştir. Yeşil sentez diğer yöntemlere göre daha düşük maliyetli olmasının yanında çevreye daha az zararlı, hem insan sağlığı hem de çevresel olarak güvenlik düzeyi yüksek olduğu için daha avantajlıdır (Jain *et al.* 2024; Ying *et al.* 2022).

Nanopartiküller, boyutlarının nano olmasının da avantajından dolayı birçok kullanım alanına sahiptir. Örneğin, manyetik rezonans görüntüleme, hedefli ilaç dağıtımı, hipertermi ile kanser hücrelerinin hedefli yıkımı, manyetofeksiyon, doku mühendisliği veya saflaştırma alanlarında kullanılabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (Krishnan, 2010; Minkner *et al.* 2020; Nosrati *et al.* 2017; Solak *et al.* 2024; Yıldız *et al.* 2021).

MNP'ler rekombinant proteinlerin saflaştırılması için uygun bir araçtır. Yüzeyleri amin, karboksil veya oksazolin gibi fonksiyonel bir grup ile modifiye edilerek, silika ile kaplanarak veya direk çekirdeğin yüzeyi Ni^{+2} veya Co^{+2} gibi iyonlarla kaplanarak kullanılabilir. Nikel, histidin etiketi ve yüksek sayıda histidin kalıntısına sahip proteinler için yüksek afiniteye sahiptir. Yüzeyi Ni^{+2} ile kaplı olan MNP'ler histidin etiketli proteinlere karşı afinite göstereceğinden saflaştırma aracı olarak kullanılabilir. MNP'ler ile saflaştırılan proteinlere örnek olarak GFP (yeşil floresan protein) verilebilir. Saflaştırma aracı olarak MNP kullanılarak *E. coli* hücre lizatından yüksek saflıkta GFP saflaştırılabilmektedir (Schwaminger *et al.* 2019). Yine aynı şekilde ipekböceği yağ gövdesi örneğinden istenilen proteinler yüksek saflıkta elde edilebilmiştir (Minkner *et al.* 2020).

Son zamanlarda popüler olan MNP'ler saflaştırma aracı olarak birçok çalışmada kullanılmış ayrıca ticari olarak da satılmaya başlanmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı; $CoFe_2O_4$ manyetik nanopartiküllerini ($CoFe_2O_4$ MNP) sentezlemek, rekombinant prepromelittinin (rppMEL) *K. phaffii* tarafından ekstraselüler üretimini sağlamak ve üretilen rppMEL'i $CoFe_2O_4$ MNP'lerle saflaştırmaktır. Bu doğrultuda;

- i. Saflaştırma aracı olarak kullanılacak olan $CoFe_2O_4$ MNP'lerin sentezlenmesi ve karakterizasyonu,
- ii. Rekombinant rppMEL'in ekstraselüler üretimi,
- iii. Sentezlenen $CoFe_2O_4$ MNP'ler ile rppMEL'in saflaştırılması için optimizasyon çalışmaları,
- iv. Saflaştırılan rppMEL'in SDS-PAGE ile görüntülenmesi hedeflenmiştir.

KURAMSAL TEMELLER

Werten *et al.* 2019, *K. phaffii*'nin yüksek verimli rekombinant protein eldesi nedeniyle bu ekspresyon sisteminin iyi bilindiğini vurgulamışlardır. Bu kapsamda *K. phaffii*'de şimdiye kadar hücre içi protein üretiminde en yüksek verimin ~22 g/L olduğunu belirtmişlerdir. En yüksek hücre dışı veriminin ise ~18 g/L olduğunu belirtmişlerdir. Hücre dışı protein üretiminin saflaştırma basamağı için kolaylaştırıcı bir adım olması ve yüksek protein verimi nedeniyle *K. phaffii*'nin rekombinant protein üretiminin yanı sıra endüstriyel bir konakçı olarak uygun bir seçim olduğuna değinmişlerdir.

Das *et al.* 2024, çalışmalarında monoklonal antikor üretimi için konakçı olarak maya kullanmışlardır. Mayaların gelişmiş posttranslasyonel modifikasyonlara sahip olması, katlanma ve salgılama özelliklerinden dolayı konakçı sistemi olarak bakterilerden daha umut verici olduğunu belirtmişlerdir. Rekombinant antikor üretimi için diğer konakçı mayalar da son zamanlarda kullanılmakla beraber en fazla tercih edilen konakçının *P. pastoris* (*K. phaffii*) olduğunu belirtmiş ve kendi çalışmalarında da bu mayayı kullanmışlardır. *K. phaffii* mayasında alfa-çiftleşme faktörü ile üretilen rekombinant antikor hücre dışına salgılatmışlardır.

Minkner *et al.* 2020, yaptıkları bir çalışmada ipekböceği ifade sistemini kullanarak His etiketli rekombinant protein üretmişlerdir. Daha sonra nikel kaplı MNP ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si}@\text{NH}_2@\text{Ni}$ kapsül) sentezlemişlerdir. Sentezledikleri nikel kaplı MNP ile His etiketli rekombinant proteini ipekböceği lizatından saflaştırmışlardır. İpekböceği lizatından protein saflaştırma işleminin, ifade sisteminin karmaşıklığı ve yağlı gövde matrisinden kaynaklı olarak birkaç adımda tamamlandığını, bunun yanı sıra, sentezledikleri MNP'ler ile saflaştırma işleminde ise sadece mıknatısa ihtiyaç duyulduğu için basit ve verimli bir saflaştırma yöntemi olduğunu bildirmişlerdir.

Lioi *et al.* 2023, çalışmalarında insan prokolajen tip II'yi vahşi tip maya suşunun fermentasyon sıvısından protein A kaplı manyetik boncuklar olarak adlandırdıkları bir sistem ile saflaştırmışlardır. Rekombinant kolajen üretimi için birkaç prokaryotik ve ökaryotik sistem araştırmışlar fakat en etkili ifade sistemi olarak mayayı belirlemişlerdir. Mayada istenilen özellikte rekombinant olarak kolajen üretiminden sonra protein A kaplı manyetik boncuklar ile seçici olarak bulunduğu ortamdan ayırmışlardır. Kullandıkları bu boncuk bazlı immün yakalama sisteminin yeniden kullanılabilirliği, kararlılığı ve özgül bağlanma gibi birçok avantajını vurgulamışlardır. Geliştirdikleri bu sistemin fermentasyon sırasında üretilen kolajen

miktarının yarı-kantitatif olarak izlenebilmesi için önemli olduğunu belirtirmiş ve diğer farmasötiklere de uygulanabileceğini önermişlerdir.

Chang *et al.* 2019, *E. coli* hücre lizatından His-etiketli proteini (rekombinant retinoid x reseptör) CMPEI-Ni²⁺@SiO₂@Fe₃O₄ olarak adlandırdıkları kendi sentezledikleri manyetik nanopartikül ile ayırmışlardır. Sentezledikleri MNP'nin sentezinin kolay olması, bağlanma kapasitesinin yüksek olması ve yeniden kullanılabilmesi avantajlarından dolayı biyoteknolojik olarak önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Türkanoglu Özçelik *et al.* 2019, yaptıkları bir çalışmada *Streptomyces mobaraensis* (*S. mobaraensis*) pro-transglutaminaz genini pGAPZαA vektörüne klonlamış ve pGAPZα-proMTGase ekspresyon kasetini elde etmişlerdir. Hücre dışı olarak proMTGase enzimini dispaaz I ile aktive ettikten sonra enzim aktivitesini spektrofotometrik yöntem ile ölçmüşlerdir. Sonuçta yüksek miktarda ürün elde ederek proMTGase üretimi için bir biyoproses geliştirmişlerdir. *K. phaffii*'nin laboratuvar ölçekli bir biyoreaktörde beslemeli-kesikli fermentasyon üretim süreci ile rekombinant pro-MTGase üretmek için oldukça uygun bir ekspresyon sistemi olduğunu ve klonun ticari amaçlar için büyük miktarda rekombinant MTGase enzimini üretmek için kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Başka bir çalışmada Acar *et al.* 2023, *K. phaffii*'de pPICZαC vektörüne yerleştirilen horseradish peroksidaz (HRP) A2A izoenzimini histidin etiketli olarak hücre dışı üretmiş ve afinite kolonu kullanarak tek adımda saflaştırabilmişlerdir. Afinite kolonu olarak 3-amino-4-kloro benzohidrazit kullanmışlardır. Ticari öneme sahip HRP'nin farklı izoenzim karşımı halinde bulunduğunu ve bunları birbirinden ayrılmasının zor olduğunu belirtmişlerdir. İzomerlerin saflaştırması oldukça zor bir yöntem olmasına rağmen, bu çalışma ile elde edilen rekombinant enzimin tek adımda saflaştırılabildiğini bildirmişlerdir.

Ünver, 2014, yaptıkları bir çalışmada memeli serum proteini olan Paraoksonaz 1 (PON1) enzimini *K. phaffii* ekspresyon sistemini kullanarak rekombinant olarak üretmiştir. α-faktör sinyal dizisini kullanarak üretilen proteinin hücre dışına salgılanmasını sağlamıştır. Hücre dışına salgılanan histidin etiketli enzimi nikel şelatlayıcı reçine kullanarak afinite tekniğiyle saflaştırmıştır.

Rosa *et al.* 2013, *Aspergillus fumigatus*'tan elde ettikleri α-glukuronidaz enzimini *K. phaffii* ekspresyon sistemini kullanarak histidin etiketi ile konjuge olarak üretmişlerdir. Kültür ortamına salgılanan histidin etiketli proteini saflaştırmak için nikel nitriloasetik asit (Ni-NTA) kolonu kullanmışlardır. Sonuçta istedikleri enzimi oldukça yüksek saflıkta elde etmişlerdir.

Yine başka bir çalışmada Mei *et al.* 2015, ticari öneme sahip kivi pektin metil esteraz inhibitörünü (rPMEI) *K. phaffii* ekspresyon sisteminde histidin etiketli olarak üretmişlerdir. Hücre dışına salgılanan bu enzimin saflaştırılması için nikel afinite kromatografisi yöntemini kullanmışlardır.

Prabhu *et al.* 2018 ise adaptif bağışıklıkta önemli bir rolü olan insan interferon gama (hIFN- γ) peptidini *K. phaffii* ekspresyon sistemi ile rekombinant olarak üretmişlerdir. Kültür ortamına salgılanan peptidin saflaştırılması için yeni bir modifiye yöntem önermişlerdir. Nikel şelatlı ters misel sistemi adı verdikleri bu yeni sistem ile saflaştırılan peptidin miktarını ve özelliklerini karşılaştırmak için Ni-NTA yöntemini kullanmışlardır. Sonuçta kendi geliştirdikleri modifiye sistemin optimizasyon çalışmaları ile elde edilen verimin iyileştirilmesine olanak sağladığını belirtmişlerdir.

Sadalla-Pinto *et al.* 2024, yaptıkları bir çalışmada *K. phaffii*'de (GS115 suşu) Amazon havzasına özgü olan *tambaqui* (*Colossoma macropomum*) türüne ait GH (büyüme hormonu) ifadesini hücre dışı olarak gerçekleştirmişlerdir. Büyüme ortamı için biyoreaktör kullanarak yüksek miktarda (250 mg L^{-1}) ürün elde etmişlerdir. Kültür ortamına salınan rekombinant GH (rGH) toplandıktan sonra afinite kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar ile ilk defa *tambaqui*'den türetilen rGH'nin heterolog gen ifadesini ve üretimini biyoreaktörde gerçekleştirmiş, kültür ortamına bu proteini salgılatmış ve afinite kromatografisi ile de saflaştırmışlardır.

Chen *et al.* 2021, arı zehrinin küçük katyonik peptidi olan melittini (MLT) SUMO füzyon teknolojisi ile *E.coli*'de üretmişlerdir. Bunun için pET-3c-SUMO-Melittin plazmidini oluşturmuşlardır. Son olarak füzyon protein şeklinde (SUMO-Melittin) hücre içi olarak üretimini gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra SUMO proteazı ile kesilen protein karışımını Ni-NTA (Nikel-Nitriloasetikasit) yöntemiyle saflaştırmışlardır. 1 litre fermentasyon kültüründen %95'ten fazla saflıkta yaklaşık 25 mg rekombinant protein elde etmişlerdir. Rekombinant melittin ve sentetik olarak üretilen melittini kıyasladıklarında sitotoksosite ve antimikrobiyal açıdan benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarla rekombinant melittinin yüksek ekspresyonuna dair sistem geliştirdiklerini ve bu sistemin benzer antimikrobiyal peptidlerin hazırlanması için kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Aygar *et al.* 2015, Histidin etiketli proteinleri seçici olarak ayırmak için yüzeyi modifiye edilmiş CoFe_2O_4 manyetik nanopartikülleri kullanmışlardır. Birlikte çöktürme yöntemiyle MNP'leri sentezlemişler, sonrasında yüzeyini silika ile kaplayarak Ni-NTA afinite grupları ile modifiye etmişlerdir. Hazırladıkları MNP'leri *E. coli* pQE-31/775 hücre lizatından N-terminalinde His-etiketi bulunan rekombinant küçük ısı şoku proteini olan *Tpv-sHSP 14.3*'ü

saflaştırmak için kullanılmışlardır. Geliştirdikleri saflaştırma sisteminin diğerk sistemlere göre bağlayıcı tampon ve elüsyonlara ihtiyaç duymamasından dolayı avantajlı olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca tüm saflaştırma adımları santrifüje ihtiyaç duymadan mıknatısla yapılabileceği için süreden de tasarruf edildiğini bildirmişlerdir.

