



**SENTETİK BİR EKOSİSTEM OLUŞTURARAK ÇOĞUNLUĞU
ALGILAMA MEKANİZMASINA BAĞLI VİOLASEİN ÜRETİMİ**

Ivona POCRNJA

Yüksek Lisans Tezi

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Venhar ÇELİK ÖZGEN

ELAZIĞ-2018

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SENTETİK BİR EKOSİSTEM OLUŞTURARAK ÇOĞUNLUĞU ALGILAMA
MEKANİZMASINA BAĞLI VIOLASEİN ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ivona POCRNJA

(151132109)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 11.10.2018.

Tezin Savunulduğu Tarih: 24.10.2018.

Tez Danışmanı Dr. Öğr. Üyesi Venhar ÇELİK ÖZGEN (F.Ü.)

Diğer Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Aykut TOPDEMİR (F.Ü.)

Dr. Öğr. Üyesi Pınar ERECEVİT (M.Ü.)

ÖNSÖZ

Tez süresi boyunca bilgi ve yardımını esirgemeyen danışmanım Sn. Dr. Öğr. Üyesi Venhar ÇELİK ÖZGEN'e, deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Sentetik Biyoloji ve Metabolik Mühendisliği laboratuvarında çalışan değerli arkadaşlarıma ve hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı canım aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalar FÜBAP M.F.17.07 nolu proje çalışmalarıyla gerçekleştirilmiştir.

Ivona POCRNJA ELAZIĞ-2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	VI
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
TABLolar LİSTESİ	XII
KISALTMALAR	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Sentetik Biyoloji ve Metabolik Mühendisliği	3
2.1.1.Sentetik Biyoloji Nedir?	3
2.1.2. Biyosensörler	4
2.1.4. Sentetik Biyolojide Violasein Pigmenti	5
2.1.5. Metabolik Mühendisliği Nedir?	6
2.1.6. Metabolik Mühendisliğinde Violasein Pigmenti.....	6
2.2. Violasein Pigmenti	7
2.2.1 Chromobacterium violaceum ve Violaseinin Diğer Doğal Üreticileri....	9
2.3. Violasein Biosentezi	10
2.3. Quorum Sensing: Hücreler Arasında İletişim Mekanizması	13
2.3.1. Gram Negatif Bakterilerde Quorum Sensing	14
2.4. Ko-kültür	16
2.4.1. Ko-kültürde Değişkenler	16
2.4.2. Ko-kültür Teknolojileri	17

2.4.3. Ko-kültür Sistem Mühendisliğinin Sentetik Biyolojide Kullanımı.....	18
2.5. Sentetik Ekosistem Oluşturarak Quorum Sensing Mekanizmasına Bağlı Violasein Üretimi.....	20
2.5.1. Sentetik Ekosistemler Üzerinde Benzer Çalışmalar.....	20
2.5.2. Çalışmadaki Ekosistemin Amacı	21
2.5.3. Sistemin Beklenen İşlevi.....	22
2.5.4. Konstitütif Promotorun Kontrolü Altında E. coli'de Vio Operonunun Heterolog Ekspresyonu	23
3. MATERYAL VE METOT.....	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Kullanılan bakteri suşları ve plazmidleri.....	25
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	25
<i>Escherichia coli</i> NEB 10-beta.....	25
<i>Escherichia coli</i> EPI300	25
<pcc-ptrc-rbs3-rnpt1<="" p="" plazmidi=""></pcc-ptrc-rbs3-rnpt1>	26
pCC1BAC-CcdB Plazmidi	26
pCC-Ptrc-RBS3-vioAE Plazmidi.....	27
3.1.2. Besi yerleri	28
LB Broth Besi yeri.....	28
LB Agar Besi yeri.....	28
LB Broth+ Cm25 ve LB Agar+ Cm25	28
SOB Medyum (Hanahan's Broth)	29
SOC Medyum (SOB+ Glukoz)	29
3.1.3. DNA İzolasyon Kitleri	29
QIAGEN DNEasy Kiti.....	29
QIAquick Jelden ve PCR'dan DNA Saflaştırma Kiti	29
QIAprep Spin Miniprep Kit.....	30
3.1.4. PCR Reaksiyonu ve Bileşenleri	30

