T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT TRANSMEMBRAN PROTEİNLERİN KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERLE SAFLAŞTIRILMASI

Levent TURA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Danışman

Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI

Eş Danışman

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK

Temmuz, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT TRANSMEMBRAN PROTEİNLERİN KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERLE SAFLAŞTIRILMASI

Levent TURA tarafından hazırlanan tez çalışması 18.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Doç. Dr. Tülin ÖZBEK Yıldız Teknik Üniversitesi Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Serap DERMAN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Gizem DİNLER DOĞANAY, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Rekombinant Transmembran Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Levent TURA

İmza

Bu çalışma, TÜBİTAK'ın 122Z026 numaralı "Litik Bakteriyofaj K'nın, *S. aureus* Lizis Mekanizmasındaki Kilit Molekülü Holin Proteininin Biyoteknolojik Araç Olarak Kullanımının Değerlendirilmesi" isimli projesi ile desteklenmiştir.

Hayatını bilime adayanlara

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenim hayatım boyunca engin bilgi birikimleriyle bana destek olan, her konuda fikirlerine danışabildiğim ve biyoteknoloji alanında farkındalık kazanmamı sağlayan sayın danışmanım Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI ve sayın eş danışmanım Doç. Dr. Tülin ÖZBEK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Biyoteknoloji alanının temeli ve bu alanın çeşitliliğini konusunda bizlere yol göstererek, farklı bir perspektifle bilimi değerlendirmeyi öğreten Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Dilek BALIK ve Lisansüstü Koordinatörümüz Prof. Dr. Serap DERMAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bir paydaşı olarak içinde bulunduğum "Litik Bakteriyofaj K'nın, *S. aureus* Lizis Mekanizmasındaki Kilit Molekülü Holin Proteininin Biyoteknolojik Araç Olarak Kullanımının Değerlendirilmesi" isimli proje için sağladığı destekten dolayı TÜBİTAK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Gerek teorik gerekse pratik olarak aldığım eğitim süresi zarfında laboratuvarlarında ve çalışma alanlarında bizlere sağladığı imkânlar için Yıldız Teknik Üniversitesi'ne sonsuz teşekkürlerimi sunmak isterim.

Tez çalışmama başladığım günden bu yana laboratuvarda, başta karakterizasyon analizleri ile bana en büyük desteği veren, deneyimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, kendi bilgi birikimleri ile beni de aydınlatan proje paydaşlarım Hande HANÇER ve İlknur YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Çalıştığım Vem İlaç bünyesinde, personelin eğitim ve gelişimine büyük önem vererek biz bilim insanlarının ve bilimin her zaman koşulsuz destekçisi olan Sayın Genel Müdürümüz Vedat DEMİRCİ'ye, çalışmalarım için hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, bilgileri ve fikirleriyle en büyük destekçim olan değerli çalışma arkadaşlarım Turhan YILMAZ, Uğur BABUCCU, Ömer TONGUÇ ve Akif Burak AKANSU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans projem için şirketlerinin kapılarını sonuna kadar açan ve preparatif HPLC cihazlarını ve kromatografi kolonlarını kullanmama izin vererek projemin ilerlemesinde bana önemli ölçüde zaman kazandıran Hüseyin TAL, Alper KUT'a ve Cytiva firmasına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Farmasötik biyoprosesler alanında kendileri oldukça iyi geliştiren bireyler olarak tecrübelerini her zaman benimle paylaşıp yol gösteren ve benim bu alanda daha çok aydınlanmamı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili meslektaşlarım Tolgahan DURMAZ ve Tuğba AKSOY'a sonsuz teşekkürlerimi iletmek isterim.

Biyoteknolojik analizler konusunda projeme en büyük desteği veren ve sıklıkla fikirlerine ihtiyaç duyduğum Fulya KARAKAŞ ve Çilem ESKİTAŞÇIOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Biyofarmasötik endüstrisinde kullanılan laboratuvar ölçekli cihazlar ve filtrasyon malzemeleri ile ilgili sıklıkla fikir alışverişinde bulunduğum Ali Rahmi FIRAT ve Sartonet firmasına teşekkürlerimi sunarım.

Proteinlerin karakterizasyon analizleri konusunda yolumu aydınlatan sevgili meslektaşlarım Şefik ÖNDER, Behlis ÖNDER ve Berna ASLAN'a teşekkürlerimi iletmek isterim.

Projem kapsamında, bana farklı tür ve ölçekte filtre imkânı sunarak çalışmalarıma hız kazandıran Erhan ÇAKAN ve Ant Teknik firmasına en içten teşekkürlerimi sunarım.

Levent TURA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR **v**
SİMGE LİSTESİ **viii**
KISALTMA LİSTESİ **ix**
ŞEKİL LİSTESİ **x**
TABLO LİSTESİ **xii**
ÖZET **xiii**
ABSTRACT **xv**
1 GİRİŞ **17**
1.1 Literatür Özeti 17
1.2 Tezin Amacı 20
1.3 Hipotez 20
2 TEORİK BİLGİLER **21**
2.1 Rekombinant Proteinler 21
2.2 Transmembran Proteinler 23
2.3 Protein Saflaştırma Yöntemleri 29
3 GEREÇ VE YÖNTEMLER **44**
3.1 Materyal 44
3.2 Yöntem 51
4 BULGULAR VE TARTIŞMA **58**
4.1 Hareketsizleştirilmiş Metal Afinite Kromatografisi 58
4.2 GST Etiketli Afinite Kromatografisi 63
4.3 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi 69
4.4 İyon Değişim Kromatografisi 73
5 SONUÇ **88**
KAYNAKÇA **93**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **103**

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
dk	Dakika
rpm	Dakikada dönme hızı
ºC	Derece santigrat
g	Gram
kDa	Kilodalton
m/z	Kütle/net yük
L	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
s	Saniye
V	Volt

KISALTMA LİSTESİ

AC	Afinite kromatografisi
AEX	Anyon değişim kromatografisi
CEX	Katyon değişim kromatografisi
CFF	Çapraz akış filtrasyonu
CV	Kolon hacmi
DNA	Deoksiribonükleik asit
E. coli	*Escherichia coli*
GST	Glutatyon S-transferaz
HIC	Hidrofobik etkileşim kromatografisi
IEX	İyon değişim kromatografisi
IMAC	Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi
IMP	İç zar proteini
mAb	Monoklonal antikor
mAU	Mili absorbans birimi
OMP	Dış zar proteini
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PTM	Translasyon sonrası değişim
rDNA	Rekombinant DNA
rHolin	Rekombinant Holin
RNA	Ribonükleik asit
RPC	Ters faz kromatografisi
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SEC	Boyut dışlama kromatografisi
TFF	Teğetsel akış filtrasyonu
TMD	Transmembran bölgesi
TMP	Transmembran protein
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Membran proteinlerin sınıflandırılması [59] **23**
Şekil 2.2 Tek geçişli tip I transmembran protein yapısı **25**
Şekil 2.3 Tek geçişli tip II transmembran protein yapısı **26**
Şekil 2.4 Çok geçişli transmembran protein yapısı **27**
Şekil 2.5 Holin proteini sınıflandırmaları **28**
Şekil 2.6 Rekombinant protein üretim ve saflaştırma süreçleri akış şeması **30**
Şekil 2.7 Proteinlerde solubilizasyon ve yeniden katlanma süreçleri **33**
Şekil 2.8 Teğetsel akış filtrasyonu **35**
Şekil 2.9 Teğetsel akış membranlarının çalışma prensibi **35**
Şekil 2.10 Preparatif kolon kromatografisi sistemi **37**
Şekil 2.11 Yüksek tuz konsantrasyonunda proteinlerin kolona bağlanması **38**
Şekil 2.12 İyon değişim kromatografisinde zıt yüklerin etkileşimi **40**
Şekil 2.13 Afinite kromatografisi çalışma mekanizması **42**
Şekil 2.14 Füzyon etiketlerinin polipeptit zinciri üzerindeki konumları **42**
Şekil 3.1 rHolin proteininin amino asit dizisi **45**
Şekil 3.2 rHolin proteini TMD bölgesinin amino asit dizisi **45**
Şekil 3.3 Füzyon etiketlerine sahip TMD bölgesinin amino asit dizisi **46**
Şekil 3.4 Tez çalışması kapsamında uygulanan deneysel akış şeması **51**
Şekil 4.1 Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC) 1. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu) **60**
Şekil 4.2 Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC) 1. deneme SDS-PAGE jel görüntüsü **61**
Şekil 4.3 Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC) 2. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu) **62**
Şekil 4.4 Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC) 2. deneme SDS-PAGE jel görüntüsü **63**
Şekil 4.5 GST etiketli afinite kromatografisi 1. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu) **65**
Şekil 4.6 GST etiketli afinite kromatografisi 1. deneme SDS-PAGE görüntüsü **66**

Şekil 4.7 GST etiketli afinite kromatografisi 2. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu) **67**

Şekil 4.8 GST etiketli afinite kromatografisi 2. deneme SDS-PAGE görüntüsü .. **68**

Şekil 4.9 Hidrofobik etkileşim kromatografisi 1. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu) **70**

Şekil 4.10 Hidrofobik etkileşim kromatografisi 1. deneme SDS-PAGE görüntüsü..... **71**

Şekil 4.11 Hidrofobik etkileşim kromatografisi 2. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu) **72**

Şekil 4.12 Hidrofobik etkileşim kromatografisi 2. deneme SDS-PAGE görüntüsü..... **72**

Şekil 4.13 İyon değişim kromatografisi 1. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)..... **75**

Şekil 4.14 İyon değişim kromatografisi 1. deneme SDS-PAGE görüntüsü..... **76**

Şekil 4.15 İyon değişim kromatografisi 2. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)..... **77**

Şekil 4.16 İyon değişim kromatografisi 2. deneme SDS-PAGE görüntüsü..... **78**

Şekil 4.17 İyon değişim kromatografisi 3. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)..... **79**

Şekil 4.18 İyon değişim kromatografisi 3. deneme SDS-PAGE görüntüsü..... **80**

Şekil 4.19 İyon değişim kromatografisi 4. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)..... **81**

Şekil 4.20 İyon değişim kromatografisi 4. deneme SDS-PAGE görüntüsü..... **82**

Şekil 4.21 İyon değişim kromatografisi 5. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)..... **83**

Şekil 4.22 İyon değişim kromatografisi 5. deneme SDS-PAGE görüntüsü..... **84**

Şekil 4.23 İyon değişim kromatografilerinden sonra elde edilen fraksiyonun Western blot analizi görüntüsü **85**

Şekil 4.24 İyon değişim kromatografisinde elde edilen saf fraksiyonun MALDI TOF kütle spekstroskopisi 35-42 kDa taraması..... **86**

Şekil 4.25 İyon değişim kromatografisinde elde edilen saf fraksiyonun MALDI TOF kütle spekstroskopisi 5-40 kDa taraması..... **87**

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC) deneme koşulları..... **59**

Tablo 4.2 GST afinite kromatografisi deneme koşulları..... **64**

Tablo 4.3 Hidrofobik etkileşim kromatografisi deneme koşulları..... **69**

Tablo 4.4 İyon değişim kromatografisi deneme koşulları..... **73**

ÖZET

Rekombinant Transmembran Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması

Levent TURA

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI

Eş-Danışman: Doç. Dr. Tülin ÖZBEK

Son yıllarda bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdikleri dirençte önemli bir artış olması, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) gibi birçok patojenden kaynaklı hastalıkların tedavisini zorlaştırmaktadır. Bu sebeple, bu tip patojenlere karşı yeni tedavi yöntemlerinin ve ilaç moleküllerinin geliştirilmesi elzem hale gelmiştir. Bu amaçla geliştirilen ve rekombinant olarak üretilen antibakteriyel etkili transmembran proteinlerin dirençli patojenlere karşı kullanılabilecek önemli bir strateji olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak, transmembran proteinlerin ekspresyonu sonrası lipit çift tabakaya çok geçişli olarak konumlanması, bu proteinlerin rekombinant üretimi sonrasında saflaştırılmasında çeşitli zorlukları beraberinde getirmektedir. Rekombinant transmembran proteinlerin lipit çift tabakada bulunan α-sarmal kısımları proteine hidrofobik bir özellik katmaktadır. Bu durum, kolon kromatografisi için etkin ve yüksek verimli bir metodun geliştirilmesini gerektirmektedir.

Çalışmada, *S. aureus* patojenine karşı antibakteriyel aktivite göstermesi öngörülen bir transmembran proteininin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması amaçlanmıştır. Çalışılan transmembran proteinin kromatografik saflaştırmasının tasarımından önce saflaştırma etkinliğini en üst düzeye çıkarabilmek amacıyla disülfit bağı potansiyeli, hidrofobik amino asitlerin bulunma sıklığı, zincir uzunluğu ve moleküler ağırlığı gibi veriler değerlendirilmiştir. Hedef rekombinant proteinin histidin ve GST etiketlerine sahip olması nedeniyle öncelikle HisTrap™ FF ve GSTrap™ kolonları ile afinite kromatografisi uygulanmıştır. Sonrasında, proteinin hidrofobik özelliğinden yararlanarak HiTrap™ Butyl HP kolonu ile tuz ortamında artan hidrofobisite ilkesi ışığında saflaştırma yöntemi oluşturulmaya çalışılmıştır. Son olarak ise, ilgili rekombinant proteinin teorik izoelektrik noktası hesaplanarak HiScreen™ Capto DEAE kolonu ile iyon değişim kromatografisi, farklı gradient türleri ile artan iyonik yük koşulunda uygulanmıştır. Gerçekleştirilen afinite kromatografileri ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri ile yüksek saflıkta protein saflaştırılması gerçekleştirilememiş olmasına rağmen iyon değişim kromatografisi ile önemli ölçüde saf fraksiyonlar elde edildi. Elde edilen saf fraksiyonların SDS-PAGE, Western blot ve MALDI TOF kütle spektroskopisi gibi karakterizasyon analizleri gerçekleştirilerek hedef rekombinant proteinin yapısı doğrulanmıştır.

Farklı kromatografi türlerinin hedef rekombinant proteinin saflaştırma stratejisine etkisi araştırılarak, sağlık, gıda, tarım, kozmetik gibi bakteriyel kontaminasyonların sıkça rastlandığı alanlarda yüksek saflıkta antibakteriyel transmembran protein üretimi tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *S. aureus*, Holin proteini, afinite kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, iyon değişim kromatografisi.

ABSTRACT

Purification of Recombinant Transmembrane Proteins with Chromatographic Techniques

Levent TURA

Department of Biotechnology

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Tülin ÖZBEK

In recent years, there has been a significant increase in the resistance of bacteria to antibiotics, making the treatment of diseases caused by many pathogens such as *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) difficult. Consequently, it has become essential to develop new treatment methods and drug molecules against this type of pathogen. It has been shown in studies that transmembrane proteins with antibacterial effect, developed for this purpose and produced recombinantly, are an important strategy that can be used against resistant pathogens. However, the multi-pass positioning of transmembrane proteins into the lipid bilayer after expression brings along various challenges in the purification of these proteins after recombinant production. The α-helical portions of recombinant transmembrane proteins in the lipid bilayer add a hydrophobic property to the protein. This requires the development of an efficient and high-throughput method for column chromatography.

In this study, it was aimed to purify a transmembrane protein that is predicted to show antibacterial activity against *S. aureus* pathogen by chromatographic methods. Before the design of the chromatographic purification of the studied transmembrane protein, data such as disulfide bond potential, frequency of presence

of hydrophobic amino acids, chain length and molecular weight were evaluated in order to maximize the purification efficiency. Since the target recombinant protein has histidine and GST tags, affinity chromatography was first performed with HisTrap™ FF and GSTrap™ columns. Afterwards, a purification method was tried to be established in the light of the principle of increasing hydrophobicity in the salt environment with the HiTrap™ Butyl HP column by utilizing the hydrophobic property of the protein. Finally, by calculating the theoretical isoelectric point of the relevant recombinant protein, ion exchange chromatography with HiScreen™ Capto DEAE column was performed under the increasing ionic load condition with different gradient types. Although high purity protein purification could not be achieved by affinity chromatography and hydrophobic interaction chromatography methods, significantly pure fractions were obtained by ion exchange chromatography. The structure of the target recombinant protein was confirmed by performing characterization analyzes such as SDS-PAGE, Western blot and MALDI TOF mass spectroscopy of the pure fractions obtained.

The effects of different types of chromatography on the purification strategy of the target recombinant protein were investigated, and the production of high-purity antibacterial transmembrane protein in areas where bacterial contamination is frequently encountered such as health, food, agriculture and cosmetics was discussed.

Keywords: *S. aureus*, Holin protein, affinity chromatography, hydrophobic interaction chromatography, ion exchange chromatography.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Rekombinant DNA (rDNA) teknolojisinin keşfi, biyoloji alanındaki gelişmelerle beraber moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanında da büyük bir devrime yol açarak; tarım, çevre ve en önemlisi sağlık alanında birçok yeniliğe öncülük etmiştir [1]. Son yıllarda biyoteknoloji; hayatı önemli ölçüde etkileyen farklı hastalıkların teşhisinde, tanısında ve tedavisinde rDNA teknolojisi, gen tedavisi, DNA aşıları ve kök hücre tedavisi gibi modern yöntemlerin keşfedilmesiyle sağlık biliminin gelişmesine önemli katkıda bulunmuştur [2].

Yıllar içinde rDNA teknolojisinin daha da anlaşılmasıyla canlı organizmalar tarafından üretilebilen ürünlerin ve bu ürünlerin özelliklerinin istenildiği gibi tasarımının yapılması, ilgili organizmanın genetik materyalinin değiştirilmesine yönelik geliştirilen teknikler sayesinde mümkün olmuştur [1]. Bu teknikler ile herhangi bir organizmanın gen izolasyonu, karakterizasyonu ve DNA dizisinin belirlenmesi sağlanarak günümüzde yaygın olarak kullanılan terapötik protein, biyofarmasötik bileşik, yeni antibiyotikler, monoklonal antikorlar (mAb), RNA esaslı terapötikler, ilaç sistemleri için modifiye edilmiş vektörler, enzim faktörü ve aşı gibi ürünlerin gelişim süreci hızlanmıştır [2][3]. Bu süreci takiben, ilk ikisi bilim insanlarının enzimler kullanarak farklı DNA parçalarını kesip yapıştırması ve diğer iki olay ise yabancı DNA'yı yeni konakçı hücrelere transfer etmek için kullanılan tekniklerin geliştirilmesini içeren dört ana gelişme, ilk rekombinant DNA teknolojisinin temellerinin atılmasına yol açmıştır [4]. Terapötik proteinlerin üretilebilmesi için bakteriler, her ne kadar kolay manipülasyon nedeniyle genellikle tercih edilen bir ajan olsa da sonralarda maya ve memeli hücreleri de sıklıkla tercih edilen hücre hatları listesinde yer almaya başlamıştır [3][4].

Ortaya çıkışı 1960'lara dayanıyor olsa da rekombinant DNA teknolojisinin temeli 1928 yılına, Londra'da bir salgından sorumlu olduğu düşünülen bakteri türünü araştıran, Frederick Griffith isimli İngiliz bir tıp görevlisinin çalışmalarına kadar uzanmaktadır [4]. On yıldan uzun bir süre tekrar edilen çalışmalar neticesinde DNA'nın bir hücreden başka bir organizmaya aktarılabildiği gösterilmiştir [4].

Bu gelişmelerden birkaç yıl sonra 1978 yılında rDNA teknolojisi kullanılarak *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisine eksprese edilen insan insülini, insülinin A- ve B- zincirleri birleştirilerek başarıyla üretilmesinin ardından 1982 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış ve bununla birlikte ilk terapötik insan protein tıp bilimine kazandırılmıştır [3][8]. Bu sayede rekombinant protein ilaçları, başta kanser türleri olmak üzere birçok hastalığın tedavisi için bilim insanlarına farklı bir perspektifin yolunu açmıştır [3]. Ek olarak 2001 yılından bu yana rekombinant proteinlerin piyasa değerinin yıllık ortalama %35 oranında büyümesi, biyofarmasötik endüstrisinin daha sağlıklı bir geleceğin temeli olacağını göstermektedir [3].

E. coli bakterisi, iyi anlaşılan yapısı ve kolay uygulanabilirliği nedeniyle biyoteknoloji alanında sıklıkla tercih edilen bir hücre hattı seçeneği olsa da memeli hayvan hücreleri de 1980'lerden bu yana biyoterapötik ürünlerin rDNA teknolojisiyle eldesinde sıklıkla kullanılmaktadır [7]. Çin hamster yumurtalık (CHO) hücresi, insan serviks (HeLa) hücresi, bebek hamster böbrek (BHK) hücresi ve insan embriyonik böbrek (HEK-293) hücreleri farklı rekombinant proteinleri üretebilmeleri nedeniyle biyofarmasötik endüstrisinde önemli bir yere sahiptir [6][7]. Terapötik rekombinant proteinlerin %30'undan fazlasının *E. coli* tabanlı bir hücre hattında üretilmesi farklı rekombinant protein ve metabolitin ekspresyonunu mümkün kılmasının yanı sıra büyüme hızı ve yüksek verimliliği sebebiyle de endüstriyel ölçekte büyük avantaj sağlamaktadır [5]. Laboratuvar koşullarında oluşturulan vektörleri bünyesinde barındıran konak hücreler farklı türlerde bulunabilmekle birlikte rDNA teknolojisi kapsamında *E. coli* BL21(DE3) ve *E. coli* C43(DE3) türü yaygın olarak kullanılmaktadır [5].

Birçok biyolojik süreçte aktif olarak rol almalarına rağmen, transmembran proteinler (TMP), lipit zarlarına gömülü olmalarının yapısal karakterizasyonu baskılaması nedeniyle globüler proteinlere göre daha az sıklıkla çalışılan protein türlerindendir [16]. Membran proteinleri, tüm insan proteomunun yaklaşık olarak %30'unu oluşturmakta, fakat protein veri bankasındaki diğer yapıların sadece %1'inden daha azını temsil etmelerine rağmen çok sayıda farmasötik araştırmanın odak noktasında yer almaktadırlar [16][18]. Membran proteinlerin, ökaryotik hücre grubunun %30'unu oluşturduğu bilinmektedir ve bu proteinlerin yanlış katlanması

veya muhtemel bir mutasyonu başta kanser ve kalp hastalıkları olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilidir [17].

Transmembran proteinleri, evrimsel adaptasyondan kaynaklanan kendine özgü membran ortamı ve doğası nedeniyle hücre membranına gömülü haldeyken α-sarmal ve β-tabaka yapıları oluştururlar [9][10]. Buna karşılık, membran ile ilişkili ya da membrana bağlı bölgelerin genel yapısı, çözülebilir bölgelere benzerlik göstererek integral membran proteinlerini (IMP) ya da gram negatif bakterilerden ve prokaryotik canlılardan evrimleşerek oluşan, β-tabaka yapısına sahip dış membran proteinlerini (OMP) içerebilirler [10][20].

Biyolojik süreçlerdeki önemi göz önünde bulundurulduğunda membran proteinlerinin karakterize edilebilmesi için iyi bir saflaştırma metodolojisi geliştirmek zordur, çünkü su fazında çok düşük miktarda bulunurlar ve çözünebilmek için bazı deterjanlara ihtiyaç duymaları muhtemel olduğundan, membran proteinlerinin saflaştırma süreçlerinde kullanılabilecek en uygun deterjanın belirlenmesi kritik öneme sahiptir [19].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda uygulanan bir dizi tekniğe göre; üre gibi denatürasyonu sağlayan ajanlar kullanarak hidrofobik proteinlerin hidrofilik olanlardan ayrılabileceğini gösterilmiştir [22]. Membranda bulunan transmembran sarmallarının birleşmesini de göz ardı etmeyecek şekilde alternatif protokol olarak yüksek tuz ve yüksek pH içeren tamponlarla yıkamalar da uygulanabilmektedir [21][22]. Yapısal olarak karakterize edilebilmiş transmembran proteininin yüksek miktarlarda elde edilebilme talebi, saflaştırma verimliliğindeki bazı olumsuzluklar nedeniyle tam olarak karşılanamıyor olsa da, kromatografik bazı yaklaşımlar ve metotlar sayesinde saf fraksiyonlar elde edebilmek mümkündür [23]. Transmembran proteinlerinin sergiledikleri son derece yüksek hidrofobiklik nedeniyle saflaştırılmaları zor gibi görünse de, hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC), iyon değişim kromatografisi (IEX) ve afinite kromatografisi (AC) gibi bazı kromatografi teknikleri ile yüksek saflıkta protein elde edilebilmesi mümkündür [23][24]. Kromatografi tekniği oluşturulurken, resin seçimi, uygun tampon içeriğinin hazırlanması, kolondaki akış hızı, adsorbe edilecek proteinin konsantrasyonu, proteinin iletkenliği ve pH'ı gibi süreci ilgilendiren tüm parametrelerin oldukça iyi optimize edilmiş olması proteinin daha yüksek saflıkta elde edilebilmesi için önemlidir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışması kapsamında, günden güne antibiyotiğe karşı dirençli hale gelen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) patojenine karşı etkili bir ilaç olabileceği düşünülen ve rekombinant olarak üretilen Holin proteininin transmembran bölgesinin (TMD) ön saflaştırma ve kromatografik saflaştırma adımlarının gerçekleştirilerek yüksek saflıkta rekombinant protein eldesi amaçlanmıştır.

Bu amaca ulaşmak için aşağıdaki hedefler esas alınmıştır;

1) Holin TMD proteininin ön saflaştırma basamaklarının gerçekleştirilerek *E. coli* hücresinin lizizinin gerçekleştirildikten sonra proteinlerin hücre debrisinden arındırılması.
2) Holin TMD proteininin kolon kromatografisinde adsorpsiyonunun arttırılması amacıyla denatüre edilmesi.
3) Holin TMD proteini için farklı kromatografi teknikleri ile en saf fraksiyonların elde edilmesi.
4) Hedef proteinin saflaştırılmış fraksiyonlarının sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), Western blot ve MALDI TOF kütle spektrometresi yöntemleriyle yapısının doğrulanması.

1.3 Hipotez

Yıllar içinde farklı türdeki antibiyotiklere karşı direnç kazanan ve çeşitli hastalıkların sorumlusu olan *S. aureus* patojenine karşı etkili farklı tedavi yöntemleri aranmaktadır. Bu yöntemler arasında, *S. aureus* litik fajının liziz evresinde patojeni parçalamada rol oynayan Holin proteininin rDNA teknolojisi kullanılarak üretilmesi ve modern kromatografi yöntemleri ile saflaştırılmasının mümkün olduğu ön görülmektedir. Elde edilen saf fraksiyonların *S. aureus* patojeni üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

2
TEORİK BİLGİLER

2.1 Rekombinant Proteinler

Proteinler, canlılığın yaşam döngüsü boyunca farklı biyokimyasal işlevleri yerine getirmekten sorumlu olan yapılardır. Fakat proteinlerin doğal olarak üretilemediği veya yetersiz miktarda üretildiği durumlarda canlı bedeni, biyolojik işlevlerini yerine getirememe noktasına gelebilir [1]. Genetik veya çevresel faktörlü hastalıkların çoğalması, proteinlerin tam olarak işlevini yerine getirememesi ve doğal olmayan bir protein yapısına duyulan ihtiyaç, insanoğlunu modern çözümler arama noktasına getirmiş ve rekombinant proteinlerin keşfiyle birlikte biyoteknoloji ve biyofarmasötik endüstrisinin yaygınlaşmasına katkı sağlamıştır [26][32].

Son yıllarda biyoteknoloji endüstrisindeki hızlı büyüme, rDNA teknolojisi ile üretilebilen rekombinant proteinleri, genetiği değiştirilmiş organizmaları, DNA'nın klonlanmasını ve hücre replikasyonu gibi kavramlarının gelişimini ve terapötik olarak uygulanabilirliğini önemli ölçüde etkilemiştir [25]. Rekombinant protein teknolojisi, bir canlı organizmada doğal olarak bulunmayan genetik verilerin bir vektör organizmanın genomuna yerleştirildiği bir tekniğin sonucu olarak ortaya çıkmıştır [31]. Hedef proteini rekombinant olarak uygun maliyetli ve yeterli miktarda üretebilmek için günümüz teknolojisiyle çok sayıda yöntem ve teknik geliştirilmiştir [1].

2.1.1 Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi, biyolojik süreçleri yönetebilme ve etkin olarak kullanabilme yeteneğimizin bir sonucudur. Spesifik özelliklere sahip olan proteinlerin doğal konakçı hücreler tarafından üretilmesi çok nadiren gerçekleşmesi mümkün olduğu için hedeflenen protein üretiminde rDNA teknolojisi sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir [28]. Rekombinant proteinler, enzimler, terapötik ürünler veya biyofarmasötiklerin üretim yöntemlerinde prokaryotik ve ökaryotik ekpresyon sistemlerinin kullanılması ve ileri teknolojilerin yardımıyla günden güne daha da geliştirilmektedir [29]. Bunun sonucu olarak hücre ekspresyon sistemleri saf rekombinantların elde edilebildiği bir fabrikaya dönüşmüş olur [34]. Genetik

materyalin izolasyonu ile başlayan bu süreç, tanıma bölgelerindeki genin kesilmesi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yoluyla kopyaların çoğaltılması ve sonrasında elde edilen rDNA'nın uygun bir konağa yerleştirilmesi esasına dayanır [37][40]. Bu nedenle PCR tekniği, elde edilmek istenen hedef genlerin yüksek verimle hazırlanabilmesi için kullanılan en yaygın yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır ve rekombinant proteinlerin üretiminde ekspresyona yönelik yapılan çalışmaların vazgeçilmez bir basamağıdır [36][45]. Bu süreçte vektörler; istenen genin hedeflenen organizmaya taşınmasına yardımcı olurken, konak organizma; elde edilen rDNA'nın eksprese edildiği nihai bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır [30][32]. Hedef genin organizmaya eksprese edilmesine olanak tanıyan vektörler, replikasyon sayılarının fazla olması nedeniyle ilgilenilen geni yüksek kopya sayısına ulaştırabilen birimlerdir [4][44].

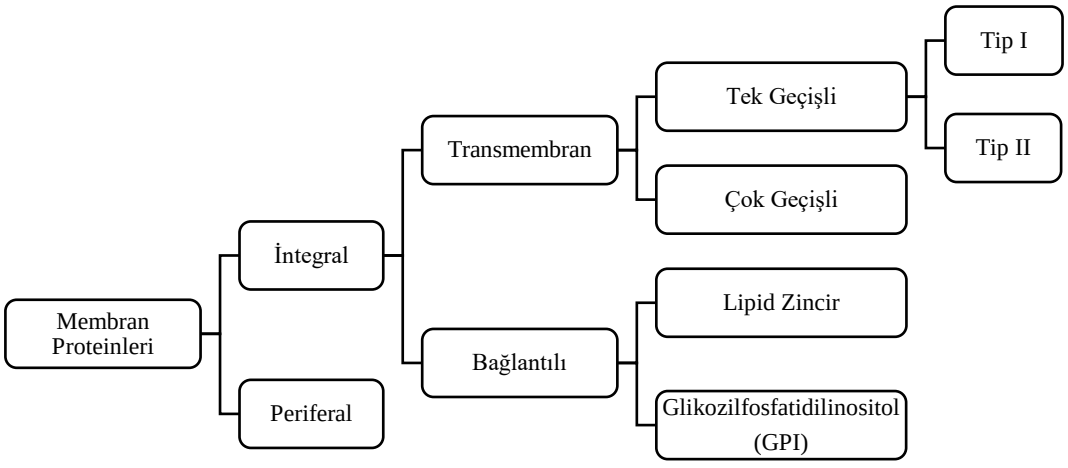
2.1.2 Protein Ekspresyonu

Rekombinant protein ekspresyonu, hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde canlı hücrelerin veya organizmaların nasıl üretildiğini açıklayan sürecin bir tanımıdır ve rDNA'dan türetilen proteinlerin sentezlenmesini ifade eder [41]. Maya, bakülovirüs, transgenik bitkiler, memeli hücresi ve hücresiz ekspresyon sistemleri gibi bakteriyel olmayan rekombinant ekspresyon sistemlerinin oldukça gelişmiş olmasına rağmen, kültürünün ucuz, sürecinin hızlı ve manipüle edilmesindeki kolaylık nedeniyle *E. coli*, hala protein ekspresyonu için sıklıkla tercih edilen bir konaktır [27][42]. Protein üretimini en verimli hale getirmek için geliştirilen, doğru konakçı hücre seçimi, antibiyotik direncinin bilinmesi, şaperon ortaklı ekspresyon, sıcaklık, besiyeri kompozisyonu ve kültür koşullarının kontrol edilmesi gibi bazı stratejiler verimli bir protein üretimine olanak tanır [31][33][34]. Özellikle çalkalama hızı ve sıcaklık faktörleri kritiktir. Çünkü 15-25 ºC arasındaki düşük sıcaklıklar çözünür proteinlerin üretimini arttırırken yüksek sıcaklıklar protein agregasyonuna neden olmaktadır [36]. Promotör ve konak hücre seçimi, hedef rekombinant proteininin üretimi için başka bir önemli kriterdir. Üretilmesi hedeflenen rekombinant protein, daha küçük amino asit zincirine sahip bir protein yapısı olabileceği gibi nispeten daha büyük boyutta mAb ve hatta viral antijenik moleküller de olabileceğinden ekspresyon için doğru hücre hattı seçilmelidir [35][39]. *E. coli* hücresine ek olarak Çin hamster yumurtalık (CHO), insan serviks (HeLa), bebek hamster böbrek (BHK) ve insan embriyonik böbrek (HEK-293)

hücre hatları da rekombinant protein teknolojisinde yüksek verimli ekspresyon kabiliyetleri nedeniyle sıklıkla tercih edilen hücre hatlarıdır [6][7]. *E. coli* protein ekspresyon sisteminde; kodon eğilimi, toksitite, mRNA kararsızlığı, inklüzyon cisimciği oluşumu, protein inaktivitesi ve post translasyonel modifikasyon (PTM) eksikliği gibi birçok sınırlamanın oluşturduğu darboğazı aşmak için çok sayıda vektör, suş ve etiket geliştirilmiştir [36][38][43]. Özellikle terapötik proteinlerin üretiminde *E. coli* hücresinin BL21(DE3) ve C43(DE3) suşları yaygın olarak kullanılmaktadır [5][41]. Transmembran proteinlerin üretilmesi için de bu suşlar kullanılabilmektedir [5]. Ancak ekspresyon koşulları her ne kadar optimize edilmiş olsa da saflaştırma basamaklarında; yüksek miktarda protein kaybı, yeterli saflığa ulaşılamama veya transmembran proteinini lipit çift tabakadan ayıramama gibi bazı darboğazlarla karşılaşılması muhtemeldir [58][63][94].

2.2 Transmembran Proteinler

Membranlar, yapıları itibariyle proteinlerden, değişen miktarlarda karbonhidratlardan ve lipitlerden oluşarak çok çeşitli hücresel rollerde görev alan önemli bir hücre bileşenidir [46]. Hücre membranlarının farklı varyasyonlarda lipit ve protein içermesinin hücre fonksiyonlarındaki görevi henüz kesin olarak belirlenememiş olmasına karşın, bu proteinlerin varlığı ve yapısı hücre tarafından düzenleniyor olması sebebiyle pek çok lipit türü membran işlevinde önemli bir rol oynamaktadır [47]. Membran proteinleri; periferal ve integral proteinler olmak üzere iki ana grupta incelenmektedir. Şekil 2.1'de membran proteinlerinin sınıflandırılması gösterilmektedir.