Schwaminger *et al.* 2019, çıplak demir oksit nanopartikülleri (BION olarak isimlendirilmiş) kullanarak *E.coli* hücre lizatından 6x-His etiketli GFP proteinini saflaştırmışlardır. Çalıştıkları farklı tampon sistemlerinin çoğunda histidin etiketinin BION yüzeyine yüksek afinite gösterdiği belirtilmiştir. 6x-His etiketli GFP proteinlerinin %50’si MNP yüzeyine bağlanırken etiketsiz olan GFP proteinlerinin BION yüzeyine karşı herhangi bir afinite gösteremediğini belirtmişlerdir. 6x-His etiketi sayesinde bağlanma ve nihayetinde saflaştırma işleminin olduğu sonucuna varılmıştır. Bu şekilde %91 oranında protein saflığını 1 litrelik üretimden elde etmişlerdir. Yine de 6x-His etiketli proteinlerin BION aracılığıyla saflaştırılabilmesi için adsorpsiyon ve yıkama adımlarında protein kaybının oldukça fazla olduğuna ve bunların azaltılması gerektiğine değinmişlerdir.

Başka bir çalışmada ise Park *et al.* 2018, dört farklı ferrit manyetik nanopartikül ile histidin etiketli GFP’nin immobilizasyonunun verimini araştırmışlardır. Negatif kontrol olarak demir (III) oksit MNP kullanılmıştır. Kullanılan diğerk partiküller, kobalt demir oksit, bakır demir oksit, nikel demir oksittir. Bunların arasında bakır ferrit MNP’nin en yüksek immobilizasyon verimliliğine neden olduğunu rapor etmişlerdir. Verim oranını, üretilen toplam GFP’nin %78’ini saflaştırabildiklerini belirtmişlerdir. 1 gram MNP’nin ortalama 3 mg protein bağlayabildiği sonucuna ulaşmışlardır. Ayrıca maksimum bağlanma veriminin bakır MNP ile olduğunu ve bu ürünün diğerk uygulama alanında umut vadeden bir araç olduğuna değinmişlerdir.

MATERYAL VE METOT

Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 1’de verildi.

Tablo 1. Kullanılan Cihazların İsimleri ve Markaları

Cihaz Adı	Marka
Çeker ocak	Tolkim
Çalkalayıcı inkübatör	IKA KS 3000i ve JSR
Hassas terazi	Shimadzu-ATX224
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph
İnkübatör	Memmert
Mikroplaka okuyucu (ELISA okuyucu)	Biotek Epoch
Işık mikroskobu	ZEISS Primo Star
Otoklav	HMC Hirayama
PCR cihazı	Applied Biosystems ProFlex
pH metre	Mettler Toledo
Saf su cihazı	Millipore Direct-Q 8 UV
Santrifüj	Beckman Coulter-Allegro X30R
SDS-PAGE sistemi	BIO-RAD
UV görüntüleme cihazı	BIO-RAD Gel DocTM XR+
Vorteks	Heidolph
-80°C dondurucu	Nuaire

Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerler

Bu tez çalışmasında kullanılan besiyerleri, kitler, protein markırları, antikorlar ve diğer kimyasallar ThermoFisher Scientific (Invitrogen), Merck, Sigma, Honeywell, Condalab, Neogen, Origene, Abcam, Fluka, Jena Bioscience, Oxoid ve Ampliqon firmalarından tedarik edildi.

Çalışmada kullanılan besiyeri, çözelti ve tamponların hazırlanışı

Bu tez çalışmasında kullanılan çözeltiler, besiyerleri ve tamponların hazırlanışı Tablo 2’de verildi.

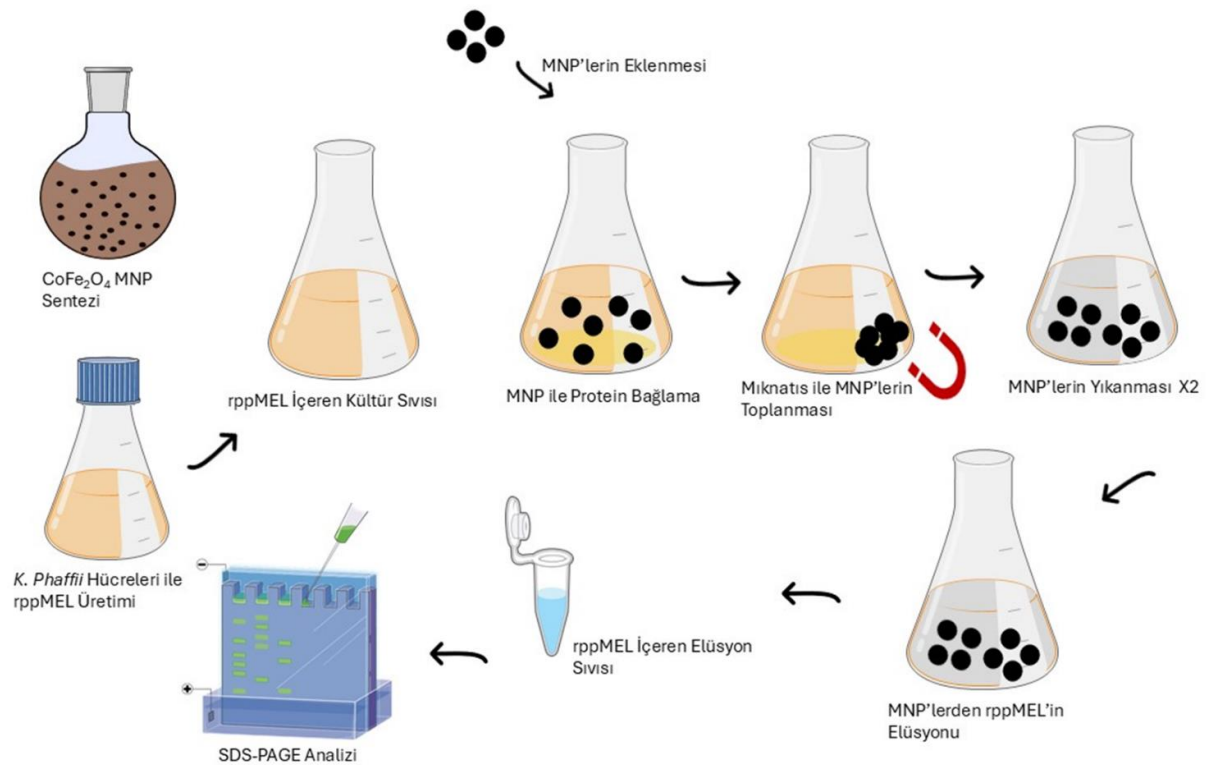
Tablo 2. Kullanılan Çözeltiler, Besiyerleri ve Tamponların Hazırlanışı

Adı	Hazırlanışı
YPD Agar Besiyeri	5 g YPD broth ve 2 g agar tartılarak 70 mL saf suda çözdürüldü. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı ve otoklavlandı.
BMGY Besiyeri	%2 pepton, %1 maya ekstraktı ve 1 M KH_2PO_4 (pH:6) içerecek şekilde hazırlandı ve otoklavlandı. Daha sonra, %1 gliserol ve %1,34 YNB steril filtreden geçirilerek eklendi.
BMMY Besiyeri	%2 pepton, %1 maya ekstraktı ve 1 M KH_2PO_4 (pH:6) içerecek şekilde hazırlandı ve otoklavlandı. Daha sonra, %0,5 metanol ve %1,34 YNB steril filtreden geçirilerek eklendi.
TCA Çözeltisi	3,5 mL saf suda 5 g TCA çözdürüldü. + 4 °C de saklandı.
%10 PER Çözeltisi	0,5 g amonyum persülfat tartıldı ve 4,5 mL saf suda çözdürüldü.
2X SDS-PAGE Yükleme Tamponu	0,5 M Tris-HCl (pH:6,8) çözeltisinden 2,5 mL alınıp üzerine 200 µL gliserol (%100), 0,4 µL β-merkaptoetanol, 0,02 g bromofenol blue ve 0,4 g SDS karıştırılıp son hacim steril saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Alikuatlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.
1 M Tris/HCl (pH:8,8 veya pH:6,8)	90 mL saf su içerisinde 12,1 g tris çözdürülerek 1 M HCl ile pH:8,8 ve pH:6,8'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
%30'luk Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi	12 g akrilamid ve 0,32 g bisakrilamid tartıldı ve 27,68 mL saf suda çözdürüldü.
%10'luk SDS	1 g SDS tartılıp 9 mL saf suda çözdürüldü.
1X SDS-PAGE Yürütme Tamponu	1,5 g tris, 7,2 g glisin ve 0,5 g SDS tartıldı ve 400 mL saf suya eklenerek çözdürüldü. Son hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
10X YNB (Yeast Nitrogen Base)	3,35 g YNB tartılıp 25 mL saf su ile çözdürülüp filtreden geçirilerek hazırlandı. + 4 °C'de saklandı.
1 M Potasyum Fosfat (KH_2PO_4) Tamponu	Bir miktar saf su içerisinde 13,6 g KH_2PO_4 çözdürüldü. KOH ile pH:6'ya ayarlanıp son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı ve otoklavlandı. +4 °C'de saklandı.
Tespit Çözeltisi	60 mL saf su, 30 mL %96'lık etanol ve 10 mL asetik asit karıştırılarak hazırlandı.
Redüksiyon Çözeltisi	4,8 g $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, 45 mL etanol ve 80 mL saf su ile karıştırıldı. Asetik asitle pH: 6'ya ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosülfat ve 3 mL glutaraldehit eklendi ve karıştırıldı. Son hacim saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.
Boyama Çözeltisi	100 mL saf su, 30 µL formaldehit karıştırıldı. Üzerine 100 mg gümüş nitrat eklenerek çözdürüldü.
Yıkama Çözeltisi 1	270 mL saf su içerisine 120 µL formaldehit ve 3,75 g Na_2CO_3 eklenerek çözdürüldü.

Tablo 2. (devamı)

Yıkama Çözeltisi 2	200 mL saf suya 1 mL gliserol ve 12,5 mL asetik asit eklendi. Son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
Saflaştırma Tamponu	1,5 g NaH_2PO_4 (50 mM) ve 7,3 g NaCl (0,5 M) tartıldı ve pH 8'e HCl/NaOH ile ayarlandı. Son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
İmidazol Tamponu	0,12 g NaH_2PO_4 (3M), 1,46 g NaCl (0,5 M), 10,21 g imidazol (3M) tartıldı. pH 6'ya HCl/NaOH ile ayarlandı. Son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
Yıkama Tamponu	50 mL saflaştırma tamponu ve 335 μL imidazol tamponu karıştırıldı. pH 8'e HCl/NaOH ile ayarlandı.
Elüsyon Tamponu	13,75 mL saflaştırma tamponu ve 1,25 mL imidazol tamponu karıştırıldı. pH 8'e HCl/NaOH ile ayarlandı.

Bu tez çalışması, CoFe_2O_4 MNP sentezi ve karakterizasyonu, *K. phaffii* ile rekombinant rppMEL üretimi ve sentezlenen CoFe_2O_4 MNP'ler ile rppMEL'in saflaştırılması için optimizasyon çalışmaları olmak üzere 3 basamak halinde planlandı. Aşağıdaki metotlar kullanılarak çalışmalar tamamlandı (Şekil 2).