<i>Nukleaz-free Saf Suyu</i>	31
<i>HF Tamponu</i>	31
<i>dNTPler</i>	31
<i>Primerler</i>	31
<i>Phusion Polimeraz Enzimi</i>	32
3.1.5. Agaroz Jel Elektroforez.....	33
<i>Jel Hazırlama</i>	33
<i>Jel Görüntüleme</i>	33
3.1.6. Gibson Assembly Metodu ve Malzemeleri	33
3.1.7. Transformasyon.....	35
3.2. METOT.....	35
3.2.1. <i>C. violaceum</i> bakterinin büyütülmesi ve genomik DNA izolasyonu... 35	35
3.2.2. pCC1BAC-CcdB Plazmid DNA İzolasyonu.....	37
3.2.3. pCC1BAC-QS-vioAE Plazmid İnşası.....	37
<i>Primerlerin Tasarımı</i>	37
<i>PCR Reaksiyonları ve Şartları</i>	37
3.2.4. Gibson Assembly Reaksiyon Şartları.....	40
3.2.5. Transformasyon Deneyi	41
<i>Elektrokompetent Hücre Hazırlama</i>	41
<i>Elektroporasyon</i>	42
3.2.6. Gönderici Hücrenin Tasarımı.....	42
3.2.7. Ko-kültür Deneyleri	43
<i>Damlatma Deneyi</i>	43
<i>Time-Course Deneyi</i>	43
4. BULGULAR	45
4.1. pCC1BAC-QS-vioAE Plazmid İnşası İçin DNA Fragmentlerin Elde Edilmesi	45
4.1.1. pCC1BAC-Ccdb Plazmitten Backbone Fragmentlerin Elde Edilmesi	45

4.1.2. <i>C. violaceum</i> gDNA 'sından Vio Operonun Elde Edilmesi.....	47
4.1.3. pCC1BAC-QS-vioAE Plazmidin <i>E. coli</i> EPI300 ve 10-beta NEB Suşlarına Aktarılması.....	48
4.1.4. Damlatma Deneyi ve QS Mekanizması	49
<i>Ekimden 36 Saat Sonrası</i>	49
<i>Ekimden 48 Saat Sonrası</i>	49
4.1.5. Time-Course Deneyleri ve Bulguları	50
<i>Bir Gecelik Kültürler ile Başlatılan Deneyler</i>	50
<i>Time-Course Deneyin Optimizasyonu</i>	51
<i>Farklı Suşların Violasein Üretimi Konusunda Karşılaştırılması</i>	52
<i>E.coli EPI300 Suşunda Violasein Üretimi</i>	52
<i>Violasein Pigmentin Özelliklerinin Doğrulanması</i>	54
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	70

ÖZET

Sentetik Bir Ekosistem Oluşturarak Çoğunluğu Algılama Mekanizmasına Bağlı Violasein Üretimi

Violasein doğada bazı Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen mavi-mor renkli doğal bir indol karbazol pigmenttir. Doğal bir mikrobiyal pigment olan violasein çeşitli bakteriler tarafından üretilmektedir ve en iyi bilinen tür *Chromobacterium violaceum*'dur. Violasein ciddi biyolojik aktiviteler göstermesinin yanısıra kozmetik, tıp, gıda ve tekstildeki endüstriyel uygulamalarda artan bir ilgiye sahiptir. Violasein üreten yabani doğal suşların kararsızlığı, pigment üretmeyen varyantlarının spontan oluşumu ve düşük verimliliği dolayısıyla violaseinin kararlı seri üretimi güçtür ve bu problem pigmentin endüstriyel potansiyeline rağmen pratikteki uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Bu çalışmada violaseinin kararlı ve yüksek üretimi için endüstriyel olarak kabul edilebilir bir konak olarak *Escherichia coli*'de violasein biyosentetik yolağının yeniden inşası sağlanmıştır. Çalışmada sentetik biyoloji ve metabolik mühendislik yaklaşımıyla violasein pigmentinin üretileceği sentetik bir ekosistem oluşturarak senkronize populasyon davranışının bir heterolog biyosentetik operonun pigment biyosentez verimi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Sentetik ekosistemin koordineli populasyon davranışını kontrol etmek için violasein biyosentetik yolak, bir bakteriyel haberleşme sistemi olan çoğunluğu algılama mekanizması (Quorum Sensing) ile kontrol edilmiştir. Bunun için çoğunluğu algılama mekanizmasının kontrolü altındaki violasein biyosentetik yolak her biri ayrı hücreye yerleştirilecek şekilde iki modüle ayrılmıştır. Quorum Sensing promotörü (P_{luxI}) tarafından kontrol edilen violasein yolak bir hücreye (alıcı hücre) yerleştirilirken bu mekanizmanın çalışması için gerekli olan difüze edilebilir sinyaller diğer hücreye (gönderici hücre) yerleştirilmiş olan modülden gönderilmiştir. Violasein pigmentinin heterolog üretimi için gerekli sinyal konsantrasyonu gönderici hücrenin konsantrasyonuna bağlı olduğundan alıcı hücredeki violasein biyosentezi gönderici hücrenin konsantrasyonuna bağlı olarak ve populasyon düzeyinde koordineli bir şekilde gerçekleşmiştir. Violasein pigmentinin üretimini sağlayacak bu sentetik ekosistem aynı zamanda ortamdaki sinyal molekülünün konsantrasyonunu belirleyen bir biosensör olarak çalışabilir.