Şekil 2.1 Membran proteinlerin sınıflandırılması [59]

Akademik ve endüstriyel çevrelerin farmasötik çalışmalar için büyük ilgi gösterdiği transmembran proteinleri ise, bir membran protein olmakla beraber, membranın transmembran alanı (TMD) olarak isimlendirilen, lipit çift tabaka boyunca uzanan proteinlerdir. Transmembran proteinler, membran boyunca uzanma biçimlerine, suda çözünme potansiyeline ve katlanma yeteneklerine göre sınıflandırılırlar [50]. β-tabaka ve α-sarmal yapıda olabilen transmembran proteinleri, insan vücudunda meydana gelen hastalıkların tedavisindeki kullanılabilirliğine dair olan çalışmalar sayesinde umut vaat eden bir rekombinant protein olma yolunda hızla ilerlemektedir [52]. Özellikle *S. aureus* patojenine karşı etkili olması beklenen çok sayıda çalışma günümüzde aktif olarak yürütülmektedir [57]. *E. coli* hücre hattında sentezlenebilecek olası bir transmembran proteini, başlangıçta sitoplazmada sentezlenmekte ve ardından translokasyon için iç membrana gönderilip sonra da yüksek olasılıkla sitoplazmik zarın yüzeyine lokalize olmak için hedeflenmektedir [56].

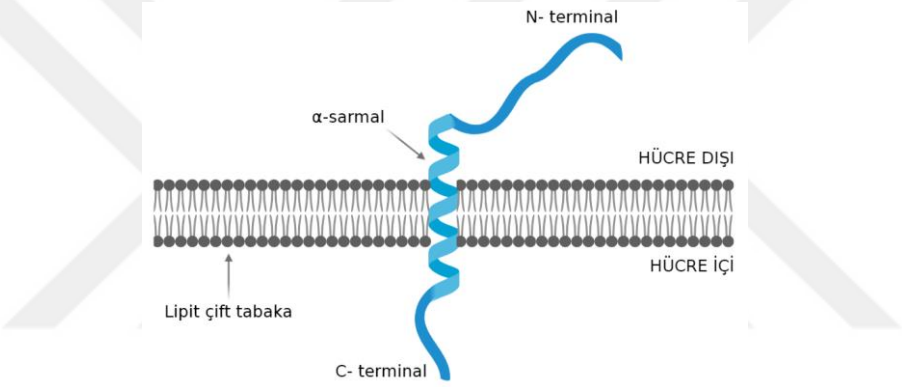
İntegral membran protein kompleksleri, proteaz gruplarına ek olarak birçok membran ve membran dışı alt birim içererek, enerji iletimi, besin ve iyon taşınması gibi faaliyetleri gerçekleştirerek protein işleme ve kalite kontrol süreçleri gibi çeşitli hücresel işlevlerden sorumludur [56]. Bir genomda transmembran protein yapılarının dağılımının farklılık göstermesi, protein zincir uzunluğuna ve membran yapısını kaç kez katettiği ile ilgilidir [49]. Bir membran proteininin; su, çözünen maddeler ve bağışıklık hücreleri için paraselüler geçirgenliğini düzenlemek için lipit çift tabakaya nasıl entegre olduğu protein işlevini anlamada yol göstericidir [48][55]. Ayrıca hücrenin komşu hücre ve hücre dışı matriks bağlantıları ile farklılaşmasını, proliferasyonu ve polariteyi düzenleyen çeşitli sinyal moleküllerini koordine yapılardır [54]. İntegral membran proteinlerinin aksine periferal proteinler gibi bazı membran proteinleri, sentezlendikten sonra lipit çift tabakanın arasında bulunan hidrofobik kısımda hiç bulunmaz; bunun yerine tabakada yer alan başka bir membran proteini ile kovalent olmayan etkileşimler kurarak hücre membranına bağlanırlar [55]. Farklı tür ve uzunlukta üretilen membran proteinlerin yapısının henüz bilinmemesine rağmen, katlanması ve üç boyutlu yapı tayin çalışmaları günümüzde üzerinde en sık çalışılan konulardan biridir [51].

Membran yapısına bağlı bir proteinin, lipit çift tabakanın üzerinde her iki tarafında veya yalnız bir tarafında fonksiyon gösterebilmesi için konumlanması ilgili

proteinin işlevini anlamamızı sağlar [59]. Ökaryot veya prokaryot hücre hatlarında sentezlenen transmembran proteinler, lipit çift tabakayı tek geçişli veya çift geçişli olarak kat edebilir ve ilgili proteinin amino terminali ve karboksi terminali tip I veya tip II olmasına göre tabaka üzerinde farklı yönlenmeler sunabilir [56]. Transmembran proteinler, lipit tabakayı geçiş türlerine göre üç farklı başlık altında incelenebilir.

2.2.1 Tek Geçişli Tip I Transmembran Proteinler

Sitozolde bulunan protein sentez mekanizması, bir membran proteinini başlangıçta çözünemeyecekleri sulu bir ortamda üretir ve lipit çift katmanına kararlı olarak yerleştirir [60]. Tip I tek geçişli transmembran proteinlerinde lipit çift tabaka entegrasyonu için itici ana güç hidrofobik α-sarmal segmentleridir [61].

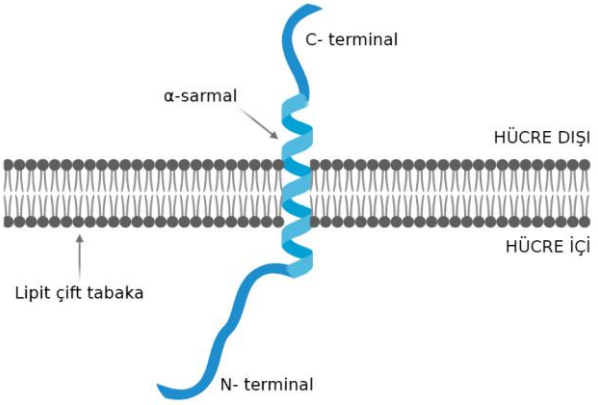


Şekil 2.2 Tek geçişli tip I transmembran protein yapısı

Tip I transmembran proteinleri, Şekil 2.2'de gösterildiği gibi lipit çift tabaka üzerinde konumlanırken N- terminalleri hücre dışı boşluğa bakacak şekilde yönlenir [63]. Karakter olarak hidrofobik yapıda olan lipit tabakasının içinden bir transmembran proteininin geçebilmesi için, proteinin, tabaka ile teması olan bölgelerinin de (α-sarmal) hidrofobik yapıda olması beklenir ve bu bölgenin uzunluğu, sayısı 7 ila 15 arasında değişen, çoğunlukla apolar yapıya sahip olan amino asitlerden oluşur [62]. Genel olarak integral membran proteinlerinin, yapısal olarak önemli ölçüde suda çözünebilen proteinlerden farklı olması ve bundan dolayı farklı katlanma profili sergileme eğiliminde olmaları, ekspresyon sistemleri ve hücresel arka planları ile ilgilidir [64].

2.2.2 Tek Geçişli Tip II Transmembran Proteinler

Tip I transmembran proteinler gibi tip II proteinler de lipit çift tabakaya tek bir α-sarmal ile tutunur ve hem sabitlenmesi hem de yerleştirmesi bir sinyal-çapa dizisi sorumluluğunda gerçekleşir [62]. Tip II proteinlerinin de sentezlendikten sonra lipit tabakasına yerleşmesi, hidrofobisitesi ile alakalıdır ve tabaka ile ilişkisi olan bölge 18-25 adet, çoğunlukla apolar özellik gösteren amino asitlerden oluşur [62][65].



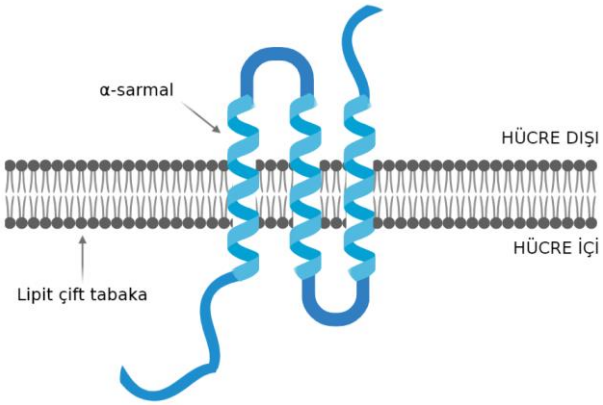
Şekil 2.3 Tek geçişli tip II transmembran protein yapısı

Tip II transmembran proteinlerin tip I yapısından farklı olarak Şekil 2.3'de gösterildiği gibi C- terminali, hücre dışı boşluğa denk gelecek şekilde yönelir ve tek bir α-sarmal lipit çift tabakada konumlanır. Bu α-sarmalın bileşenlerini, yalnızca yapısında bulunan ve sarmal bölümlerde yan bölgelere göre daha sık meydana gelen amino asitlerin hidrofobisitesi belirler ve bu iki tip protein integral membran proteinlerin bulunan en yaygın formlarıdır [49].

2.2.3 Çok Geçişli Transmembran Proteinler

Transmembran α-sarmalların uzunlukları birbirine benzerlik gösterse de bitopik (tek geçişli tip I, tip II) ve politopik (çok geçişli) proteinlerin amino asit bileşimi, yapısı ve işlevselliği arasında farklılıklar vardır [66]. Tip I ve tip II proteinlerinden farklı olarak, çok geçişli transmembran proteinler, lipit çift tabakayı α-sarmallar ile birkaç kez ve sıkıca kat eder. Sıkı bir biçimde oluşturulan bu yapının, çözünen maddeler, iyonlar ve hücrelerin taşınmasına olanak sağladığı ve hücreyle dış ortamın bağlantılarının sağlanması gibi çeşitli fonksiyonlarda görev aldığı düşünülür [54]. Bu çok geçişli proteinlerin kendi içinde farklı türleri olabilir. N-terminal ucu veya C- terminal kısmı farklı yönlere bakabileceği gibi ikisi aynı anda hücre içine veya hücre dışı ortama da uzanabilir. Hedeflenen proteinin

transmembran alanının lipit çift tabakaya entegre olabilmesi için ideal uzunluğuna ve yeterince hidrofobikliğe sahip olması gerekir [65]. Hidrofobisite ve zincir uzunluğu kavramları, α-sarmalların eğilimi ve şekli gibi özelliklerine göre proteini ayırt edebilmek için önemlidir [62].



Şekil 2.4 Çok geçişli transmembran protein yapısı

Şekil 2.4'te de görüldüğü gibi α-sarmalların sayısı iki veya daha fazla olabilir. Çok sayıda α-sarmalın uzunluğu ve hizalanması karşılaştırılırken, bir sarmalın lipit baş grubunun başka bir sarmalın hidrofobik çekirdeğine denk gelmesi gibi bir sorunla karşılaşılması muhtemeldir, ayrıca lipit çift tabaka kalınlığı değiştikçe, içinde bulunan proteinlerin α-sarmallarında da değişimler meydana gelebilir [66].

Konformasyonlarına göre iki ana tipe ayrılan transmembran proteinler, insan vücudunda hücreler arası iletişim ve iyon taşınması gibi görevleri gerçekleştirerek, depresyon, hipertansiyon ve kanser gibi hastalıklarda da etkili rol oynayabilmeleri nedeniyle farmasötik endüstrisi tarafından yakından takip edilmektedir [52]. Ancak bir protein doğru katlandığı zaman aktivite gösterebilir ve bir doku için hedeflenebilir. Uzun bir amino asit zinciri olan proteinlerin katlanmasında, birincil, ikincil ve üçüncül katlanma yapılarının oluşması için hidrojen bağları, van der Waals etkileşimleri, disülfit köprüleri ve hidrofobik etkileşimler gibi birçok kuvvet büyük bir öneme sahiptir [67].

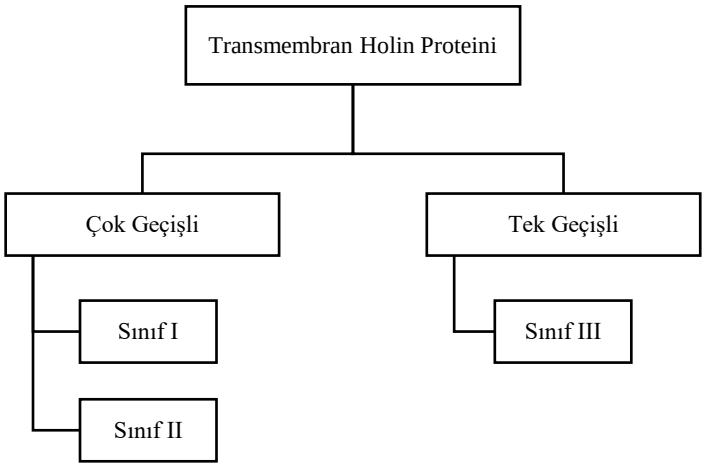
2.2.4 Holin Proteini ve Transmembran Alanı

Bakteriyofajların veya bakteriyel virüslerin son yıllarda antibiyotiklere olan direncinin artması, hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan antibiyotiklerin etkinliğinin azalmasına neden olmuş ve litik bakteriyofaj proteinleri üzerinde yapılan çalışmaların daha hızlı artmasını sağlayarak enfeksiyon tedavileri için bir

umut ışığı olmuştur [70]. Fajların antibakteriyel farmasötik bileşenler için tasarımı bazı sınırlamalara sahip olsa da tıp ve veterinerlik alanlarında birçok kullanım uygulaması mevcuttur.

Bu kapsamda sıklıkla araştırmalara konu olan Holin proteini, faj kodlu endolizinlerin peptidoglikana erişimini kontrol ederek liziz sürecini tetikleyen membran protein grubudur [69]. Holinler, sitoplazmik zarda kendiliğinden oluşan veya lezyonlar oluşturan, en az bir hidrofobik α-sarmaldan oluşan ve konakçı hücrenin sitoplazmik membranına oligomerik olarak yerleşen membran proteinleridir [73]. Büyük bir aile olmalarına rağmen bu zamana kadar yapılan çalışmalarda yalnızca 52 adet Holin ailesi iyi tanımlanmış ve karakterize edilerek veri tabanlarına eklenmiştir [71]. Holin proteinlerinin sekans benzerliği paylaşmadığı bilinmektedir, ancak hepsi hidrofobik TMD ve yükü oldukça fazla olan bir hidrofilik C- terminal alanına sahiptir [70]. Hidrofobik amino asitlerin toplam yapıdaki bulunma yüzdesi ve hidrofilik amino asitlerin bulunma sıklığı, tüm protein yapısının hidrofobisitesini ve protein net yükünü etkileyen en önemli faktörlerdir. Bu da transmembran proteinlerinin saflaştırma basamaklarını dizayn ederken göz önünde bulundurulması gereken önemli bir faktördür.

Holin proteinleri, tek geçişli ve çift geçişli olmak üzere topolojik olarak üç sınıfta incelenebilir. Şekil 2.5'te Holin proteininin sınıflandırılması gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Holin proteini sınıflandırmaları

- Sınıf I Holinler, Bakteriyofaj I S proteini ve *S. aureus* faj P68Hol15 proteinin de bulunduğu, 95'ten fazla amino asit sayısına ve üç adet TMD bölgesine sahip proteinlerdir.

- Sınıf II Holinler, 65 ila 95 kadar amino asite ve iki adet TMD bölgesine sahip transmembran protein türleridir.
- Sınıf III Holinler ise, sınıf I ve II'ye göre daha küçük yapıda olup sadece bir TMD bölgesine sahiplerdir [74][79].

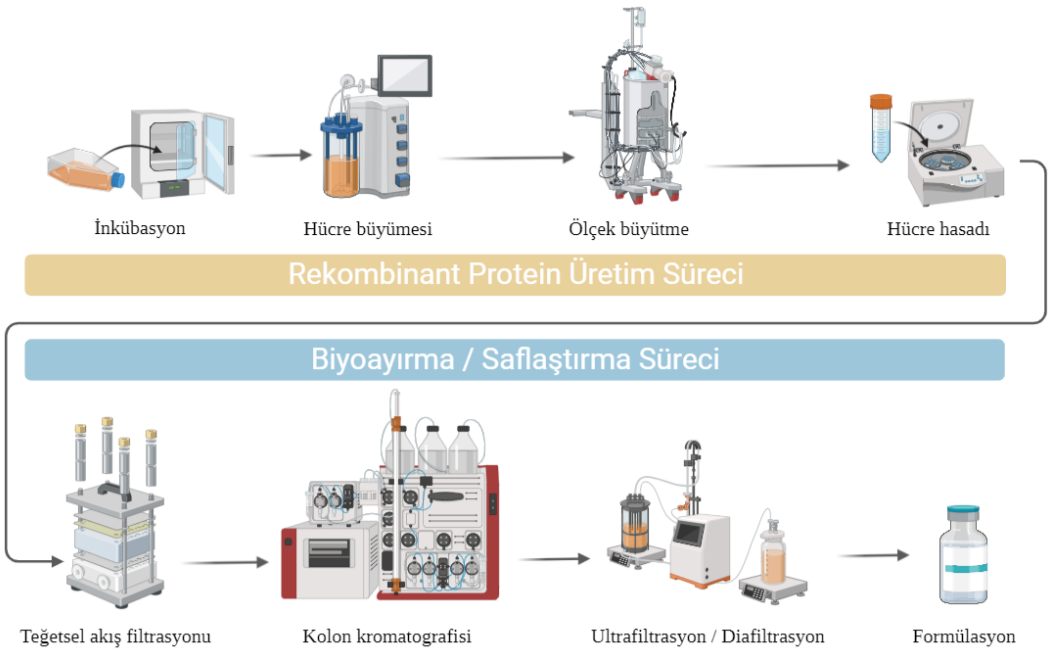
Holin proteinlerinin lipit çift tabaka içinde bulunan bölgeleri TMD olarak adlandırılır ve sınıflarına göre sayısı birden fazla olabilmektedir. Her bir Holin sınıfının bakteriler üzerinde işlevleri farklılık gösterse de temel prensip, bakteriyofajlar tarafından kodlanan bakteri hücrelerinin iç ve dış membranında yıkıma yol açarak hücreyi parçalaması esasına dayanır [80]. Bu prensibin formülasyonu oluşturularak bir biyofarmasötik müstahzar olarak tasarlanması, antimikrobiyal direncin küresel olarak insan sağlığını tehdit ettiği ve etmeye devam edeceği düşünüldüğünde kaçınılmaz olacaktır [77][78]. Yapılan bazı çalışmalarda, *S. aureus* bakterisini enfekte edebilen ve rekombinant olarak üretilebilen HolGH15 proteininin antibakteriyel aktivite gösterdiği ve püskürtme veya ıslatma yoluyla kullanıldığında kontaminasyonu önlenebileceği gösterilmiştir [72]. Bu strateji, Holin proteininin ve bir endolizin uyumlu eylemine dayanır ve virüslerin hücre membranının parçalanmasını sağlayarak antibiyotik direnç krizi konusunda modern tedavi yöntemleri için çözüm olmaya adaydır [75][76].

2.3 Protein Saflaştırma Yöntemleri

Rekombinant olarak üretilebilen proteinler, biyoteknoloji ve ilaç endüstrilerinde önemli bir yere sahiptir. Verimli ve daha hızlı protein saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi, saflaştırma proseslerinin uygulandığı biyofarmasötik endüstrisi başta olmak üzere birçok alanda yaygın kullanım alanı bulmuştur. Rekombinant protein saflaştırılması, karmaşık bir protein matriksinden hedeflenen proteinin tek başına yüksek saflıkta yüksek verimle ayrıştırılması işlemlerini ifade eder [87]. Çünkü yüksek saflık oranında proteinlerin elde edilmesi, hedeflenen proteinin yapısal özelliklerinin araştırılması, in vivo ve in vitro test süreçlerinin ardından farmasötik ürün olarak kullanımı için esastır [88].

Biyofarmasötiklerin üretilmesi ve saflaştırılması sürecindeki teknolojilerin, 1980'lerden bu yana gelişerek yüksek verimli hale gelmesi farklı rekombinant proteinlerin üretim süreçlerinin gelişmesine olanak sağlamıştır [81]. Rekombinant DNA teknolojisinden önce ancak domuz pankreasından sentezlenebilen insan

insülininin [89], Gıda ve İlaç Dairesi'nden (FDA) onay almasının ardından artık rekombinant protein teknolojisiyle üretilebiliyor olması bu alanda çığır açan önemli bir kilometre taşıdır [3][81]. İnsülinin ardından diğer rekombinant proteinler, daha büyük yapıdaki terapötikler ve hatta mAb için farklı üretim metodolojileri oluşturularak farmasötik endüstrisinin hizmetine sunulmuştur. Tarihsel süreçte rekombinant proteinlerin üretilmesinde çeşitli yöntemler mevcuttur. Hedeflenen protein *E. coli* gibi bakteri tabanlı bir hücre hattında üretilebileceği gibi farklı memeli hücre hatlarında da üretilebilmesi mümkündür [5][6][7]. Hücre hattında bir ekspresyonun gerçekleşebilmesi, hedef molekülde istenen özelliklere göre değişebilmektedir. İstenen proteinin post translasyonel modifikasyona uğraması veya uğramaması proteinin katlanmasını doğrudan etkilerken, protein yapısının hidrofilik veya hidrofobik olması da protein aktivitesi üzerinde doğrudan etkilidir [81][82]. Bir biyoteknolojik proteinin üretim ve saflaştırma süreçleri Şekil 2.6'dakine benzer bir biçimde ilerlemektedir. Rekombinant protein üretim süreci; hücre çözünmesinden başlayıp hücrelerin logaritmik olarak çoğaldıktan sonra hedeflenen rekombinant proteinin üretildiği ve sonrasında hasat edildiği üretim (upstream processing) basamaklarının ardından teğetsel akış filtrasyonu, ultrafiltrasyon ve farklı prensiplere dayalı kolon kromatografisi gibi saflaştırma işlemlerinin (downstream processing) gerçekleştirildiği biyoayırma adımlarından oluşur [90].



Şekil 2.6 Rekombinant protein üretim ve saflaştırma süreçleri akış şeması

Üretim ve saflaştırma süreçleri, hedef protein ve seçilen hücre hattına göre değişiklik gösterebilir. Örneğin teğetsel akış filtrasyonu, kolon kromatografisinden önce olabileceği gibi, sonrasında da uygulandığı prosesler görmek mümkündür. Saflaştırma süreçleri, hücre canlılığının sonlandırıldığı hücre hasadından sonra başlar ve hedef proteinin gereksinimleri göz önünde bulundurularak süreç şekillendirilir [83]. Hücre lizizi hemen hemen her hücre hattı için ortak bir süreçken, solubilizasyon ve yeniden katlanma gereksinimi yalnızca post translasyonel modifikasyona uğramayan prokaryotik hücre hatlarını kapsamaktadır [84]. Çünkü bir protein CHO gibi bir memeli hücrede eksprese edilirse proteini yeniden katlamaya gerek kalmayacak ve protein aktif olarak görev yapabilecektir. Ancak *E. coli* hücresinde eksprese edildiğinde protein sentezi yüksek olasılıkla yanlış katlanmış formunda elde edileceği için proteinin disülfit köprülerinin kırılarak lineer hale gelmesi ve ardından doğru katlanma formuna kavuşması sağlanmaktadır [15][86]. Benzer bir durum kromatografi yöntemleri için de geçerli olup hedef proteinin karakteristik özelliklerine göre bir saflaştırma yöntemi seçilmelidir [88]. Bunun için öncelikle saflaştırma metotlarının iyi öğrenilmesi ve hedeflenen rekombinant protein için uygunluğunun değerlendirilmesi önemlidir.

2.3.1 Hücre Lizizi

Bir hücreden DNA, RNA, protein veya organeller gibi materyalleri serbest bırakmak için hücre membranının parçalandığı veya yok edildiği yöntemlerin tamamı hücre lizizi olarak tanımlanır [93]. Hem hücre içi süreçlerin karmaşıklığı hem de hücre içi materyallerin çokluğu, hedef proteinin sinyal iletim sürecinin sonundaki konumu da göz önüne alındığında, liziz süreçleri aşılması gereken bir takım zorluklarla karşı karşıyadır [91]. Liziz prosesi uygulanırken hedef proteinin yapısal bütünlüğünün zarar görmemesi ve aktivitesini kaybetmemesi, diğer saflaştırma basamaklarında olduğu gibi bu adımda da çok önemlidir. Yüksek değerli proteinler üretmek için seçilen ekspresyon hattının prokaryotik veya ökaryotik temelli olması; liziz prosesindeki verimi, maliyeti ve tekrarlanabilirliği etkiler [81]. Genel olarak memeli hücre hatlarında, hedef rekombinant protein, membranın dışında lokalize olduğu için liziz yöntemleri bazen basittir ve sadece 0,8 µm gözenek çapına sahip bir filtreden geçirildiğinde bile kolaylıkla serbest kalabilir. Buna karşın bakteri tabanlı hücre hatlarında durum biraz daha farklı ve karmaşık olabilir. Örnek verilecek olursa, periferal proteinler membrana sıkı

olmayan bir biçimde bağlanır ve uygun pH, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) veya düşük konsantrasyondaki deterjan koşullarında bile salınabilirken integral membran proteinleri membrandan ayrılabilmek için yüksek konsantrasyondaki deterjanlara, hatta enzim kullanımına dahi ihtiyaç duyabilir [82].

Kimyasal yöntemlerden hariç hücreleri parçalamak için kullanılabilecek optik, mekanik, sonikasyon [92] ve elektriksel liziz gibi dört farklı yaklaşım daha mevcuttur. [91]. Bu metotlardan sonikasyon, ultrasonik dalgaların kullanımıyla yüksek basınçlı alanlar oluşturarak hücreleri parçalamada laboratuvar ve pilot ölçekli denemelerde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Sonikasyonun kimyasal ajanlarla birlikte kullanımı ise daha etkili bir hücre lizizi gerçekleştirilmesi sağlar, ancak özellikle çok geçişli transmembran proteinlerini hücre membranından ayırabilmek için bu iki yöntem de yetersiz kalabilmektedir [93]. Lipit çift tabakaya entegre olmuş membran proteininin hücre dışına alınması bazı durumlarda başta lizozim gibi membranı kuvvetli parçalama özelliğine sahip enzimler gerektirebilir [94]. Enzim kullanımı genellikle sonikasyon ve kimyasal deterjanlara ek olarak tercih edilen bir yöntemdir. Ancak saflaştırma süreçlerinin maliyetleri düşünüldüğünde, hücre lizizi için enzim kullanımı da fazladan bir maliyete sebep olacaktır. Bu sebeple sonikasyonu veya mekanik lizizi efektif olarak kullanabilmek ve mümkün mertebe maliyetleri düşürebilmek adına enzim kullanımından olabildiğince kaçınılmalıdır [82][91].

2.3.2 Solubilizasyon ve Yeniden Katlanma Süreçleri

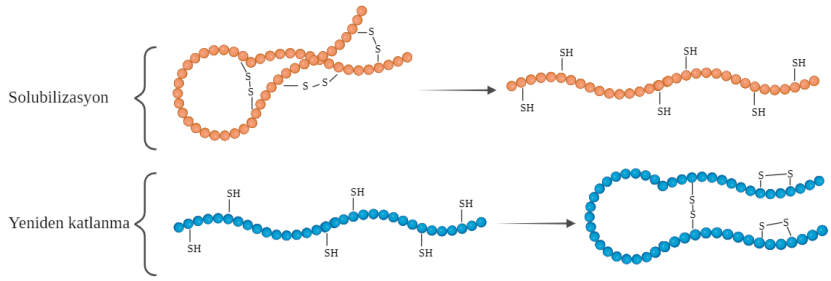
Translasyondan sonra proteinler, son yapılarına ulaşmak için farklı modifikasyon süreçlerinden geçerek, ısı şoku proteinleri ve şaperoninlerin de desteğiyle son konformasyonlarına katlanırlar [96]. Proteinlerin doğru formunda katlanmış olması direkt olarak biyolojik aktivitesini etkileyeceği için yanlış katlanmaların önüne geçmek önemlidir. Protein yapısı, birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapı olmak üzere dört farklı katlanma hiyerarşisine göre tanımlanır [99].

- Birincil yapı: Protein dizisini oluşturan amino asitlerin peptit bağlarıyla birbirine bağlanmasının bir ifadesidir. Peptit bağları kovalent türünde bir bağ yapısıdır.
- İkincil yapı: Polipeptit zincirinin oluşmasının ardından α-sarmal ve β-yaprakları formunda üç boyutlu formuna katlandığı yapı olarak tanımlanır. α-sarmalında her dönüş 3,6 amino asit içerir. β-yaprakları, üç boyutlu protein omurgasında

amino asitlerin bükülmesiyle gerçekleşir. Çok sayıda hidrojen bağı, ikincil yapının oluşmasında itici güçtür [100].

- Üçüncül ve dördüncül yapı: Her bir üçüncül yapı ikincil yapının bir kısmının katlanmasından oluşur. α-sarmal ve β-yapraklar kompakt bir yapı oluşturmak üzere katlanırlar. Bu yapının oluşmasında, yapıda sistein amino asidinin bulunmasına göre molekül içi veya moleküller arası disülfit bağları oluşabilir. Bazı proteinler daha işlevsel hale gelmek için üçüncül grupları birbirleriyle agregat oluşturarak bir araya gelirler. Her proteinin dördüncül yapısı olmayabilir [97][100].

Protein yapısının yanlış katlanması ifadesi, disülfit bağlarının yanlış sistein amino asitlerinin arasında olmasından kaynaklandığı söylenebilir. Post translasyonel modifikasyona uğrayan proteinler, stres altında üretilmediği sürece genellikle doğru katlanırlar [81]. Ancak farmasötik endüstrisinde de sıklıkla tercih edilen *E. coli* ekspresyon sistemlerinde protein yüksek olasılıkla yanlış katlanmış olacağından hücre lizizi sonrasında proteinin denatüre hale getirilip ardından doğru konformasyonda yeniden katlanması sağlanmalıdır [98]. Geçtiğimiz 20 yıl *E. coli* ekspresyon sistemlerinde protein katlanmasını teşvik etmek, transkolasyonunu desteklemek ve yanlış katlanmayı önlemek için bazı mekanizmalar geliştirmek için çalışılıyor olsa da yanlış katlanmanın önlenmesi endüstriyel olarak halen solubilizasyon yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir [102]. Ancak bu yeni nesil çalışmaların katlama modülatörleri oluşturması ve glikozilasyon gerçekleştirmesi için ortaya çıkan stratejiler endüstri için umut ışığı olarak görülmektedir.



Şekil 2.7 Proteinlerde solubilizasyon ve yeniden katlanma süreçleri

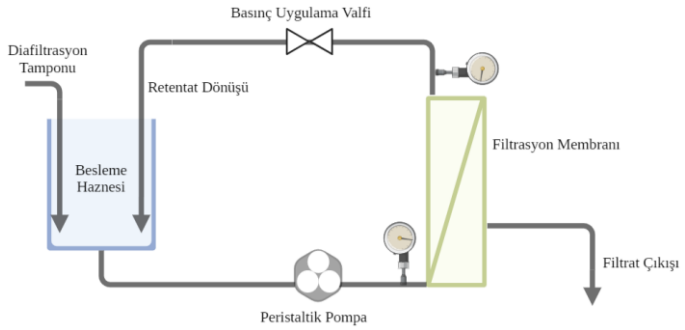
Solubilizasyon işlemlerinde temel prensip disülfit bağlarının kırılarak protein yapısının lineer bir hale gelmesini sağlamaktır (Şekil 2.7) [19]. Bunun için sıklıkla tercih edilen metot, proteinin yüksek molaritede üre veya guanidin HCl gibi kimyasallara maruz bırakılmasıdır [98]. Üre, yüksek konsantrasyonda çözelti

ortamında bulunduğunda protein yapısının lineer olmasını sağlar. Buna ek olarak farklı kimyasal ajanlar da çözelti ortamında bulunabilir. Proses sıcaklığı genel olarak yaklaşık 26 ºC olması tercih edilir ve nötral pH koşulları altında hızlı bir karıştırma uygulanarak disülfit bağlarının kırılıp, lineer bir protein elde edilmeye çalışılır [101]. Yeniden katlanma prosesinde ise kabul görmüş işleyiş biraz daha farklı ilerlemektedir. Proteinin yeniden katlanması, disülfit köprülerinin yeniden oluşturularak hedef proteinin doğru konumunda, biyolojik aktivite gösterecek şekilde katlanmasını veya denatüre olmuş bir proteinin yeniden doğal formuna kavuşmasını ifade eder [67][98]. Solubilizasyonun aksine yeniden katlanma işlemleri için daha düşük sıcaklıklar tercih edilir ve uygun pH veya tuz gibi koşullarının katlanma mekanizmasını çalıştırması beklenir [85][95]. Yeniden katlanma süreci, solubilizasyon gibi yoğun ortamlarda değil daha düşük konsantrasyonlarda, daha uzun sürelerde gerçekleştirilir. Bu süreç boyunca disülfit köprüleri oluşur, ancak protein yapısı üzerinde sistein amino asidi bir tane olabildiği gibi hiç olmadığı durumlar da mümkündür. Eğer yapı üzerinde tek bir sistein amino asidi mevcutsa, bu durumda protein, başka bir proteinle disülfit köprüsü oluşturması muhtemeldir [97][103]. Yapı üzerinde hiç sistein olmaması durumunda ise biyolojik yapıda sadece hidrofobik etkileşimler, α-sarmal ve β-tabaka yapıları aktif rol oynayabilir. Katlanma prosesi, bir saflaştırma sürecinin en önemli adımı olsa da, henüz araştırma sürecinde olan rekombinant proteinler için bu işlemin prosesteki yerin değiştirilebilir [105]. Örneğin, tüm saflaştırma süreçlerinden sonra da proteinin yeniden katlanması gerçekleştirilebilir. Üretilen rekombinant proteinin doğru katlanıp katlanmadığı konusu biyolojik aktivitenin devamlılığı için önemlidir ve bu sürecin gerektirdiği analitik metotlar için dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi ve X ışını kristalografisi bizlere katlanmanın doğruluğu konusunda yüksek kesinlikte yol gösterir [97][104].

2.3.3 Teğetsel Akış Filtrasyonu

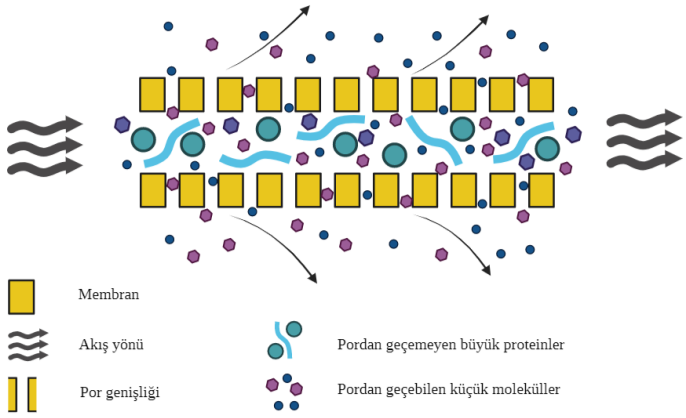
Biyofarmasötik endüstrisinde saflaştırma süreçlerinin vazgeçilmez bir adımı olan ve çapraz akış filtrasyonu (CFF) olarak da bilinen teğetsel akış filtrasyonlarının (TFF) kullanımı 1960'lara kadar dayanmaktadır [115]. Günümüzde ise daha yenilikçi modeller ve çözümler ile biyoteknoloji sektöründe daha yaygın uygulama alanı bulmuşlardır. Konvansiyonel olarak TFF prosesleri tampon değişimi, konsantrasyon ve ön saflaştırma işlemleri için kullanılan molekül büyüklüğüne

dayalı bir ayrıştırma yöntemidir [107]. Genel olarak TFF prosesi (Şekil 2.8) bir besleme tankına eklenen protein çözeltisinin, akışı sağlayan bir pompanın yardımıyla membrandan geçirilerek tekrar başlangıç konumuna geri döndürülmesi ve bu sirkülasyonun sürekli sağlanması olarak açıklanabilir.