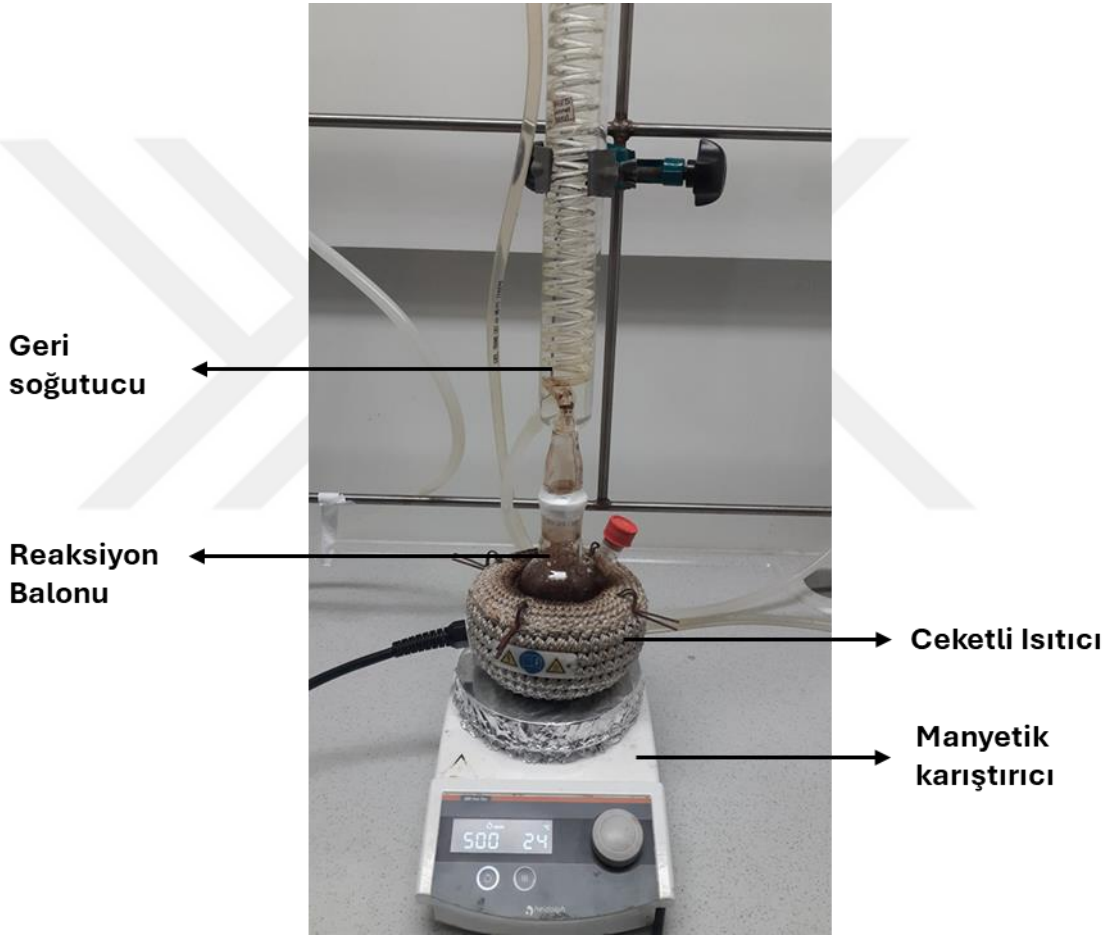
**Şekil 2.** Tez çalışmasının şematik gösterimi

CoFe_2O_4 MNP'lerin Sentezi ve Karakterizasyonu

CoFe_2O_4 MNP'lerin sentezi

Kobalt nanopartiküllerinin (CoFe_2O_4 MNP) üretimi için birlikte çöktürme yöntemi kullanıldı. 250 mL reaksiyon balonu içerisine 0,63 molar (M) 180 mL NaOH çözeltisi eklendi.

İnert atmosfer altında geri soğutucuya bağlı olarak kaynatıldı. Aynı zamanda 2,70 gram FeCl_3 tuzu 5 mL ultra saf su içerisinde çözüldü. 1,19 gram CoCl_2 tuzu 5 mL ultra saf su içerisinde çözüldü. Homojen hale getirilen tuz çözeltileri aynı anda ayrı ayrı şırınga yardımıyla kaynayan baz çözeltisinin içerisine eklendi. Çözeltinin renginin siyaha dönmesi görüldükten sonra 2 saat boyunca inert atmosfer altında 500 rpm çalkalama hızında reaksiyon devam ettirildi. 2 saatlik sürenin sonunda reaksiyon soğumaya bırakıldı. Elde edilen manyetik nanopartiküller güçlü bir mıknatıs olan neodyum mıknatıs yardımıyla toplandı. Daha sonra ortam pH'sını nötr hale getirmek için 3 defa ultra saf su ile yıkama yapıldı. Son olarak MNP'ler saflaştırmada kullanılmak üzere oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı (Fernandes de Medeiros *et al.* 2017).



Şekil 3. CoFe_2O_4 MNP sentez sistemi.

CoFe_2O_4 MNP'lerin karakterizasyonu

Sentezlenen CoFe_2O_4 MNP'lerin şekil ve boyutlarının belirlenebilmesi için TEM (Transmission Electron Microscopy; Geçirimli Elektron Mikroskobu) (Hitachi HighTech HT7700) kullanıldı. TEM görüntüleri, karbon kaplı bakır grid üzerine örnekler damlatılıp kurutulduktan sonra kaydedildi. MNP'lerin kristal yapılarının belirlenebilmesi amacıyla XRD (X-ray Diffraction; X Işını Difraksiyonu) (PANalytical Empyrean XRD) analizinden faydalanıldı. Ölçüm için CoFe_2O_4 MNP'ler toz haline getirildi. Yaklaşık 5 mg toz örnek,

cihazda gönderilen ışının malzeme üzerine düşme açısı olan Grazing açısı ($0,5^{\circ}$ - 3°) ölçümü ile 2θ açısında yansıyan ışınlarla oluşan difraksiyon desenlerinin ölçümü alındı. Ölçümler Atatürk Üniversitesi, DAYTAM (Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi)'da uzman desteği ile gerçekleştirildi.

Rekombinant Prepromelittin (rppMEL) Üretimi

Rekombinant prepromelittinin ekstraselüler üretimi için laboratuvarımızda bulunan daha önce elde edilmiş, genomunda alkol oksidaz promotörünün aşağı akış (downstream) bölgesinde ppMEL genini taşıyan rekombinant *K. phaffii* hücreleri (pPICZ α A-ppMEL/X33) kullanıldı (Taskin *et al.* n.d.; US20220220491A1.pdf, n.d.).

Stoktan alınan maya hücreleri YPD katı besiyerinde büyütüldükten sonra öze ile toplanarak BMGY besiyerine inoküle edildi. 30°C 225 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bir gece büyümeye bırakıldı. Yaklaşık 18-20 saatlik inkübasyonun ardından maya hücreleri 4000 g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek toplandı. Ortamdaki gliserolü uzaklaştırmak için 4000 g'de 5 dakika santrifüj ile çöktürülen mayalar steril saf suyla yıkandı. Tekrar 4000 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet, süspanse edilerek BMMY besiyerine inoküle edildi. Kültür ortamına her 24 saatte bir %0,5 saf metanol ilave edildi. 72 saat sonunda kültür 4000 g'de 5 dakika santrifüj yapılarak rekombinant protein içeren süpernatant toplandı.

Rekombinant Proteinin Manyetik Nanopartiküllerle Saflaştırılması ve Optimizasyon Çalışmaları

Sentezlenen manyetik nanopartiküller (MNP) saflaştırmada kullanılmaları için en uygun şartların belirlenmesi amacıyla optimizasyon çalışmaları yapıldı. MNP ve rppMEL peptidini önce bağlayıp daha sonra elüe edebilmek için uygun MNP miktarı, süre ve tamponda kullanılan imidazol/EDTA konsantrasyonları denendi.

MNP miktar optimizasyonu için öncelikle yüksek konsantrasyonlarda MNP kullanıldı. Bunun için 100, 200, 300, 400 ve 500 mg/mL konsantrasyon şartları denendi. Bu şartların yanı sıra 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 mg/mL konsantrasyonları denendi. Maliyeti düşürmek amacıyla en düşük konsantrasyon olan 10 mg/mL konsantrasyon ile diğer optimizasyon çalışmalarına devam edildi.

Saflaştırma işleminde proteinlerin MNP'lere bağlanması için uygun sürenin belirlenebilmesi amacıyla hem literatürdeki veriler hem de ticari saflaştırma kitlerinin süreleri göz önüne alınarak bir süre aralığı belirlendi. Bu bağlamda 2, 5, 10, 15 ve 30 dakika süre ile 10

mg/mL MNP ve protein bağlama süreleri denendi. Daha sonra 10 mg/mL MNP ve 2 dk protein bağlama süresi ile diğer optimizasyon çalışmaları yapıldı.

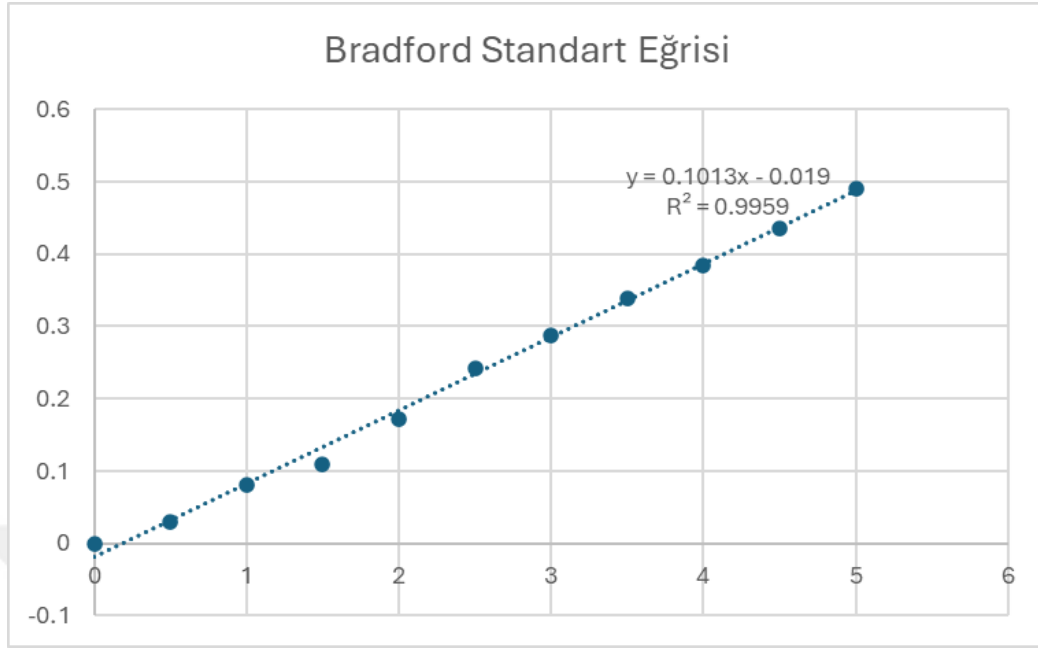
Bağlama basamağının ardından hem yıkama yapılarak hem de yıkama yapılmadan elüsyonlar toplanarak sonuçlara bakıldı. Ayrıca yıkama basamağında kullanılan tampona 50, 100, 150 ve 200 mM olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda imidazol eklendi. Diğer yandan, yıkama tamponuna 10 ve 100 mM EDTA eklendi. Son olarak elüsyon tamponuna 200 ve 300 mM imidazol eklendi. Yapılan tüm çalışmalar sonrasında örnekler SDS-PAGE’de yürütüldü ve protein bantları gümüş boyama ile görünür hale getirildi.

SDS-PAGE analizi

Üretilen rppMEL ile optimizasyon çalışmaları sırasında elde edilen protein örnekleri ile SDS-PAGE analizi yapıldı. Bunun için bazı örnekler TCA (trikloroasetik asit) ile çöktürme yapılarak hazırlanırken bazı örnekler 20 µg protein içerecek şekilde kullanıldı. TCA ile protein çöktürme işlemi için rppMEL içeren kültür sıvısından 1 mL alındı ve üzerine Tablo 2’de tarif edildiği gibi hazırlanan TCA çözeltisinden 250 µL eklendi. Hazırlanan karışım +4°C’de 10 dakika inkübe edildikten sonra 5 dakika 13.000 g’de santrifüj edildi. Süpernatantı ortamdan uzaklaştırdıktan sonra yıkama adımı için peletin üzerine 200 µL soğuk aseton eklendi. 5 dakika 13.000 g’de santrifüj işlemi tekrarlandı. Yıkama adımı bir kere daha aynı şekilde tekrarlandı. Yıkama işleminden sonra asetonun tamamen uzaklaşması için örnekler 95°C’de bekletildi (Ünver, 2014).

Kuyuya yüklenecek protein miktarı, Bradford protein tayin metodu ile hesaplandı. Bu metot, Bradford reaktifi kullanılarak reaktif ve proteinlerin tepkimeye girerek oluşturduğu kompleksin absorbansını ölçmeye dayanan protein tayin yöntemidir. Eğer bir çözeltide protein varsa boya ile kompleks oluşturacak ve proteinin yoğunluğuna göre renk gittikçe maviye dönmektedir. Oluşan kompleksin absorbansı çözeltinin grafiğindeki denklemde yerine yazılarak hesaplanır. Çözeltinin denklemi her çözeltiye göre değişeceğinden öncelikle standart grafik oluşturulması gerekir. Bunun için deneye başlamadan önce Bradford reaktifi hazırlandı. 96 kuyulu plakalar kullanıldı. Hazırlanan Bradford reaktifi 96 kuyulu tabakalar için optimize edilerek denklem hazırlandı. Bradford reaktifi (Bradford, 1976) protokole göre hazırlandıktan sonra 96 kuyulu plaka için 10 farklı artan konsantrasyonlarda BSA çözeltisi hazırlandı. 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/mL konsantrasyonlarında BSA çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti 10 kat saf su ile seyreltilti. Her bir kuyuya 245 µL Bradford reaktifi ve 5 µL hazırlanan ve seyreltilen BSA çözeltisi eklendi. Son hacim 250 µL oldu. Bu işlem her bir BSA konsantrasyonu için 5 tekrarlı olarak yapıldı. Her bir kuyuda birkaç defa pipetleme yapıldı. 10 dakika boyunca karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Süre dolduktan sonra 595 nm dalga boyunda

ELISA tabaka okuyucuda absorbans değerleri 3 kere okutma yapılarak alındı. Elde edilen veriler kullanılarak Bradford standart grafiği (Şekil 4) çizildi.