Anahtar kelimeler: Sentetik biyoloji, metabolik mühendisliği, violasein, Quorum Sensing, ekosistem.



SUMMARY

Quorum Sensing Mechanism Dependent Violacein Production By Constructing a Synthetic Ecosystem

Violacein is a natural purple-blue indolocarbazole pigment which is produced in nature by some Gram Negative bacteria. This microbial natural pigment is produced by many different bacterial species, and among them *Chromobacterium violaceum* is so far the most thoroughly studied one. Alongside violacein's important biological activities, there has been increased interest shown for the use of this pigment in various industrial applications, such as cosmetics, medicine, food and textile. However, due to the lack of stability of pigment production, spontaneous biosynthesis in the non-producing strain variants, and overall poor production yields exhibited by natural wild type strain producers, serial production of violacein for industrial applications is difficult and as a result, although this pigment is very versatile, its' practical use is still very limited. In this study, in order to obtain stable and high production yield of violacein, the biosynthetic pathway which is responsible for pigment production was reconstructed in the *Escherichia coli* host cell. The aim of this study was to investigate the effect of synchronous population behavior on pigment biosynthesis efficiency of a heterologous biosynthetic operon by forming a synthetic ecosystem using synthetic biology and metabolic engineering principles, where as a result violacein pigment was produced. To control the coordinated population behavior of the synthetic ecosystem, the violacein biosynthetic pathway was put under the bacterial communication system Quorum Sensing mechanism. For violacein biosynthetic pathway to be controlled by Quorum Sensing mechanism, the synthetic ecosystem was planned to constitute of two separate modules: sender and recipient cell modules. Quorum Sensing gene responsible for the synthesis of the diffusible signal molecules was placed into the "sender" cell, and the genes which are responsible for the violacein production were placed under the Quorum Sensing promotor's (P_{lux}) control into the "recipient" cell. For the heterologous production of violacein, the needed concentration of the signal is dependent on the concentration of the sender cell in the environment and furthermore, the recipient cell's violacein production is based on sender cell concentration, thus ensuring

high production yield and stable production of the pigment. This violacein production-based synthetic ecosystem may help us detect the concentration of the signal molecules that are present in the environment.

Keywords: Synthetic biology, metabolic engineering, violacein, Quorum Sensing, ecosystem.



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Violasein pigmentin moleküler yapısı.....	8
Şekil 2.2. Violasein yolağı [54].	11
Şekil 2.3. Gram negatif bakterilerinin LuxI/R Quorum Sensing Modeli. AHL, kırmızı üçgen olarak gösterilmektedir. IM membran içi, OM membran dışı [83].....	15
Şekil 2.5. Ko-kültür teknolojileri. (a) Mikrofluidik sistemler. (b) Petri kutu sistemi. (c) Sağlam destek sistemi. (d) Biyoreaktor sistemleri. (e) Transwell sistemleri [4].	18
Şekil 2.6. Sentetik predator-prey sistemi [96].	20
Şekil 2.7. Violasein pigmentinin üretimi için oluşturulmuş olan ko-kültür tasarımı.	21
Şekil 2.8. Sistemin beklenen işlevi.	23
Şekil 2.9. Violasein metabolik yolağının metabolik mühendislik yaklaşımıyla <i>E. coli</i> 'de yeniden inşa edilmesi (P_{cons} : Konstitütif promotor, RBS: Ribozom bağlanma bölgesi). 24	
Şekil 3.1. pCC-Ptrc-RBS3-rnpT1 plazmid haritası.	26
Şekil 3.2. pCC1BAC-CcdB plazmid haritası.	27
Şekil 3.4. <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472.....	36
Şekil 4.1. pCC1BAC-CcdB Plazmitten Elde Edilen Backbone Fragment-1.	46
Şekil 4.2. pCC1BAC-CcdB Plazmitten Elde Edilen Backbone Fragment-2.	46
Şekil 4.3. <i>C. violaceum</i> gDNA'sından elde edilen Vio Operonun Fragmenti-1.	47
Şekil 4.4. <i>C. violaceum</i> gDNA'sından elde edilen Vio Operonun Fragmenti-2.	48
Şekil 4.5. Transformasyon sonucu petri kutusunun görüntüsü.	48
Şekil 4.6. Damlatma deneyi 36 saat sonrası.	49
Şekil 4.7. Damlatma deneyi 48 saat sonrası.	49
Şekil 4.8. 10-beta NEB suşunda violasein üretimi (585 nm/OD600)-1.	50
Şekil 4.9. 10-beta NEB suşunda violasein üretimi (585 nm)- 1.	51
Şekil 4.10. 10-beta NEB suşunda violasein üretimi (585 nm/OD600)-2.	51
Şekil 4.11. 10-beta NEB suşunda violasein üretimi (585 nm)- 2.	52
Şekil 4.12. EPI300 suşunda violasein üretimi (585 nm/OD ₆₀₀).	53
Şekil 4.13. EPI300 suşunda violasein üretimi (585 nm)-2.	53
Şekil 4.14. Violaseinin 585 nm'de spektrofotometrik ölçümü.	54