Şekil 2.8 Teğetsel akış filtrasyonu

Normal bir filtrasyonu sürecinde filtre edilecek çözelti, filtreden tek seferde ve gözenek boyutundan daha büyük yapıların geçişine izin verilmeden gerçekleştirilirken, teğetsel akış filtrasyonlarında çözelti, filtre ya da membrandan sürekli sirküle olacak şekilde geçirilir [117]. Aslında küçük moleküllerin geçişine izin verilmesinden ziyade büyük moleküllerin veya proteinlerin çözelti ortamından uzaklaşmaması için kullanılırlar. Endüstriyel olarak kaset isminin yaygın olarak kullanıldığı TFF membranları, hidrofobik ve hidrofilik özelliklerine göre ayrılarak teknolojinin de gelişmesiyle 2 kDa'dan 300 kDa'a kadar farklı por genişliklerine sahip membranlar geliştirilebilmiştir (Şekil 2.9) [113]. Bu boyut farklılığı, daha küçük proteinlerin saflaştırılmasından daha büyük makro proteinlerin saflaştırılmasına kadar hemen hemen birçok proteinin ayrıştırılmasına olanak sağlar [109].



Şekil 2.9 Teğetsel akış membranlarının çalışma prensibi

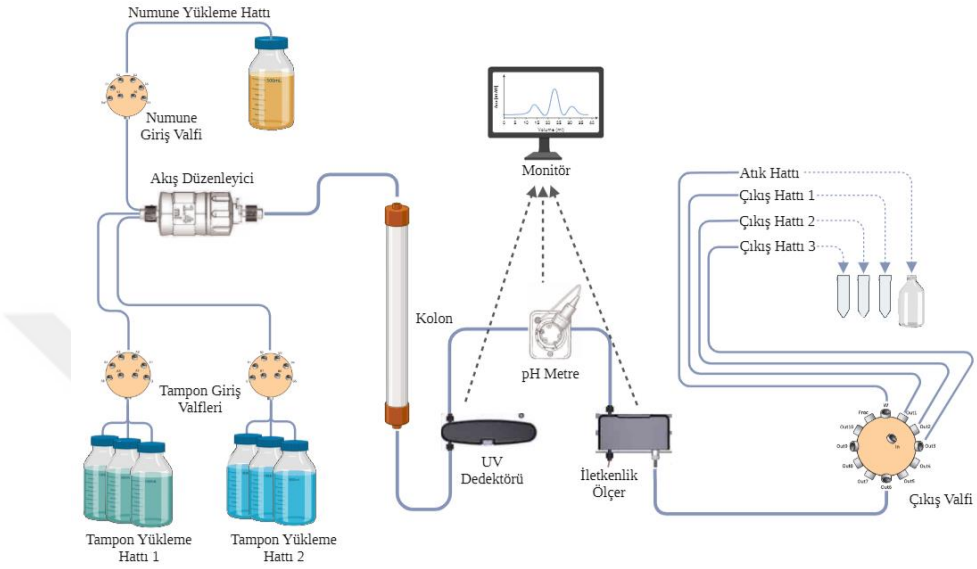
Bir protein çözeltisi membran yüzeyi boyunca hareket ederken, membranın por boyutundan daha küçük olan kimyasallar veya safsızlıklar ortamdan uzaklaşmaya başlar. Por boyutundan daha büyük olan makro proteinler ise döngü boyunca hareketine devam eder. Bu sayede ultrafiltrasyon yapılarak çözelti hacminin azalarak proteinin konsantre edilmesine olanak tanınır [110]. Özellikle hücre lizizinden sonra protein çözelti ortamının yoğun bir hücre debrisi ile karşı karşıya olduğu düşünüldüğünde hem küçük boyuttaki safsızlıkların hem de istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılmasında eşsiz bir yöntemdir [114]. Protein konsantrasyonunun istenen değere kadar arttırılabilmesinin bir avantajı da kolon kromatografisi öncesinde kullanıldığında kolona ideal olarak bağlanmasını sağlayabilmesidir. Çünkü kromatografi yapılırken kolona yüklenecek proteinin konsantrasyonu proses verimi açısından önemlidir [106].

TFF sistemlerinin bir diğer avantajı ise diafiltrasyon uygulanabilirliği açısından elverişli olmasıdır. Diafiltrasyon, proteinin bulunduğu çözücü ortamının değiştirilmesi olarak tanımlanabilir. Bu sayede protein, farklı bir çözücü ortamına alınabilir ve iletkenliği istenilen seviyeye ayarlanabilir [108][113]. İletkenliğin düşürülmesi özellikle iyon değişim kromatografisi öncesinde ve sonrasında, iletkenliğin yüksek olmasına bağlı olarak hedef proteinin kolona tutunamaması gibi sorunları önlemek için sıklıkla tercih edilir. Özellikle küçük hacimlerde dahi çalışılmasına olanak tanıması, etkin ayırma yeteneği ve nispeten düşük maliyetleri sayesinde TFF prosesleri biyofarmasötik endüstrisi için vazgeçilmez bir adımdır [111][112][116].

2.3.4 Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi; protein karışımlarını, boyutuna, toplam yüküne, yapı üzerinde bulunan yakalama etiketine, yüzey etkileşim biçimine ve hidrofobik grupların durağan faza bağlanmalarına göre birbirinden ayrılmalarını sağlayarak biyolojik ilaçların keşfinin genişlemesini destekleyen yöntemler bütünü olarak tanımlanabilir [123]. Olabilecek en kısa adımda istenen saf proteini elde etmek, başarılı ve yüksek verimli bir saflaştırmanın anahtarıdır [83]. Kolon kromatografisi, özellikle biyofarmasötik endüstrisinde protein saflaştırma adımlarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [124]. Teknolojinin de sağladığı olanaklarla birlikte kolon kromatografisi sistemleri çok yönlü olarak bazı verileri de anlık olarak izlemesine olanak sağlar (Şekil 2.10). Örneğin, protein çözeltisinin kolondan

geçtikten sonra pH değeri, iletkenliği, akış hızı, basıncı ve UV absorbans değeri izlenebilir. Bu sayede kolonun ve saflaştırma metodun gereksinimlerine en uygun akış hızı ve tampon karışım oranı belirlenerek hedef proteinin saf olarak izole edilmesi sağlanır. Prokaryotik ve ökaryotik ekspresyon sistemlerindeki saflaştırma stratejileri ise birkaç yöntem dışında esasen aynıdır [84].



Şekil 2.10 Preparatif kolon kromatografisi sistemi

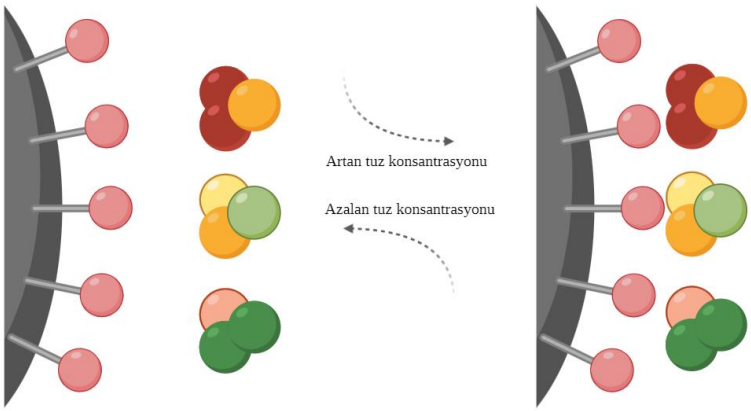
Birçok bileşenin birbiriyle koordineli olarak çalışması modern kromatografi sistemini oluşturur. Bir akış düzenleyicisi, istenen tamponu veya protein çözeltisini istenen akış hızıyla kolondan geçirerek kolon şartlanma prosedürünü, proteinin kolona tutunmasını ve alıkonulan proteinin kolondan ayrılması prosedürlerini gerçekleştirebilir [87]. Ardından kolondan geçirilen tüm çözeltilerin anlık olarak pH'ı, iletkenliği ve UV absorbans değeri anlık olarak izlenerek saflaştırma prosesi hakkında yorum yapılabilir. Hedef protein ve diğer proteinler kolondan ayrıldıktan sonra 280 nm'de absorbans ölçümü yapan UV dedektörü kullanılarak ayrı pikler görülür. Görülen bu ayrılmış pikler yüksek oranda saflaşmış proteinleri ifade eder [88].

Kromatografik saflaştırma işlemlerinde metodoloji geliştirilebilmesi oldukça karmaşıktır ve genel olarak deneme yanılma yaklaşımlarını içerir [119]. Biyomoleküllerin sahip olduğu karakteristik özellikleri kromatografik yöntem oluşturulmasında önemli rol oynar [123]. Örneğin; proteinin sahip olduğu yüke göre iyon değişim kromatografisi, hidrofobik özelliklerine göre hidrofobik değişim

kromatografisi, boyutuna göre boyut dışlama kromatografisi veya özel bağlanma özelliklerinden yararlanarak afinite kromatografisi oluşturulabilir. Modern tekniklerin gelişmesiyle birlikte aynı türde saflaştırma yapabilen farklı özelliklerde kolon dolgu maddeleri geliştirilmiş ve verimliliğin en üst düzeye çıkarılması mümkün olmuştur [84][119]. Maliyetleri ve yapısal stabilitesi göz önünde bulundurulduğunda rekombinant proteinlerin saflaştırma süreçlerinin olabilen en kısa sürede ve en az basamakta gerçekleşmesi arzu edilir. Fakat yine de anlamlı bir saflık derecesine ulaşılması, en az iki belki üç kromatografi yönteminin uygulanmasını gerektirebilir. Ancak hangi kromatografi yönteminin daha etkili olacağı ve prosesin hangi sıra ile uygulanacağı konusunda kesin kurallar bulunmamakla beraber hedef proteinin karakteristik özelliklerine göre dizayn edilmesi gerekmektedir. Biyofarmasötiklerin verimli olarak geri kazanımı ve saflaştırılması işlemlerinde ise hidrofobik etkileşim, iyon değişim, ters faz ve afinite kromatografisi yaygın olarak kullanılmaktadır [131].

2.3.4.1 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Hareketsizleştirilmiş hidrofobik ligandlar ve protein yapısındaki apolar bölgeler arasındaki hidrofobik etkileşim temeline dayanan bir kromatografi yöntemidir [132]. Protein yapısında hidrofobik amino asitlerin bulunma yüzdesi genel yapının hidrofobikliğini önemli ölçüde etkileyen bir faktördür. Transmembran proteinlerinde lipit çift tabakada bulunan α-sarmalları hidrofobik özellik sergilerken tabaka dışında kalan bölgeler hidrofilik özellik gösterme eğilimindedir [97]. Hidrofobik bölgelerin açığa çıkarılması ve proteinin kolona bağlanmasını sağlayan adsorpsiyonun artması, mobil fazdaki yüksek tuz konsantrasyonları ile mümkün olabilir (Şekil 2.11) [118].



Şekil 2.11 Yüksek tuz konsantrasyonunda proteinlerin kolona bağlanması

Protein, membran dışına alındıktan sonra hidrofobik bölgelerin sudan uzaklaşarak proteinin iç kısımlarına doğru katlanacak biçimde konumlandığı görülür [95]. Kolona yüklenecek protein çözeltisi yüksek tuz içereceği için kolonun şartlanması da aynı konsantrasyondaki tuz içeren bir mobil fazla yapılmalıdır. Protein sabit faza tutunduktan sonra kolondan geçirilen tuzsuz veya alkol bazlı bir mobil faz ile proteinlerin azalan hidrofobik koşulun oluşmasıyla sırayla kolondan ayrılmaya başladığı UV_{280} absorbans değerinde bir artış olmasıyla gözlemlenebilir [127]. Yüksek verimli bir kromatografi prosesi için elde edilen piklerin ayrım gücünün yüksek olması önemlidir. Hücre lizizi aşamasında kullanılan deterjanların varlığı, saflaştırma aşamasında ayrım gücünü ve proses verimini etkileyebileceği için bazı durumlarda hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanmadan önce diafiltrasyon yapılması gerekebilir [121]. Çok yönlü bir kromatografi tekniği olmasına rağmen diğer kromatografi yöntemleriyle kombine olarak kullanımı tercih edilmelidir. Hedef rekombinant proteinin yüksek saflığa ulaşması sadece hidrofobik etkileşim ile mümkün olmayabilir. Ancak yine de biyomoleküller üzerinde yapısal hasarın minimum olması ve biyolojik aktivitenin korunabilmesi sebebiyle hem laboratuvar araştırmalarında hem de endüstriyel olarak gerçekleştirilen biyofarmasötik üretim süreçleri için sıklıkla tercih edilen bir kromatografi yöntemidir [131].

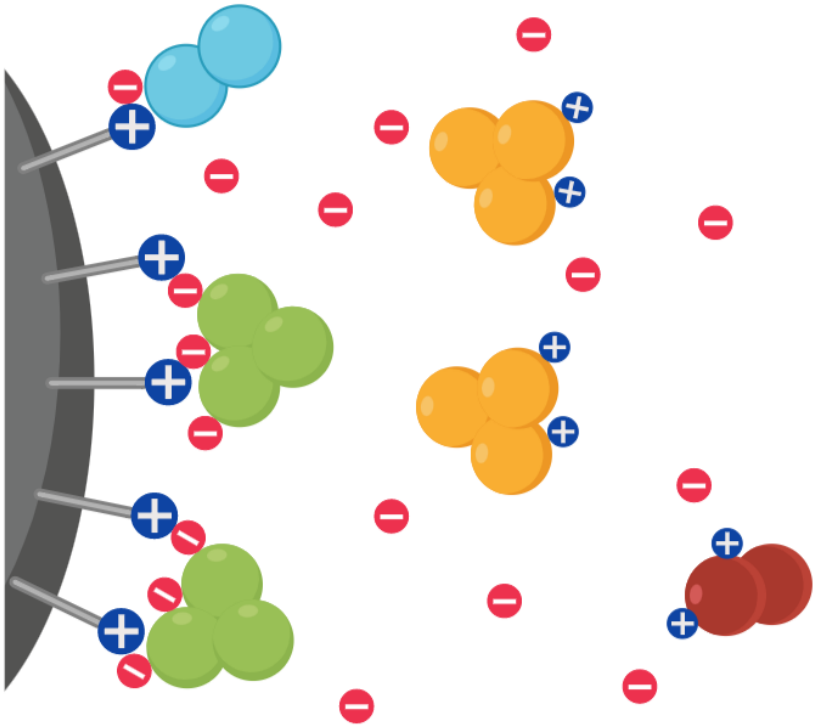
2.3.4.2 İyon Değişim Kromatografisi

Terapötik proteinlerin yük heterojenliğinden faydalanarak gerçekleştirilen ve günümüzde monoklonal antikorlar da dâhil olmak üzere birçok biyofarmasötik proteinin yüksek verimle saflaştırılmasına olanak tanıyan güçlü bir kromatografi yöntemidir [133]. 1960'larda ilk tanıtıldığı günden bu yana yüksek ayrım gücü ve yüksek yükleme kapasitesi sayesinde biyomoleküllerin saflaştırılmasında hem mikro ölçekli hem de endüstriyel ölçekli olarak kullanımıyla önemli bir rol oynamaya devam etmektedir [125]. Yöntem, artı veya eksi yüklü sabit bir faz ile ona zıt iyon yüküne sahip olan protein arasında kurulan iyonik bağ ile proteinin yakalanmasına ve sonrasında da tampon çözeltisinin iyonik gücünün değiştirilerek (Şekil 2.12) proteinin kolondan ayrılması esasına dayanır. İyon değişim kromatografisindeki bir diğer önemli husus, proteinin net yükünün sıfır olduğu pH değeri olan izoelektrik noktasıdır (pI). pI değerinin üzerinde bir pH değerine sahip olan protein negatif yüklü hale gelerek anyon değişim uygulanırken pI değerinin altında sahip olduğu pH değerinde ise pozitif yüklü hale gelerek katyon değişim

kromatografisi için uygun hale gelir [126]. Katyon ve anyon değişim kromatografilerinde yapılan pH değişimlerinin pI değerinden 0,5-1,0 birim uzaklıkta olması, yüksek ölçüde proteinin bağlama ve ayrıştırma imkânı sunmaktadır. pI değerinin tam olarak hesaplanması izoelektrik odaklama metodu ile kesin olarak saptanabiliyor olsa da web tabanlı gelişmiş programlar yardımıyla da yüksek doğrulukla hesaplanabilmekte ve çalışmalarda uygulanabilmektedir.

İyonik kuvvetlerin etkileşimiyle gerçekleştirilen kromatografi yöntemi anyon değişim ve katyon değişim kromatografisi olmak üzere proteinin gereksinimleri ölçüsünde iki farklı yöntemle gerçekleştirilebilir [129].

- Anyon değişim kromatografisi; kolon sabit fazının artı yüklü ve proteinin yükünün eksi olduğu durumda gerçekleştirilebilen bir saflaştırma yöntemidir.
- Katyon değişim kromatografisi; eksi yüklü sabit faz yüzeyine pozitif yüklü proteinlerin bağlanmasını ifade eder. İyonik bağlanmanın gerçekleşebilmesi için proteinin ve sabit fazın birbirine zıt yükte olması önemlidir.



Şekil 2.12 İyon değişim kromatografisinde zıt yüklerin etkileşimi

Katyon değişiminde Na^+ iyonları aktif rol oynarken anyon değişim kromatografisinde Cl^- iyonları görev alır. Kolon şartlama tamponu olarak, düşük iyonik kuvvette olmaları nedeniyle tris çözeltileri ve etanolamin sıklıkla tercih

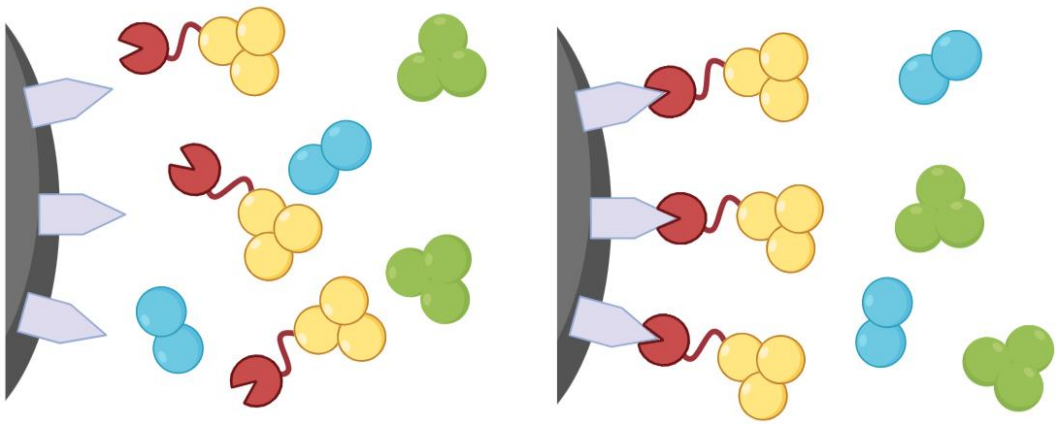
edilirken amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) ve potasyum fosfat (K_3PO_4) tamponları proteinin çökmesine neden olduğu için tercih edilmezler [125]. Aynı şekilde hücre lizizi için kullanılan iyonik yüklü deterjanlar da iyon değişim kromatografilerinde kullanımından kaçınılan kimyasallardır. Yüksüz bir deterjan kullanılması veya deterjanı uzaklaştırmak adına diafiltrasyon uygulanarak tampon ortamının değiştirilmesi sıklıkla uygulanır [106].

Kolonun şartlanması için düşük iyonik kuvvetteki tamponlar kullanılarak iyonların kolona bağlanması sağlanır. Ardından protein yakalama adımında kolona yüklenen biraz daha yüksek iyonik kuvvete sahip protein düşük iyonik moleküller ile yer değiştirerek tutunmuş olur. Final adımında ise yüksek oranda tuz içeren kuvvetli iyonik moleküller kolona bağlanarak hedef proteinin kolondan ayrılmasını sağlar [126]. Protein karışımında hedef proteinden farklı olarak istenmeyen safsızlık veya proteinler de bulunduğundan yüksek konsantrasyonda tuz tamponu kolondan geçirilirken her proteinin farklı bir konsantrasyon değerinde kolondan ayrılması beklenir [120]. Yüksek iyonik kuvvete sahip olan tuz tamponunun kolondan farklı akış hızları ve gradientlerde geçirilebilir ve bu strateji, iyon değişim kromatografisinin temelini oluşturur [130]. Günümüzde farklı yöntemlere olanak sağlayan saflaştırma modelleri için farklı kolon resinleri geliştirilmiştir. Kuaterner amonyum, dietilaminoetil ve dietilaminopropil resinleri anyon değişim kromatografisi için sıklıkla tercih edilirken, sülfopropil, metil sülfonat ve karboksimetil resinleri ise katyon değişim kromatografiside yaygın kullanım alanına sahiptir [88][125]. Her kolon resininin etkin olarak çalışabildiği bir pH aralığının olması ve hedef rekombinant protein pI değerinin bu aralıklarda olması yüksek verimli saflaştırma prosesi geliştirilebilmesi için gereklidir.

2.3.4.3 Afinite Kromatografisi

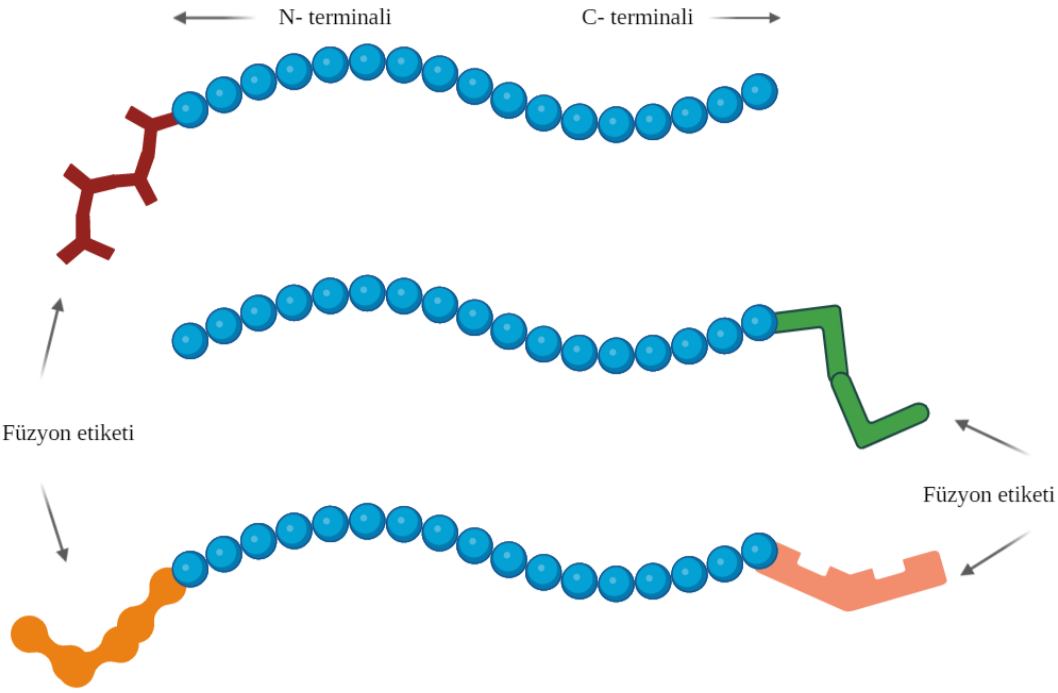
Hedef proteinin saflaştırma sürecinde muhtemelen en yüksek verimle geri kazanıma olanak sağlayan, araştırma süreçlerini hızlandıran ve terapötiklerin üretiminde endüstriyel olarak da tercih edilen yöntem afinite kromatografisidir [131]. Rekombinant proteinlerin kolona seçimli olarak bağlanması, bu yöntemi diğerlerinden ayrıcalıklı ve özel bir konuma getirmektedir. Monoklonal antikorların başlıca saflaştırma yönteminde kullanılan protein-A kromatografisinde olduğu gibi spesifik bağlanmaya (Şekil 2.13) dayalı bu yöntem ile bazı füzyon etiketlerinin kullanılmasıyla daha küçük yapıda olan ve kolona bağlanacak özel bir karakteristik

özellik göstermeyen rekombinant proteinlerin saflaştırılmasına olanak tanınmış olur [127].



Şekil 2.13 Afinite kromatografisi çalışma mekanizması

Özgül bağlanmanın sağlandığı afinite kolonlarında genellikle agaroz ve poliakrilamid bazlı resinler tercih edilir. Günümüzde bu resinler modifiye edilerek farklı türleri geliştirilmiş ve ayrım gücü, perfomansı, akış hızı gibi parametrelerin iyileştirilmesiyle ölçek büyütmeyi de daha kolay hale getiren yeni nesil kolonlar piyasaya sunulmuştur [122]. Kolon ile protein arasındaki etkileşim, histidin, glutatyon S-transferaz (GST) ve maltoz bağlama proteini gibi farklı özelliklere sahip füzyon etiketlerinin kullanılmasıyla sağlanır (Şekil 2.14) [134].



Şekil 2.14 Füzyon etiketlerinin polipeptit zinciri üzerindeki konumları

Kullanılacak etiketlerin bazıları proteinin N- terminaline bağlanmaya spesifikken bazı türleri C- terminaline bağlanabilir. Ayrıca bir proteinin hem amino hem karboksi ucuna ayrı ayrı etiketler bağlanarak farklı yöntemlerde kromatografi prosesi dizayn edilebilir. Her etiket farklı bir prensip ile bu işleyişi yürütür. Örneğin hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC) olarak da bilinen polihistidin etiketi kolonda bulunan Ni^{2+}, Cu^{2+} ve Co^{2+} metal iyonlarıyla etkileşim kurarak kolonda tutunmayı gerçekleştirir [128]. Burada histidin, imidazol ile metal iyonlarına bağlanmak için bir yarış halindedir. Kolon, düşük molaritede imidazol içeren bir tampon ile şartlandığında kolondaki metal iyonları imidazolü yakalar. Sonrasında kolona yüklenen protein çözeltisindeki etiket molekülleri ile imidazol yer değiştirerek metal iyonlarının etiketli hedef proteini tutması beklenir. Hedef proteinin ayrılarak saflaştırılması ise kolondan geçirilecek yüksek molaritedeki imidazol ile mümkün olacaktır [126][134]. GST etiketinde ise kolon üzerinde hareketsizleştirilmiş glutatyon, hedef proteine bağlı GST için substrat görevi görerek kolonda tutunmayı sağlar [135]. Etiket proteininin kolondan ayrımı için genellikle indirgenmiş glutatyon kullanılır.

Rekombinant proteinin amino veya karboksi terminaline bağlanmış olan etiketin uzaklaştırılması için genellikle enzimler kullanılır. Çünkü doğal olmayan ve üzerinde farklı bir yapı bulunduran rekombinant proteinler terapötik bir ürün olarak değerlendirilemeyeceği gibi aktivite de gösteremezler [122][135]. Afinite kromatografisinin öncesinde veya sonrasında başka bir kromatografi uygulanacaksa, protein ile ilgili hesaplamalar etiketlerin amino asit zinciri üzerindeki varlığı da göz önünde bulundurularak yeniden yapılmalıdır. Füzyon etiketinin veya etiketlerinin varlığı başta molekül ağırlığı olmak üzere, izoelektrik nokta, hidrofobisite ve zincir uzunluğu gibi kavramları da değiştirecektir [134].

3
GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Preparatif kromatografi sistemi - Cytiva ÄKTA™ Avant 25
- Dikey elektroforez - Mini-PROTEAN Tetra Cell Systems
- Kütle spektrometresi - Shimadzu AXIMA Performance MALDI TOF/TOF
- Western sistemi - Thermo Fisher Scientific iBind™ Automated Western
- Jel görüntüleme sistemi - Thermo Fisher Scientific iBright™ 1500
- Hassas terazi - Shimadzu ATX224
- Sonikatör - Bandelin SONOPULS Ultrasonic Homogenizers
- Soğutmalı santrifüj - Beckman Coulter- Allegra X-30R Centrifuge
- pH-metre - Mettler Toledo Seven Compact/Ion S220
- Manyetik karıştırıcı - RH basic
- Su cihazı - Milipore Q Gradient
- Buzdolabı - Arçelik Altus
- Vortex - IKA V1S000
- Ultrasonik su banyosu - Bandelin SONOREX

3.1.2 Kullanılan Rekombinant Hücre Hattı

Yıldız Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilen ve genetik olarak modifikasyonu gerçekleştirilmiş *E. coli* C43(DE3) bakterileri ekspresyon için kullanıldı. Yapılan tüm denemelerde bu hücre hattından elde edilen lizat kullanıldı.

3.1.3 Füzyon Etiketlerine Sahip rHolinin TMD Protein Sekansı

Holin proteininin doğal amino asit dizisi, 167 amino asit ve iki adet TMD bölgesinden oluşmaktadır. Molekül ağırlığı 18,13 kDa ve pI değeri 4,09'dur. National Center for Biotechnology Information (NCBI) sitesinden alınmış olan amino asit dizisi Şekil 3.1'de gösterildiği gibidir.

>YP_009041295.1 Holin [Staphylococcus phage K]

MANETKQPKVVGGINLSTRT[20]KSKTFWVAIISAVALFANQI[40]IGAFGLDYSAQIEQG

VNIVG[60]SILTLLAGLGIIVDNNTKGL[80]KDSDIVQTDYLKPRDSKDPN[100]EFVQWQANA

NNTSTFEIDSY[120]ENNAEPDTDDSDEVPAIEDE[140]IDGGSAPSQDEEDTEEHGKV[160]FA

EEEVK[167]

Kırmızı bölge TMD-I
Mavi bölge TMD-II

Şekil 3.1 rHolin proteininin amino asit dizisi

Amino asit dizisinde belirtilen kırmızı ve mavi bölgeler, rekombinant proteinin TMD-I ve TMD-II bölgelerini göstererek rHolin transmembran proteininin lipit çift tabakada lokalize olan kısımlarını göstermektedir.

NCBI sitesinden alınan amino asit dizisi, rHolin proteininin tamamını kapsamaktadır. Yapılan bu çalışmada ilgili proteinin sadece TMD bölgesinin saflaştırılması hedeflenmiştir. Şekil 3.2'de hedef rekombinant proteinin sadece TMD bölgelerine sahip yeni amino asit dizisi verilmiştir. 89 amino asite sahip olan TMD proteininin molekül ağırlığı 9,36 kDa ve pI değeri 7,80'dir.

MANETKQPKVVGGINLSTRT[20]KSKTFWVAIISAVALFANQI[40]IGAFGLDYSAQIEQG

VNIVG[60]SILTLLAGLGIIVDNNTKGL[80]KDSDIVQTC[89]

Kırmızı bölge TMD-I
Mavi bölge TMD-II

Şekil 3.2 rHolin proteini TMD bölgesinin amino asit dizisi

Gerçekleştirilen saflaştırma denemeleri kapsamında rHolin TMD proteini, *E. coli* C43(DE3) suşuna füzyon etiketleri ile birlikte ekprese edilmiştir. Bu durumda TMD proteini, N- terminalinde GST ve C- terminalinde histidin etiketi ile rekombinant olarak üretilmiştir. Füzyon etiketlerinin varlığı ile hedef rekombinant protein 347 amino asite sahiptir. İnternet tabanlı farklı kaynaklar tarafından elde edilen hesaplamalara göre proteinin izoelektrik noktası ortalama olarak 6,60 ve molekül ağırlığı 39,20 kDa'dur. Hedef proteinin amino asit dizisi Şekil 3.3'te gösterildiği gibidir.

MSPILGYWKIKGLVQPTRLL[20]LEYLEEKYEEHLYERDEGDK[40]WRNKKFELGLEFPNP

YYIDG[60]DVKLTQSMAIIRYIADKHNM[80]LGGCPKERAEISMLEGAVLD[100]IRYGVSRIA

YSKDFETLKVD[120]FLSKLPEMLKMFEDRLCHKT[140]YLNGDHVTHPDFMLYDALDV[160]

VLYMDMCLDAFPKLVCFKKR[180]IEAIPQDKYLKSSKYIAWPL[200]QGWQATFGGGDHP

PKHMASW[220]SHPQFEKGADDDDKVPANET[240]KQPKVVGGINLSTRTKSKTF[260]WVAII

SAVALFANQIIGAFG[280]LDYSAQIEQGVNIVGSILTL[300]LAGLGIIVDNNTKGLKDSDI[320]

VQTCAAAGAPGFSSISAHHH[340]HHHHHHH[347]

Sarı bölge	GST etiketi
Kırmızı bölge	TMD-I
Mavi bölge	TMD-II
Yeşil bölge	Histidin etiketi

Şekil 3.3 Füzyon etiketlerine sahip TMD bölgesinin amino asit dizisi

Amino asit dizisinde belirtilen kırmızı ve mavi bölgeler, rekombinant proteinin TMD-I ve TMD-II bölgelerini göstererek rHolin transmembran proteininin lipit çift tabakada lokalize olan hidrofobik kısımlarını göstermektedir. Sarı bölge, C-terminalinde bulunan GST etiket dizisini ve yeşil ile işaretlenmiş bölge histidin etiketinin dizisini göstermektedir.

3.1.4 Hücre Lizizi Tamponunun Hazırlanması

100 mL liziz tamponu için, 0,3 mL 1 M NaH_2PO_4 (Sigma Aldrich), 4,7 mL 1 M Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich), 2,3 g (0,4 M) NaCl (Sigma Aldrich), 0,75 g (0,1 M) KCl (Multicell), 10 mL Gliserol (Multicell), 0,5 mL Triton X-100 (Biomatik), 68 mg (1 mM) imidazol'e (Sigma Aldrich) 90 mL distile su eklenerek pH'ı 7,80'e ayarlandı. Sonrasında hacim, distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Liziz aşamasında hücrelerin üzerine lizozim (Thermo Scientific) kullanıldı.

3.1.5 Solubilizasyon Tamponunun Hazırlanması

8 M Üre (Multicell), 20 mM Trisma base (Biomatik) ve 2 mM EDTA (Multicell) kullanıldı. Solubilizasyon tamponu stok olarak hazırlanmadı. Bunun yerine hücre lizizi aşamasından sonra elde edilen pellet miktarına göre hazırlık yapılarak ilgili proses gerçekleştirilirken hazırlandı.

3.1.6 Afinite Kromatografisi Mobil Faz Hazırlığı

Bu metot kapsamında hem GST etiketi hem de histidin etiketi için iki farklı kromatografi yöntemi denenmiştir. Yöntemler için hazırlanan tamponlar aşağıda belirtildiği gibidir.

Histidin etiketli kromatografi için iki farklı şartlama ve elüsyon tamponu hazırlandı.