Şekil 4. Hazırlanan Bradford standart eğrisi

Jel hazırlamak için öncelikle gerekli camlar ve diğer aparatlar temizlenerek hazır hale getirildi. Cam plakalar arasına öncelikle ayırma jeli eklenerek polimerleşmesi beklendi. Ayırma jeli içeriği: 2500 µL 1M Tris-HCl tamponu (pH:8,8), 2200 µL akrilamid bisakrilamid, 100 µL %10'luk SDS, 65 µL TEMED, 1565 µL saf su ve 35 µL %10'luk PER çözeltisi olacak şekilde hazırlandı. Plakaların arasına eklenen jelin üzerine izopropanol eklenerek kabarcık oluşması engellendi ve jelin üst kısmının düz bir sıra halinde sabitlenmesi sağlandı. Ayırma jeli polimerleştikten sonra izopropanol ortamdan uzaklaştırılarak üzerine yığıma jeli eklendi. Yığıma jeli içeriği: 220 µL 1 M Tris-HCl tamponu (pH:6,8), 400 µL akrilamid-bisakrilamid, 15 µL %10'luk SDS, 15 µL TEMED, 1225 µL saf su ve 20 µL %10'luk PER çözeltisi olacak şekilde hazırlandı. Jel polimerleşmeden üzerine tarak yerleştirilerek yine polimerleşmesi beklendi. Tamamen polimerleşen jel kasetten çıkarılarak yürütme tankına alındı ve üzerine yürütme tamponu ilave edildi. Yürütme tamponu içerisindeyken tarak çıkarıldı ve kuyuların tampon ile ıslanması sağlandı. Önceden hazırlanan örnekler 18'er µL olacak şekilde kuyulara yüklendi. Yürütme tankı kontrol ünitesine bağlandıktan sonra önce 60 V'de 30 dakika yürütme yapılarak örneklerin yığıma jeli içerisinde aynı hizaya gelmeleri sağlandı. Daha sonra akım 120 V'ye ayarlanıp 60 dakika boyunca oda sıcaklığında örneklerin jelde yürüyerek ayrılması sağlandı (Laemmli, 1970).

Jelde yürütülen örneklerin görüntülenmesi için gümüş boyama yöntemi kullanıldı. Bunun için süre sonunda cam plakalar arasındaki jel alınarak saf suyla yıkandı. Daha sonra

tespit çözeltisine alınarak 30 dakika oda sıcaklığında yavaşça çalkalamaya bırakıldı. Süre dolduktan sonra jel saf suyla çalkalandı ve sonrasında redüksiyon çözeltisine alınarak 30 dakika yavaşça çalkalamaya bırakıldı. Süre dolduktan sonra jel 3 defa saf suyla 5'er dakika çalkalandı. Sonrasında boyama çözeltisine alınarak 20 dakika boyunca yavaşça çalkalandı. Boyamadan sonra jel yine 3 defa saf suyla çalkalandı ve yıkama 1 çözeltisine alındı. Yavaşça çalkalanırken bant varlığı gözlemlendi. Sonrasında yıkama 2 çözeltisine alınarak jelin zemin rengi açılıp bantlar sabitlenene kadar beklendi. En son aşamada jel saf su içerisine alındı. Görüntüleme sistemi kullanılarak jel görüntüldü (Ünver, 2014) (Bu aşamada kullanılan çözeltiler Tablo 2'de verildi).

Ticari Nanopartikül Saflaştırma Kiti ile Protein Saflaştırma

Laboratuvarda sentezlenen CoFe_2O_4 MNP'lerin protein saflaştırma etkinliğini karşılaştırabilmek için iki farklı ticari protein saflaştırma kiti kullanıldı. Bunlardan ilk olarak histidin etiketli proteinleri ayırmak için manyetik boncuk tabanlı MagneHis™ saflaştırma kiti (Promega, V8500) kullanılarak saflaştırma yapıldı. Kit protokolüne göre 1 mL kültür sıvısı için 0,03 g NaCl tartıldı ve içerisine eklendi. Vorteks kullanılarak tuz ve kültür sıvısı iyice karıştırıldı. Üzerine 27,3 μL MagneHis™ MNP eklendi. 10 defa alt-üst edilerek karışımı sağlandı. 2 dakika oda şartlarında inkübe edildi. Sonrasında 30 saniye boyunca MNP'ler mıknatısla toplandı. MNP'ler mıknatısa toplandıktan sonra geriye kalan sıvı uzaklaştırıldı. 150 μL bağlama-yıkama tamponu MNP'lerin üzerine eklendi. Ek olarak 0,03 g NaCl eklendi. Birkaç defa alt-üst edilerek ortamın karışması sağlandıktan sonra tekrar 30 saniye boyunca MNP'ler mıknatısla toplandı. Geriye kalan sıvı uzaklaştırıldı. Bu şekilde yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı. Elüsyon için MNP'lerin üzerine 100 μL elüsyon tamponu eklendi. 2 dakika boyunca oda şartlarında inkübe edildi. Süre sonunda MNP'ler mıknatısla 30 saniye boyunca toplandı. Elde edilen elüsyon sıvısı SDS-PAGE için $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletildi.

Ticari Nikel Şelatlayıcı Reçine ile Protein Saflaştırma

Protein saflaştırma etkinliğini karşılaştırabilmek için bir diğer ticari kit olarak nikel şelatlayıcı reçine (Probond™, K85001) kullanıldı. Bu protein saflaştırma kiti rekombinant proteindeki histidin etiketine afinite gösteren nikel şelatlayıcı reçine tabanlı süspanse haldeki kolon dolgu maddesi halinde bulunmaktadır. Kit protokolüne göre öncelikle kolonu hazırlamak için 10 mL'lik saflaştırma kolonu içerisine 2 mL Probond™ nikel şelatlayıcı reçine ve 6 mL saf su ilave edildi. Kolon alt-üst edilerek karışımın iyice süspanse olması sağlandı. Reçinenin kolona yerleşmesi beklendikten sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Daha sonra kolonun dengelenmesi için 8 mL dengeleme tamponu eklendi. Kolon dolgu maddesinin

iyice süspanse olabilmesi için alt-üst edildi. Tekrar yer çekimi ile reçinenin kolona yerleşmesi beklendi. Bu işlem iki defa tekrarlandı. Kolon dengelenip saflaştırma için hazır hale getirildikten sonra, üretim yapıldıktan 72 saat sonra 4000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilip toplanan kültür sıvısı Amicon filtre (10 kDa, Milipore) ile konsantre edildi. Konsantre haldeki kültür sıvısı (8 mL) kolona yüklendi. 40 dakika boyunca nikel şelatlayıcı reçine ile karışımı sağlandı. Süre dolduktan sonra yer çekimiyle reçinenin kolona yerleşimi sağlandı. Üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi için kolona 8 mL yıkama tamponu ilave edildi. Karışım alt-üst edilerek süspanse hale getirildikten sonra kolona yerleşmesi beklendi ve üstteki sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Bu işlem 3-4 defa tekrarlandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra kolona 10 mL elüsyon tamponu ilave edildi. Karışım alt-üst edilerek homojen hale getirildikten sonra dik konuma getirilip reçinenin kolona yerleşmesi beklendi. Üstte kalan rppMEL içeren elüsyon sıvısı farklı bir tüpe alındı. Deney boyunca kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı Tablo 2’de verildi.

ARAŞTIRMA BULGULARI

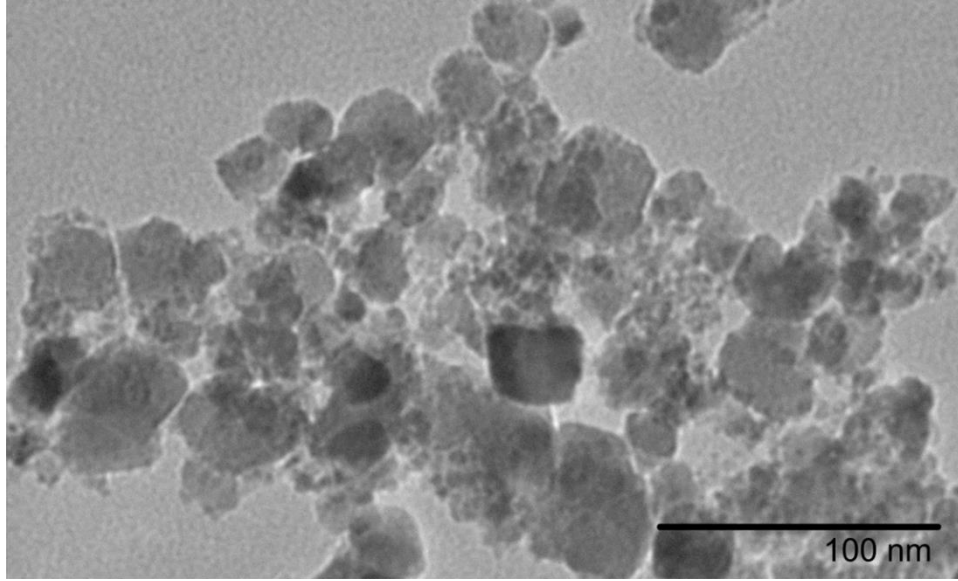
CoFe₂O₄ MNP Sentezi ve Karakterizasyonu

CoFe₂O₄ MNP'lerin sentezi

CoFe₂O₄ MNP'lerin üretimi için birlikte çöktürme yöntemi kullanıldı. İnert atmosfer altında baz ve tuzların karışımı sağlanarak kaynamaya bırakıldı. Çözeltinin renginin siyaha dönmesi görüldükten sonra reaksiyon süresi başlatıldı. 2 saatlik sürenin sonunda reaksiyon soğumaya bırakıldı. Elde edilen CoFe₂O₄ MNP'ler mıknatısa yaklaşık 1 dakika içerisinde toplandı. Reaksiyon sonucunda yaklaşık 1 gram CoFe₂O₄ MNP elde edildi.

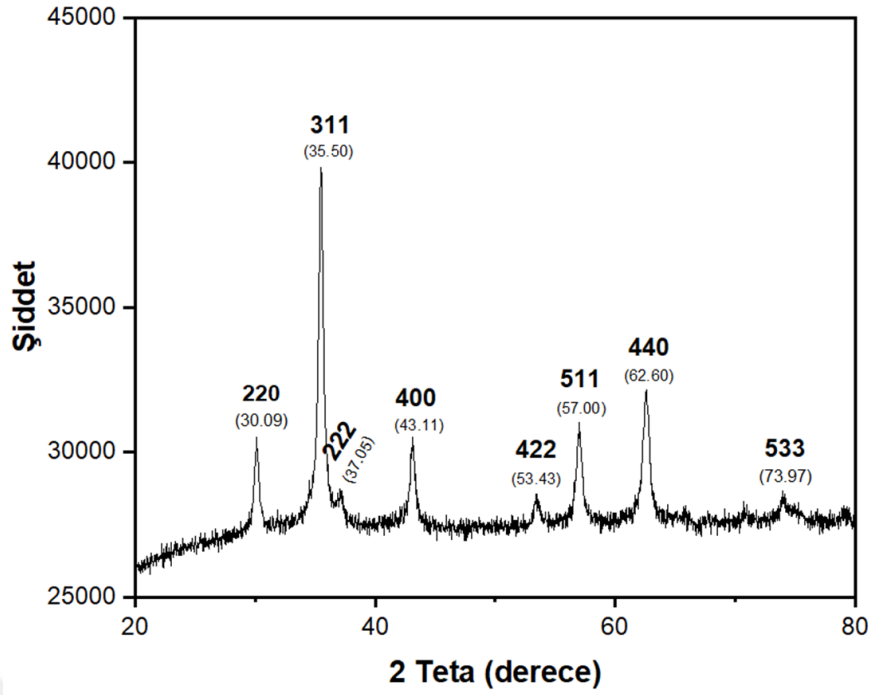
CoFe₂O₄ MNP'lerin karakterizasyonu

Mıknatıs varlığında manyetik özellik gösteren CoFe₂O₄ MNP'ye ait TEM görüntüsü Şekil 5'te verildi. Bu sonuca göre CoFe₂O₄ MNP'lerin küresel yapıda olduğu görüldü.



Şekil 5. CoFe₂O₄ MNP'lere ait TEM görüntüsü (Skala: 100 nm).

Sentezlenen CoFe₂O₄ MNP'lere ait X ışını kırınım deseni Şekil 6'da verildi. Bu sonuç literatür ile karşılaştırıldığında elde edilen X ışını kırınım deseninin CoFe₂O₄ MNP'lere ait olduğu doğrulandı.