- 1 L "A" şartlama tamponu için; 4,04 g (28 mM) Na_2HPO_4, 0,68 g (5,6 mM) NaH_2PO_4, 29,22 g (500 mM) NaCl ve 2,72 g (40 mM) imidazol üzerine 950 mL distile su eklenerek çözüldü. Sonrasında pH'ı 7,40'a ayarlandı ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- 1 L "A" elüsyon tamponu için; 4,04 g (28 mM) Na_2HPO_4, 0,68 g (5,6 mM) NaH_2PO_4, 29,22 g (500 mM) NaCl ve 20,42 g (300 mM) imidazol üzerine 900 mL distile su eklenerek çözüldü. Sonrasında pH 7,40'a ayarlandı ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- 1 L "B" şartlama tamponu için; 360,36 g (6 M) üre, 4,04 g (28 mM) Na_2HPO_4, 0,68 g (5,6 mM) NaH_2PO_4, 29,22 g (500 mM) NaCl ve 0,68 g (10 mM) imidazol üzerine 700 mL distile su eklenerek çözüldü. Sonrasında pH'ı 9,50'ye ayarlandı ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- 1 L "B" elüsyon tamponu için; 360,36 g (6 M) üre, 4,04 g (28 mM) Na_2HPO_4, 0,68 g (5,6 mM) NaH_2PO_4, 29,22 g (500 mM) NaCl ve 34,03 g (500 mM) imidazol üzerine 700 mL distile su eklenerek çözüldü. Sonrasında pH 9,50'ye ayarlandı ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlandı.

Hazırlanan tüm tamponlar 0,45 µm gözenek çapına sahip filtre ile süzülmüş ve ayrıca içlerinde hava kabarcığı kalmaması için ultrasonik su banyosunda yaklaşık 4 dakika bekletilmiştir.

GST denemesi için iki farklı şartlama ve elüsyon tamponu hazırlandı.

- 1 L "A" şartlama tamponu için, 3,06 g (50 mM) Trisma base ve 8,76 g (150 mM) NaCl üzerine 950 mL distile su eklenerek pH'ı 8,00'a ayarlandı. Hacim 1000 mL'ye tamamlandı ve pH yeniden kontrol edildi.
- 1 L "A" elüsyon tamponu için, 3,06 g (50 mM) Trisma base, 8,76 g (150 mM) NaCl ve 3,07 g (10 mM) indirgenmiş glutatyon (Thermo Scientific) üzerine 950 mL distile su eklenerek pH'ı 8,00'a ayarlandı. Hacim 1000 mL'ye tamamlandı ve pH yeniden kontrol edildi.

- 1 L “B” şartlama tamponu için, 8,18 g (140 mM) NaCl, 0,20 g (2,7 mM) KCl, 1,42 g (10 mM) Na_2HPO_4 ve 0,24 g (1,8 mM) KH_2PO_4’e (Multicell) 950 mL distile su eklenerek pH’ı 7,30’a ayarlandı. Hacim 1000 mL’ye tamamlandı ve pH yeniden kontrol edildi.
- 1 L “B” elüsyon tamponu için, 7,88 g (50 mM) Tris HCl ve 3,07 g (10 mM) indirgenmiş glutatyon üzerine 950 mL distile su eklendi. Çözelti pH’ı 8,00’a ayarlandı. Hacim 1000 mL’ye tamamlandı ve pH yeniden kontrol edildi.

Hazırlanan tüm tamponlar 0,45 µm gözenek çapına sahip filtre ile süzülmüş ve ayrıca içlerinde hava kabarcığı kalmaması için ultrasonik su banyosunda yaklaşık 4 dakika bekletilmiştir.

3.1.7 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Mobil Faz Hazırlığı

Bu yöntem için iki farklı şartlama tamponu, iki farklı seyreltme tamponu ve tek çeşit elüsyon tamponu hazırlandı.

- 1 L “A” şartlama tamponu için, 3,15 g (20 mM) Tris HCl ve 198,21 g (1,5 M) amonyum sülfat üzerine 800 mL distile su eklenerek çözüldü. Sonrasında pH 7,50’ye ayarlandı ve hacim 1000 mL’ye distile su ile tamamlanarak pH yeniden kontrol edildi.
- 1 L “A” seyreltme tamponu için, 6,30 g (40 mM) Tris HCl ve 396,42 g (3 M) amonyum sülfat üzerine 800 mL distile su eklenerek çözüldü. Sonrasında pH 7,50’ye ayarlandı ve hacim 1000 mL’ye distile su ile tamamlanarak pH yeniden kontrol edildi.
- 1 L “B” şartlama tamponu için, 1,21 g (10 mM) Trisma base ve 87,66 g (1,5 M) NaCl üzerine 900 mL distile su eklenerek çözüldü. Sonrasında pH 7,50’ye ayarlandı ve hacim 1000 mL’ye distile su ile tamamlanarak pH yeniden kontrol edildi.
- 1 L “B” seyreltme tamponu için, 2,42 g (20 mM) Trisma base ve 175,32 g (3 M) NaCl üzerine 900 mL distile su eklenerek çözüldü. Sonrasında pH 7,50’ye ayarlandı ve hacim 1000 mL’ye distile su ile tamamlanarak pH yeniden kontrol edildi.
- 1 L “A” elüsyon tamponu için, 3,15 g (20 mM) Tris HCl üzerine 950 mL distile su eklenerek çözüldü. Sonrasında pH 7,50’ye ayarlandı ve hacim 1000 mL’ye distile su ile tamamlanarak pH yeniden kontrol edildi.

Hazırlanan tüm tamponlar 0,45 µm gözenek çapına sahip filtre ile süzülmüş ve ayrıca içlerinde hava kabarcığı kalmaması için ultrasonik su banyosunda yaklaşık 4 dakika bekletilmiştir.

3.1.8 İyon Değişim Kromatografisi Mobil Faz Hazırlığı

Bu yöntem için iki farklı şartlama tamponu ve üç farklı elüsyon tamponu hazırlandı.

- 1 L "A" şartlama tamponu için, 3,15 g (20 mM) Tris HCl üzerine 950 mL distile su eklendi. Çözündükten sonra pH'ı 7,50'ye ayarlandı ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlanarak pH yeniden kontrol edildi.
- 1 L "B" şartlama tamponu için, 3,15 g (20 mM) Tris HCl üzerine 950 L distile su eklendi. Çözündükten sonra pH'ı 8,00'a ayarlandı ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlanarak pH yeniden kontrol edildi.
- 1 L "A" elüsyon tamponu için, 1,21 g (10 mM) Trisma base ve 87,66 g (1,5 M) NaCl üzerine 950 mL distile su eklenerek çözüldü. Sonrasında pH 7,50'ye ayarlandı ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlanarak pH yeniden kontrol edildi.
- 1 L "B" elüsyon tamponu için, 3,15 g (20 mM) Tris HCl ve 46,75 g (0,8 M) NaCl üzerine 950 mL distile su eklendi. Çözündükten sonra pH'ı 8,00'a ayarlandı ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlanarak pH yeniden kontrol edildi.
- 1 L "C" elüsyon tamponu için, 3,15 g (20 mM) Tris HCl ve 46,75 g (0,8 M) NaCl üzerine 950 mL distile su eklendi. Çözündükten sonra pH'ı 9,00'a ayarlandı ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlanarak pH yeniden kontrol edildi.

Hazırlanan tüm tamponlar 0,45 µm gözenek çapına sahip filtre ile süzülmüş ve ayrıca içlerinde hava kabarcığı kalmaması için ultrasonik su banyosunda yaklaşık 4 dakika bekletilmiştir.

3.1.9 Proteinlerin SDS-PAGE Jel Hazırlığı

Tampon için; Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, gliserol (Multicell), NaCl, KCl, Triton X-100 ve imidazol. SDS jeli için; Tris HCl, SDS (Multicell), %30 Akrilamid solüsyonu (Biorad), TEMED (Sigma), Amonyumpersülfat (APS) (Biorad); yükleme tamponu için Tris HCl, gliserol, SDS, Dithiothreitol (DTT) (GoldBIO), Bromofenol Blue (Biomatik). Tank tamponu için Trisma base, glisin (Multicell). SDS için; Coomasie

boyama için Coomasie Brillant Blue R-250 Staining (GoldBIO), asetik asit (Sigma Aldrich), metanol (Sigma Aldrich) ve son olarak jelden fazla boyayı arındırmak için kullanılan solüsyonun hazırlanmasında asetik asit ve metanol kimyasalları kullanıldı.

% 12'lik alt jelin hazırlanması;

50 mL'lik bir tüp içerisine alınan 1,6 mL distile su üzerine 1,3 mL 1,5 M Trisma base, 50 µL %10'luk SDS, 2 mL %30'luk Akrilamid, 50 µL %10'luk APS ve 5 µL TEMED eklenir, 1 dakika boyunca karıştırılır.

% 5'lik üst jelin hazırlanması;

50 mL'lik bir tüp içerisine alınan 1,8 mL distile su üzerine 0,31 mL 0,5 M Trisma base, 25 µL %10'luk SDS, 335 µL %30'luk Akrilamid, 25 µL %10'luk APS ve 2,5 µL TEMED eklenir, 1 dakika boyunca karıştırılır.

6X SDS Loading Dye hazırlanışı;

3,75 mL 1 M Trisma base pH: 6,8, 6 mL Gliserol, 1,2 g SDS, 0,93 g DTT, 3 mg Bromofenol Blue kimyasalları iyice karıştırılarak toplam 10 mL'ye ayarlandı.

5X tank tamponu hazırlanışı;

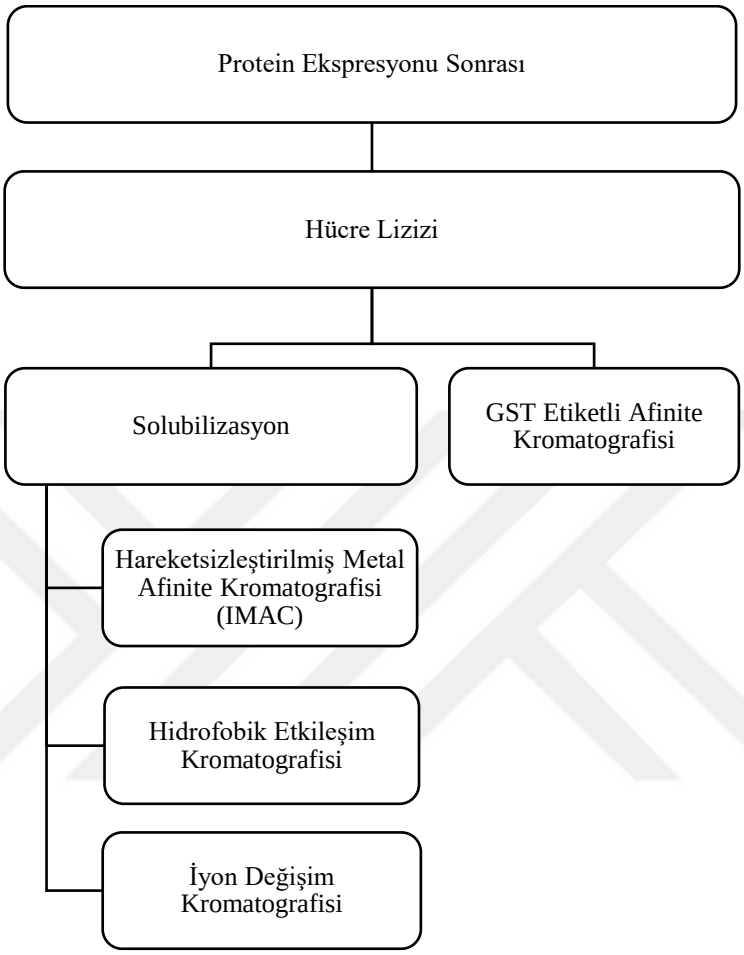
15,19 g (125 mM) Trisma base, 94 g (1,25 M) Glisin, 50 mL %10 SDS behere eklendi. Behere 900 mL distile su konularak kimyasalların çözünmesi sağlandı. Tamponun pH'ı 8,30'a ayarlandıktan sonra tampon distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Ardından SDS-PAGE'de kullanılmak üzere distile su ile 1x'e seyreltildi.

3.1.10 Western Blot Reaktif Hazırlığı

Western blot analizi için; Thermo Fisher Scientific iBind™ Automated Western sistemi kullanıldı. Thermo Fischer Scientific iBind kit içeriğinde bulunan 100X Additive solüsyonundan 300 µL, iBind 5X Buffer solüsyonundan 6 mL olacak şekilde karıştırılarak 23,7 mL distile su eklendi. Hazırlanan çözeltinin 12 mL'si transfer işleminden sonra distile suda 5-10 dk arasında bekletilen membranın üzerine bloklama işlemi için eklendi. Membranın bloklanması için 5-10 dk bu solüsyonda bekletildi. Çözeltinin geri kalan kısmı ile 2 mL GST-primer antikor (GST-Tag Monoclonal Antibody (Elabscience)) (1:2500), 2 mL sekonder antikor (Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody (Invitrogen)) (1:500), 6 mL iBind Cards Western kartlarının üzerini ıslatması için kullanıldı.

3.2 Yöntem

Deneysel olarak yapılan çalışmalar kapsamında Şekil 3.4'te belirtilen akış şeması izlenmiş ve uygulanmıştır.



Şekil 3.4 Tez çalışması kapsamında uygulanan deneysel akış şeması

3.2.1 Hücre Lizizi

Yıldız Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, laboratuvarında elde edilen rekombinant *E. coli* C43(DE3) bakterileri ekspresyon sonunda 10000 rpm, +4 ºC'de santrifüjlendikten sonra pelletler halinde elde edildi. Ağırlıkça her 1 g pellet üzerine 5 mL liziz tamponu ve 5 mg lizozim (Thermo Scientific) enzimi eklendi. Tüpler vorteks ile çalkalandıktan sonra 30 dakika boyunca +4 ºC'de bekletildi. Ardından her bir tüp 3 dk boyunca %50 güçte, 10 s sonikasyon, 10 s duruş olacak şekilde sonike edildi. Bu işlemden sonra tüpler 10000 rpm, +4 ºC'de santrifüjlendi ve pelletler sonraki aşamada kullanılmak üzere pellet ağırlıkları ölçüldükten sonra -20 ºC'de muhafaza edildi.

3.2.2 Solubilizasyon

Liziz işlemi gerçekleştirilen pelletler için pellet ağırlığının on katı kadar hacimde solubilizasyon tamponu hazırlandı. 5 g pellet için 50 mL tampon kullanıldı. 24,02 g üre üzerine 25 mL distile su eklenerek üre çözdürüldü. Ardından pH'ı 9,00'a ayarlandı. pH ayarı sonrası tampon hacmi yaklaşık 40 mL'dir. Başka bir kapta 0,12 g Trisma base ve 29,22 mg EDTA üzerine 9 mL distile su eklenerek çözündürüldü. 5 g pellet üzerine önce çözünmüş üre tamponu eklendi. Tamamen homojen olarak çözündükten sonra Trisma base ve EDTA tamponu da solüsyona eklenerek pH'ı 9,00'a ayarlandı. Ardından 1,5 saat boyunca 26 ºC'de yüksek rpm ile karıştırıldı. 1,5 saatin sonunda pH'ı 11,50'ye ayarlandı ve 1 saat daha karıştırıldı. Son olarak pH'ı 10,30'a düşürülerek proses sonlandırıldı. Sonraki aşamalar için solubilize edilmiş protein çözeltisi ilgili kromatografinin şartlama tamponu ile seyreltilerek 0,8 µm gözenek çaplı ardından 0,45 µm gözenek çaplı filtreler ile süzüldü.

3.2.3 Hareketsizleştirilmiş Metal Afinite Kromatografisi (IMAC)

HisTrap™ FF 1 mL ve HisTrap™ FF 5 mL kolonu bu yöntem için kullanıldı. Kolonda, hareketsizleştirilmiş metal olarak Ni^{2+} iyonu tercih edildi. Solubilizasyondan sonra iki ayrı protein çözeltisi şartlama tamponu ile farklı oranlarda seyreltildi. Seyreltilmiş lizat önce 0,8 µm gözenek çaplı ardından 0,45 µm gözenek çaplı sahip filtreler ile süzüldü.

- 1. deneme için; Kolon olarak HisTrap™ FF 1 mL kullanıldı. Kolon, "A" şartlama tamponu ile yaklaşık 15 kolon hacmi (CV) şartlandıktan sonra UV_{280} absorbans değeri sıfırlandı. Solubilizasyon sonrası elde edilen çözelti 2 kat seyreltme tamponu ile seyreltildi. 2 kat seyreltilmiş protein çözeltisi sabit bir akış hızıyla kolondan geçirildi. Kolona tutunmayan safsızlıkları ve proteinleri uzaklaştırmak için "A" şartlama tamponu kolondan 10 CV kadar yeniden geçirildi. "A" elüsyon tamponu ise sabit bir akış hızıyla, şartlama tamponuna karşı %100 B, 10 CV gradienti uygulanarak kolondan geçirildi. Elüsyon kısmına geçildiği andan itibaren kolondan çıkan tüm çözelti fraksiyonlar halinde toplandı ve elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı tüplerde +4 ºC'de muhafaza edildi.
- 2. deneme için; Kolon olarak HisTrap™ FF 5 mL kullanıldı. Kolon, "B" şartlama tamponu ile yaklaşık 15 kolon hacmi (CV) şartlandıktan sonra UV_{280} absorbans değeri sıfırlandı. Solubilizasyon sonrası elde edilen çözelti 5 kat

seyreltme tamponu ile seyreltildi 5 kat seyreltilmiş protein çözeltisi sabit bir akış hızıyla kolondan geçirildi. Kolona tutunmayan safsızlıkları ve proteinleri uzaklaştırmak için "B" şartlama tamponu kolondan 10 CV kadar yeniden geçirildi. "B" elüsyon tamponu ise sabit bir akış hızıyla, şartlama tamponuna karşı %100 B, 5 CV gradienti uygulanarak kolondan geçirildi. Elüsyon kısmına geçildiği andan itibaren kolondan çıkan tüm çözelti fraksiyonlar halinde toplandı ve elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı tüplerde +4 ºC'de muhafaza edildi.

3.2.4 GST Etiketi Afinite Kromatografisi

GSTrap™ HP 1 mL ve GSTrap™ FF 1 mL kolonları bu yöntem için kullanıldı. Hücre lizizi sonrası elde edilen pelletlerin üzerine kullanılacak tamponlara göre "A" veya "B" şartlama tamponu eklendi. Her 1 g pellet üzerine 60 mL şartlama tamponu ile pelletler çözüldü ve vorteks ile homojen hale getirildi. Hücre lizatı çok yoğun partikül içerdiği için filtrelenmek yerine 10000 rpm'de, +4 ºC'de, 15 dk santrifüjendi.

- 1. deneme için; kolona yüklenecek protein çözeltisi hazırlanırken liziz sonrası elde edilen pellete "A" şartlama tamponu eklendi. Kolon olarak GSTrap™ HP 1 mL kullanıldı. Kolon, "A" şartlama tamponu ile 20 CV kadar şartlandı. Şartlama sonrası UV_{280} absorbans değeri sıfırlandı. Hemen ardından elde edilen protein çözeltisi, sabit bir akış hızıyla kolondan geçirildi. Kolona tutunmayan safsızlıkları ve proteinleri uzaklaştırmak için "A" şartlama tamponu kolondan 15 CV kadar yeniden geçirildi. Son olarak "A" elüsyon tamponu %100 B, 0 CV gradienti uygulanarak kolondan geçirildi ve elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı tüplere toplanarak +4 ºC'de muhafaza edildi.
- 2. deneme için; kolona yüklenecek protein çözeltisi hazırlanırken liziz sonrası elde edilen pellete "B" şartlama tamponu eklendi. Kolon olarak GSTrap™ FF 1 mL kullanıldı. Kolon, "B" şartlama tamponu ile 15 CV kadar şartlandı. Şartlama sonrası UV_{280} absorbans değeri sıfırlandı. Hemen ardından elde edilen protein çözeltisi, sabit bir akış hızıyla kolondan geçirildi. Kolona tutunmayan safsızlıkları ve proteinleri uzaklaştırmak için "B" şartlama tamponu kolondan 15 CV kadar yeniden geçirildi. Son olarak "B" elüsyon tamponu %100 B, 0 CV gradienti uygulanarak kolondan geçirildi ve elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı tüplere toplanarak +4 ºC'de muhafaza edildi.

3.2.5 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

HiTrap™ Butyl HP 1 mL kolonu bu yöntem için kullanıldı. Gerçekleştirilen iki farklı denemede şartlama tamponları farklı olacak şekilde aynı elüsyon tamponları kullanıldı. Solubilizasyon sonrası elde edilen protein çözeltileri, bu deneme kapsamında hazırlanan seyreltme tamponları ile 2 kat seyreltildi. Seyreltilen hücre lizatı önce 0,8 µm gözenek çaplı ardından 0,45 µm gözenek çaplı filtreler ile süzüldü. Elde edilen seyrelmiş protein çözeltisi denemelerde kullanıldı.

- 1. deneme için; kolon, "A" şartlama tamponu ile 20 CV kadar şartlandı. Şartlama sonrası UV_{280} absorbans değeri sıfırlandı. Hemen ardından elde edilen protein çözeltisi, sabit bir akış hızıyla kolondan geçirildi. Kolona tutunmayan safsızlıkları ve proteinleri uzaklaştırmak için "A" şartlama tamponu, kolondan 10 CV kadar yeniden geçirildi. Son olarak "A" elüsyon tamponu kolondan %100 B, 10 CV gradienti olacak şekilde geçirildi ve elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı tüplere toplanarak +4 ºC'de muhafaza edildi.
- 2. deneme için; kolon, "B" şartlama tamponu ile 20 CV kadar şartlandı. Şartlama sonrası UV_{280} absorbans değeri sıfırlandı. Hemen ardından elde edilen protein çözeltisi, sabit bir akış hızıyla kolondan geçirildi. Kolona tutunmayan safsızlıkları ve proteinleri uzaklaştırmak için "B" şartlama tamponu, kolondan 10 CV kadar yeniden geçirildi. Son olarak "A" elüsyon tamponu kolondan %100 B, 10 CV gradienti olacak şekilde geçirildi ve elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı tüplere toplanarak +4 ºC'de muhafaza edildi.

3.2.6 İyon Değişim Kromatografisi

HiTrap™ Capto DEAE 1 mL ve HiScreen™ Capto DEAE 4,7 mL anyon değişim kolonları bu yöntem için kullanıldı. Solubilizasyon sonrası elde edilen protein çözeltisi, ilgili denemenin şartlama tamponu ile üç kat seyreltildi. Seyreltilen hücre lizatı önce 0,8 µm gözenek çaplı ardından 0,45 µm gözenek çaplı filtre ile süzüldü.

- 1. deneme için; HiTrap™ Capto DEAE kolonu "A" şartlama tamponu ile 20 CV kadar şartlandı. Şartlama sonrası UV_{280} absorbans değeri sıfırlandı. Sonrasında seyreltilmiş ve pH'ı 8,20'ye ayarlanan protein çözeltisi kolona yüklendi. Ardından %100 B, 15 CV gradienti uygulanarak "A" elüsyon tamponu kolondan geçirildi ve elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı tüplere toplanarak +4 ºC'de muhafaza edildi.

- 2. deneme için; HiScreen™ Capto DEAE kolonu "A" şartlama tamponu ile 20 CV kadar şartlandı. Şartlama sonrası UV_{280} absorbans değeri sıfırlandı. Sonrasında seyreltilmiş ve pH'ı 8,00'a ayarlanan protein çözeltisi kolona yüklendi. Ardından %100 B, 15 CV gradienti uygulanarak "A" elüsyon tamponu kolondan geçirildi ve elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı tüplere toplanarak +4 ºC'de muhafaza edildi.
- 3. deneme için; HiScreen™ Capto DEAE kolonu "B" şartlama tamponu ile 20 CV kadar şartlandı. Şartlama sonrası UV_{280} absorbans değeri sıfırlandı. Sonrasında seyreltilmiş ve pH'ı 8,00'a ayarlanan protein çözeltisi kolona yüklendi. Ardından %100 B, 10 CV gradienti uygulanarak "B" elüsyon tamponu kolondan geçirildi ve elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı tüplere toplanarak +4 ºC'de muhafaza edildi.
- 4. deneme için; HiScreen™ Capto DEAE kolonu "B" şartlama tamponu ile 20 CV kadar şartlandı. Şartlama sonrası UV_{280} absorbans değeri sıfırlandı. Sonrasında seyreltilmiş ve pH'ı 8,00'a ayarlanan protein çözeltisi kolona yüklendi. Ardından farklı yüzdelerde basamak gradienti uygulanarak "B" elüsyon tamponu kolondan geçirildi ve elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı tüplere toplanarak +4 ºC'de muhafaza edildi.
- 5. deneme için; HiScreen™ Capto DEAE kolonu "B" şartlama tamponu ile 20 CV kadar şartlandı. Şartlama sonrası UV_{280} absorbans değeri sıfırlandı. Sonrasında seyreltilmiş ve pH'ı 8,00'a ayarlanan protein çözeltisi kolona yüklendi. Ardından farklı yüzdelerde basamak gradienti uygulanarak "C" elüsyon tamponu kolondan geçirildi ve elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı tüplere toplanarak +4 ºC'de muhafaza edildi.

Tüm kromatografi denemelerinden sonra +4 ºC'de muhafaza edilen fraksiyonlara, SDS-PAGE elektroforezi, Western blot ve MALDI TOF/TOF gibi tanı testleri uygulanmıştır.

3.2.7 SDS-PAGE Elektroforez

%12'lik jelin hazırlanmasında kullanılan distile su, 1,5 M Trisma base, %10 SDS, %30 Akrilamid, %10 APS ve TEMED belirlenen oranlarda karıştırılarak iki camın arasına pastör pipeti yardımı ile döküldü. Belli bir seviyeye kadar eklenen jelin üzerine en üst seviyeye kadar distile su eklenerek polimerleşmesi beklendi. Ardından %5'lik üst jel hazırlandı ve polimerleşen alt jelin üzerine pastör pipeti

yardımıyla eklendi. En üst seviyeye kadar eklenen üst jele tarak konularak polimerleşmesi beklendi. Polimerleşen jellerin bulunduğu cam, kasete yerleştirildi ve tankın içerisine koyuldu. Tank, 1X'lik tank tamponu ile dolduruldu. Sonrasında test örnekleri, 5 µL 6X SDS Loading Dye / 45 µL örnek olacak şekilde hazırlandı. 95 °C'de 5 dakika proteinlerin denatürayonu için bekletildi. Hazırlanan jelin üzerinden tarak yavaşça çekildi ve denatüre edilen örneklerin 25 µL'si kuyucuklara koyuldu. Örnekler, alt jele geçinceye kadar 90 V yürütüldükten sonra güç kaynağı 120 V'a ayarlanarak yürütme işlemi gerçekleştirildi. İşlem sonrasında jel Coomasie Brillant Blue içeren çözeltiye koyuldu ve bir gece oda sıcaklığında çalkalandı. Ertesi gün, boyanan jel "Destaining" olarak adlandırılan jeldeki fazla boya giderimi işlemine tabi tutuldu. İşlem sonrasında jel, distile su ile yıkandıktan sonra proteinler gözlemlendi. Son olarak elde edilen jellerin görüntüsü alındı.

3.2.8 Western Blot Analizi

Saflaştırılan protein fraksiyonlarının doğrulanması için Western blot tekniği kullanıldı. Thermo Fischer Scientific iBind kit içeriğinde bulunan 100X Additive solüsyonundan 300 µL, iBind 5X Buffer solüsyonundan 6 mL olacak şekilde karıştırılarak 23,7 mL distile su eklendi. Hazırlanan çözeltinin 12 mL'si transfer işleminden sonra distile suda 5-10 dk arasında bekletilen membranın üzerine bloklama işlemi için eklendi. Membranın bloklanması için 5-10 dk bu solüsyonda bekletildi. Çözeltinin geri kalan kısmı ile 2 mL GST-primer antikor (GST-Tag Monoclonal Antibody (Elabscience)) (1:2500), 2 mL sekonder antikor (Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody (Invitrogen)) (1:500), 6 mL iBind Cards Western kartlarının üzerini ıslatması için kullanıldı. iBind sisteminin içerisine Western kartı yerleştirildi ve üzerine 5 mL iBind solüsyonu eklenerek kart ıslatıldı. Kartın orta noktasına 1 mL iBind solüsyonu eklenerek proteinlerin transfer edildiği membran yüzeyi kartın üzerine gelecek şekilde koyuldu ve sistemin kapağı kapatıldı. Sistemin üzerindeki oyuklara sırası ile 2 mL primer antikor, 2 mL iBind solüsyonu, 2 mL sekonder antikor ve 6 mL iBind solüsyonu eklendi. Membran 2 saat boyunca sistemde bekletildi. Eklenen bütün solüsyonlar oyuklardan sisteme geçtikten sonra sistem kapağı açıldı ve membrana SuperSignal West Pico PLUS kemilüminesans solüsyonlarının eşit hacimde karıştırılarak hazırlanan solüsyon eklendi. 5 dk karanlıkta bırakıldı. iBright sisteminde görüntülendi.

3.2.9 MALDI-TOF Kütle Spektrometresi

Saflaştırılan rHolin proteininin kütlesinin tam olarak öğrenilebilmesi için Shimadzu AXIMA Performance MALDI TOF/TOF kütle spektrometresi cihazı kullanıldı. Analiz, 80 V güç, doğrusal mod, 1-144 profili ve Smooth Gauss 100 parametrelerinde gerçekleştirilerek 5000-42000 m/z ve 35000-42000 m/z aralığı tarandı.

4
BULGULAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasında, rekombinant *E. coli* C43(DE3) hücresine eksprese edilerek sentezlenen ve füzyon etiketleri ile birlikte üretilen Holin TMD proteininin ekspresyon basamağı sonrasında farklı yaklaşımlar kullanılarak saflaştırılmasına yönelik işlemler gerçekleştirilmiştir. İlk adım olarak gerçekleştirilen hücre lizizi tüm denemeler için ortak bir süreçken, proteinin denatüre edildiği solubilizasyon basamağı hareketsizleştirilmiş metal afinite, hidrofobik etkileşim ve iyon değişim kromatografilerinden önce uygulandı. Solubilizasyon tamponu içinde bulunan ürenin, proteinin kolona adsorbe olmasını engellediği için GST etiketli afinite kromatografisinden önce protein denatürasyonu işlemi uygulanmadı. Tüm kromatografi basamakları Cytiva ÄKTA™ Avant 25 cihazı ve farklı yöntemlere özgü kolonlar kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntem olarak; afinite kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve iyon değişim kromatografi yöntemleri değerlendirildi. Elde edilen tüm kromatogram kayıtları UNICORN™ 6.3 arayüzünden alındı. Kromatogram görsellerinde, protein lizatının kolona yüklenmesinden elüsyon basamağının sonuna kadar geçen zamanda UV_{280} absorbans değeri ve elüsyon tamponunun gradienti gösterilirken, iletkenlik, pH, kolon öncesi basıncı, kolon sonrası basıncı ve akış hızı gibi aktüel değerler proses esnasında izlenmiş olmasına rağmen gösterilmemektedir. Kromatogramlarda X ekseni, proses süresince kolondan geçirilen mL cinsinden toplam hacmi, soldaki Y ekseni mAU değerini ve sağdaki Y ekseni kolondan geçen elüsyon tamponunun yüzde olarak gradientini göstermektedir. mAU absorbans değerinden elde edilen çizgi mavi renkte, Elüsyon tampon yüzdesinin çizgisi ise mor renkli olarak gösterilmektedir.

4.1 Hareketsizleştirilmiş Metal Afinite Kromatografisi

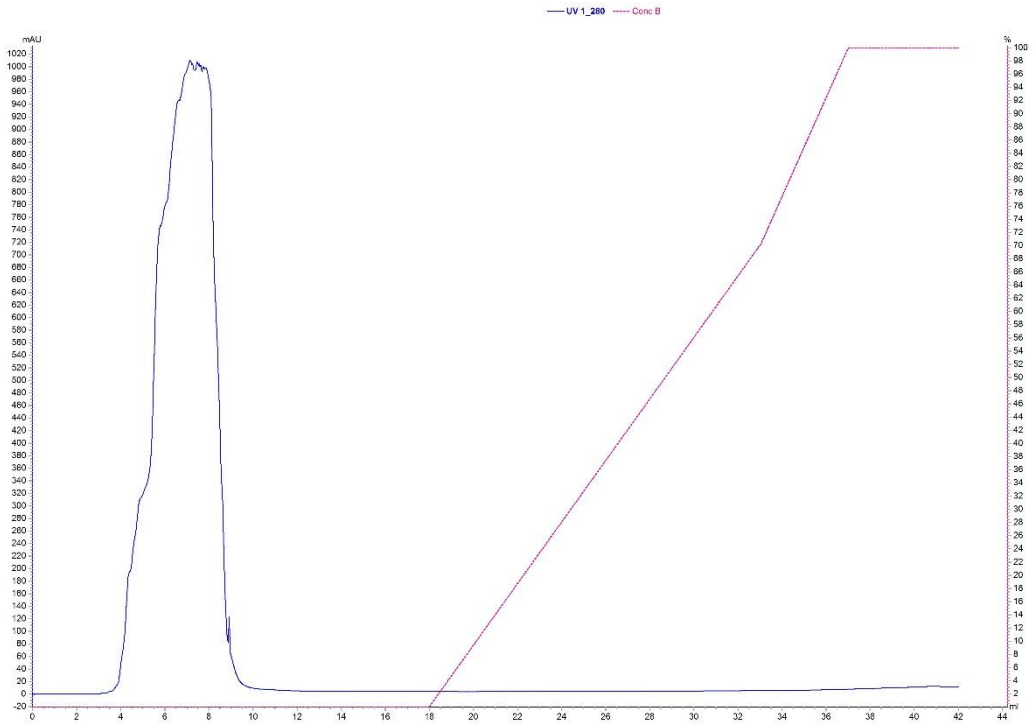
HisTrap™ FF 1 mL ve HisTrap™ FF 5 mL kolonu ile gerçekleştirilen iki farklı kromatografi denemesinde uygulanan parametreler, tampon içerikleri, protein pH değerleri ve seyreltilme katsayıları gibi koşulların daha kolay kıyaslanabilmesi adına Tablo 4.1'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1 Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC) deneme koşulları

Proses Koşulu	1. Deneme	2. Deneme
Kullanılan kolon	HisTrap FF 1 mL	HisTrap FF 5 mL
Protein lizatının seyreltilme oranı	2x	5x
Proteinin kolondan geçirilme hızı	0,4 mL/dk	2,0 mL/dk
Elüsyon akış hızı	0,8 mL/dk	4,0 mL/dk
Elüsyon gradient türü	Doğrusal %100 B, 18 CV	Doğrusal %100 B, 5 CV
Şartlama tamponu	20 mM Sodyum fosfat 500 mM NaCl 40 mM İmidazol pH: 7,40	6 M Üre, 20 mM Sodyum fosfat 500 mM NaCl 10 mM İmidazol pH: 9,50
Elüsyon tamponu	20 mM sodyum fosfat 500 mM NaCl 300 mM İmidazol pH: 7,40	6 M üre 20 mM sodyum fosfat 500 mM NaCl 500 mM İmidazol pH: 9,50
Kolona yüklenen protein pH'ı	7,40	9,50

1. hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografi denemesi kapsamında; solubilizasyon sonrası elde edilen hücre lizatı 2 kat "A" şartlama tamponu ile

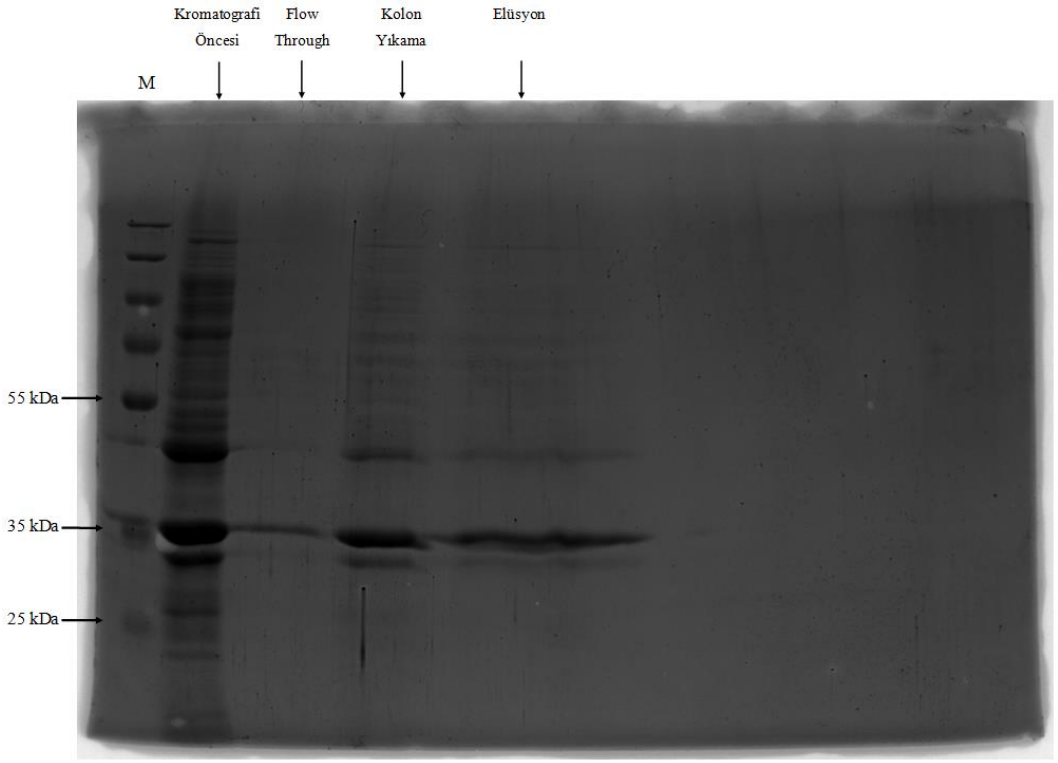
seyreltildi ve filtre ile süzüldükten sonra 0,4 mL/dk akış hızıyla kolona yüklendi. Ardından 0,8 mL/dk akış hızıyla şartlama tamponu 10 CV kadar kolondan geçirilerek impüritelerin uzaklaştırılması adına kolon yıkaması gerçekleştirildi. Son olarak %100 B, 18 CV gradienti uygulanarak elüsyon tamponu 0,8 mL/dk akış hızıyla kolondan geçirildi. Gerçekleştirilen 1. deneme kapsamında elde edilen kromatogram, Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Kromatogramda mavi çizgi boyunca 0-9 mL aralığı protein yükleme kısmını, 9-18 mL aralığı kolon yıkama kısmını ve 18-42 mL aralığı elüsyon kısmını göstermektedir.



Şekil 4.1 Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC) 1. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)

Proses süresince anlamlı bir elüsyon piki elde edilemedi. Fakat yine de düz olan UV_{280} çizgisinde protein olabileceği düşünülerek fraksiyonlar halinde ependorflara toplandı. Kolona yüklenecek olan hedef proteinin varlığının gösterilmesi adına protein çözeltisinden örnek alınarak SDS-PAGE analizi yapıldı. Şekil 4.2'deki jel görüntüsünde de görüldüğü gibi kromatografi öncesi alınan örnekte proteinin varlığı açıkça görülmektedir. Protein, kolondan geçtikten sonra alınan örnekte (Flow through) ise 35 kDa'da görülenden hariç başka bir protein görülmemektedir. Bu durum, hedef protein dâhil tüm proteinlerin kolonda oldukça iyi tutunduğunu

gösterir. Yine Şekil 4.2'de kolon yıkama kısmında görülen 35 ve 39 kDa'da görülen bantlar, hedef proteinin şartlama tamponuna karşı dayanıksız olduğunu ve kolayca kolondan ayrılabileceğini göstermektedir. Elüsyon kısmından alınan örnekte 35 kDa'daki bant safsızlığa ait proteinindir ve oldukça yoğun olarak görülmektedir. Elüsyon kısmında görülen 39 kDa'daki bant ise hedef protein olmasına rağmen çok düşük konsantrasyonda olduğu görülmektedir. Aynı fraksiyonda 35 kDa ve 39 kDa boyutlu proteinlerin gözlenmesi bu yöntemi, efektif olmayan bir kromatografi yöntemi olarak göstermektedir.

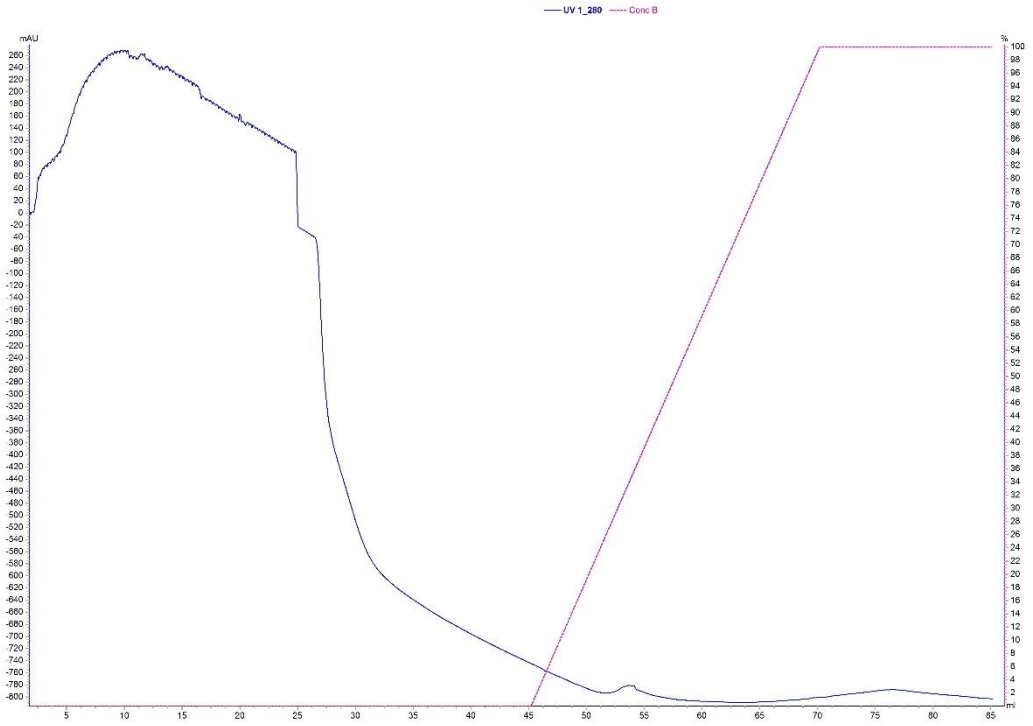


Şekil 4.2 Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC) 1. deneme SDS-PAGE jel görüntüsü

Şekil 4.1'deki ilk hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografi denemesinde görülen 4-10 mL arasındaki pikin dar ve uzun olması, kolona yüklenen protein çözeltisinin çok konsantre olduğu bize göstermektedir. Bu nedenle solubilizasyon aşamasından sonra elde lizat, bir sonraki saflaştırma denemesinde 5x oranında seyreltilerek kolona yüklendi.

2. hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografi denemesi kapsamında; solubilizasyon sonrası elde edilen hücre lizatı 5 kat "B" şartlama tamponu ile seyreltildi ve filtre ile süzüldükten sonra 2 mL/dk akış hızıyla kolona yüklendi.

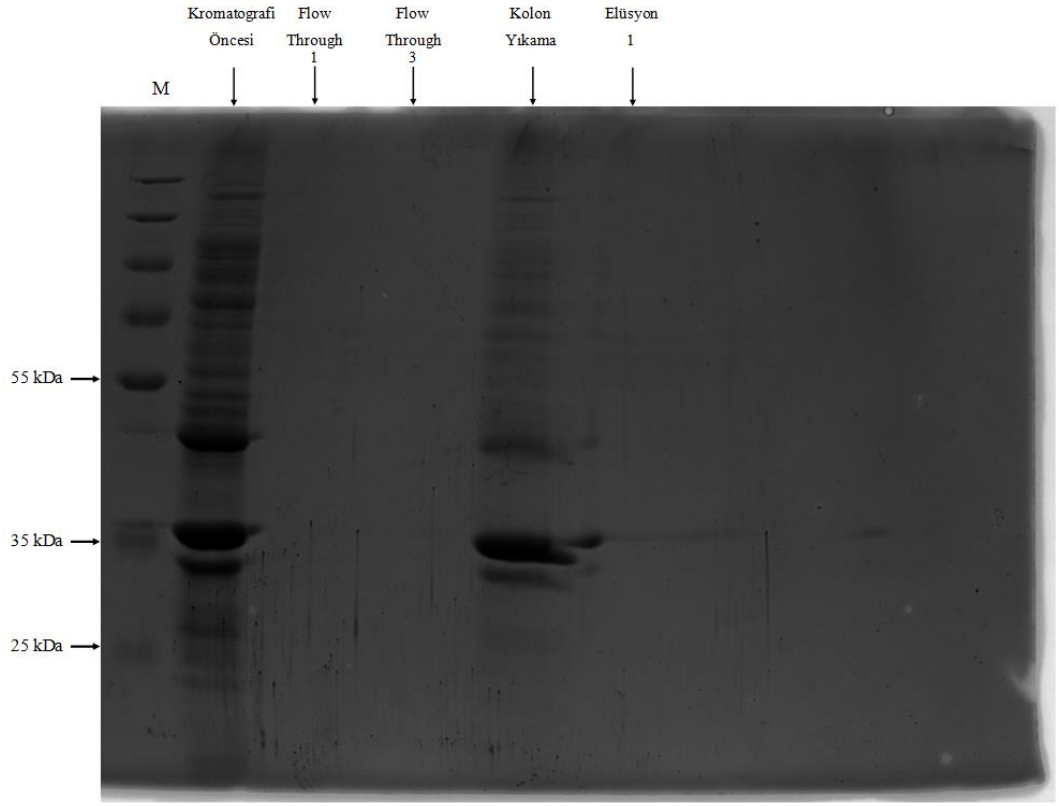
Ardından 4 mL/dk akış hızıyla şartlama tamponu 4 CV kadar kolondan geçirilerek impüritelerin uzaklaştırılması adına kolon yıkaması gerçekleştirildi. Son olarak %100 B, 5 CV gradienti uygulanarak elüsyon tamponu 4 mL/dk akış hızıyla kolondan geçirildi. Gerçekleştirilen 2. deneme kapsamında elde edilen kromatogram, Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Kromatogramda mavi çizgi boyunca 0-25 mL aralığı protein yükleme kısmını, 25-45 mL aralığı kolon yıkama kısmını ve 45-85 mL aralığı elüsyon kısmını göstermektedir.



Şekil 4.3 Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC) 2. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)

Proses süresince kromatogramda 54 mL'de gelen küçük pik dışında anlamlı bir elüsyon piki elde edilemedi. Fakat yine de UV_{280} çizgisinde protein olabileceği düşünülerek fraksiyonlar halinde tüplere toplandı. Kolona yüklenecek olan hedef proteinin varlığının gösterilmesi adına protein çözeltisinden örnek alınarak SDS-PAGE analizi yapıldı. Şekil 4.4'teki jel görüntüsünde de görüldüğü gibi kromatografi öncesi alınan örnekte proteinin varlığı açıkça görülmektedir. Protein, kolondan geçtikten sonra alınan flow through örneklerinde ise herhangi bir protein görülmemektedir. Bu denemede de kolon yıkama kısmında protein bantları görülmektedir. 35 kDa'da görülen proteininin ve diğer yüksek boyutlu proteinlerin

bu kısımda kolondan uzaklaşması kromatografi verimliliği için iyi olsa da hedef protein de bu kısımda kolondan uzaklaşmıştır. 54 mL'de gelen pik SDS-PAGE analizinde "Elüsyon 1" olarak adlandırıldı. Bu pikin hedef protein olduğu düşünülse de Şekil 4.4'te gösterilen SDS-PAGE sonucuna göre içinde hedef proteini içermeyen bir fraksiyon olduğu görülmektedir. Elüsyon kısmında hedef proteine rastlanılmaması bu yöntemi de etkili bir yöntem olmaktan çıkartmaktadır.



Şekil 4.4 Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC) 2. deneme SDS-PAGE jel görüntüsü

Yapılan hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi denemelerinin ardından GST etiketli afinite kromatografisi gerçekleştirildi.

4.2 GST Etiketli Afinite Kromatografisi

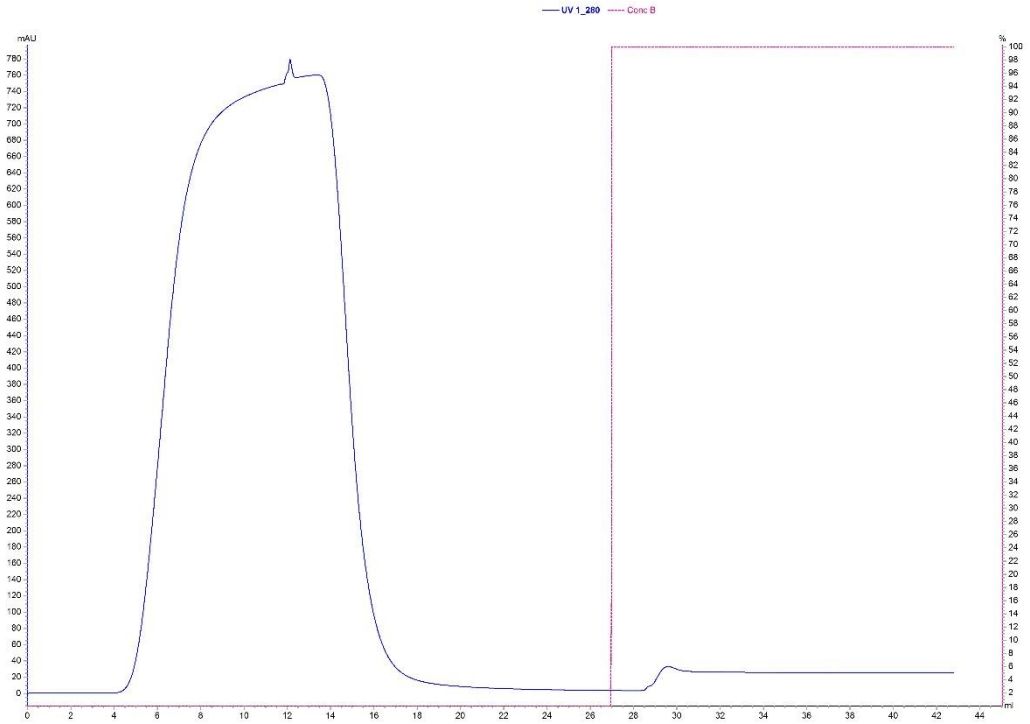
Bu afinite kromatografisi kapsamında gerçekleştirilen iki farklı denemede GSTrap™ HP ve GSTrap™ FF kolonları kullanıldı. Uygulanan parametreler, koşulların daha kolay kıyaslanabilmesi adına Tablo 4.2'de belirtilmiştir. Yalnızca mobil faz tamponları, kullanılan kolonlar ve protein pH'ı değiştirilirken seyreltme katsayısı, akış hızları ve gradient türü gibi faktörler her iki deneme için aynı

tutulmuştur. Hücre lizizi adımından sonra solubilizasyon yapılmadan direkt kromatografi prosesi uygulanması da gerçekleştirilen her iki deneme için ortak bir koşuldur.

Tablo 4.2 GST afinite kromatografisi deneme koşulları

Proses Koşulu	1. Deneme	2. Deneme
Kullanılan kolon	GSTrap HP 1 mL	GSTrap FF 1 mL
Protein lizatının seyreltilme oranı	60x	60x
Proteinin kolondan geçirilme hızı	0,4 mL/dk	0,4 mL/dk
Elüsyon akış hızı	0,8 mL/dk	0,8 mL/dk
Elüsyon gradient türü	Doğrusal %100 B, 0 CV	Doğrusal %100 B, 0 CV
Şartlama tamponu	50 mM Trisma base 150 mM NaCl pH: 8,00	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na_2HPO_4 1,8 mM KH_2PO_4 pH: 7,30
Elüsyon tamponu	50 mM Trisma base 150 mM NaCl 10 mM İndirgenmiş glutatyon pH: 8,00	50 mM Tris HCl 10 mM İndirgenmiş glutatyon pH: 8,00
Kolona yüklenen protein pH'ı	8,00	7,30

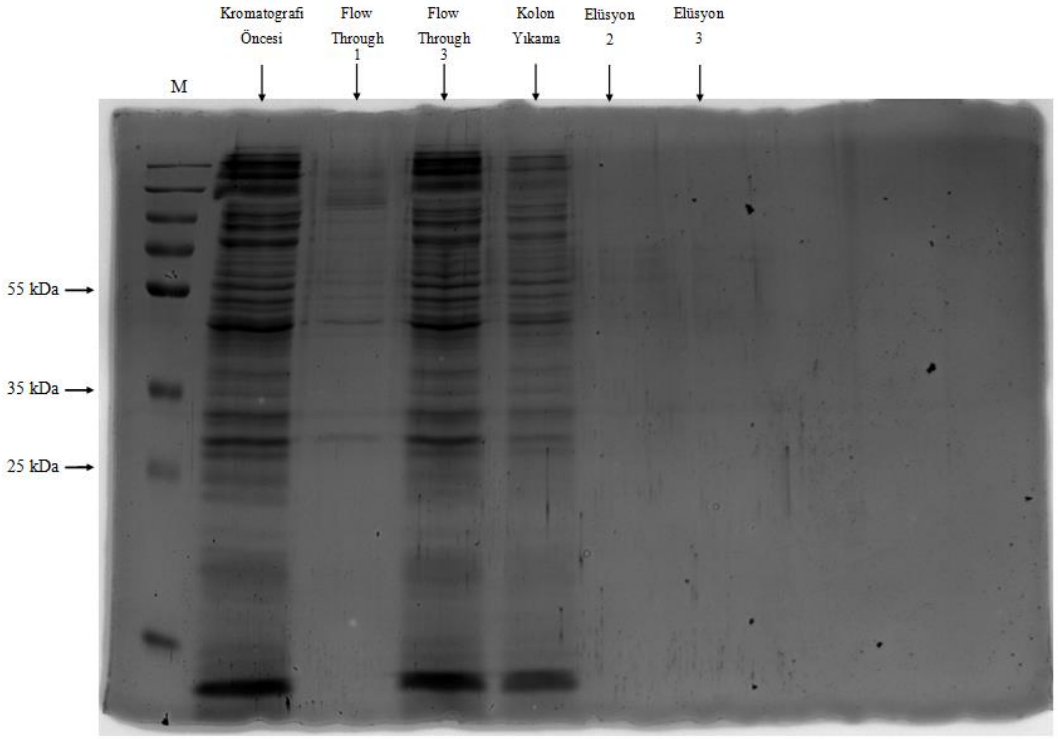
1. GST etiketli afinite kromatografi denemesi kapsamında; hücre lizizi sonrası elde edilen pellet, şartlama tamponu ile seyreltildi. Yoğun partikül içerdiği ve filtre kullanımının elverişsiz olacağı düşünülerek elde edilen çözelti 10000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant kısmı 0,4 mL/dk akış hızıyla GSTrap™ HP kolonuna yüklendi. Ardından 0,8 mL/dk akış hızıyla "A" şartlama tamponu 15 CV kadar kolondan geçirilerek impüritelerin uzaklaştırılması adına kolon yıkaması gerçekleştirildi. Son olarak %100 B, 0 CV gradienti uygulanarak "A" elüsyon tamponu 0,8 mL/dk akış hızıyla kolondan geçirildi. Gerçekleştirilen 1. deneme kapsamında elde edilen kromatogram, Şekil 4.5'te gösterildiği gibidir. Kromatogramda mavi çizgi boyunca 0-13 mL aralığı protein yükleme kısmını, 13-28 mL aralığı kolon yıkama kısmını ve 28-43 mL aralığı elüsyon kısmını göstermektedir.



Şekil 4.5 GST etiketli afinite kromatografisi 1. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)

5-17 mL aralığında görülen pik, proteinin kolondan çıktıktan sonra verdiği UV_{280} absorbans değerinin bir karşılığıdır. Proteinin kolondan geçirilmeden önceki, geçirildiği andaki ve geçirildikten sonraki alınan numunelerinin SDS-PAGE jel görüntüleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Şekil 4.5'te gösterilen ve 5-10 mL aralığında

gelen pikin, çok sivri veya çok geniş olmamasına istinaden protein konsantrasyonunun doğru bir seyreltme oranı ile iyi ayarlandığı sonucuna varılabilir. Ancak kromatografi öncesinden alınan numunenin jel görüntüsü incelendiğinde hedef proteini içeren bantların ve safsızlık içeren bantların diğer denemelerdeki gibi çok yoğun olarak bulunmadığı görülmektedir. Yine aynı jel görüntüsünde proteinin kolondan geçirilirken alınan flow through numunelerinde ise "flow through 1" Şekil 4.5'te belirtilen kromatogramda 5-8 mL aralığını kapsarken "flow through 3" 11-13 mL aralığını kapsamaktadır.

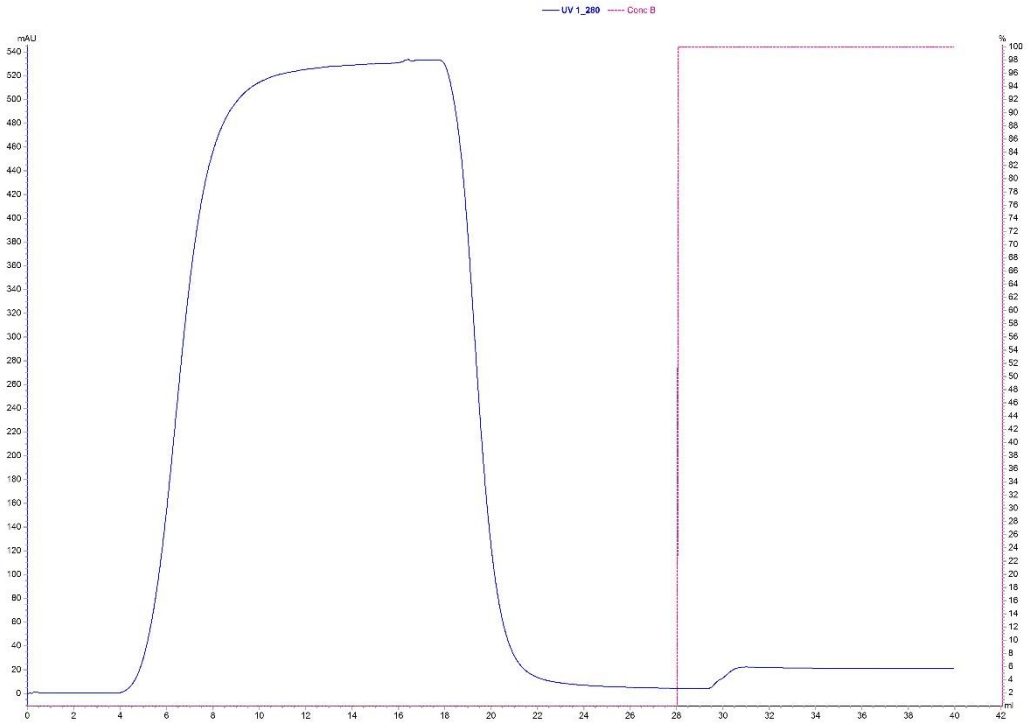


Şekil 4.6 GST etiketli afinite kromatografisi 1. deneme SDS-PAGE görüntüsü

Ancak kolon yıkama kısmında saflaştırılması hedeflenen protein dâhil birçok proteinin kolondan ayrıldığı gözlemlendi. "Elüsyon 2" ve "elüsyon 3" fraksiyonları Şekil 4.5'teki kromatogramda görülen ve 28-31 mL arasında alınan pikin fraksiyonlarıdır. SDS-PAGE jel görüntüsünde elüsyon fraksiyonları için herhangi bir bant tespit edilemedi. 28-31 mL arasında görülen bu pikin hedef rekombinant protein olduğu düşünülse de SDS-PAGE analizine bu pikin hedef proteine ait olmadığı görüldü. Kolon yıkama kısmında hedef proteinin ve diğer proteinlerin kolondan kolay ayrılabilmesi, rHolin proteininin kolon ile zayıf bir etkileşim halinde olduğunu göstermektedir. Gerçekleştirilen ikinci denemede GSTrap™ HP kolonu yerine GSTrap™ FF kolonu kullanıldı. Şartlama ve elüsyon tamponu olarak

Tablo 4.2'de belirtilen tamponlar kullanıldı. Diğer tüm proses koşulları aynı tutulmuştur.

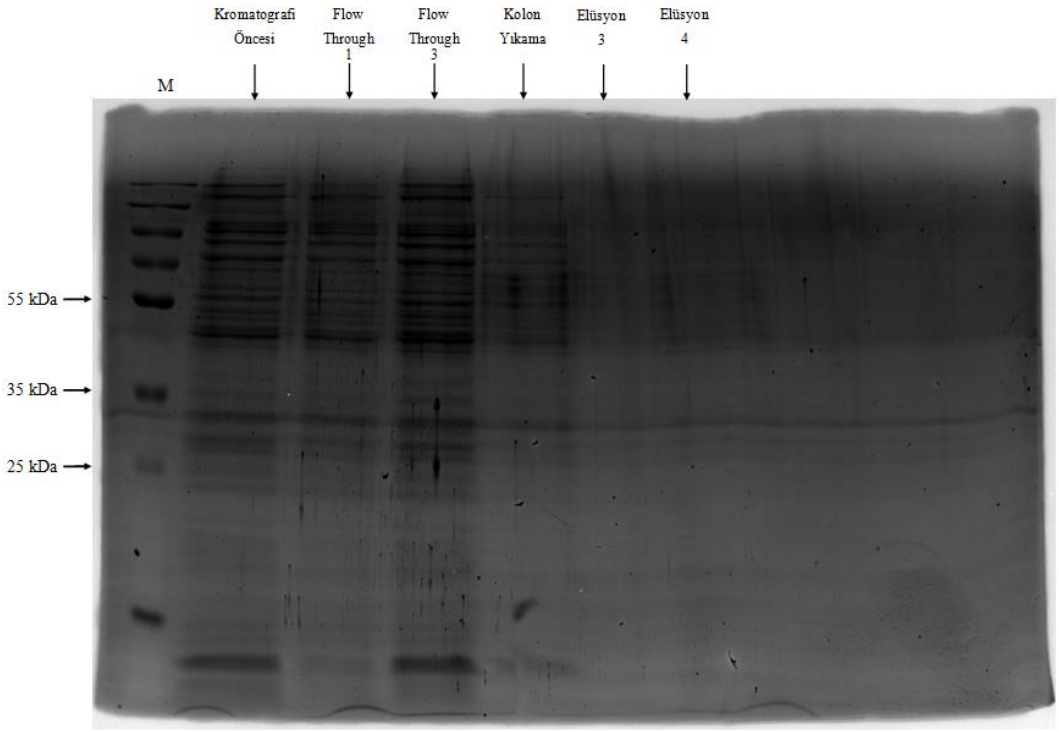
2. GST etiketli afinite kromatografi denemesi kapsamında; hücre lizizi sonrası elde edilen seyreltilmiş lizat, 10000 rpm'de santrifüjlendikten sonra 0,4 mL/dk akış hızıyla GSTrap™ FF kolonuna yüklendi. Ardından 0,8 mL/dk akış hızıyla "B" şartlama tamponu 15 CV kadar kolondan geçirilerek impüritelerin uzaklaştırılması adına kolon yıkaması gerçekleştirildi. Son olarak %100 B, 0 CV gradienti uygulanarak "B" elüsyon tamponu 0,8 mL/dk akış hızıyla kolondan geçirildi. Gerçekleştirilen 2. deneme kapsamında elde edilen kromatogram, Şekil 4.7'de gösterildiği gibidir. Kromatogramda mavi çizgi boyunca 0-15 mL aralığı protein yükleme kısmını, 15-28 mL aralığı kolon yıkama kısmını ve 28-40 mL aralığı elüsyon kısmını göstermektedir.



Şekil 4.7 GST etiketli afinite kromatografisi 2. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)

4-20 mL aralığında görülen pik, proteinin kolondan geçtikten sonra verdiği UV_{280} absorbans değerinin bir karşılığıdır. Proteinin kolon öncesi ve kolon sonrası alınan numunelerinin SDS-PAGE jel görüntüleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir. İlk denemede olduğu gibi kromatografi öncesinden alınan numunenin jel görüntüsü

incelendiğinde hedef proteini içeren bantların ve safsızlık içeren bantların diğer denemelerdeki gibi çok yoğun olarak bulunmadığı görüldü. Yine aynı jel görüntüsünde proteinin kolondan geçirilirken alınan "flow through" numunelerinde ise "flow through 1" Şekil 4.7'de belirtilen kromatogramda 4-8 mL aralığını kapsarken "flow through 3" 12-15 mL aralığını kapsamaktadır. "Flow through 1" fraksiyonunun ilk denemeye göre daha fazla bant içermesi proteinin kolona tutunmasının ilk denemeye göre daha az gerçekleştiğini gösterir.



Şekil 4.8 GST etiketli afinite kromatografisi 2. deneme SDS-PAGE görüntüsü

Kolon yıkama kısmında saflaştırılması hedeflenen protein dâhil birçok proteinin kolondan ayrıldığı gözlemlendi. "Elüsyon 3" ve "elüsyon 4" fraksiyonları Şekil 4.7'deki kromatogramda görülen ve 29-31 mL arasında elde edilen pikin fraksiyonlarıdır. SDS-PAGE jel görüntüsünde elüsyon fraksiyonları için herhangi bir bant tespit edilemedi. 29-31 mL arasında görülen bu pikin hedef rekombinant protein olduğu düşünülse de SDS-PAGE analizine bu pikin hedef proteine ait olmadığı görüldü. Kolon yıkama kısmında hedef proteinin ve diğer proteinlerin kolondan kolay ayrılabilmesi, bu kolonda da rHolin proteininin kolon ile zayıf bir etkileşim halinde olduğunu göstermektedir. Gerçekleştirilen her iki denemede de saf olarak rHolin proteini elde edilemedi.

4.3 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

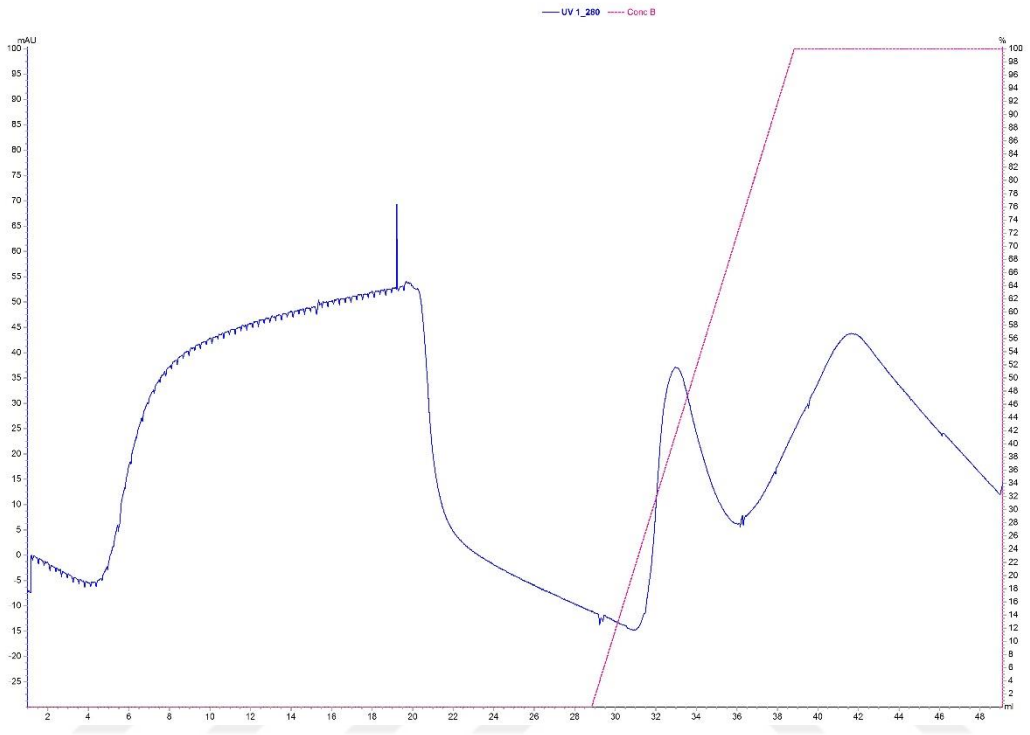
Hidrofobik etkileşim kromatografisi denemeleri kapsamında HiTrap™ Butyl HP kolonu kullanıldı. Uygulanan parametreler, koşulların daha kolay kıyaslanabilmesi adına Tablo 4.3'de belirtilmiştir. Akış hızlarındaki küçük değişiklik ve mobil faz tamponlarında kullanılan tuz türü değişikliği haricinde bir değişiklik yapılmamıştır.