Şekil 6. CoFe₂O₄ MNP'lere ait X ışını kırınım deseni

rppMEL Üretimi

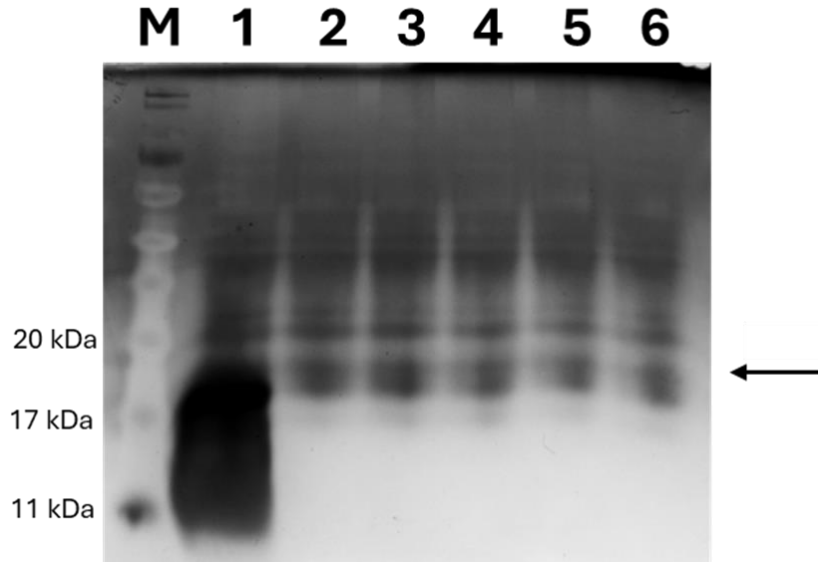
Genomunda ppMEL geni olduğu bilinen mayalar ile üretim yapıldı. Üretim 72 saat boyunca devam ettirildi. Kontrol olarak pPICZαA vektörünü içeren hücreler kullanıldı. Besiyerine mayaları aşıladıktan her 24 saat sonra %0,5 metanol eklenerek indükleme yapıldı. 72 saat sonunda santrifüj ile örnekler toplandı. Üretilen protein hücre dışına salgılandığı için pelet dışında kalan kültür sıvısı deneylerde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

CoFe₂O₄ MNP ile rppMEL Saflaştırma Optimizasyon Çalışmaları

MNP ile rppMEL saflaştırmak için öncelikle uygun şartlar belirlendi. Bunun için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Saflaştırma için uygun MNP konsantrasyonu, optimum sürenin belirlenmesi, yıkama basamağındaki imidazol ve EDTA konsantrasyonunun saflaştırma üzerindeki etkisine bakıldı.

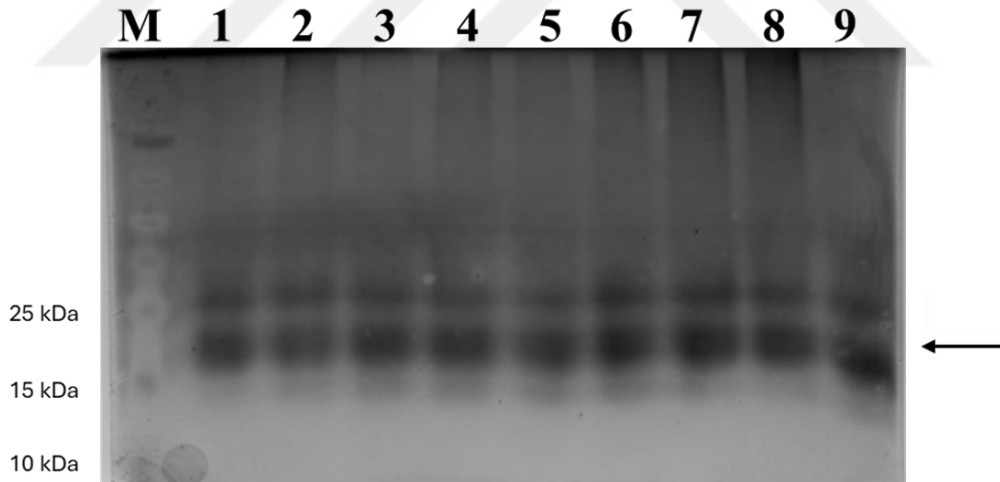
CoFe₂O₄ MNP konsantrasyonu

Literatür araştırmasına dayalı olarak öncelikle en geniş MNP konsantrasyon aralığı denendi. Bunun için 100, 200, 300, 400 ve 500 mg/mL MNP kullanılarak kültür sıvısından protein saflaştırma yapıldı. SDS-PAGE sonrasında yapılan gümüş boyama sonucu elde edilen görüntü Şekil 8'de verildi.



Şekil 7. Artan konsantrasyonlarda CoFe_2O_4 MNP denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü (M: Markır, 1: rppMEL içeren kültür sıvısı, 2-6: sırasıyla; 100, 200, 300, 400 ve 500 mg/mL CoFe_2O_4 MNP ile saflaştırma sonucu elde edilen elüsyon sıvıları)

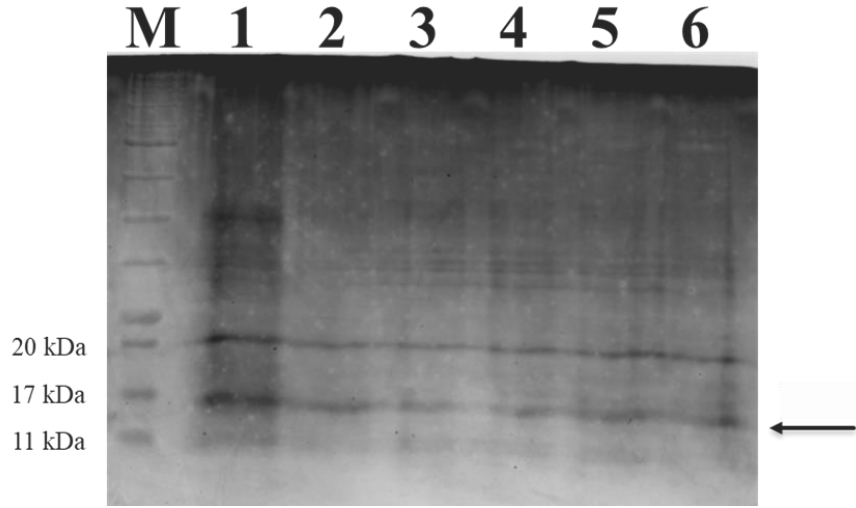
Yukarıda denenen konsantrasyonların yanı sıra 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 mg/mL CoFe_2O_4 MNP konsantrasyon aralığı da denendi. SDS-PAGE sonrasında yapılan gümüş boyama sonucu elde edilen görüntü Şekil 9’da verildi.



Şekil 8. Artan konsantrasyonlarda CoFe_2O_4 MNP denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü (M: Markır, 1-9 sırasıyla; 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 mg/mL MNP ile saflaştırma sonucu elde edilen elüsyon sıvıları)

Protein bağlama süresi optimizasyon çalışması

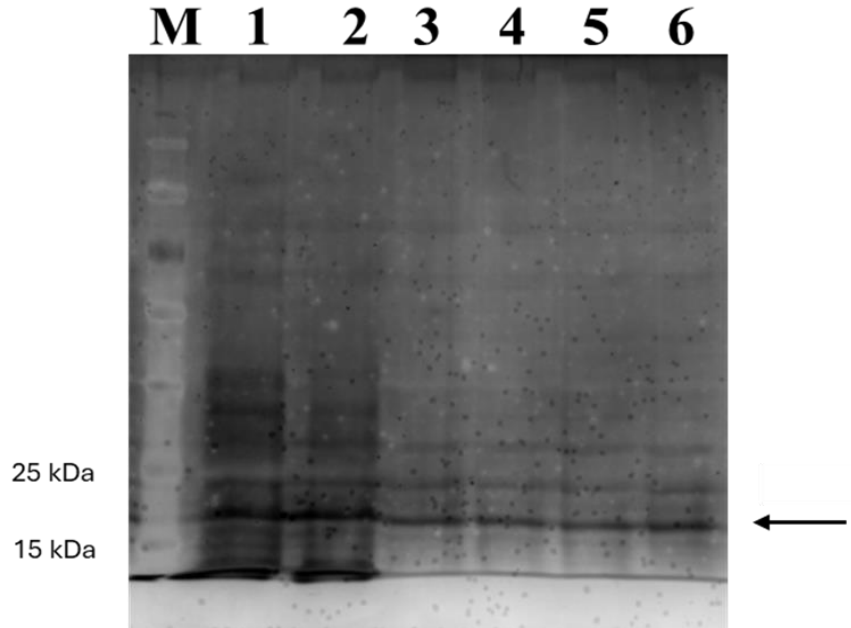
rppMEL ve CoFe_2O_4 MNP’nin bağlanma süresi olarak adlandırılan inkübasyon süresi belirlendi. 10 mg/mL CoFe_2O_4 MNP ile 2, 5, 10, 15 ve 30 dakika olmak üzere farklı süreler denendi. SDS-PAGE sonrasında yapılan gümüş boyama görüntüsü Şekil 9’da verildi.



Şekil 9. CoFe₂O₄ MNP ile ppMEL bağlama süresi denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü (M: Markır, 1: rppMEL içeren kültür sıvısı, 2-6 sırasıyla; 2, 5, 10, 15 ve 30 dk MNP ile saflaştırma sonucu elde edilen elüsyon sıvıları)

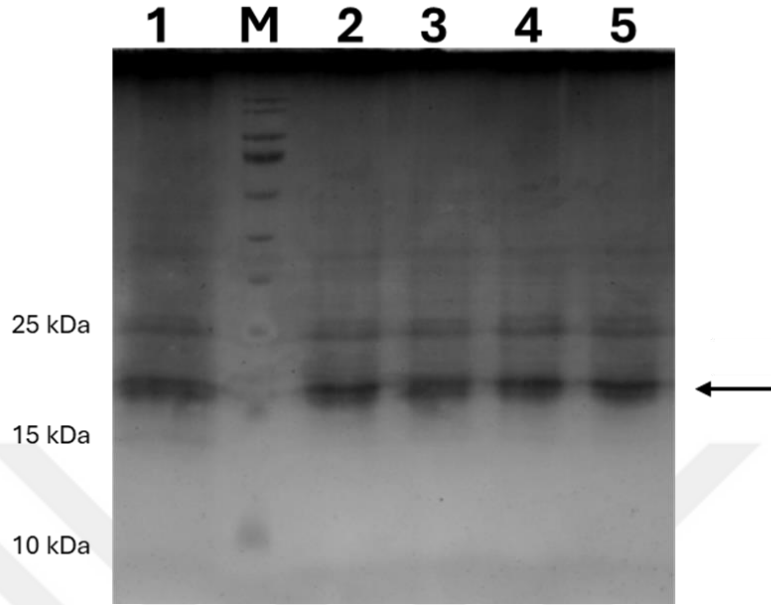
Yıkama tamponuna eklenen imidazol ve EDTA'nın etkisi

Yıkama basamağında kullanılan tampon içerisine eklenen imidazol konsantrasyonunun saflaştırma üzerine etkisini görmek amacıyla yıkama tamponuna farklı konsantrasyonlarda imidazol eklenerek protein saflaştırma yapıldı. Deney sonunda örnekler SDS-PAGE ile yürütüldü. Sonrasında gümüş boyama ile bantlar görüntülendi. Ayrıca bu deneyde kültür sıvısını Amicon filtreden (10 kDa, Milipore) geçirmeden önce ve geçirdikten sonra saflaştırma üzerine etkisine de bakıldı. SDS-PAGE sonrasında yapılan gümüş boyama sonucu elde edilen görüntü Şekil 10'da verildi.



Şekil 10. CoFe₂O₄ MNP'lerin yıkama basamağında tampona eklenen imidazol konsantrasyonunun saflaştırma üzerine etkisi denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü (M: Markır, 1 ve 2 sırasıyla; filtreden geçirilmeyen ve geçirilen rppMEL içeren kültür sıvısı, yıkama tamponuna eklenen imidazol konsantrasyonu, 3-6 sırasıyla; 50, 100, 150 ve 200 mM imidazol).

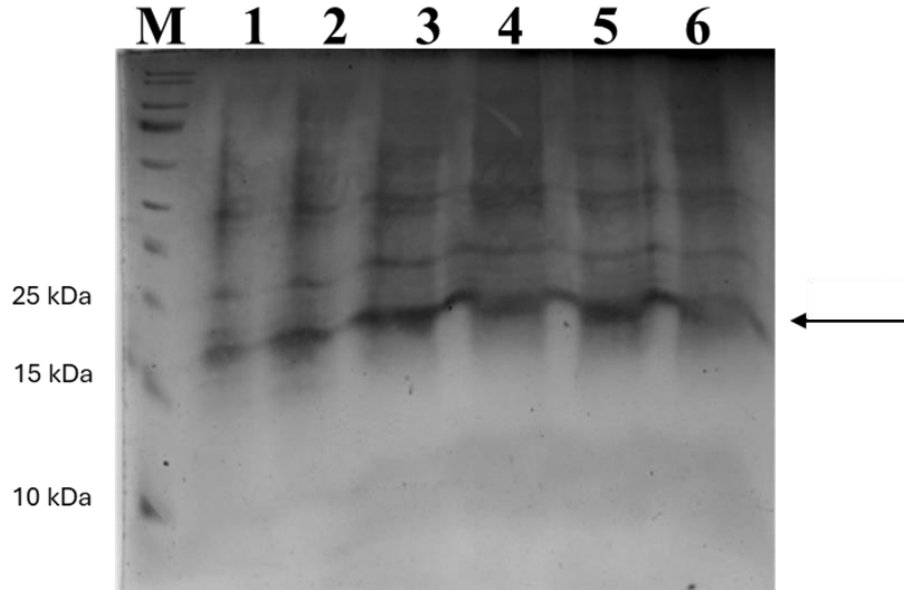
Yıkama tamponuna imidazolden farklı olarak 10 ve 100 mM konsantrasyonunda EDTA eklenerek saflaştırma üzerine etkisine de bakıldı. Saflaştırma işlemi sonrasında yapılan SDS-PAGE ve gümüş boyama sonucu elde edilen görüntü Şekil 11’de verildi.