Tablo 4.3 Hidrofobik etkileşim kromatografisi deneme koşulları

Proses Koşulu	1. Deneme	2. Deneme
Kullanılan kolon	HiTrap Butyl HP 1 mL	HiTrap Butyl HP 1 mL
Protein lizatının seyreltilme oranı	2x	2x
Protein adsorpsiyon akış hızı	0,6 mL/dk	0,4 mL/dk
Elüsyon akış hızı	1,0 mL/dk	0,8 mL/dk
Elüsyon gradient türü	Doğrusal %100 B, 10 CV	Doğrusal %100 B, 10 CV
Şartlama tamponu	20 mM Tris HCl 1,5 M Amonyum sülfat pH: 7,50	10 mM Trisma base 1,5 M NaCl pH: 7,50
Elüsyon tamponu	20 mM Tris HCl pH: 7,50	20 mM Tris HCl pH: 7,50
Protein pH'ı	7,50	7,50

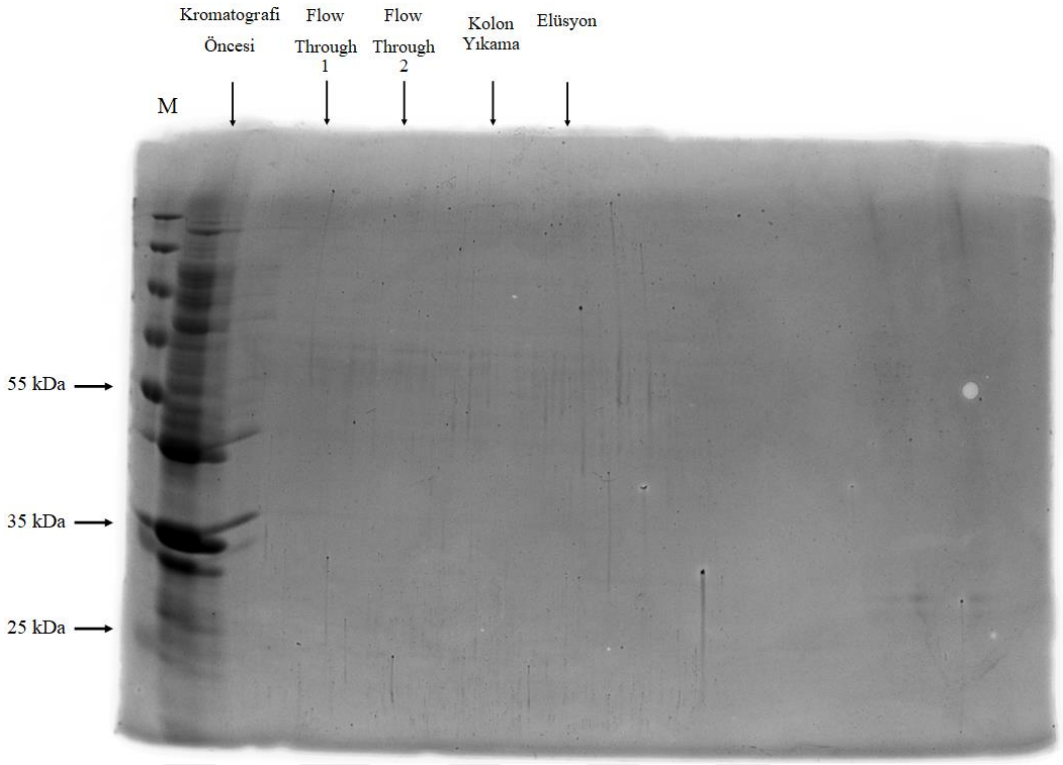
1. hidrofobik etkileşim kromatografi denemesi kapsamında; elde edilen kromatogram, Şekil 4.9'da gösterildiği gibidir. Solubilizasyon sonrası elde edilen hücre lizatı 2 kat "A" seyreltme tamponu ile seyreltildi ve filtre ile süzüldükten sonra 0,6 mL/dk akış hızıyla kolona yüklendi. Proteinin kolondan geçirilmesinin

ardından 1,0 mL/dk akış hızıyla "A" şartlama tamponu 10 CV kadar kolondan geçirilerek impüritelerin uzaklaştırılması adına kolon yıkaması gerçekleştirildi. Son olarak %100 B, 10 CV gradienti uygulanarak "A" elüsyon tamponu 1,0 mL/dk akış hızıyla kolondan geçirildi.



Şekil 4.9 Hidrofobik etkileşim kromatografisi 1. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)

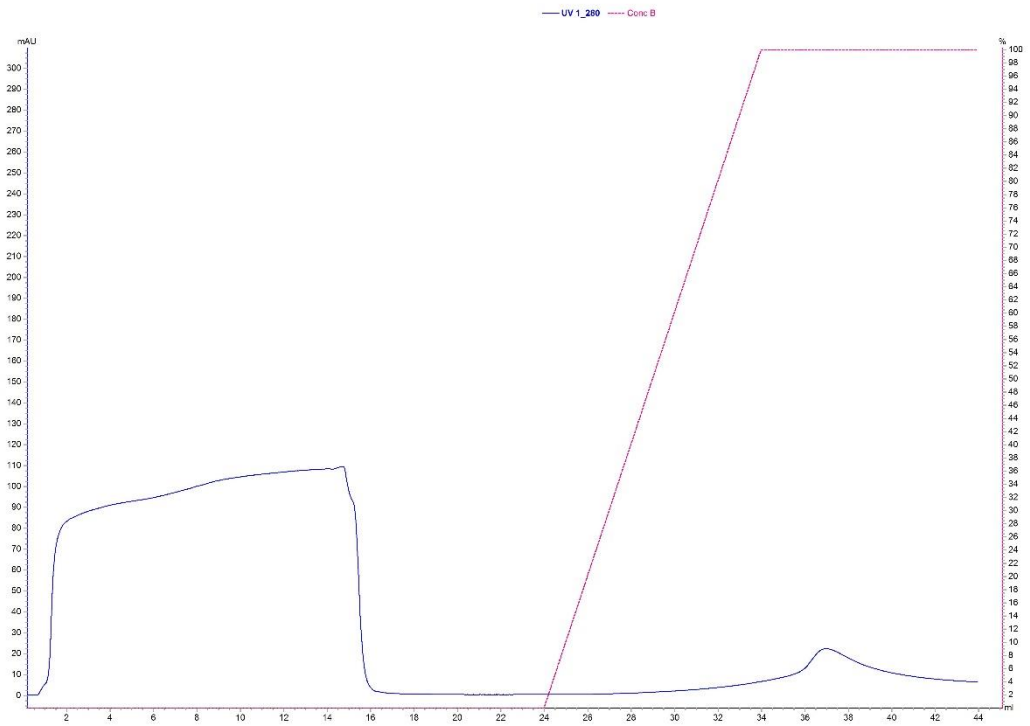
Yine aynı kromatogramda görülen 31-35 mL aralığında görülen pik, hedef protein olabileceği düşünülerek SDS-PAGE analizi kapsamına alındı. 1. deneme süresince alınan örneklerin SDS-PAGE analiz görüntüleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Şekil 4.9'daki kromatogramda mavi çizgi boyunca 0-19 mL aralığı protein yükleme kısmını, 19-29 mL aralığı kolon yıkama kısmını ve 29-49 mL aralığı elüsyon kısmını göstermektedir. 5-20 mL aralığında görülen pike bakılarak kromatografi öncesi protein konsantrasyonunun iyi ayarlandığı söylenebilir. 1. denemeye ait SDS-PAGE jel görüntüsü incelendiğinde, sadece kromatografi öncesi alınan protein çözeltisine ait bantlar ve marker'a ait bantlar görülebilmiştir. Jelde kromatografi öncesi alınan numuneye ait blok ile marker'lara ait blok iç içe geçmiş olarak gözlemlendi.



Şekil 4.10 Hidrofobik etkileşim kromatografisi 1. deneme SDS-PAGE görüntüsü

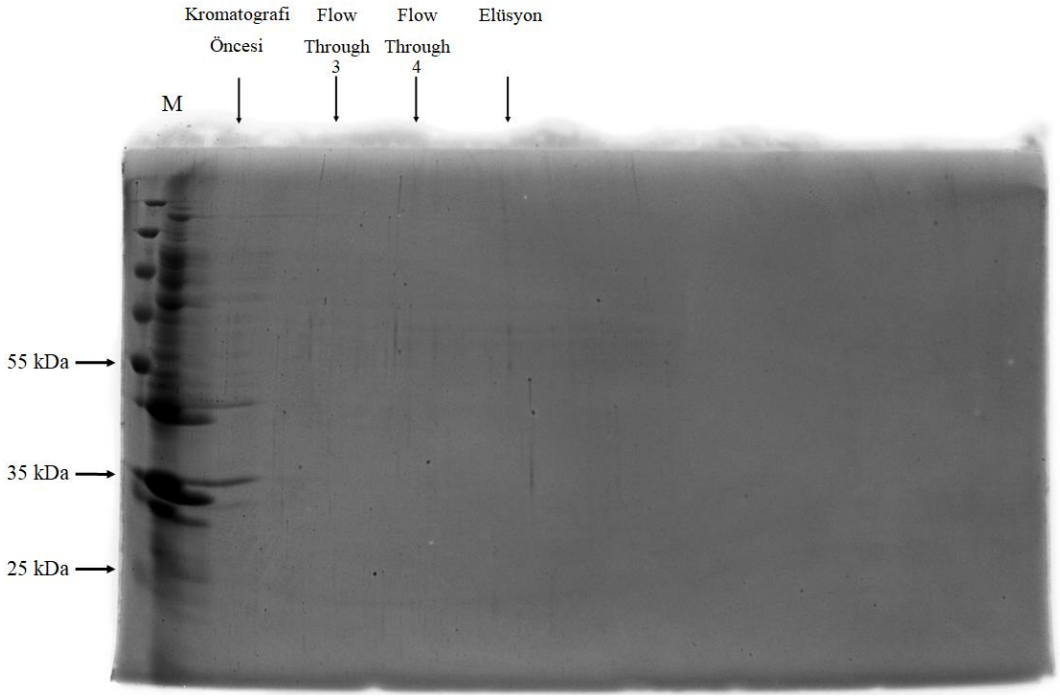
Şartlama ve seyreltme tamponlarında bulunan amonyum sülfatın buna sebep olma ihtimali değerlendirilecektir. Flow through, kolon yıkama ve elüsyon kısımlarından alınan numunelere ait herhangi bir protein bandı görülemedi. Bu sebeple gerçekleştirilecek olan 2. denemede amonyum sülfat yerine sodyum klorür tuzu kullanıldı ve daha düşük akış hızı tercih edildi.

2. hidrofobik etkileşim kromatografi denemesi kapsamında; solubilizasyon sonrası elde edilen hücre lizatı 2 kat "B" seyreltme tamponu ile seyreltildi ve filtre ile süzüldükten sonra 0,4 mL/dk akış hızıyla kolona yüklendi. Ardından 0,8 mL/dk akış hızıyla "B" şartlama tamponu 10 CV kadar kolondan geçirilerek safsızlıkların uzaklaştırılması adına kolon yıkaması gerçekleştirildi. Son olarak %100 B, 10 CV gradienti uygulanarak "A" elüsyon tamponu 0,8 mL/dk akış hızıyla kolondan geçirildi. Gerçekleştirilen 2. denemede elde edilen kromatogram, Şekil 4.11'de gösterildiği gibidir. Kromatogramda mavi çizgi boyunca 0-14 mL aralığı protein yükleme kısmını, 14-24 mL aralığı kolon yıkama kısmını ve 24-44 mL aralığı elüsyon kısmını göstermektedir. Yine aynı kromatogramda görülen 36-38 mL aralığında görülen pik, hedef protein olabileceği düşünülerek SDS-PAGE analizi kapsamına alındı.



Şekil 4.11 Hidrofobik etkileşim kromatografisi 2. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)

2. deneme süresince alınan örneklerin SDS-PAGE analiz görüntüleri Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12 Hidrofobik etkileşim kromatografisi 2. deneme SDS-PAGE görüntüsü

SDS-PAGE jel görüntüsü incelendiğinde, ilk denemede olduğu gibi sadece kromatografi öncesi alınan protein çözeltisine ait bantlar ve marker'a ait bantlar görülebilmiştir. Kromatografi öncesi alınan numuneye ait blok ile marker'lara ait bloğun jelde iç içe geçmiş olduğu gözlemlendi. Flow through, kolon yıkama ve elüsyon kısımlarından alınan numunelere ait fraksiyonlarda herhangi bir protein bandı gözlemlenmedi. Gerçekleştirilen her iki hidrofobik etkileşim kromatografi denemesinde kromatogram profilleri nispeten benzerlik gösterse de SDS-PAGE jel görüntüleri büyük ölçüde aynıdır. İlk denemede şartlama tamponunda kullanılan amonyum sülfatın jel görüntüleri üzerinde etkili olduğu düşünülmüş olsa da gerçekleştirilen ikinci denemede de benzer jel görüntüsünün elde edilmesi sorunun farklı bir sebepten kaynaklandığını göstermektedir. Her iki denemede kullanılan HiTrap™ Butyl HP kolonunda yaşanabilecek diğer sorunlar değerlendirildi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi çalışmaları sonlandırılarak iyon değişim kromatografileri gerçekleştirildi.

4.4 İyon Değişim Kromatografisi

Bir iyon değişim kromatografisi türü olan anyon değişim kromatografisi kapsamında HiTrap™ Capto DEAE 1 mL ve HiScreen™ Capto DEAE 4,7 mL kolonları, farklı türde hazırlanan tamponlar ile birlikte kullanıldı. Şartlama ve elüsyon tamponlarında önemli değişiklikler yapılmasa da gradient türlerinde önemli ölçüde değişiklikler yapıldı. Kıyaslama kolaylığı açısından aynı hacimdeki kolonlar için akış hızlarında değişiklik yapılmadı. Gerçekleştirilen 5 farklı deneme için uygulanan tüm proses parametreleri Tablo 4.4'te özetlenmiştir.

Tablo 4.4 İyon değişim kromatografisi deneme koşulları

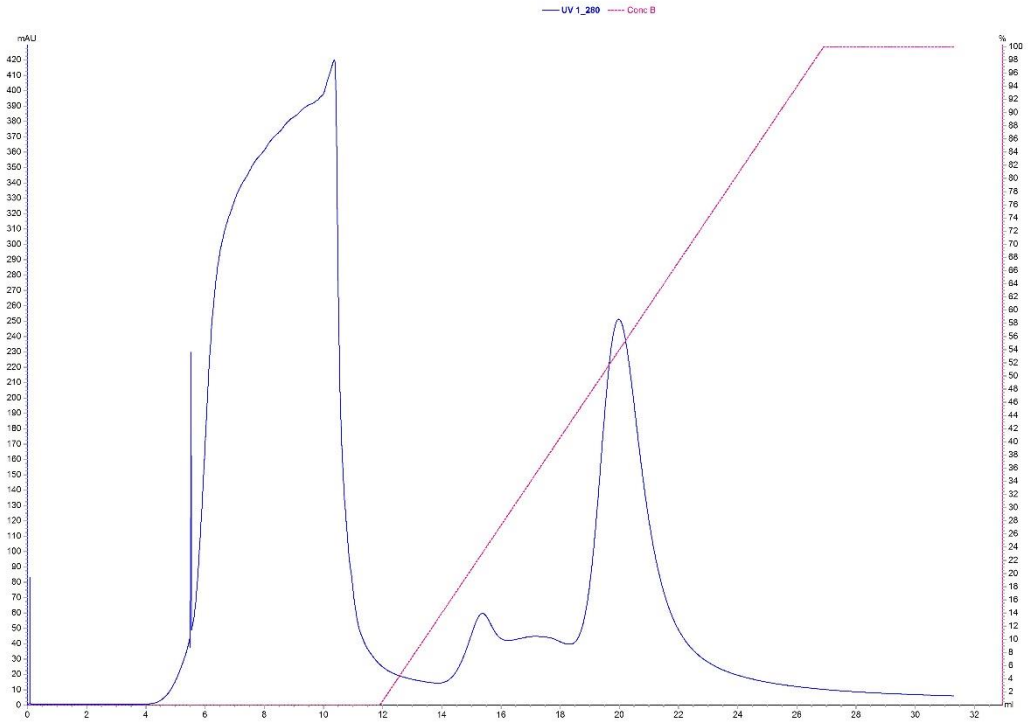
Proses Koşulu	1. Deneme	2. Deneme	3. Deneme	4. Deneme	5. Deneme
Kullanılan kolon	HiTrap Capto DEAE	HiTrap Capto DEAE	HiScreen Capto DEAE	HiScreen Capto DEAE	HiScreen Capto DEAE
Protein lizatının seyreltilme oranı	3x	3x	3x	3x	3x

Tablo 4.4 İyon değişim kromatografisi deneme koşulları (devamı)

Protein adsorpsiyon akış hızı	0,4 mL/dk	0,4 mL/dk	1,5 mL/dk	1,5 mL/dk	1,5 mL/dk
Elüsyon akış hızı	0,8 mL/dk	0,8 mL/dk	2,5 mL/dk	2,5 mL/dk	2,5 mL/dk
Elüsyon gradient türü	Doğrusal %100 B 15 CV	Basamak %25 B %40 B %75 B %100 B	Doğrusal %100 B 15 CV	Doğrusal %100 B 10 CV	Basamak %5 B %15 B %30 B %55 B %100 B
Şartlama tamponu	20 mM Tris HCl pH: 7,50	20 mM Tris HCl pH: 7,50	20 mM Tris HCl pH: 8,00	20 mM Tris HCl pH: 8,00	20 mM Tris HCl pH: 8,00
Elüsyon tamponu	10 mM Trisma base 1,5 M NaCl pH: 7,50	10 mM Trisma base 1,5 M NaCl pH: 7,50	20 mM Tris HCl 0,8 M NaCl pH: 8,00	20 mM Tris HCl 0,8 M NaCl pH: 8,00	20 mM Tris HCl 0,8 M NaCl pH: 9,00
Protein pH'ı	8,20	8,00	8,00	8,00	8,00

1. iyon değişim kromatografi denemesi kapsamında; solubilizasyon sonrası elde edilen protein çözeltisi, 3 kat "A" şartlama tamponu ile seyreltildi. pH'ı 8,20 olarak ölçüldü ve herhangi bir pH ayarlaması yapılmadı. Filtre ile süzüldükten sonra 0,4 mL/dk akış hızıyla HiTrap™ Capto DEAE kolonuna yüklendi. Proteinin kolondan geçirilmesi bittiğinde kolondan yeniden 0,8 mL/dk akış hızıyla "A" şartlama

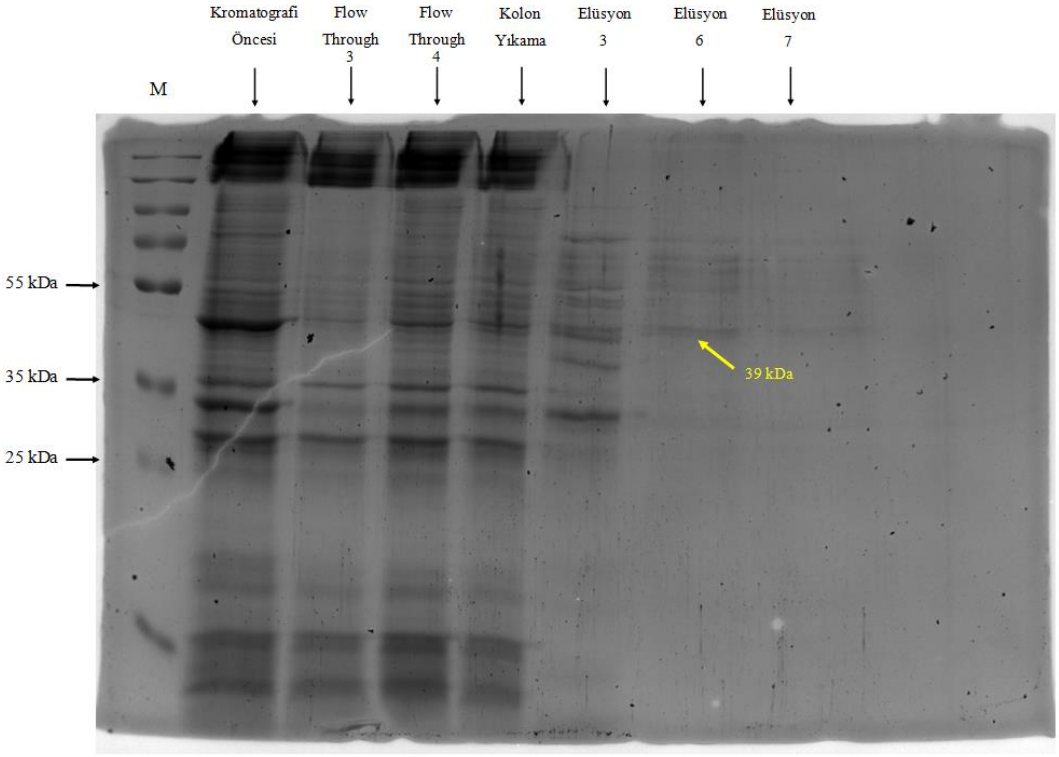
tamponu geçirildi. Ancak bu kısım kolon yıkaması kadar uzun tutulmadı. Yalnızca UV_{280} absorbansının sıfıra inmesi beklendi. Ardından %100 B, 15 CV gradienti uygulanarak "A" elüsyon tamponu 0,8 mL/dk akış hızıyla kolondan geçirildi. Gerçekleştirilen 1. deneme kapsamında elde edilen kromatogram, Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13 İyon değişim kromatografisi 1. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)

Kromatogramda mavi çizgi boyunca 0-10 mL aralığı protein yükleme kısmını, 12-32 mL aralığı elüsyon kısmını göstermektedir. İlgili kromatogramda 4-12 mL aralığında görülen pik kolondan geçen protein çözeltisinin vermiş olduğu absorbans değerinin bir ifadesidir. 15-16 mL ve 19-22 mL aralığında görülen pikler, hedef proteine ait olması ihtimaliyle ayrı ayrı tüplere fraksiyon olarak toplandı. Kolon öncesi ve sonrasında alınan tüm örneklere SDS-PAGE analizi gerçekleştirildi. 1. Denemeye ait SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 4.14'te verilmiştir. "Flow through 3" fraksiyonu Şekil 4.13'te verilen kromatogramda 6-8 mL aralığını ifade etmektedir. SDS-PAGE sonucuna göre bu fraksiyonda 39 kDa'da bulunması gereken hedef protein görülmemektedir. Buradan yola çıkarak hedef proteinin kolona iyi tutunduğu söylenebilir. Hedef protein haricindeki proteinler ise farklı kDa

değerlerinde bant olarak görüldü. Bu durumda hedef protein, kolona bağlanabiliyorken safsızlıklar kolon tarafından adsorbe edilmiyor yorumu yapılabilir. Fakat "flow through 4" fraksiyonunda hedef protein ile diğer safsızlıkların bantları da görülmektedir. "Flow through 4" fraksiyonunun 8-10 mL'lik bölgeyi ifade ettiği düşünüldüğünde 8 mL itibarıyla kolon, maksimum kapasitesine ulaşmış ve daha fazla proteini adsorbe edemiyor olarak yorumlanabilir.

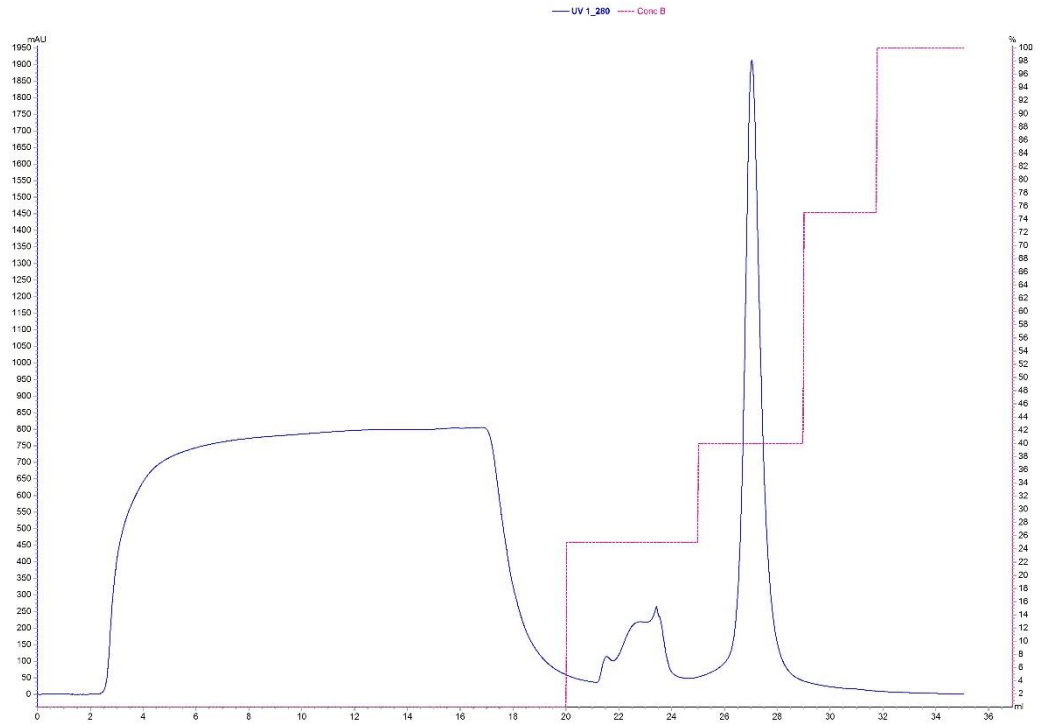


Şekil 4.14 İyon değişim kromatografisi 1. deneme SDS-PAGE görüntüsü

Kolon yıkama kısmı ise sadece UV_{280} absorbans değerinin sıfıra inmesi adına gerçekleştirilmişti. Bu kısımda 39 kDa'daki hedef protein bandının görülmesine, proteinin kolona zayıf etkileşimle bağlı olduğu yorumu yapılması doğru olmaz. Çünkü kolon yıkama kısmında elde edilen bantlar ile "flow through 4" kısmındaki bantlar büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Yalnızca elüsyona başlamadan önce kolon içinde kalan protein çözeltisi kolondan uzaklaştırıldığı için bu fraksiyonda protein bantları görülmüştür yorumu yapılabilir. 15-16 mL aralığında elde edilen "elüsyon 3" fraksiyonu içinde rHolin proteinini barındıran ama saf olarak rHolin proteini olmayan bir fraksiyondur. Bu adımda farklı safsızlıklar kolondan uzaklaşmıştır. "Elüsyon 6" ve "elüsyon 7" fraksiyonları 39 kDa

boyutundaki hedef proteini içeren ve Şekil 4.13'teki kromatogramda 19-22 mL aralığında görülen piktir. Aynı zamanda hedef proteinin tek bant olarak görüldüğü fraksiyonlardır. Fakat "elüsyon 3" pikinden tam olarak ayrılamadığı için saflığında bir düşüş olmuştur denilebilir. Yine de ilk iyon değişim kromatografisi denemesine göre etkili olarak kullanılmaya aday bir yöntem olarak değerlendirilebilir. Elde edilen bantların SDS-PAGE analizinin yanı sıra Western blot ve MALDI kütle spektroskopisiyle doğrulanması tüm iyon değişim kromatografi denemelerinden sonra ayrıca tartışılmıştır.

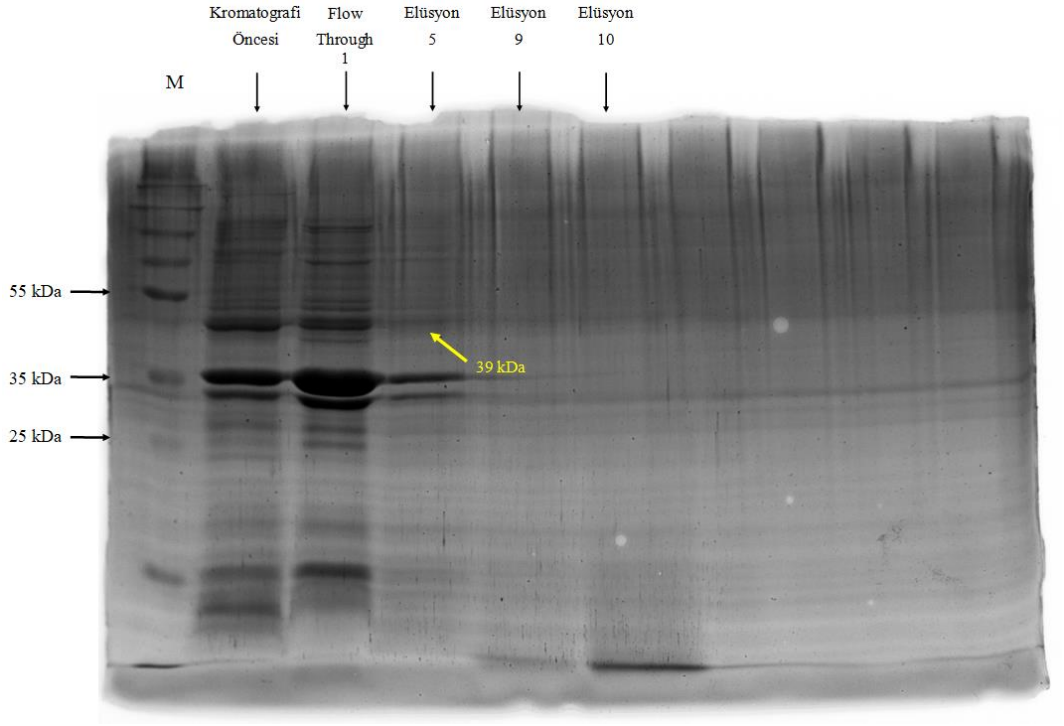
2. iyon değişim kromatografi denemesi kapsamında; solubilizasyon sonrası elde edilen protein çözeltisi, 3 kat "A" şartlama tamponu ile seyreltildi ve pH'ı 8,00'a ayarlandı. Filtre ile süzüldükten sonra 0,4 mL/dk akış hızıyla HiTrap™ Capto DEAE kolonuna yüklendi. Gerçekleştirilen 2. deneme kapsamında elde edilen kromatogram, Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15 İyon değişim kromatografisi 2. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)

Proteinin kolondan geçirilmesi bittiğinde kolondan yeniden 0,8 mL/dk akış hızıyla "A" şartlama tamponu geçirildi. Ancak bu kısım kolon yıkaması kadar uzun tutulmadı. Ardından %25 B, %40 B, %75 B ve %100 B gradienti uygulanarak "A"

elüsyon tamponu 0,8 mL/dk akış hızıyla kolondan geçirildi. 1. denemeden farklı olarak doğrusal gradient yerine basamak gradienti uygulandı. Kromatogramda mavi çizgi boyunca 0-17 mL aralığı protein yükleme kısmını, 20-35 mL aralığı elüsyon kısmını göstermektedir. 21-24 mL ve 26-29 mL aralığında görülen pikler, hedef proteine ait olması ihtimaliyle ayrı ayrı tüplere fraksiyon olarak toplandı. Kolon öncesi ve sonrasında alınan tüm örneklere SDS-PAGE analizi gerçekleştirilerek 1. deneme ile karşılaştırıldı. İlgili denemenin kromatogramı incelendiğinde, sadece pH'ta ve gradientte yapılan değişiklik sonucu ilk denemeden farklı profilde bir kromatogram elde edilmiştir. 2. deneme gerçekleştirilirken toplanan fraksiyonların SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 4.16'da gösterilmiştir ve bu analiz için kromatografi öncesi alınan numuneden hariç "flow through 1", "elüsyon 5", "elüsyon 9" ve "elüsyon 10" numuneleri incelenmiştir.

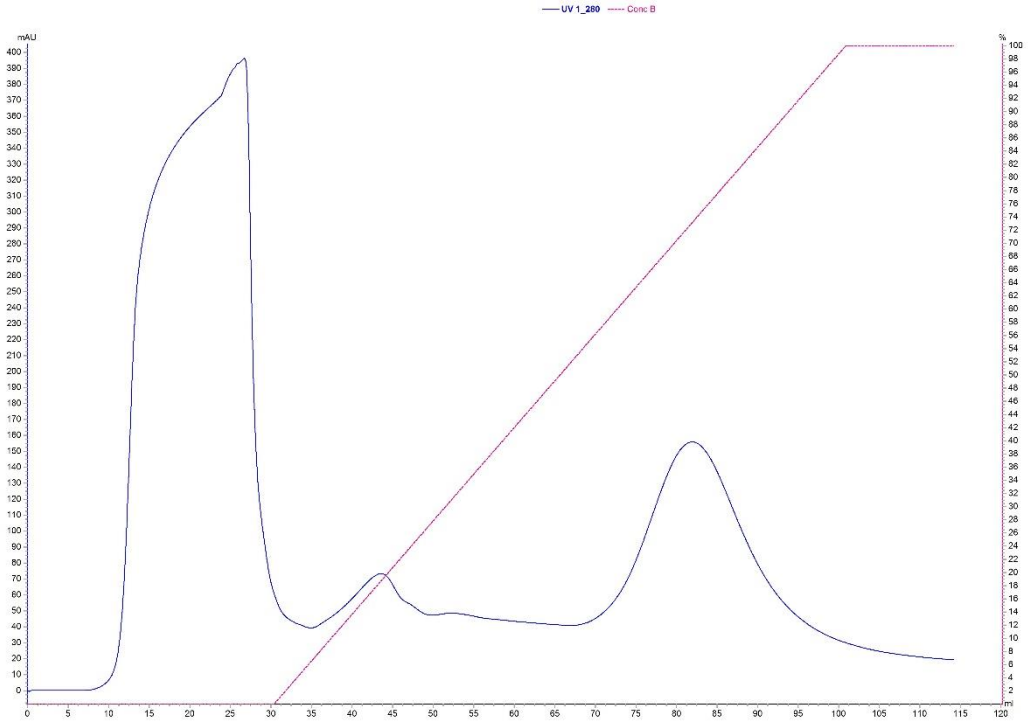


Şekil 4.16 İyon değişim kromatografisi 2. deneme SDS-PAGE görüntüsü

SDS-PAGE analizi sonucuna göre jel görüntüsü incelendiğinde kromatografi öncesi alınan numunenin hedef proteini ve diğer safsızlıkları içerdiği görülmektedir. Şekil 4.15'te verilen kromatogramda 2-8 mL aralığını ifade eden "flow through 1" fraksiyonunda ise 39 kDa'da bulunan hedef protein bandına rastlanılmıştır. Henüz protein adsorpsiyon sürecinin başında bu proteinin varlığının gözlemlenmesi, hedef proteinin kolona çok iyi bağlanmaması ile açıklanabilir. 1.

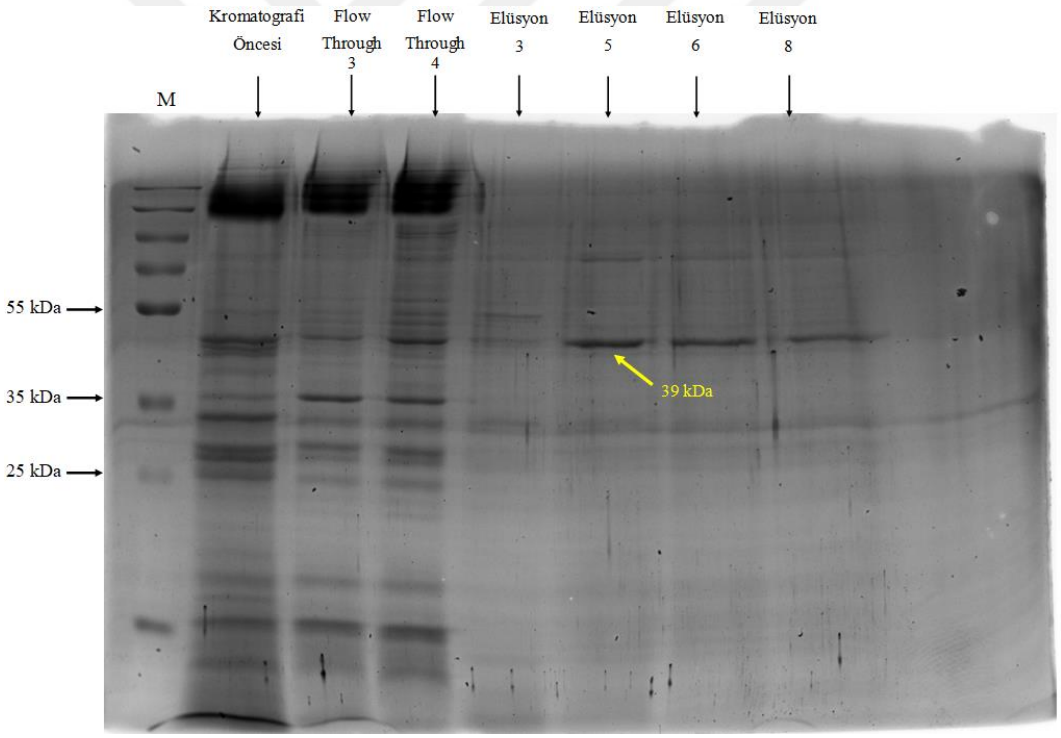
iyon değişim kromatografi denemesi ile aynı parametrelerin uygulandığı 2. denemede proteinin kolona iyi tutunamaması, protein pH'larının birbirinden farklı olması ile açıklanabilir. Kromatogramda 22-23 mL arasında alınan "elüsyon 5" fraksiyonu çok az miktarda 39 kDa'da hedef proteini içermektedir. Ancak 35 kDa bandında gelen safsızlığın daha yoğun olduğu görülmektedir. 26-27 mL'de alınan "elüsyon 9" ve 27-28 mL'de alınan "elüsyon 10" fraksiyonları hedef proteini içerdiği düşünülse de aslında molekül ağırlığı küçük bir safsızlık olarak tanımlanabilir. 1. denemeden farklı olarak uygulanan basamak gradientinin yalnızca piklerin biraz daha ayrılmasını sağladığı görülmüştür. Fakat kromatografi öncesi 8,00'a ayarlanan pH'ın proteinin kolona bağlanmasını engellediği öngörülmektedir. Sonraki denemelerde tampon içerikleri değiştirilerek 4,7 mL'lik aynı tür kolon kullanıldı.