Şekil 11. Saflaştırma tamponuna eklenen EDTA ve imidazol konsantrasyonunun saflaştırma üzerine etkisi ve karşılaştırılması denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü (1: rppMEL içeren kültür sıvısı, M: Markır, 2-3 sırasıyla; 10 ve 100 mM EDTA ile yıkama yapılan elüsyon sıvısı, 4-5 sırasıyla; 200 ve 300 mM imidazol ile yıkama yapılan elüsyon sıvısı)

Ticari Nanopartikül Saflaştırma Kiti ile Protein Saflaştırma

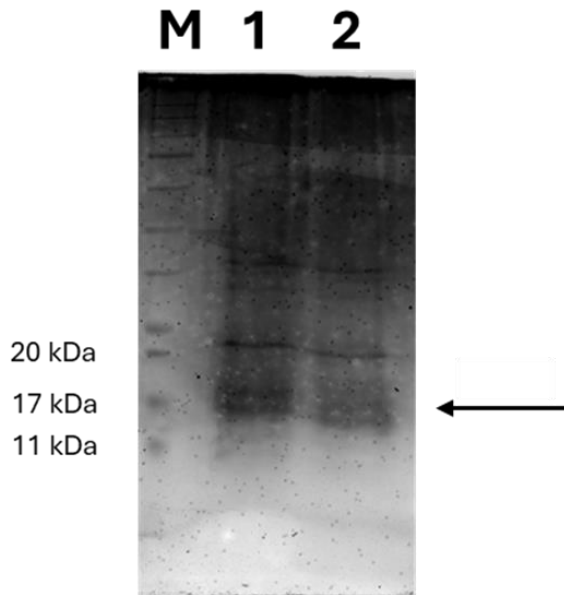
Laboratuvarımızda sentezlediğimiz CoFe_2O_4 MNP’ler ile yapılan saflaştırmanın verimini karşılaştırmak amacıyla ticari nanopartikül kullanılarak rekombinant protein saflaştırıldı. Bunun için MagneHis™ saflaştırma kiti (Promega, V8500) kullanılarak deneme yapıldı. Kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilen deney sonrası elde edilen örnekler SDS-PAGE’de yürütüldükten sonra gümüş boyama ile görüntülendi. Jel görüntüsü Şekil 12’de verildi.



Şekil 12. Ticari saflaştırma kiti kullanarak rppMEL içeren kültür sıvısından saflaştırma denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü (M: Markır, 1: rppMEL içeren kültür sıvısı, 2: MNP ile protein bağlama sonrası alınan örnek, 3-4-5 sırasıyla; 1., 2. ve 3. yıkama örneği, 6: Saflaştırma sonunda elde edilen elüsyon sıvısı)

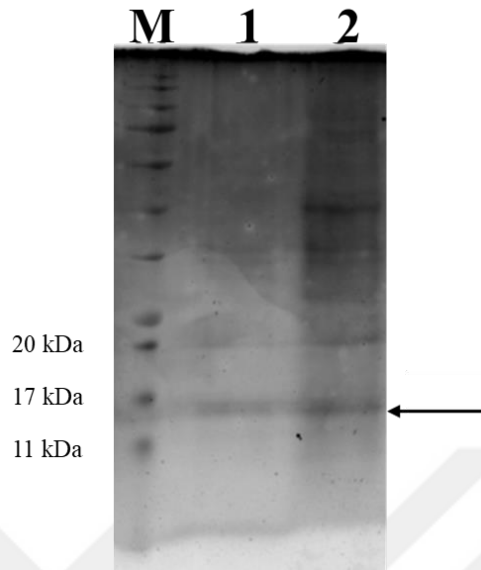
Ticari Nikel Reçine (Invitrogen, K85001) ile Protein Saflaştırma

Bu tez çalışmasında sentezlenen CoFe_2O_4 MNP'ler ile yapılan deney verimini karşılaştırma amacıyla ticari nikel şelatlayıcı reçine kullanarak deneme yapıldı. Kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilen deney sonucunda elde edilen elüsyon sıvısı SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra gümüş boyama ile görüntülendi. Jel görüntüsü Şekil 13'te verildi.



Şekil 13. Ticari nikel şelatlayıcı reçine kullanarak yapılan saflaştırma denemesine ait SDS-PAGE görüntüsü (M: Markır, 1: rppMEL içeren kültür sıvısı, 2: Elüsyon sıvısı)

Tüm optimizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar da göz önüne alınarak 10 mg/mL CoFe₂O₄ MNP kullanılarak rppMEL içeren kültür sıvısından saflaştırma yapıldı. SDS-PAGE sonrasında yapılan gümüş boyama sonucu elde edilen görüntü Şekil 14’te verildi.



Şekil 14. rppMEL’in MNP’lerle saflaştırılmasına ait SDS-PAGE görüntüsü (M: Markır, 1: 20 µg protein içeren elüsyon sıvısı, 2: 20 µg protein içeren kültür sıvısı)

Yapılan optimizasyon çalışmalarından sonra belirlenen şartlarda saflaştırma yapıldı. Buna göre 10 mg/mL CoFe₂O₄ MNP, 2 dakika protein bağlama süresi ve imidazol içeren elüsyon tamponu kullanıldı. Elüsyon tamponu olarak ticari nikel reçine kolonu için kitin (Invitrogen K85001) önerdiği içeriklerde tampon hazırlandı ve kullanıldı. Tamponların hazırlanışı Tablo 2’de verildi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler sayesinde farmasötik özellikte birçok ürün kolaylıkla ve istenilen miktarlarda üretilebilmektedir. Bu teknolojinin temeli doğal şartlarda bir araya gelmesi mümkün olmayan özelliklerin elde edilebilmesidir. Bundan kaynaklı olarak rekombinant DNA teknolojisinin uygulanabileceği farklı mikroorganizmalar çalışılmıştır. İstenilen özelliklere ve ürünün kullanılacağı alana göre düzenlenecek olan protein, konakçısına göre seçilir. Konakçı seçiminin önemi son ürünün özelliklerini belirler. Bu alanda farmasötik protein üretimi için genellikle mayalar tercih edilmektedir. Mayaların tercih edilmesinin sebebi istenilen genetik modifikasyonlara izin verebilmesi, GRAS statüsüne uygun olması, posttranslasyonel modifikasyonların ökaryot canlılara uyum olması gibi sebepler etkili olmaktadır (H. Kim *et al.* 2015). Bu tez çalışması kapsamında *K. phaffii* mayası konakçı olarak kullanılarak biyofarmasötik potansiyeli olan histidin etiketli rppMEL üretilmiştir.

Son zamanlarda popüler hale gelen MNP'lerin farklı kullanım alanları rapor edilmiştir. Örneğin gen aktarım yöntemi olan transfeksiyonun etkili olabilmesi için yüksek verimliliğe sahip olması, düşük hücre toksisitesine sahip olması, hücre fizyolojisi üzerinde minimum etkiye sahip olması, kullanımı kolay ve tekrarlanabilir olması istenir. Bu bağlamda manyetofeksiyon olarak adlandırılan yöntemde, MNP aracılığıyla DNA'nın hedef hücre içine alınması için MNP ve manyetik alan kullanılır (Kalakenger *et al.* 2024; Zhao *et al.* 2017). MNP'lerin yüzeyinin modifikasyona uygun olması, sentez işleminin basit olması, boyutlarının küçük olması sebebiyle hücre içerisine kolayca alınabilmesi MNP'lerin gen aktarımında kullanılması için sayılabilecek özelliklerdir (Kalakenger *et al.* 2024; Yıldız *et al.* 2021).

MNP'lerin kullanım alanlarından bir diğeri ise MNP'lerin bulunduğu çevredeki hücre veya dokuları alternatif bir manyetik alan altında (AMF) ısıtma işlemi olan manyetik hipertermidir (MHT). Manyetik hipertermi, kanser tedavisinde kemoterapi gibi diğer tedavilere direnç geliştiren farklı kanser türleri için ümit verici bir tedavi yöntemi olarak son zamanlarda karşımıza çıkmaktadır. MHT ile kanser hücreleri tarafından bir miknatıs yardımıyla hücre içine alımı sağlanan MNP'ler manyetik alan altında ısıtılarak hastalığın tedavisine yönelik bir yaklaşım sağlar (Acar *et al.* 2022).

İmmobilizasyon, temelde tutuklama, hareketsizleştirme anlamına gelen hücre, mikroorganizma veya enzimlere uygulanabilen bir yöntemdir. Özellikle endüstride enzimler immobilize edilerek kullanılmaktadır. Bu yöntemin en önemli avantajı immobilize edilen hücre,

mikroorganizma veya enzimin çevre ile olan etkileşimi sınırlamasıdır. İmmobilizasyon için MNP'lerin kullanımı da oldukça avantajlı bir seçimdir. İmmobilize edilen enzimin bulunduğu ortama sızması oldukça düşük seviyededir. Ayrıca enzim kaybına karşı koruma sağlar, yüksek mekanik direnç, termal kararlılık, kimyasal ve mikrobiyal bozulmaya karşı direnç sağlaması bu yöntemin diğer avantajları arasında sayılabilir. Bu yöntemin en önemli avantajı ise enzimin ortamdan ayrılması sağlamak için manyetik alanın kullanılabilmesidir (Dagci *et al.* 2024; Díaz-Hernández *et al.* 2018; Góral *et al.* 2023).

Saflaştırma alanında da MNP'ler sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Saflaştırılmak istenen ürünün özelliğine göre MNP'ler istenilen şekilde modifiye edilebilir. Bu amaçla saflaştırılmak istenen ürün özellikle proteinler için üretilirken bir etiket ile konjuge olarak üretilmektedir (Unver *et al.* 2018). Bu etiketlerden 6x-His etiketi sıklıkla kullanılmaktadır. Histidin etiketine afinite gösteren özellikle nikel, kobalt ve bakır gibi iyonlar MNP sentezinde yüzey kaplama olarak kullanılmaktadır. Metal iyonlarla şelat oluşturan MNP'ler histidin etiketli proteinlerin immobilizasyonunu ve tek adımda saflaştırılmasını sağlar (Dagci *et al.* 2024; Zeng *et al.* 2020).

MNP'lerin boyutlarının küçük olması, sentezlerinin basit olması, reaksiyon sonunda veriminin yüksek olması gibi sebeplerden dolayı ekonomik olarak potansiyel ürün olmasına neden olur (Zhou *et al.* 2018). Bu sayılan avantajlarından dolayı özellikle saflaştırma alanında sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Zhou *et al.* 2017, 2018). Ticari olarak da üretilmeye başlanılan MNP'ler özellikle proteinleri saflaştırmak için oldukça avantajlı ve kolay bir araçtır. Kullanılacak olan MNP çalışmaya göre yüzeyi modifiye edilerek (Zeng *et al.* 2020; Zhou *et al.* 2017, 2018) kullanılabilirken yüzeyinde sadece katyonlar olacak şekilde sentezlenerek de direkt olarak kullanılabilir (Park *et al.* 2018; Schwaminger *et al.* 2019). Bu tez çalışmasında sentezlenen partiküller, yüzeyinde kobalt iyonları yani katyonlar olacak şekilde çekirdek halinde sentezlendi ve kullanıldı.

Oldukça küçük boyutlarda sentezlenebilen CoFe_2O_4 MNP'ler saflaştırma esnasında küçük boyutlu protein hedefine bağlanabilmesi için ideal bir seçimdir (Aygaz *et al.* 2015). Bu tez çalışmasında boyutu yaklaşık 20-25 nm olarak hesaplanan MNP'ler elde edildi. Birlikte çöktürme yöntemine göre sentezlenen CoFe_2O_4 MNP'lerin TEM görüntülerinin literatürde birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlenen MNP'lerin TEM görüntüleri (Muthukumaran & Philip, 2024) ile doğrusalılık gösterdiği görülmüştür. Aynı şekilde XRD analizinde elde edilen desen literatür bilgisi ile birbirini doğrulamaktadır (Mahhouti *et al.* 2019).

Manyetik ayırma teknikleri piyasadaki diğer ayırma yöntemlerine göre hem hızlı hem de oldukça verimli bir yöntemdir. Bunun yanında manyetik ayırma tekniklerinde hücreler için

zararlı olabilen fiziksel ve kimyasal işlemlere maruz bırakma durumu yoktur (Zhou *et al.* 2018). Bu nedenle protein saflaştırma işlemi manyetik ayırma teknikleri ile yapıldığında sonrasında ek bir işlem uygulanmadan kullanıma hazır halde elde edilir. Bu yöntemin bir diğer avantajı ise eğer istenirse saflaştırılan proteinin konsantre olarak da elde edilebilmesidir (Wu *et al.* 2014; Zhou *et al.* 2018).

Manyetik ayırma tekniklerinde kullanılacak olan MNP seçimi de oldukça büyük önem taşır. Saflaştırmada kullanılacak olan MNP'nin saflaştırılmak istenen ürüne olabildiğince spesifik olması gerekir. Bunun için çalışmalarda sıklıkla üretilen ürünlerde özellikle proteinler histidin etiketi ile sentezlenirler (Zhou *et al.* 2018). Histidin aminoasitine afinite gösteren bazı metal katyonlar bulunur. Örneğin, bu katyonların afinitesi çoktan aza doğru $\text{Cu}^{+2} > \text{Ni}^{+2} > \text{Zn}^{+2} \geq \text{Co}^{+2}$ şeklinde sıralanabilir. Buna ek olarak bu katyonların özgüllük sıralaması ise $\text{Co}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Ni}^{+2} > \text{Cu}^{+2}$ şeklindedir (Mourão *et al.* 2016; Qu *et al.* 2020). Bu tez çalışmasında rppMEL saflaştırması için histidine afinite göstermesiyle beraber özgüllüğü en yüksek olan kobalt iyonu MNP sentezi için kullanıldı. Laboratuvarımızda daha önce elde edilmiş, genomunda alkol oksidaz promotörü arkasında ppMEL genini taşıyan rekombinant *K. phaffii* hücreleri (pPICZαA-ppMEL/X33) kültüre edildi. rppMEL histidin etiketli (6x-His) ve ekstraselüler olarak üretildi. Böylelikle, histidine spesifik olan kobalt iyonunun karışık protein çözeltisindeki histidin etiketine bağlanarak rekombinant proteinin saflaştırılması hedeflendi.

İstenilen ürünün istenilen şekil ve miktarda üretimi sağlandıktan sonra kullanılabilmesi için üretildiği ortamdan ayrılması gerekir. Saflaştırma yöntemini kısaltmak ve kolaylaştırmak için hücre içerisinde proteinin üretimi yapıldıktan sonra hücre dışına salgılanmasını sağlamak saflaştırma prosedürlerini oldukça kısaltır. Bunun için genelde istenilen gen ile sinyal sekansı birlikte bulunduğu üretilen protein hücre dışına salgılanır (Burdette *et al.* 2018; Ünver *et al.* 2022). Ayırma teknikleri olarak çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Özellikle afinite yöntemleri sıklıkla kullanılmakla beraber manyetik ayırma teknikleri de son zamanlarda dikkat çekmektedir (Chang, Qin, Wang, Xia, Lv, *et al.* 2019).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda 6x-His etiketli proteinleri saflaştırmak için farklı yöntemler kullanılmıştır. Protein saflaştırmak için nikel şelatlayıcı reçine kullanımı yaygın olmakla beraber son zamanlarda MNP'ler de sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Minkner *et al.* 2020; Park *et al.* 2018; Ünver, 2014).

Bu tez çalışmasında afinite tekniği ile saflaştırma yapabilmek için genin aşağı akış (downstream) bölgesinde 6x-His sekansı olacak şekilde maya hücrelerinin genomuna eklenen ppMEL geninin ekspresyonu sonucu protein üretimi gerçekleştirildi. Bu şekilde 6x-His etiketli

rekombinant protein CoFe₂O₄ MNP'lerle kısmi olarak saflaştırılabildi. Bunun için 10 mg/mL MNP ve 2 dakika protein bağlama süresi kullanıldı. Elüsyon tamponu ile proteinler elüe edildi.

Sonuçlar

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar şu şekildedir;

- Manyetik alan altında mıknatıs özelliği gösteren, oldukça 20-25 nm boyutta ve kristal yapıda CoFe₂O₄ MNP'ler sentezlendi.
- *K. phaffii* hücreleri kullanılarak ekstraselüler 6x-His etiketli rppMEL üretimi gerçekleştirildi.
- Sentezlenen CoFe₂O₄ MNP'ler ile rppMEL'in kısmi saflaştırılması sağlandı.
- Kültür sıvısına salgılanan rppMEL, iki farklı ticari kit protokolüne göre yapılan saflaştırma işlemi sonucunda, her iki kitle de kısmi olarak saflaştırılabildi.
- CoFe₂O₄ MNP'lerin yüzeyine herhangi bir kaplama yapılmadan kısmi saflaştırma yapılabildiği görüldü. Bu durum, yüzey kaplaması olmayan MNP'lerle saflaştırma işleminin maliyetini düşürüp sentez aşamasının daha kısa sürede tamamlanmasına olanak sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- Acar, M., Abul, N., Yildiz, S., Taskesenligil, E. D., Gerni, S., Unver, Y., Kalin, R., & Ozdemir, H. (2023). Affinity-based and in a single step purification of recombinant horseradish peroxidase A2A isoenzyme produced by *Pichia pastoris*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 46(4), 523–534. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02837-2>
- Acar, M., Solak, K., Yildiz, S., Unver, Y., & Mavi, A. (2022). Comparative heating efficiency and cytotoxicity of magnetic silica nanoparticles for magnetic hyperthermia treatment on human breast cancer cells. *3 Biotech*, 12(11), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03377-y>
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5301–5317. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
- Alpert, A. J., Petritis, K., Kangas, L., Smith, R. D., Mechtler, K., Mitulović, G., Mohammed, S., & Heck, A. J. R. (2010). Peptide Orientation Affects Selectivity in Ion-Exchange Chromatography. *Analytical Chemistry*, 82(12), 5253–5259. <https://doi.org/10.1021/ac100651k>
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., & Pedersen, J. (2011). WITHDRAWN: Reprint of: Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.009>
- Aygar, G., Kaya, M., Özkan, N., Kocabiyik, S., & Volkan, M. (2015). Preparation of silica coated cobalt ferrite magnetic nanoparticles for the purification of histidine-tagged proteins. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 87, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2015.08.005>
- Báčkorová, M., Jendželovský, R., Kello, M., Báčkor, M., Mikeš, J., & Fedoročko, P. (2012). Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, 26(3), 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.01.017>
- Barrero, J. J., Casler, J. C., Valero, F., Ferrer, P., & Glick, B. S. (2018). An improved secretion signal enhances the secretion of model proteins from *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1009-5>
- Bernauer, L., Radkohl, A., Lehmayr, L. G. K., & Emmerstorfer-Augustin, A. (2021). Komagataella phaffii as Emerging Model Organism in Fundamental Research. *Frontiers in Microbiology*, 11(January), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.607028>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brizzard, B. L., Chubet, R. G., & Vizard, D. L. (1994). Immunoaffinity purification of FLAG® epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *BioTechniques*, 16(4), 730–732+734.

- Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M. S., Metreveli, G., Schaumann, G. E., Schulz, R., & Wagner, S. (2018). Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? In *Environmental Sciences Europe* (Vol. 30, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>
- 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), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1041-5>
- Carta, G., & Jungbauer, A. (2010). Downstream Processing of Biotechnology Products. In *Protein Chromatography* (pp. 1–55). <https://doi.org/10.1002/9783527630158.ch1>
- Ceremuga, M., Stela, M., Janik, E., Gorniak, L., Synowiec, E., Sliwinski, T., Sitarek, P., Saluk-Bijak, J., & Bijak, M. (2020). Melittin—a natural peptide from bee venom which induces apoptosis in human leukaemia cells. *Biomolecules*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biom10020247>
- Chang, M., Qin, Q., Wang, B., Xia, T., Lv, W., Sun, X., Shi, X., & Xu, G. (2019). Carboxymethylated polyethylenimine modified magnetic nanoparticles specifically for purification of His-tagged protein. *Journal of Separation Science*, 42(3), 744–753. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800969>
- Chang, M., Qin, Q., Wang, B., Xia, T., Lv, W., Sun, X., Shi, X., & Xu, G. (2019). Carboxymethylated polyethylenimine modified magnetic nanoparticles specifically for purification of His-tagged protein. *Journal of Separation Science*, 42(3), 744–753. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800969>
- Chen, Q. chi, Liu, L., Yu, T. Y., Tang, L., Yin, M. li, Zhu, W. he, Jiang, X. yun, & Wang, H. yan. (2021). High-Level Expression and Purification of Melittin in Escherichia coli Using SUMO Fusion Partner. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 9–15. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10060-4>
- Cooney, J. K., Law, R. J., Matschke, V., Lemmey, A. B., Moore, J. P., Ahmad, Y., Jones, J. G., Maddison, P., & Thom, J. M. (2011). Benefits of exercise in rheumatoid arthritis. In *Journal of Aging Research* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.4061/2011/681640>
- Dagci, I., Acar, M., Turhan, F., Mavi, A., & Unver, Y. (2024). Extracellular production of azurin by reusable magnetic Fe₃O₄ nanoparticle-immobilized Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Biotechnology*, 394(April), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.08.010>
- Das, P. K., Sahoo, A., & Veeranki, V. D. (2024). Recombinant monoclonal antibody production in yeasts: Challenges and considerations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 266(P2), 131379. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131379>
- Díaz-Hernández, A., Gracida, J., García-Almendárez, B. E., Regalado, C., Núñez, R., & Amaro-Reyes, A. (2018). Characterization of Magnetic Nanoparticles Coated with Chitosan: A Potential Approach for Enzyme Immobilization. *Journal of Nanomaterials*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9468574>
- Feng, T., Liu, H., Xu, Q., Sun, J., & Shi, H. (2015). Identification and Characterization of Two Endogenous β -Glucosidases from the Termite Coptotermes formosanus. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(7), 2039–2052. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1699-7>
- Fernandes de Medeiros, I. A., Lopes-Moriyama, A. L., & de Souza, C. P. (2017). Effect of synthesis parameters on the size of cobalt ferrite crystallite. *Ceramics International*, 43(5), 3962–3969. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.10.105>
- Gajski, G., & Garaj-Vrhovac, V. (2009). Radioprotective effects of honeybee venom (Apis

- mellifera) against 915-MHz microwave radiation-induced DNA damage in wistar rat lymphocytes: In vitro study. *International Journal of Toxicology*, 28(2), 88–98. <https://doi.org/10.1177/1091581809335051>
- Ganesana, M., Istarnboulie, G., Marty, J. L., Noguer, T., & Andreescu, S. (2011). Site-specific immobilization of a (His)6-tagged acetylcholinesterase on nickel nanoparticles for highly sensitive toxicity biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 30(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.08.024>
- GE Healthcare Life Sciences. (2007). Purifying Challenging Proteins: Principles and Methods. *General Electric Company*, 28-9095-3(10), 1–107. <http://www.mcdb.ucla.edu/Research/Jacobsen/LabWebSite/PDFOthers/GESeminar.pdf>
- Gomes, A. M. V., Carmo, T. S., Carvalho, L. S., Bahia, F. M., & Parachin, N. S. (2018). Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. *Microorganisms*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020038>
- Góral, D., Marczuk, A., Góral-Kowalczyk, M., Koval, I., & Andrejko, D. (2023). Application of Iron Nanoparticle-Based Materials in the Food Industry. *Materials*, 16(2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ma16020780>
- Hasan, S. (2014). A Review on Nanoparticles : Their Synthesis and Types. *Research Journal of Recent Sciences Res . J . Recent . Sci . Uttar Pradesh (Lucknow Campus)*, 4(February), 1–3.
- Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W. E. G., Yagi, F., & Kasai, K. I. (2002). Oligosaccharide specificity of galectins: A search by frontal affinity chromatography. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1572, Issues 2-3, pp. 232–254). [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00311-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00311-2)
- Jain, K., Takuli, A., Gupta, T. K., & Gupta, D. (2024). Rethinking Nanoparticle Synthesis: A Sustainable Approach vs. Traditional Methods. *Chemistry – An Asian Journal*, 202400701. <https://doi.org/10.1002/asia.202400701>
- Jones, S. L., Jones, H. R., & Thrasyvoulou, A. (2011). Disseminating research about bee products. A review of articles published in the Journal of Apicultural Research over the past fifty years. *Journal of ApiProduct & ApiMedical Science*, 3(3), 105–116. <https://doi.org/10.3896/ibra.4.03.3.01>
- Kalakenger, S., Yildiz Arslan, S., Turhan, F., Acar, M., Solak, K., Mavi, A., & Unver, Y. (2024). Heterologous Expression of Codon-Optimized Azurin Transferred by Magnetofection Method in MCF-10A Cells. *Molecular Biotechnology*, 66(6), 1434–1445. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00798-9>
- Kim, H., Yoo, S. J., & Kang, H. A. (2015). Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Research*, 15(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12195>
- Kim, J. Y., Leem, J., & Hong, H. L. (2021). Melittin Ameliorates Endotoxin-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting Inflammation, Oxidative Stress, and Cell Death in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8843051>
- Kimple, M. E., Brill, A. L., & Pasker, R. L. (2013). Overview of affinity tags for protein purification. *Current Protocols in Protein Science*, SUPPL.73. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0909s73>
- Kosobokova, E. N., Skrypnyk, K. A., & Kosorukov, V. S. (2016). Overview of fusion tags for