3. iyon değişim kromatografi denemesi kapsamında; solubilizasyon sonrası elde edilen protein çözeltisi, 3 kat "B" şartlama tamponu ile seyreltildi ve pH'ı 8,00'a ayarlandı. Filtre ile süzüldükten sonra 1,5 mL/dk akış hızıyla HiScreen™ Capto DEAE kolonuna yüklendi.



Şekil 4.17 İyon değişim kromatografisi 3. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)

Gerçekleştirilen 3. deneme kapsamında elde edilen kromatogram, Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Bir önceki denemeden farklı olarak şartlama tamponunun pH'ı 7,50 yerine 8,00 olarak ayarlandı. Elüsyon tamponunda ise Trisma base yerine Tris HCl kullanılarak NaCl molaritesi düşürüldü. Proteinin kolondan geçirilmesi bittiğinde kolondan yeniden 2,5 mL/dk akış hızıyla "B" şartlama tamponu geçirildi. Ancak bu kısım kolon yıkaması kadar uzun tutulmadı. Yalnızca UV_{280} absorbansının sıfıra inmesi beklendi. Ardından %100 B, 15 CV gradienti uygulanarak "B" elüsyon tamponu 2,5 mL/dk akış hızıyla kolondan geçirildi. Kromatogramda mavi çizgi boyunca 0-25 mL aralığı protein yükleme kısmını, 30-115 mL aralığı elüsyon kısmını göstermektedir. 36-46 mL ve 75-90 mL aralığında görülen pikler, hedef proteine ait olması ihtimaliyle ayrı ayrı tüplere fraksiyon olarak toplandı. 3. deneme sırasında toplanan fraksiyonların SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

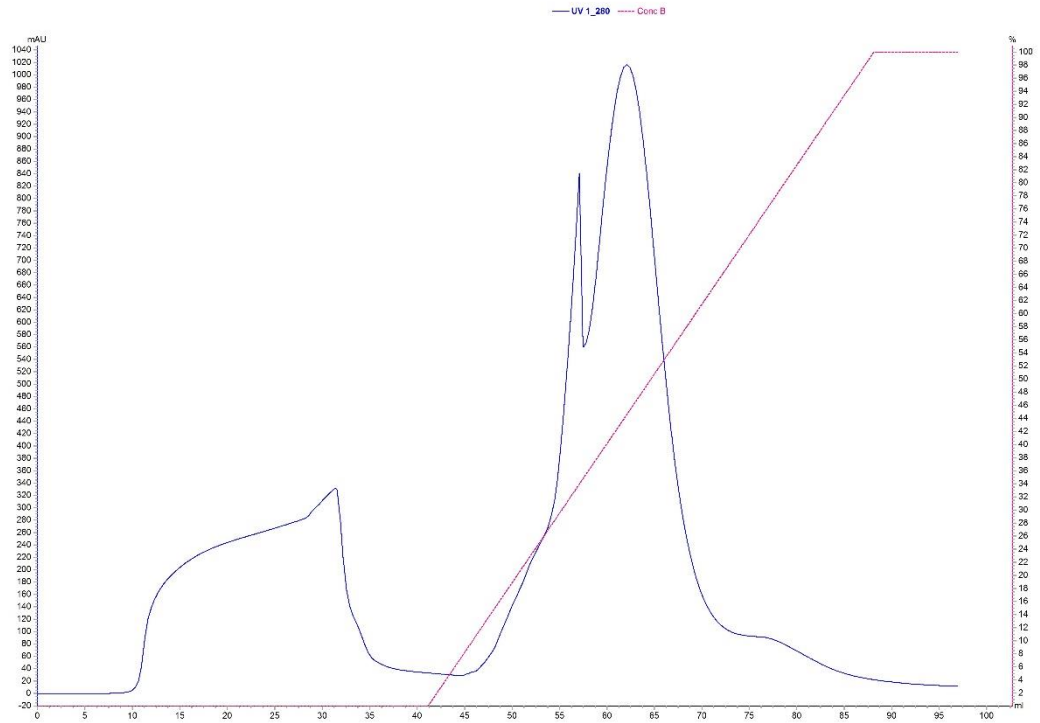


Şekil 4.18 İyon değişim kromatografisi 3. deneme SDS-PAGE görüntüsü

Bu analiz için kromatografi öncesi alınan numuneden hariç "flow through 3", "flow through 4", "elüsyon 3", "elüsyon 5", "elüsyon 6" ve "elüsyon 8" fraksiyonları incelenmiştir. Kromatogramda 14-19 mL aralığını içeren "flow through 3" fraksiyonu incelendiğinde önemli miktarda 39 kDa'da bulunan hedef proteini içermediği görülmüştür. Fakat 19 mL'den sonra alınan "flow through 4"

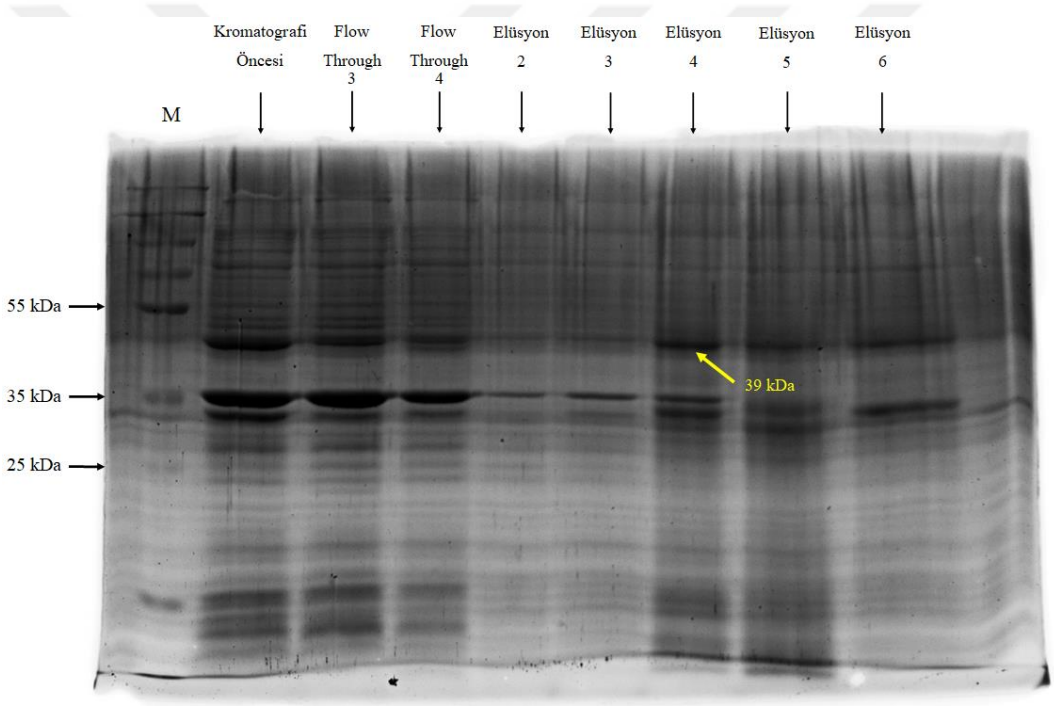
numunesinde hedef protein varlığının biraz daha artmış olduğu görüldü. Bu durum, yaklaşık 20 mL itibarıyla kolonun maksimum protein adsorbe etme kapasitesine ulaşmış olmasıyla açıklanabilir. 40-45 mL aralığında görülen ilk pik olan "elüsyon 3" fraksiyonuna ait blokta hedef protein görülmezken 39 kDa bandından daha aşağıdaki safsızlıkların kolondan uzaklaştığı görülmektedir. 75-95 mL aralığında görülen pik beş ayrı fraksiyon olarak toplanarak üç tanesi SDS-PAGE analizinde değerlendirilmiştir. "elüsyon 5", "elüsyon 6" ve "elüsyon 8" fraksiyonlarında yaklaşık 39 kDa boyutunda bant görülmesi bu pikin hedef proteine ait olması ihtimalini güçlendirmektedir. Bu pikin rHolin proteinine ait olup olmadığının değerlendirilmesi için Western blot analizi gerçekleştirilmiş ve sonuçları ayrıca tartışılmıştır.

4. iyon değişim kromatografi denemesi kapsamında; solubilizasyon sonrası elde edilen protein çözeltisi, 3 kat "B" şartlama tamponu ile seyreltildi ve pH'ı 8,00'a ayarlandı. Filtre ile süzüldükten sonra 1,5 mL/dk akış hızıyla HiScreen™ Capto DEAE kolonuna yüklendi. Gerçekleştirilen 4. deneme kapsamında elde edilen kromatogram, Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



Şekil 4.19 İyon değişim kromatografisi 4. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)

Bir önceki denemeden farklı olarak yalnızca gradient türü 15 CV yerine 10 CV olarak uygulandı. Diğer tüm koşullar 3. deneme ile tamamen aynı olacak şekilde gerçekleştirildi. Proteinin kolondan geçirilmesi bittiğinde kolondan yeniden 2,5 mL/dk akış hızıyla "B" şartlama tamponu geçirildi. Ancak bu kısım kolon yıkaması kadar uzun tutulmadı. Yalnızca UV_{280} absorbansının sıfıra inmesi beklendi. Ardından %100 B, 10 CV gradienti uygulanarak "B" elüsyon tamponu 2,5 mL/dk akış hızıyla kolondan geçirildi. Kromatogramda mavi çizgi boyunca 0-30 mL aralığı protein yükleme kısmını, 41-97 mL aralığı elüsyon kısmını göstermektedir. 54-67 mL aralığında görülen çift tepeli pik, hedef proteine ait olması ihtimaliyle ayrı ayrı tüplere fraksiyon olarak toplandı. 4. deneme sırasında toplanan fraksiyonların SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 4.20'de gösterilmiştir.

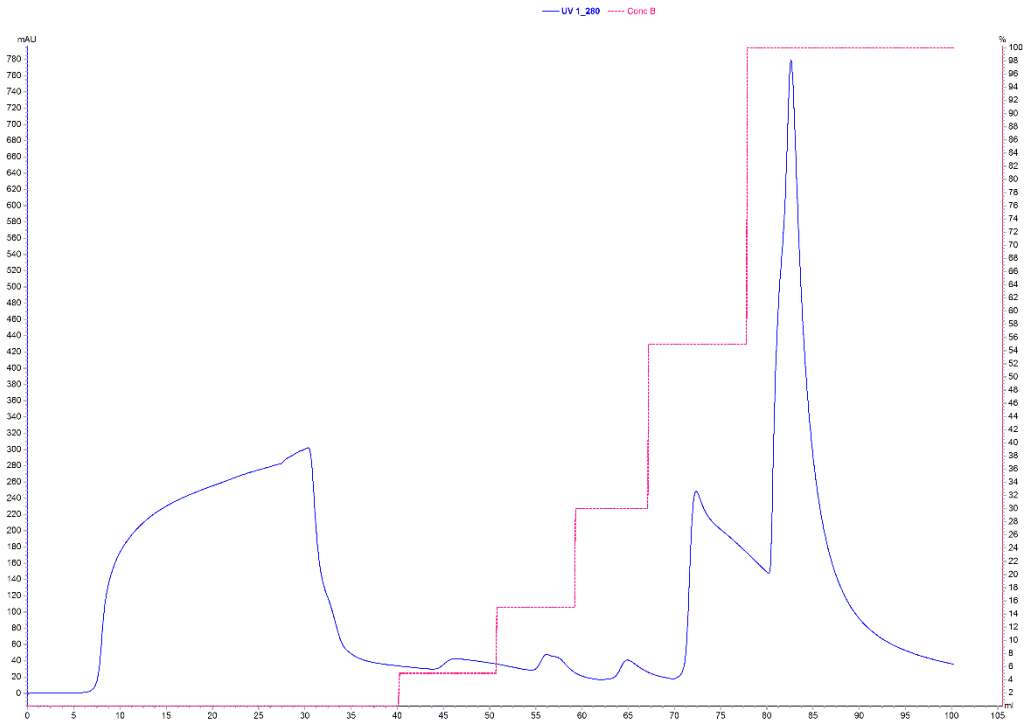


Şekil 4.20 İyon değişim kromatografisi 4. deneme SDS-PAGE görüntüsü

Bu analiz için kromatografi öncesi alınan numuneden hariç "flow through 3", "flow through 4", "elüsyon 2", "elüsyon 3", "elüsyon 4", "elüsyon 5" ve "elüsyon 6" fraksiyonları incelenmiştir. Kromatogramda 19-35 mL aralığını içeren "flow through 3" ve "flow through 4" fraksiyonu incelendiğinde önemli miktarda 39 kDa'da bulunan hedef proteini içerdiği görülmüştür. Bu durum, yine bir önceki denemede de olduğu gibi yaklaşık 20 mL itibarıyla kolonun maksimum protein adsorbe etme kapasitesine ulaşmış olmasıyla açıklanabilir. 3. denemeden farklı olarak sadece gradientin değiştirilmiş olması, çift tepeli bir pik görülmesine neden

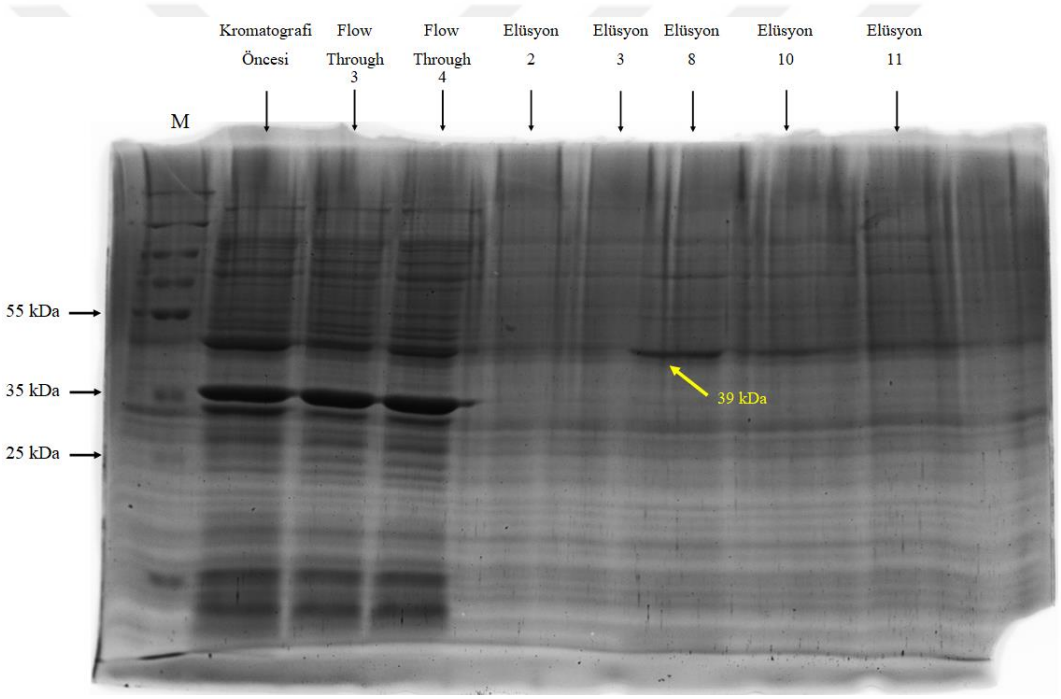
olmuştur. Görülen çift tepeli pikin sol tarafı “elüsyon 2” ve “elüsyon 3” fraksiyonlarını içermektedir. SDS-PAGE jel görüntüsüne göre bu fraksiyonlarda hedef protein varlığına rastlanılmadı. Ancak pikin sağ tarafını içeren “elüsyon 4”, “elüsyon 5” ve “elüsyon 6” fraksiyonları hem 39 kDa’daki rHolin protein bandını hem de diğer safsızlıklardan gelen bantları içerdiği gözlemlendi. Uygulanan gradient değişikliğinin iki pikin tam olarak birbirinden ayrılmasında etkili olamadığı düşünülmektedir. Hedef proteinin safsızlıklardan ayrı bir pik olarak ayrılmasında farklı bir iyonik denge kurulmalıdır. Sonraki gerçekleştirilen denemede konsantrasyon geçişleri daha dar olan basamaklı bir gradient uygulanmıştır. Aynı zamanda elüsyon tamponunda yapılan değişikliğin etkileri gözlemlenmiştir.

5. iyon değişim kromatografi denemesi kapsamında; solubilizasyon sonrası elde edilen protein çözeltisi, 3 kat “B” şartlama tamponu ile seyreltildi ve pH’ı 8,00’a ayarlandı. Filtre ile süzüldükten sonra 1,5 mL/dk akış hızıyla HiScreen™ Capto DEAE kolonuna yüklendi. Gerçekleştirilen 5. deneme kapsamında elde edilen kromatogram, Şekil 4.21’da gösterilmiştir.



Şekil 4.21 İyon değişim kromatografisi 5. deneme kromatogramı (Mavi: 280 nm’de UV dedektöründen elde edilen kromatogram, Mor: kolondan geçen elüsyon tamponu konsantrasyonu)

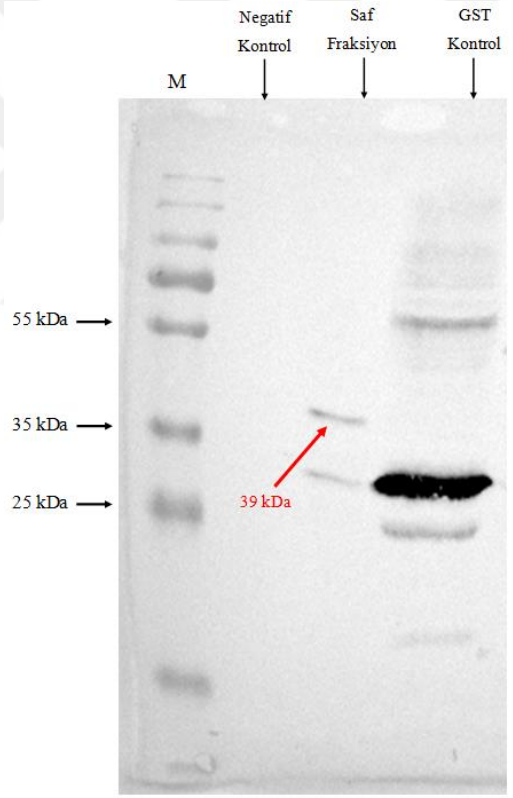
Önceki denemelerden farklı olarak basamak gradienti daha dar bir skalada uygulandı. Proteinin kolondan geçirilmesi bittiğinde kolondan yeniden 2,5 mL/dk akış hızıyla "B" şartlama tamponu geçirildi. Ancak bu kısım kolon yıkaması kadar uzun tutulmadı. Yalnızca UV_{280} absorbansının sıfıra inmesi beklendi. Ardından %5 B, %15 B, %30 B, %55 B ve %100 B gradienti uygulanarak "C" elüsyon tamponu 2,5 mL/dk akış hızıyla kolondan geçirildi. Kromatogramda mavi çizgi boyunca 0-30 mL aralığı protein yükleme kısmını, 40-100 mL aralığı elüsyon kısmını göstermektedir. 45-46 mL, 55-56 mL, 64-66 mL, 71-73 mL ve 80-85 mL aralığında görülen tüm pikler, hedef proteine ait olması ihtimaliyle ayrı ayrı tüplere fraksiyon olarak toplandı. 5. deneme sırasında toplanan fraksiyonların SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 4.22'de gösterilmiştir.



Şekil 4.22 İyon değişim kromatografisi 5. deneme SDS-PAGE görüntüsü

Bu analiz için kromatografi öncesi alınan numuneden hariç "flow through 3", "flow through 4", "elüsyon 2", "elüsyon 3", "elüsyon 8", "elüsyon 10" ve "elüsyon 11" fraksiyonları incelenmiştir. Kromatogramda 20-40 mL aralığını içeren "flow through 3" ve "flow through 4" fraksiyonu incelendiğinde önemli miktarda 39 kDa'da bulunan hedef proteini içerdiği görülmüştür. Bu durum, yine bir önceki denemede de olduğu gibi yaklaşık 20 mL itibarıyla kolonun maksimum protein adsorbe etme kapasitesine ulaşmış olmasıyla açıklanabilir. Şekil 4.21'deki ilgili denemenin kromatogramında görülen 55-56 mL ve 64-66 mL aralığında gelen

pikler “elüsyon 2” ve “elüsyon 3” fraksiyonlarını göstermektedir. Bu fraksiyonlarda hedef proteine rastlanılmaması, görülen piklerin safsızlıklara ait olduğunu göstermektedir. 71-73 mL aralığında görülen pik, SDS-PAGE jel görüntüsünden de görüldüğü gibi 39 kDa’da yoğun olarak rHolin proteinine aittir. 80-85 mL aralığında görülen pikin SDS-PAGE jel görüntüsünde de çok az miktarda hedef protein içerdiği gözlemlenmiştir. Fakat esas olarak bu pik rHolin proteinine ait değildir. Yalnızca hedef proteinin bulunduğu pik ile tam olarak birbirinden ayrılamadığı için jel görüntüsünde bu proteine rastlanılmıştır. rHolin proteininin bulunduğu pikin tam olarak ayrılabilmesi ve daha yüksek saflıkta elde edilebilmesi için 5. deneme biraz daha geliştirilmeye açıktır. Örneğin elüsyon akış hızı 2,5 mL/dk yerine 3,0 mL/dk uygulanabilir. Fakat bu haliyle bile 5. deneme uygulanabilir bir saflaştırma yöntemi olduğu görülmektedir.

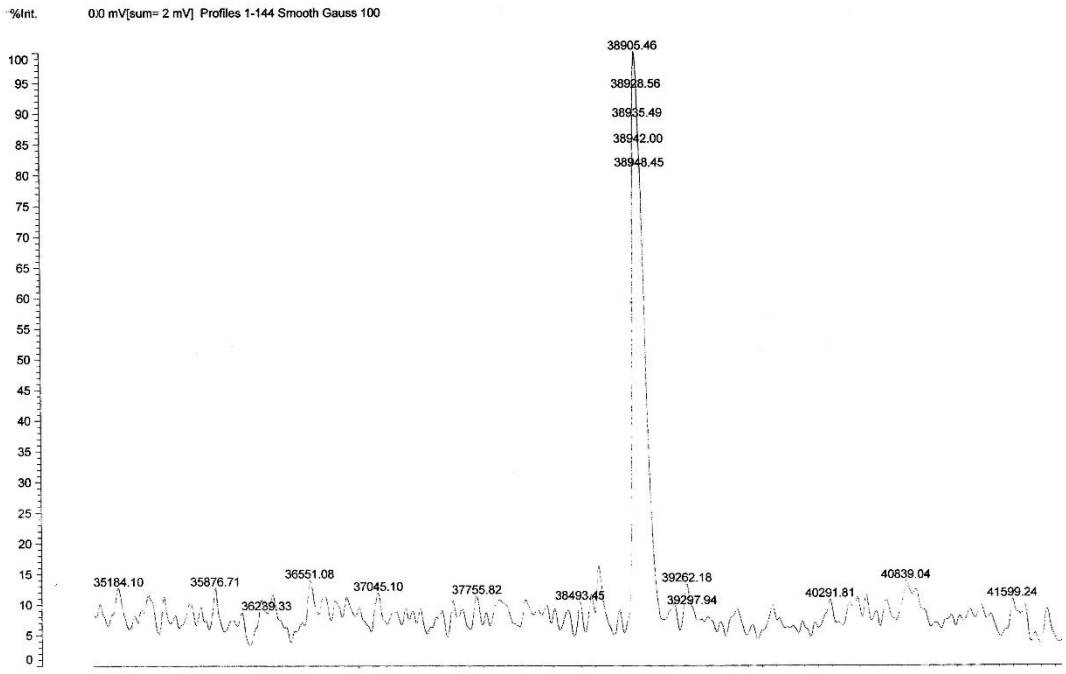


Şekil 4.23 İyon değişim kromatografilerinden sonra elde edilen fraksiyonun Western blot analizi görüntüsü

İyon değişim kromatografisi uygulamalarından sonra elde edilen saf fraksiyonlara, rHolin proteinin varlığını doğrulamak için iBind™ cihazı yardımıyla Western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntü Şekil 4.23’te gösterilmiştir. Western blot analizi gerçekleştirilen saf bir fraksiyon için 39 kDa’da saflaştırılmış

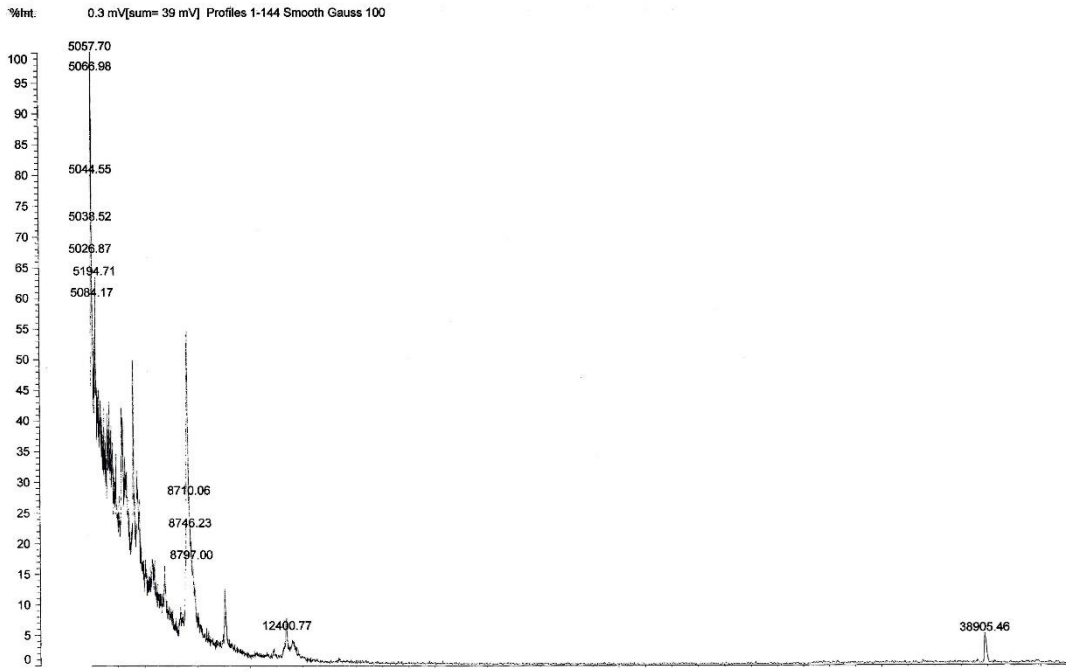
rHolin proteinin bandı görülmüştür. Birincil ve ikincil antikorların hedef rekombinant proteine bağlanması rHolin proteinin varlığını göstererek 39 kDa'da görülen proteinin hedef protein olduğunu göstermektedir. Negatif kontol bloğunda herhangi bir bant gözlemlenmemesi, analizde kullanılan antikorların başka bir proteine bağlanmadığını göstermektedir.

Beş farklı iyon değişim kromatografisinden sonra 1. ve 5. denemeler uygulanabilir ve verimli kromatografi yöntemi olarak değerlendirilmiştir. 5. denemede elde edilen "elüsyon 8" fraksiyonu, kütlesinin tam olarak saptanabilmesi adına AXIMA Performance MALDI TOF/TOF kütle spektroskopisi cihazıyla analiz edilmiştir. Geniş bir spektrumda elde edilen MALDI sonuçları Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'te verilmiştir.



Şekil 4.24 İyon değişim kromatografisinde elde edilen saf fraksiyonun MALDI TOF kütle spekstroskopisi 35-42 kDa taraması

35-42 kDa arası yapılan taramada 38,905-38,948 kDa arasında görülen protein rHolin proteinine aittir. Ancak dar bir spektrumda proteinin kütlesini değerlendirmek doğru olmadığı için 5-40 kDa arası kütleler de incelenmelidir. 5-40 kDa spektrumunda; kütle olarak 30-40 kDa arasında başka bir proteine rastlanılmaması teorik olarak hesaplanan kütle ile analiz edilen gerçek kütlenin birbirine çok yakın olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.25 İyon değişim kromatografisinde elde edilen saf fraksiyonun MALDI TOF kütle spekstroskopisi 5-40 kDa taraması

38,905 kDa'da görülen pik yüksekliğinin küçük olması hedef proteinin konsantrasyonunun bir göstergesidir. Eğer daha konsantre olarak analiz edilirse daha yüksek bir pik elde etmek mümkün olacaktır. Fakat saf fraksiyonun hacminin az olması ve yüksek miktarda protein elde edilememiş olmasından dolayı ultrafiltrasyon işlemi uygulanmamıştır. 8,710 kDa ve 12,400 kDa'da görülen pikler analiz edilen fraksiyonun içinde bulunan ve safsızlık olarak değerlendirilen proteinlerdir. Bu proteinlerin varlığı, saflaştırılan rHolin proteininin saflık yüzdesini etkilemektedir.

5
SONUÇ

S. aureus, küresel olarak yaşanan çoğu enfeksiyon kaynaklı hastalıkların sorumlusu olan bir bakteri türüdür [137]. Kan dolaşımında bulunması ya da dokulara ulaşması halinde ciddi enfeksiyonlara sebep olabilen bu bakteri, ancak bir antibiyotik kullanımı ile tedavi edilebilmektedir [71][139]. Her ne kadar farklı kuşak antibiyotikler geliştirilerek patojenler üzerinde etki gösterse de yıllar içinde bakteriler bu antibiyotiklere karşı direnç kazanmayı başarmıştır [138]. Bu durum bilim insanlarını alternatif yöntemlerin geliştirilmesine yöneltmiş ve bakteriyofaj türevli antimikrobiyallerin, dirençli bakterilere karşı etkili olduğunun görülmesi umut verici olarak değerlendirilmiştir.

Bu kapsamda bakteriyofaj kaynaklı bir transmembran proteini olan Holinler, *S. aureus* patojenini enfekte edebilmesindeki üstün yeteneği sayesinde antimikrobiyal etki gösteren ilaç olmaya adaydır [72]. Holinler, bakteri hücresinin önce iç membranına sonra sitoplazmik membranına yerleşen ve sitozolde birikerek hücre duvarının yıkımına neden olan hidrofobik transmembran proteinlerdir [71]. Holinlerin bu etkisi, rekombinant olarak elde edilen ve saflaştırılabilen rHolin proteininin antimikrobiyal ürün olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymuştur.

Sunulan bu tez çalışmasında *E. coli* C43(DE3) hücre hattında rekombinant olarak üretilen Holin proteininin hem kromatografi hem de kromatografi öncesi saflaştırma süreçlerine odaklanıldı. Doğal haliyle rHolin proteini 167 amino asite, 18,127 kDa molekül ağırlığına ve 4,09 izoelektrik nokta değerine sahip bir proteinken, rHolin proteini TMD bölgesi 89 amino asite, 9,364 kDa molekül ağırlığına ve 7,80 izoelektrik nokta değerine sahiptir. Fakat bu çalışmada rHolin proteininin TMD bölgesinin N- terminaline bağlı GST etiketi ve C- terminaline bağlı histidin füzyon etiketleri ile birlikte üretilmesi nedeniyle elde edilen protein; 347 amino asite, 39,204 kDa büyüklüğe ve 6,60 izoelektrik nokta değerine sahiptir. Amino asit zinciri üzerinde iki farklı etiketin bulunması başta protein büyüklüğü olmak üzere birçok değeri değiştirmiş ve bu değişiklikler saflaştırma prosesi oluşturulurken göz önünde bulundurulmuştur. rHolin proteininin iki adet TMD bölgesine sahip olması ve lipit çift tabakayı iki kez katetmesi, onu çok geçişli bir

transmembran proteini olarak tanımlar. Çok geçişli transmembran proteinlerin lipit çift tabakadan ayrılarak serbest bırakılması tek geçişli proteinlere göre nispeten daha zor olduğundan liziz yönteminin iyi bir şekilde tasarlanması gerekir.

Hücre lizizi aşaması için; hücre zarını yıkıma uğratıcı kimyasal deterjanlar, sonikasyon ile birlikte kullanıldı. Deterjanlara ek olarak lizozim enzimi kullanılarak lipit çift tabakanın tamamen parçalanması ve hedef proteinin serbest bırakılması sağlandı. Sonikasyon süreci sonrasında gerçekleştirilen santrifüj ile hedef protein, pellet ile birlikte çöktürüldü. Liziz sonrasında pelletler, yüksek molaritede üre içeren tampon ile bazik koşullarda solubilize edildi. Bu basamak, proteinin denatüre hale getirilip kolonda daha kolay tutunmasını sağlamak amacı ile gerçekleştirildi. Yalnızca GST afinite kromatografisinden önce solubilizasyon işlemi, ürenin kolon resinini deformasyona uğratması nedeniyle gerçekleştirilmedi.

Kromatografik yöntem tasarımı, hedef rekombinant proteinin yapısı göz önüne alınarak yapıldı. Proteinin boyutu, hidrofobikliği, izoelektrik noktası ve füzyon etiketlerinin varlığı incelendi. rHolin proteini TMD bölgesinin molekül ağırlığı 9,364 kDa olmasına rağmen protein zincirinin her iki ucunda füzyon etiketlerinin varlığı hedef proteinin molekül ağırlığının 39,204 kDa olmasına neden olmaktadır. Fakat hem protein boyutunun küçük olması hem de protein harici safsızlık boyutlarının küçük olmasından dolayı boyut dışlama kromatografisi (SEC) bu proteinin saflaştırılma yöntemleri arasında yer almadı. Ters faz kromatografisi (RPC), performansı ve ayrım gücü yüksek bir metot olmasına rağmen kolonlarının maliyeti ve kullanılacak cihazların yüksek basınç gerektirmesi nedeniyle bu proteinin saflaştırma yöntemlerinde tercih edilmedi. Hedef proteinin zinciri üzerinde histidin etiketinin varlığından dolayı hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC) değerlendirmeye alındı. Yine aynı şekilde protein zincirinin diğer ucundaki GST etiketinin varlığı, GST etiketli afinite kromatografisini de değerlendirmeye alınması gereken bir diğer yöntem olarak karşımıza çıkarmıştır. rHolin proteininin iki adet TMD bölgesine sahip olması yapıya hidrofobik bir özellik kazandırdığı için hidrofobik etkileşim kromatografisi de uygulanan bir diğer kromatografi yöntemidir. İyon değişim kromatografisi (IEX) türleri olan anyon değişim (AEX) ve katyon değişim kromatografileri (CEX) proteinin izoelektrik noktasına (pI) göre değerlendirilmesi gereken bir yöntem olarak ele alındı. rHolin TMD proteininin doğal pI değeri 7,80'dir ancak füzyon

etiketleri ile birlikte bu pI değeri yeniden hesaplandığında 6,60 olarak bulunmaktadır. İyon değişim kromatografisi için yapılacak olan kromatografik tasarımda bu fark göz ardı edilmemelidir. Rekombinant protein çözeltisi, pI değeri 6,60'ın daha üzerinde bir pH değerinde eksi yüke sahip olurken pI değerinin daha altında bir pH değerinde artı yüke sahip olacaktır. Bu durumda protein pH değerinin 7,00-9,00 olduğu bir aralıkta rHolin TMD'nin eksi yüke sahip olmasından dolayı anyon değişim kromatografisi uygulanabilir. Diğer taraftan 5,00-6,00 aralığındaki bir pH değerinde artı yük ile yükleneceğinden ve katyon değişim etkisi göstereceğinden katyon değişim kromatografisi tercih edilebilir. IEX basamağından bir önceki basamağın solubilizasyon olması ve solubilizasyonun 10,30-11,30 aralığındaki bir pH değerinde gerçekleştiriliyor olmasından dolayı kromatografi metodunun AEX olması daha uygun bir hale gelmiştir. Çünkü pH'ın 11,00'dan 8,00'a düşürülmesi hem daha az kimyasal sarfiyatına neden olur hem de izoelektrik noktasındaki pH değerine gelindiğinde proteinin agrege olması önlenmiş olur. Sonuç olarak yapılan bu çalışmalarda iyon değişim kromatografisi olarak yalnızca AEX metodu uygulanmıştır.