- recombinant proteins. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 81, Issue 3, pp. 187–200). <https://doi.org/10.1134/S0006297916030019>
- Krishnan, K. M. (2010). Biomedical nanomagnetism: A spin through possibilities in imaging, diagnostics, and therapy. *IEEE Transactions on Magnetics*, 46(7), 2523–2558. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2010.2046907>
- Kurtzman, C. P. (2009). Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(11), 1435–1438. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0638-4>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Li, B., Zou, X., Zhao, Y., Sun, L., & Li, S. (2013). Biofunctionalization of silica microspheres for protein separation. *Materials Science and Engineering C*, 33(5), 2595–2600. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.02.030>
- Lin-Cereghino, G. P., Stark, C. M., Kim, D., Chang, J. W. J., Shaheen, N., Poerwanto, H., Agari, K., Moua, P., Low, L. K., Tran, N., Huang, A. D., Nattestad, M., Oshiro, K. T., Chang, J. W. J., Chavan, A., Tsai, J. W., Lin-Cereghino, J., Pina, A. S., Lowe, C. R., ... Karaoglan, M. (2013). The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene*, 519(2), 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.01.062>
- Lioi, M., Tengattini, S., Bagatin, F., Galliani, S., Daly, S., Massolini, G., & Temporini, C. (2023). Development of a rapid, efficient, and reusable magnetic bead-based immunocapture system for recombinant human procollagen type II isolation from yeast fermentation broth. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(16), 3155–3166. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04752-1>
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. In *Yeast* (Vol. 22, Issue 4, pp. 249–270). <https://doi.org/10.1002/yea.1208>
- Mahhouthi, Z., El Moussaoui, H., Mahfoud, T., Hamedoun, M., El Marssi, M., Lahmar, A., El Kenz, A., & Benyoussef, A. (2019). Chemical synthesis and magnetic properties of monodisperse cobalt ferrite nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 30(16), 14913–14922. <https://doi.org/10.1007/s10854-019-01863-3>
- Mahmoodi, S., Pourhassan-Moghaddam, M., Wood, D. W., Majdi, H., & Zarghami, N. (2019). Current affinity approaches for purification of recombinant proteins. *Cogent Biology*, 5(1), 1665406. <https://doi.org/10.1080/23312025.2019.1665406>
- Marqus, S., Pirogova, E., & Piva, T. J. (2017). Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *Journal of Biomedical Science*, 24(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0328-x>
- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M., & Porro, D. (2012). Recombinant protein production in yeasts. *Methods in Molecular Biology*, 824, 329–358. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_17
- Mehta, R. V. (2017). Synthesis of magnetic nanoparticles and their dispersions with special reference to applications in biomedicine and biotechnology. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 79, pp. 901–916). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.135>
- Mei, X., Shpigelman, A., Verrijssen, T. A. J., Kyomugasho, C., Luo, Y., Van Loey, A. M., Michiels, C., Huang, K., & Hendrickx, M. E. (2015). Recombinant kiwi pectin methylesterase inhibitor: Purification and characterization of the interaction with plant

- pectin methylesterase during thermal and high-pressure processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.02.008>
- Milne, J. J. (2011). Scale-Up of Protein Purification: Downstream Processing Issues. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 681, pp. 73–85). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_5
- Minkner, R., Xu, J., Takemura, K., Boonyakida, J., Wätzig, H., & Park, E. Y. (2020). Ni-modified magnetic nanoparticles for affinity purification of His-tagged proteins from the complex matrix of the silkworm fat body. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00715-1>
- Mourão, C. A., Carmignotto, G. P., & Bueno, S. M. A. (2016). Separation of human IgG fragments using copper, nickel, zinc, and cobalt chelated to CM-Asp-agarose by positive and negative chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1017-1018, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.058>
- Muthukumaran, T., & Philip, J. (2024). A review on synthesis, capping and applications of superparamagnetic magnetic nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 334(October), 103314. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2024.103314>
- Nielsen, J. (2013). Production of biopharmaceutical proteins by yeast: Advances through metabolic engineering. In *Bioengineered* (Vol. 4, Issue 4, pp. 207–211). <https://doi.org/10.4161/bioe.22856>
- Nosrati, H., Salehiabar, M., Davaran, S., Ramazani, A., Manjili, H. K., & Danafar, H. (2017). New advances strategies for surface functionalization of iron oxide magnetic nanoparticles (IONPs). In *Research on Chemical Intermediates* (Vol. 43, Issue 12, pp. 7423–7442). <https://doi.org/10.1007/s11164-017-3084-3>
- Oršolić, N. (2009). Potentiation of bleomycin lethality in hela and V79 cells by bee venom. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 60(3), 317–326. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-1936>
- Park, S. J., Kim, S. Y., Kim, S. H., Park, K. M., & Hwang, B. H. (2018). His-tagged protein immobilization on cationic ferrite magnetic nanoparticles. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 35(6), 1297–1302. <https://doi.org/10.1007/s11814-018-0043-7>
- Pina, A. S., Lowe, C. R., & Roque, A. C. A. (2014). Challenges and opportunities in the purification of recombinant tagged proteins. *Biotechnology Advances*, 32(2), 366–381. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.001>
- Prabhu, A. A., Purkayastha, A., Mandal, B., Kumar, J. P., Mandal, B. B., & Veeranki, V. D. (2018). A novel reverse micellar purification strategy for histidine tagged human interferon gamma (hIFN- γ) protein from *Pichia pastoris*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2512–2524. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.130>
- Qu, J. H., Horta, S., Delport, F., Sillen, M., Geukens, N., Sun, D. W., Vanhoorelbeke, K., Declerck, P., Lammertyn, J., & Spasic, D. (2020). Expanding a Portfolio of (FO-) SPR Surface Chemistries with the Co(III)-NTA Oriented Immobilization of His6-Tagged Bioreceptors for Applications in Complex Matrices. *ACS Sensors*, 5(4), 960–969. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b02227>
- Roque, A. C. A., & Lowe, C. R. (2007). Affinity chromatography: History, perspectives, limitations and prospects. *Methods in Molecular Biology*, 421, 1–21.
- Rosa, L., Ravanal, M. C., Mardones, W., & Eyzaguirre, J. (2013). Characterization of a

- recombinant α -glucuronidase from *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Biology*, 117(5), 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.04.002>
- Sadalla-Pinto, E. A., de ANDRADE, E., Do Carmo, E. J., de SOUZA-NETO, J. N., Batista, L. M., Bentes-Sousa, A. R., Mariúba, L. A. M., Passos, D. de F., Fernandes, R. P., Pereira Junior, N., Porto, J. I. R., & Astolfi-Filho, S. (2024). Extracellular expression, purification and bioreactor production of tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth hormone in the yeast *Komagataella phaffii* (formerly *Pichia pastoris*). *Acta Amazonica*, 54(2). <https://doi.org/10.1590/1809-4392202301791>
- Schwaminger, S. P., Fraga-García, P., Blank-Shim, S. A., Straub, T., Haslbeck, M., Muraca, F., Dawson, K. A., & Berensmeier, S. (2019). Magnetic one-step purification of his-tagged protein by bare iron oxide nanoparticles. *ACS Omega*, 4(2), 3790–3799. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03348>
- Singh, N., Jenkins, G. J. S., Asadi, R., & Doak, S. H. (2010). Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews*, 1(1), 5358. <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358>
- Solak, K., Yildiz Arslan, S., Acar, M., Turhan, F., Unver, Y., & Mavi, A. (2024). Combination of magnetic hyperthermia and gene therapy for breast cancer. *Apoptosis*. <https://doi.org/10.1007/s10495-024-02026-4>
- Taskin, M., Unver, Y., Acar, M., Yıldız, M., & Yıldız, Ş. (n.d.). *REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ İÇİN BİR YÖNTEM*.
- Türkanoğlu Özçelik, A., Ersöz, F., & İnan, M. (2019). Extracellular production of the recombinant bacterial transglutaminase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 159, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.03.003>
- Ullah, A., Mohammed, F., Ishtiaq, S., Raza, G., Ahmad, S., & Lacks, H. (2023). Pharmacological properties and therapeutic potential of honey bee venom. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 31(1), 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.11.008>
- Unver, Y., Yildiz, M., Kilic, D., Taskin, M., Firat, A., & Askin, H. (2018). Efficient expression of recombinant human telomerase inhibitor 1 (hPinX1) in *Pichia pastoris*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(6), 535–540. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1466160>
- Unver, Y., Yildiz, S., & Acar, M. (2022). Extracellular production of azurin from *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of Triton X-100 or Tween 80. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45(3), 553–561. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02678-5>
- US20220220491A1.pdf. (n.d.).
- Ünver, Y. (2014). *İnsan Paraoksonaz 1 (Pon1) Geninin Klonlanması, Pichia pastoris'te Ekspresyonu, Rekombinant Enzimin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu*. 1, 133.
- Varol, A., Sezen, S., Evcimen, D., Zarepour, A., Ulus, G., Zarrabi, A., Badr, G., Daştan, S. D., Orbayoğlu, A. G., Selamoğlu, Z., & Varol, M. (2022). Cellular targets and molecular activity mechanisms of bee venom in cancer: recent trends and developments. *Toxin Reviews*, 1(14), 1382–1395. <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.2024576>
- Varol, M. (2018). Anti-breast cancer and anti-angiogenic potential of a lichen-derived small-molecule: barbatolic acid. *Cytotechnology*, 70(6), 1565–1573. <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0249-x>
- Walter, J. K., & Gottschalk, U. (2010). Concepts for Disposables in Biopharmaceutical Manufacture. In *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing* (pp. 87–99). https://doi.org/10.1007/978-0-387-76643-0_7

- Werten, M. W. T., Eggink, G., Cohen Stuart, M. A., & de Wolf, F. A. (2019). Production of protein-based polymers in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Advances*, 37(5), 642–666. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.012>
- Wingfield, P. T. (2015). Overview of the purification of recombinant proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 2015, 6.1.1–6.1.35. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80>
- Wu, Y., Chang, G., Zhao, Y., & Zhang, Y. (2014). Hierarchical Fe₃O₄@NixSiO_y microspheres for affinity separation of His-tagged proteins. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(4). <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2358-6>
- Yildiz, S., Solak, K., Acar, M., Mavi, A., & Unver, Y. (2021). Magnetic nanoparticle mediated-gene delivery for simpler and more effective transformation of *Pichia pastoris*. *Nanoscale Advances*, 3(15), 4482–4491. <https://doi.org/10.1039/d1na00079a>
- Ying, S., Guan, Z., Ofoegbu, P. C., Clubb, P., Rico, C., He, F., & Hong, J. (2022). Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. In *Environmental Technology and Innovation* (Vol. 26). <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102336>
- Young, C. L., Britton, Z. T., & Robinson, A. S. (2012). Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. In *Biotechnology Journal* (Vol. 7, Issue 5, pp. 620–634). <https://doi.org/10.1002/biot.201100155>
- Zeng, K., Sun, E. J., Liu, Z. W., Guo, J., Yuan, C., Yang, Y., & Xie, H. (2020). Synthesis of magnetic nanoparticles with an IDA or TED modified surface for purification and immobilization of poly-histidine tagged proteins. *RSC Advances*, 10(19), 11524–11534. <https://doi.org/10.1039/c9ra10473a>
- Zhao, X., Meng, Z., Wang, Y., Chen, W., Sun, C., Cui, B., Cui, J., Yu, M., Zeng, Z., Guo, S., Luo, D., Cheng, J. Q., Zhang, R., & Cui, H. (2017). Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Nature Plants*, 3(12), 956–964. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0063-z>
- Zhou, Y., Yan, D., Yuan, S., Chen, Y., Fletcher, E. E., Shi, H., & Han, B. (2018). Selective binding, magnetic separation and purification of histidine-tagged protein using biopolymer magnetic core-shell nanoparticles. *Protein Expression and Purification*, 144(October 2017), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.11.004>
- Zhou, Y., Yuan, S., Liu, Q., Yan, D., Wang, Y., Gao, L., Han, J., & Shi, H. (2017). Synchronized purification and immobilization of his-tagged β -glucosidase via Fe₃O₄/PMG core/shell magnetic nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(January), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep41741>
- Zhu, K., Zhou, X., Yan, Y., Mo, H., Xie, Y., Cheng, B., & Fan, J. (2017). Cleavage of fusion proteins on the affinity resins using the TEV protease variant. *Protein Expression and Purification*, 131, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.02.003>
- Zuo, J., Wang, D. H., Zhang, Y. Y. J., Liu, L., Liu, F. L., Liu, W., Zimmermann, R., Mollay, C., Zhou, Y., Yuan, S., Liu, Q., Yan, D., Wang, Y., Gao, L., Han, J., Shi, H., Yuan, S., Chen, Y. S. Y., Fletcher, E. E., ... Yalcin, H. C. (2020). Targeting the cancer stroma with a fibroblast activation protein-activated promelittin protoxin. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10313-w>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Hacer KARABULUT
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	
Lisans:	
Yüksek lisans:	
Yabancı Dil Bilgisi	