Çalışma sonuçlarının daha kolay kıyaslanabilmesi için kromatografi süreçleri boyunca yalnızca ÄKTA™ Avant 25 preparatif kromatografi cihazı kullanıldı. Histidin etiketli afinite kromatografisi denemeleri için; HisTrap™ FF kolonu Ni^{2+} iyonları varlığında kullanıldı. GST etiketli afinite kromatografisi kapsamında ise; GSTrap™ HP ve GSTrap™ FF kolonları tercih edildi. Hidrofobik etkileşim kromatografisi denemeleri için; HiTrap™ Butyl HP kolonu tercih edilirken, anyon değişim kromatografisi için; HiTrap™ Capto DEAE ve HiScreen™ Capto DEAE kolonları denendi. Histidin etiketli afinite kromatografisi denemelerinde anlamlı sonuçlar elde edilemedi. rHolin proteininin bu yöntemle saflaştırılamaması, histidin etiketinin çok küçük yapıda olması nedeniyle GST etiketi tarafından maskelenerek histidinin kolonda sabit faz olarak bulunan nikel iyonlarına bağlanmasının engellemiş olması teorisiyle açıklanabilir.

GST etiketli afinite kromatografisinde de anlamlı saf fraksiyonlar elde edilememiş ve bu saflaştırma prosesinin elüsyon kısmında bir pike rastlanılmamıştır. GST etiketli afinite kromatografisinde elde edilen SDS-PAGE görüntülerinde kromatografi öncesi alınan numunenin yoğun bir biçimde hedef proteini içermediği görülmektedir. Bunun en muhtemel nedeni, hücre lizizi sonrasında solubilizasyon

yapılmadan direkt kromatografi için kullanılması olabilir. Liziz sonrası şartlama tamponu ile seyreltilen pelletler bir süre karıştırıldıktan sonra santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı kolondan geçirilmiştir. Bu durumda hedef protein ve birçok safsızlığı oluşturan proteinler santrifüj esnasında çökerek pellet kısmında yer almış olması kuvvetle muhtemeldir. Özet olarak, GST etiketli afinite kromatografisinde kromatografi metotları yerine daha önceki saflaştırma metotlarında revizyona gidilerek rHolin proteinin daha çözünür bir hale getirilerek süpernatant kısmına geçmesi sağlanmalıdır.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde ise SDS-PAGE görsellerine bakıldığında anlamsız sonuçlar elde edilmiştir. Şartlama ve elüsyon tamponlarının içeriği ile kullanılan tuz, yeniden değerlendirilmeli ve en uygun tampon ve tuzların seçilmesi gerektiği düşünülmüştür. Elüsyon tamponu için tuzsuz bir tampon oluşturulması için fazla bir alternatif olmamakla beraber bir alkol fazı hazırlanması önerilebilir. Bazı proteinlerin alkol ile elüsyonu gerçekleştirildiğinde daha etkili olarak kolondan ayrıldığı bilinmektedir. Bunun için de alkol seçimi iyi yapılmalıdır. Etanolden hariç bütanol ve isopropil alkol sık tercih edilen alkoller arasında yer almaktadır. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde hiçbir değişiklik yapılmasa bile iyon değişim kromatografisinden sonra ikinci bir kromatografi yöntemi olarak uygulamak daha doğru bir seçim olabilir. Ancak bu tez kapsamında ikinci bir saflaştırma yöntemine odaklanılmamıştır.

İyon değişim kromatografisi denemelerinde ise gerçekleştirilen beş farklı denemeden 1. 3. ve 5. yöntemin, rHolin proteininin saflaştırılmasında oldukça etkili olduğu SDS-PAGE, Western blot ve MALDI TOF kütle spektroskopisi analiz sonuçlarına dayanarak görülmüştür. Farklı gradientler, farklı tampon içerikleri ve farklı pH koşullarına rağmen rHolin proteini önemli ölçüde saf olarak elde edilebilmiştir. Bu durum, oluşturulan saflaştırma metotlarının geniş bir yelpazede uygulanabilmesine olanak tanımaktadır. Mobil fazların hazırlanmasında kullanılan kimyasalların ve kullanılan kolonun nispeten uygun fiyatlı olmasından dolayı, bu protein için hem ölçek büyütme hemde ticari ölçeğe geçiş süreçlerinin daha kolay uygulanabileceği ön görülmektedir. rHolin proteininin yüzdesel olarak saflığının değerlendirilmesi ve ikinci bir kromatografi uygulanıp uygulanmayacağı bu sonuçlara göre değerlendirilmelidir. Bir öneri olarak; hidrofobik etkileşim kromatografi yerine kısmen benzer bir prensibe dayalı ters faz kromatografisinin

iyon değişim kromatografisinden sonra uygulandığında rHolin proteininin daha yüksek bir saflıkla elde edilebileceği düşünülmektedir. Laboratuvar ölçeği biraz daha büyütülürse kromatografiden bağımsız olarak teğetsel akış filtrasyon sistemlerinin de bu saflaştırma yöntemlerine ilave olarak uygulanması, özellikle küçük boyutlu safsızlıkların uzaklaştırılmasında etkili olacağından daha yüksek saflıkla hedef proteine ulaşılacağı düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçlar ışığında, rHolin proteininin yüksek oranda saflık ile elde edilebilmiş olması, *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonların tedavisine yönelik yapılan çalışmaları hızlandırarak rekombinant Holin proteininin etki mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını kolaylaştıracağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

[1] S. Khan *et al.*, "Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life," *Int J Genomics*, vol. 2016, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1155/2016/2405954.

[2] R. V. Abinaya, P. Viswanathan, "in Translational Biotechnology," *A Journey from Laboratory to Clinics* (Elsevier, 2021), pp. 27–52.

[3] U. Nagaich, "Recombinant DNA technology," *A revolutionizing outlook. J Adv Pharm Technol Res.* 2015 Oct-Dec;6(4):147. doi: 10.4103/2231-4040.166456. PMID: 26605153; PMCID: PMC4630719.

[4] L. Pray, "Recombinant DNA Technology and Transgenic Animals," *Nature Education*, vol. 1, no. 1. 2008.

[5] V. M. Cardoso *et al.*, "Cost analysis based on bioreactor cultivation conditions: Production of a soluble recombinant protein using Escherichia coli BL21(DE3)," *Biotechnology Reports*, vol. 26, 2020, doi: 10.1016/j.btre.2020.e00441.

[6] I. Merfort, S. Pelzer, D. Hoffmeister, and A. Bechthold, "Prokaryotic and Eukaryotic Cells in Biotech Production," in *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, 2006. doi: 10.1002/3527600906.mcb.200400118.

[7] Y. Y. Ho, H. K. Lu, Z. F. S. Lim, H. W. Lim, Y. S. Ho, and S. K. Ng, "Applications and analysis of hydrolysates in animal cell culture," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 8, no. 1. 2021. doi: 10.1186/s40643-021-00443-w.

[8] C. C. L. Quianzon and I. E. Cheikh, "History of current non-insulin medications for diabetes mellitus," *J Community Hosp Intern Med Perspect*, vol. 2, no. 3, p. 19081, Jan. 2012, doi: 10.3402/jchimp.v2i3.19081.

[9] H. Ryu *et al.*, "Biomimetic membranes with transmembrane proteins: State-of-the-art in transmembrane protein applications," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 6. 2019. doi: 10.3390/ijms20061437.

[10] M. Punta, E. Kloppmann, "Membrane Protein Structure," *In: Roberts, G.C.K. (eds) Encyclopedia of Biophysics. Springer, Berlin, Heidelberg*. (2013) https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_422

[11] E. Nakayama *et al.*, "Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of filovirus species-specific antibodies," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 17, no. 11, 2010, doi: 10.1128/CVI.00170-10.

[12] J. Isanga *et al.*, "Development of a monoclonal antibody assay and a lateral flow strip test for the detection of paromomycin residues in food matrices," *Food Agric Immunol*, vol. 28, no. 3, 2017, doi: 10.1080/09540105.2016.1272551.

[13] J. C. Rohloff *et al.*, "Nucleic acid ligands with protein-like side chains: Modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents," *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, vol. 3. 2014. doi: 10.1038/mtna.2014.49.

[14] G. Fricker *et al.*, “Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery,” *Pharmaceutical Research*, vol. 27, no. 8. 2010. doi: 10.1007/s11095-010-0130-x.

[15] H. Kadokura, F. Katzen, J. Beckwith, “Protein disulfide bond formation in prokaryotes.” *Annual Review of Biochemistry.* 72 (2003), doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161459.

[16] M. N. Mbaye, Q. Hou, S. Basu, F. Teheux, F. Pucci, and M. Rooman, “A comprehensive computational study of amino acid interactions in membrane proteins,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-48541-2.

[17] I. Moraes, G. Evans, J. Sanchez-Weatherby, S. Newstead, and P. D. S. Stewart, “Membrane protein structure determination - The next generation,” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1838, no. 1 PARTA. 2014. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.07.010.

[18] A. Doerr, “Membrane protein structures,” *Nat Methods*, vol. 6, no. 1, 2009, doi: 10.1038/nmeth.f.240.

[19] S. H. Lin and G. Guidotti, “Chapter 35 Purification of Membrane Proteins,” in *Methods in Enzymology*, 2009. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63035-4.

[20] M. Michalik, M. Orwick-Rydmark, M. Habeck, V. Alva, T. Arnold, and D. Linke, “An evolutionarily conserved glycine-tyrosine motif forms a folding core in outer membrane proteins,” *PLoS One*, vol. 12, no. 8, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0182016.

[21] H. Gratkowski, J. D. Lear, and W. F. DeGrado, “Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 3, 2001, doi: 10.1073/pnas.98.3.880.

[22] J. Schindler, S. Jung, G. Niedner-Schatteburg, E. Friauf, and H. G. Nothwang, “Enrichment of integral membrane proteins from small amounts of brain tissue,” *J Neural Transm*, vol. 113, no. 8, 2006, doi: 10.1007/s00702-006-0508-4.

[23] J. Barroca-Ferreira, A. M. Gonçalves, M. F. A. Santos, T. Santos-Silva, C. J. Maia, and L. A. Passarinha, “A chromatographic network for the purification of detergent-solubilized six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 from Komagataella pastoris mini-bioreactor lysates,” *J Chromatogr A*, vol. 1685, 2022, doi: 10.1016/j.chroma.2022.463576.

[24] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, and E. Grell, “High-performance liquid chromatographic purification of extremely hydrophobic peptides: transmembrane segments,” *J Chromatogr A*, vol. 711, no. 1, 1995, doi: 10.1016/0021-9673(95)00056-S.

[25] D. C. Andersen and L. Krummen, “Recombinant protein expression for therapeutic applications,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, no. 2. 2002. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00300-2.

[26] J. Skolnick, M. Gao, H. Zhou, “How special is the biochemical function of native proteins?,”(2016), , doi:10.12688/f1000research.7374.1.

[27] D. M. Francis, R. Page, “Strategies to optimize protein expression in E. coli,” *Current Protocols in Protein Science* (2010), , doi:10.1002/0471140864.ps0524s61.

[28] H. P. Sørensen and K. K. Mortensen, “Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli,” *J Biotechnol*, vol. 115, no. 2, 2005, doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.

[29] S. K. Gupta and P. Shukla, “Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications,” *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 36, no. 6. 2016. doi: 10.3109/07388551.2015.1084264.

[30] G. J. Gopal and A. Kumar, “Strategies for the production of recombinant protein in escherichia coli,” *Protein Journal*, vol. 32, no. 6, 2013, doi: 10.1007/s10930-013-9502-5.

[31] A. J. F. Griffiths, “recombinant DNA.” *Encyclopedia Britannica*. (2022, October 26). https://www.britannica.com/science/recombinant-DNA-technology.

[32] R. Assenberg, P. T. Wan, S. Geisse, and L. M. Mayr, “Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research,” *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 23, no. 3. 2013. doi: 10.1016/j.sbi.2013.03.008.

[33] B. Tihanyi and L. Nyitray, “Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production,” *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 38. 2020. doi: 10.1016/j.ddtec.2021.02.003.

[34] G. L. Rosano and E. A. Ceccarelli, “Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, no. APR. 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.

[35] R. Dana, “Advances and innovations in recombinant protein expression technology,” *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*, vol. 8, 2018.

[36] B. Jia and C. O. Jeon, “High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: Current status and future perspectives,” *Open Biology*, vol. 6, no. 8. 2016. doi: 10.1098/rsob.160196.

[37] N. J. Shah, “A revolutionizing outlook,” in *Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology: Volume 1: General and Molecular Pharmacology: Principles of Drug Action*, Springer Singapore, 2019, pp. 413–417. doi: 10.1007/978-981-32-9779-1_34.

[38] C. O’Connor, “Isolating Hereditary Material: Frederick Griffith, Oswald Avery, Alfred Hershey, and Martha Chase,” *Nature Education*, vol. 1, no. 1, 2008.

[39] H. P. Sørensen and K. K. Mortensen, “Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli,” *Microbial Cell Factories*, vol. 4. 2005. doi: 10.1186/1475-2859-4-1.

[40] Y. Cao, J. Sun, J. Zhu, L. Li, and G. Liu, “PrimerCE: Designing primers for cloning and gene expression,” *Mol Biotechnol*, vol. 46, no. 2, 2010, doi: 10.1007/s12033-010-9276-3.

[41] G. Lu, M. Hallett, S. Pollock, and D. Thomas, “DePIE: Designing primers for protein interaction experiments,” *Nucleic Acids Res*, vol. 31, no. 13, 2003, doi: 10.1093/nar/gkg577.

[42] C. Elena, P. Ravasi, M. E. Castelli, S. Peirú, and H. G. Menzella, "Expression of codon optimized genes in microbial systems: Current industrial applications and perspectives," *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, no. FEB. 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00021.

[43] M. Welch *et al.*, "Design parameters to control synthetic gene expression in Eschorichia coli," *PLoS One*, vol. 4, no. 9, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0007002.

[44] K. RAMADAN, "De Novo DNA Synthesis by Human DNA Polymerase $lambda;, DNA Polymerase $mu; and Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase," *J Mol Biol*, vol. 339, no. 2, 2004, doi: 10.1016/s0022-2836(04)00370-5.

[45] A. S. Xiong *et al.*, "PCR-based accurate synthesis of long DNA sequences," *Nat Protoc*, vol. 1, no. 2, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.103.

[46] W. Stillwell and W. Stillwell, "Chapter 6 – Membrane Proteins," *An Introduction to Biological Membranes*, 2013.

[47] N. Dan and S. A. Safran, "Effect of lipid characteristics on the structure of transmembrane proteins," *Biophys J*, vol. 75, no. 3, 1998, doi: 10.1016/S0006-3495(98)74059-7.

[48] A. S. Fanning, L. L. Mitic, and J. M. Anderson, "Transmembrane proteins in the tight junction barrier," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 10, no. 6. 1999. doi: 10.1681/asn.v1061337.

[49] D. T. Jones, "Do transmembrane protein superfolds exist? [In Process Citation]," *FEBS Lett*, vol. 423, no. 3, 1998.

[50] A. Rath and C. M. Deber, "Protein structure in membrane domains," *Annual Review of Biophysics*, vol. 41, no. 1. 2012. doi: 10.1146/annurev-biophys-050511-102310.

[51] T. A. Hopf, L. J. Colwell, R. Sheridan, B. Rost, C. Sander, and D. S. Marks, "Three-dimensional structures of membrane proteins from genomic sequencing," *Cell*, vol. 149, no. 7, 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.012.

[52] V. D. T. Tran, P. Chassignet, S. Sheikh, and J. M. Steyaert, "A graph-theoretic approach for classification and structure prediction of transmembrane β-barrel proteins," *BMC Genomics*, vol. 13, 2012, doi: 10.1186/1471-2164-13-S2-S5.

[53] S. A. Houck and D. M. Cyr, "Mechanisms for quality control of misfolded transmembrane proteins," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1818, no. 4. 2012. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.11.007.

[54] H. Chiba, M. Osanai, M. Murata, T. Kojima, and N. Sawada, "Transmembrane proteins of tight junctions," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1778, no. 3. 2008. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.08.017.

[55] B. Alberts, J. A, and Lewis J, "Analyzing Protein Structure and Function," *Mol Biol Cell*, 2002.

[56] K. Xie and R. E. Dalbey, “Inserting proteins into the bacterial cytoplasmic membrane using the Sec and YidC translocases,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, no. 3. 2008. doi: 10.1038/nrmicro3595.

[57] D. Raafat, M. Otto, K. Reppschläger, J. Iqbal, and S. Holtfreter, “Fighting Staphylococcus aureus Biofilms with Monoclonal Antibodies,” *Trends in Microbiology*, vol. 27, no. 4. 2019. doi: 10.1016/j.tim.2018.12.009.

[58] J. F. Nagle and S. Tristram-Nagle, “Structure of lipid bilayers,” *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, vol. 1469, no. 3. 2000. doi: 10.1016/S0304-4157(00)00016-2.

[59] K. C. Chou and D. W. Elrod, “Prediction of membrane protein types and subcellular locations,” *Proteins: Structure, Function and Genetics*, vol. 34, no. 1, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(19990101)34:1<137::AID-PROT11>3.0.CO;2-O.

[60] A. Guna and R. S. Hegde, “Transmembrane Domain Recognition during Membrane Protein Biogenesis and Quality Control,” *Current Biology*, vol. 28, no. 8. 2018. doi: 10.1016/j.cub.2018.02.004.

[61] M. Spiess, T. Junne, and M. Janoschke, “Membrane Protein Integration and Topogenesis at the ER,” *Protein Journal*. 2019. doi: 10.1007/s10930-019-09827-6.

[62] V. Goder and M. Spiess, “Topogenesis of membrane proteins: Determinants and dynamics,” in *FEBS Letters*, 2001. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02712-0.

[63] B. A. Macher and T. Y. Yen, “Proteins at membrane surfaces - A review of approaches,” *Mol Biosyst*, vol. 3, no. 10, 2007, doi: 10.1039/b708581h.

[64] A. Fuchs and D. Frishman, “Structural comparison and classification of alpha-helical transmembrane domains based on helix interaction patterns,” *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, vol. 78, no. 12, 2010, doi: 10.1002/prot.22768.

[65] D. Dou, D. V. Da Silva, J. Nordholm, H. Wang, and R. Daniels, “Type II transmembrane domain hydrophobicity dictates the cotranslational dependence for inversion,” *Mol Biol Cell*, vol. 25, no. 21, 2014, doi: 10.1091/mbc.E14-04-0874.

[66] I. T. Arkin and A. T. Brunger, “Statistical analysis of predicted transmembrane α-helices,” *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1429, no. 1, 1998, doi: 10.1016/S0167-4838(98)00225-8.

[67] K. A. Dill, S. B. Ozkan, M. S. Shell, and T. R. Weikl, “The protein folding problem,” *Annual Review of Biophysics*, vol. 37. 2008. doi: 10.1146/annurev.biophys.37.092707.153558.

[68] A. Buchberger, B. Bukau, and T. Sommer, “Protein Quality Control in the Cytosol and the Endoplasmic Reticulum: Brothers in Arms,” *Molecular Cell*, vol. 40, no. 2. 2010. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.001.

[69] Y. Shi *et al.*, “Characterization and determination of holin protein of Streptococcus suis bacteriophage SMP in heterologous host,” *Virol J*, vol. 9, 2012, doi: 10.1186/1743-422X-9-70.

[70] N. Lu *et al.*, “Cloning and characterization of endolysin and holin from Streptomyces avermitilis bacteriophage phiSASD1 as potential novel antibiotic candidates,” *Int J Biol Macromol*, vol. 147, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.065.

[71] M. H. Saier and B. L. Reddy, “Holins in bacteria, eukaryotes, and archaea: Multifunctional xenologues with potential biotechnological and biomedical applications,” *Journal of Bacteriology*, vol. 197, no. 1. 2015. doi: 10.1128/JB.02046-14.

[72] J. Song *et al.*, “The Phage Holin HolGH15 Exhibits Potential As an Antibacterial Agent to Control Listeria monocytogenes,” *Foodborne Pathog Dis*, vol. 18, no. 8, 2021, doi: 10.1089/fpd.2020.2833.

[73] J. Song *et al.*, “Identification and characterization of HolGH15: The Holin of Staphylococcus Aureus bacteriophage GH15,” *Journal of General Virology*, vol. 97, no. 5, 2016, doi: 10.1099/jgv.0.000428.

[74] L. Rodríguez-Rubio, D. Gutiérrez, D. M. Donovan, B. Martínez, A. Rodríguez, and P. García, “Phage lytic proteins: Biotechnological applications beyond clinical antimicrobials,” *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 36, no. 3. 2016. doi: 10.3109/07388551.2014.993587.

[75] S. Fernandes and C. São-José, “More than a hole: the holin lethal function may be required to fully sensitize bacteria to the lytic action of canonical endolysins,” *Mol Microbiol*, vol. 102, no. 1, 2016, doi: 10.1111/mmi.13448.

[76] F. L. Gordillo Altamirano and J. J. Barr, “Phage therapy in the postantibiotic era,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 32, no. 2. 2019. doi: 10.1128/CMR.00066-18.

[77] H. Ling, X. Lou, Q. Luo, Z. He, M. Sun, and J. Sun, “Recent advances in bacteriophage-based therapeutics: Insight into the post-antibiotic era,” *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 12, no. 12. 2022. doi: 10.1016/j.apsb.2022.05.007.

[78] C. São-José, “Engineering of phage-derived lytic enzymes: Improving their potential as antimicrobials,” *Antibiotics*, vol. 7, no. 2. 2018. doi: 10.3390/antibiotics7020029.

[79] G. S. Abeysekera, M. J. Love, S. H. Manners, C. Billington, and R. C. J. Dobson, “Bacteriophage-encoded lethal membrane disruptors: Advances in understanding and potential applications,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 13. 2022. doi: 10.3389/fmicb.2022.1044143.

[80] Ł. Grabowski *et al.*, “Bacteriophage-encoded enzymes destroying bacterial cell membranes and walls, and their potential use as antimicrobial agents,” *Microbiological Research*, vol. 248. 2021. doi: 10.1016/j.micres.2021.126746.

[81] B. Owczarek, A. Gerszberg, and K. Hnatuszko-Konka, “A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals,” *BioMed Research International*, vol. 2019. 2019. doi: 10.1155/2019/4216060.

[82] R. K. Scopes, “Strategies for Protein Purification,” *Curr Protoc Protein Sci*, vol. 00, no. 1, 1995, doi: 10.1002/0471140864.ps0102s00.

[83] B. K. Nfor *et al.*, "Design strategies for integrated protein purification processes: Challenges, progress and outlook," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 83, no. 2. 2008. doi: 10.1002/jctb.1815.

[84] P. T. Wingfield, "Overview of the purification of recombinant proteins," *Curr Protoc Protein Sci*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1002/0471140864.ps0601s80.

[85] W. Guo, X. Zhu, J. Cai, L. Huang, P. Cen, and Z. Xu, "Refolding and two-step purification by hydrophobic interaction chromatography of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from Escherichia coli," *Process Biochemistry*, vol. 47, no. 6, 2012, doi: 10.1016/j.procbio.2012.03.003.

[86] J. Barroca-Ferreira, A. M. Gonçalves, M. F. A. Santos, T. Santos-Silva, C. J. Maia, and L. A. Passarinha, "A chromatographic network for the purification of detergent-solubilized six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 from Komagataella pastoris mini-bioreactor lysates," *J Chromatogr A*, vol. 1685, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.chroma.2022.463576.

[87] C. Hollander, S. C. Walrond, C. Connelly, L. Megson, E. Bove, and T. McDonagh, "A custom ÄKTA avant configuration enabling automated parallel protein purification over a range of process scales," *Protein Expr Purif*, vol. 182, 2021, doi: 10.1016/j.pep.2021.105842.

[88] D. M. V. Camper and R. E. Viola, "Fully automated protein purification," *Anal Biochem*, vol. 393, no. 2, 2009, doi: 10.1016/j.ab.2009.07.009.

[89] L. M. Houdebine, "Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals," *Rev Sci Tech*, vol. 37, no. 1, 2018, doi: 10.20506/rst.37.1.2746.

[90] D. Petrides, D. Carmichael, C. Siletti, and A. Koulouris, "Biopharmaceutical process optimization with simulation and scheduling tools," *Bioengineering*, vol. 1, no. 4, 2014, doi: 10.3390/bioengineering1040154.

[91] R. B. Brown and J. Audet, "Current techniques for single-cell lysis," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 5, no. SUPPL.2. 2008. doi: 10.1098/rsif.2008.0009.focus.

[92] M. Ward, J. Wu, and J.-F. Chiu, "Ultrasound-induced cell lysis and sonoporation enhanced by contrast agents," *J Acoust Soc Am*, vol. 105, no. 5, 1999, doi: 10.1121/1.426908.

[93] M. S. Islam, A. Aryasomayajula, and P. R. Selvaganapathy, "A review on macroscale and microscale cell lysis methods," *Micromachines*, vol. 8, no. 3. 2017. doi: 10.3390/mi8030083.

[94] J. A. Asenjo and B. A. Andrews, "Enzymatic cell lysis for product release.," *Bioprocess technology*, vol. 9. 1990. doi: 10.1201/9781003066392-8.

[95] C. Robert Matthews, "The mechanism of protein folding," *Curr Opin Struct Biol*, vol. 1, no. 1, 1991, doi: 10.1016/0959-440X(91)90007-G.

[96] A. Blanco and G. Blanco, *Medical Biochemistry*. 2017. doi: 10.1038/199943a0.

[97] R. Sabate, N. S. De Groot, and S. Ventura, “Protein folding and aggregation in bacteria,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 67, no. 16. 2010. doi: 10.1007/s00018-010-0344-4.

[98] H. Lilie, E. Schwarz, and R. Rudolph, “Advances in refolding of proteins produced in E. coli,” *Curr Opin Biotechnol*, vol. 9, no. 5, 1998, doi: 10.1016/S0958-1669(98)80035-9.

[99] N. V. Bhagavan and C. E. Ha, *Essentials of Medical Biochemistry*. 2011. doi: 10.1016/C2009-0-00064-6.

[100] D. Atta, A. E. Mahmoud, and A. Fakhry, “Protein structure from the essential amino acids to the 3D structure,” *Biointerface Research in Applied Chemistry*, vol. 9, no. 1. 2019. doi: 10.33263/BRIAC91.817824.

[101] K. Fujita, R. Nakano, R. Nakaba, N. Nakamura, and H. Ohno, “Hydrated ionic liquids enable both solubilisation and refolding of aggregated concanavalin A,” *Chemical Communications*, vol. 55, no. 25, 2019, doi: 10.1039/c8cc10102g.

[102] F. Baneyx and M. Mujacic, “Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli,” *Nature Biotechnology*, vol. 22, no. 11. 2004. doi: 10.1038/nbt1029.

[103] N. A. Patil, J. Tailhades, R. A. Hughes, F. Separovic, J. D. Wade, and M. A. Hossain, “Cellular disulfide bond formation in bioactive peptides and proteins,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 1. 2015. doi: 10.3390/ijms16011791.

[104] L. Whitmore and B. A. Wallace, “Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases,” *Biopolymers*, vol. 89, no. 5, 2008, doi: 10.1002/bip.20853.

[105] S. Gnanakaran, H. Nymeyer, J. Portman, K. Y. Sanbonmatsu, and A. E. García, “Peptide folding simulations,” *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 13, no. 2. 2003. doi: 10.1016/S0959-440X(03)00040-X.

[106] M. Kalyanpur, “Downstream processing in the biotechnology industry,” *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, vol. 22, no. 1. 2002. doi: 10.1385/mb:22:1:087.

[107] I. S. Pires and A. F. Palmer, “Selective protein purification via tangential flow filtration – Exploiting protein-protein complexes to enable size-based separations,” *J Memb Sci*, vol. 618, 2021, doi: 10.1016/j.memsci.2020.118712.

[108] C. Christy, G. Adams, R. Kuriyel, G. Bolton, and A. Seilly, “High-performance tangential flow filtration: A highly selective membrane separation process,” *Desalination*, vol. 144, no. 1–3, 2002, doi: 10.1016/S0011-9164(02)00301-6.

[109] Y. Wang, K. Keller, and X. Cheng, “Tangential flow microfiltration for viral separation and concentration,” *Micromachines (Basel)*, vol. 10, no. 5, 2019, doi: 10.3390/mi10050320.

[110] A. Saxena, B. P. Tripathi, M. Kumar, and V. K. Shahi, “Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview,”

Advances in Colloid and Interface Science, vol. 145, no. 1–2. 2009. doi: 10.1016/j.cis.2008.07.004.

[111] A. Lüken, M. Bruckhaus, U. Kosfeld, M. Emondts, and M. Wessling, "Automated tangential-flow diafiltration device," *HardwareX*, vol. 10, 2021, doi: 10.1016/j.ohx.2021.e00200.

[112] R. Van Reis and A. Zydney, "Membrane separations in biotechnology," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, no. 2. 2001. doi: 10.1016/S0958-1669(00)00201-9.

[113] R. Van Reis *et al.*, "High performance tangential flow filtration," *Biotechnol Bioeng*, vol. 56, no. 1, pp. 71–82, Oct. 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19971005)56:1<71::AID-BIT8>3.0.CO;2-S.

[114] A. V. Quirk and J. R. Woodrow, "Tangential flow filtration - A new method for the separation of bacterial enzymes from cell debris," *Biotechnol Lett*, vol. 5, no. 4, 1983, doi: 10.1007/BF00161129.

[115] R. R. Bhave, "Cross-Flow Filtration," in *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook: Principles, Process Design, and Equipment: Third Edition*, 2014. doi: 10.1016/B978-1-4557-2553-3.00009-X.

[116] S. Guo *et al.*, "A scale-down cross-flow filtration technology for biopharmaceuticals and the associated theory," *J Biotechnol*, vol. 221, 2016, doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.01.002.

[117] GE Healthcare, "Cross Flow Filtration Method Handbook," *J Chem Inf Model*, vol. 53, no. 9, 2013.

[118] R. K. Scopes, "Overview Of Protein Purification And Characterization," in *Handbook of Food Analytical Chemistry*, 2005. doi: 10.1002/0471709085.ch6.

[119] K. Rege, M. Pepsin, B. Falcon, L. Steele, and M. Heng, "High-throughput process development for recombinant protein purification," *Biotechnol Bioeng*, vol. 93, no. 4, 2006, doi: 10.1002/bit.20702.

[120] E. Soutschek, B. Höflacher, and M. Motz, "Purification of a recombinantly produced transmembrane protein (gp41) of HIV I," *J Chromatogr A*, vol. 521, no. 2, 1990, doi: 10.1016/0021-9673(90)85051-V.

[121] S. M. Smith, "Strategies for the Purification of Membrane Proteins," in *Methods in Molecular Biology*, 2011. doi: 10.1007/978-1-60761-913-0_29.

[122] P. Cuatrecasas, "Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 245, no. 12, 1970.

[123] O. Coskun, "Separation Tecniques: CHROMATOGRAPHY," *North Clin Istanb*, 2016, doi: 10.14744/nci.2016.32757.

[124] G. R. Ramraje, S. D. Patil, P. H. Patil, and A. R. Pawar, "A brief review on: Separation techniques chromatography," *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 10, no. 4, 2020, doi: 10.5958/2231-5675.2020.00041.1.

[125] GE Healthcare Bio-Sciences AB *et al.*, "Ion Exchange Chromatography Handbooks from GE Healthcare Life Sciences For more information refer

to www.gelifesciences.com/handbooks," *Mol Syst Biol*, vol. 7, no. 539, 2010.

[126] G. Healthcare, "Recombinant Protein Purification Handbook," *Methods*, 2006.

[127] J. C. Janson, *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications: Third Edition*. 2011. doi: 10.1002/9780470939932.

[128] A. Spriestersbach, J. Kubicek, F. Schäfer, H. Block, and B. Maertens, "Purification of His-Tagged Proteins," in *Methods in Enzymology*, 2015. doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.003.

[129] A. Grönberg, "Ion Exchange Chromatography," in *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*, Elsevier, 2018, pp. 379–399. doi: 10.1016/B978-0-08-100623-8.00018-9.

[130] A. Boxi, I. Parikh, R. B S, and S. K S, "Current Trends in Protein Purification : A Review," *Int J Sci Res Sci Technol*, 2020, doi: 10.32628/ijsrst207645.

[131] A. F. Jozala *et al.*, "Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 47. 2016. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.007.

[132] J. A. Queiroz, C. T. Tomaz, and J. M. S. Cabral, "Hydrophobic interaction chromatography of proteins," *J Biotechnol*, vol. 87, no. 2, 2001, doi: 10.1016/S0168-1656(01)00237-1.

[133] S. Fekete, A. Beck, J. Veuthey, and D. Guillarme, "Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 113, 2015.

[134] M. E. Kimple, A. L. Brill, and R. L. Pasker, "Overview of affinity tags for protein purification," *Curr Protoc Protein Sci*, no. SUPPL.73, 2013, doi: 10.1002/0471140864.ps0909s73.

[135] G. E. Healthcare and L. Sciences, "GST Gene Fusion System Handbook," *J. Mol. Biol*, vol. 238, no. 2, 2014.

[136] Brock, "Book Review: Brock Biology of Microorganisms – 14th edition," *Sci. Prog.*, 2016, doi: 10.3184/003685016x14721564318450c.

[137] J. P. Rasigade and F. Vandenesch, "Staphylococcus aureus: A pathogen with still unresolved issues," *Infect. Genet. Evol.*, 2014, doi: 10.1016/j.meegid.2013.08.018.

[138] A. Álvarez, L. Fernández, D. Gutiérrez, B. Iglesias, A. Rodríguez, and P. García, "Methicillin-resistant staphylococcus aureus in hospitals: Latest trends and treatments based on bacteriophages," *J. Clin. Microbiol.*, 2019, doi: 10.1128/JCM.01006-19.

[139] L. Fernández, D. Gutiérrez, P. García, and A. Rodríguez, "The perfect bacteriophage for therapeutic applications—A quick guide," *Antibiotics*, vol. 8, no. 3. 2019, doi: 10.3390/antibiotics8030126.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

[1] L. Tura, H. Hançer, M. Topuzoğulları, T. Özbek, “S. aureus Patojeni Üzerinde Etkili Transmembran Proteinlerin Kromatografik Olarak Saflaştırılması,”*9. Bilim Günleri Kongresi*, İstanbul, 9-11 Mayıs 2023.