Şekil 4.15. Farklı suşlardan ekstrakte edilen violasein pigmenti. Aşağı: 72 saat sonra gün ışığına maruz kaldığında pigment rengini kaybetmektedir..... 54



TABLULAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan primer listesi.....	32
--	----



KISALTMALAR

PCR- polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)

LB- Luria Bertani

E. coli- *Escherichia coli*

C. violaceum- *Chromobacterium violaceum*

Dk- dakika

Tm- primer melting temperature (primer erime sıcaklığı)

QS- Quorum Sensing (çoğunluğu algılama)

AHL- asil homoserin lakton (sinyal molekülü)

°C- Celsius santigrad birimi

nm- nanometre

DNA- deoksiribonükleik asit

gDNA- genomik DNA

OD- optical density (optik yoğunluğu)

SOB- super optimal broth (süper optimize edilmiş besiyer)

SOC-super optimal broth with catabolite repression (süper optimize edilmiş katabolit represyonlu besiyeri)

Cm- chloramphenicol (kloramfenikol)

dNTP- deoksinükleotid

EtBr- Etidyum Bromür

DMSO- dimetil sülfoksit

rpm- revolution per minute (dakika başı revolüsyon)

ng- nanogram

ml- mililitre

µl- mikrolitre

TAE tamponu- tris-asetat-EDTA tamponu

HPLC- yüksek performanslı sıvı kromatografisi



1. GİRİŞ

Sentetik biyoloji alanı, doğal biyolojik sistemlerde örgütsel ve tasarım ilkelerinin yeni analitik yaklaşımlarla incelenmesini kolaylaştırmaktadır. Spesifik ilişkileri (mutualizm, predator–prey, üretici olan-olmayan hücreler) yeniden üretmek için tasarlanan suşların mühendislik yaptığı populasyon etkileşimleri üzerine uzatılmaktadır. Metabolik mühendislik ve sentetik biyoloji saf bir kültürde biyokimyasal ürün sentezi için metabolik yolları inşa etme ve optimize etmede büyük ilerlemeler sağlamıştır [1].

Son yıllarda, doğal pigmentlerin kullanımı daha sağlıklı olduğu için, sentetik pigmentleri kullanmak yerine doğal pigmentler daha fazla kullanılmaktadır. Özellikle, mikrobiyal pigmentler artan ilgiye sahiptir. En çok ilgi çeken pigmentlerden biri de violasein pigmentidir. Violasein, doğada bazı Gram Negatif bakteri türleri (örn. *Chromobacterium violaceum*) tarafından üretilen mor bir pigmenttir. Önemli biyolojik aktiviteleri ve tıp, kozmetik, farmakoloji, gıda gibi endüstri alanlarda sahip olduğu geniş potansiyelden dolayı, biyosentez yolağı yoğun şekilde araştırılmaktadır. Daha büyük miktarda violasein elde etmek için metabolik mühendisliği alanında araştırmalar devam etmektedir [2].

Quorum Sensing (çoğunluğu algılama) mekanizması, sinyal-yanıt olarak çalışan bakteriler arasında bir nevi iletişim sağlayan bir mekanizmasıdır. Örneğin, model olarak bilinen *Vibrio fischeri* bakteri türünün LuxI/R sistemi küçük, difüze edilebilir molekülleri (AHL-asil homoserin lakton) üretir ve bu moleküller spesifik reseptöre (LuxR reseptör protein) bağlanır ve kompleks oluşturulur. Bu kompleks, mekanizmanın çalışmasını tetiklemektedir ve olumlu geribildirim döngüsü (positive feedback loop) oluşturmaktadır. Ayrıca mekanizmanın kontrolü altında belirli genler de vardır. Böylece hücre yoğunluğunu izleyerek, gen ekspresyonu değiştirilebilmektedir [3].

Doğal şartlar altında, farklı bakteri türleri birbirleri ile karışık bir şekilde yaşamaktadır. Bu sebeple, populasyon düzeyinde bakterilerin fonksiyonlarını anlayabilmek adına ko- kültür isimli teknolojiler geliştirilmiştir. Ko-kültür teknolojileri sentetik biyoloji alanında henüz yeni bir teknolojidir. Hücre populasyonları arasındaki etkileşimleri araştırmak için kullanılır. Populasyon seviyesinde hücrelerin davranışı detaylı araştırmamıza imkân sağlamaktadır [4].

Yukarıdaki noktalara değinmekle beraber, bu çalışmada yeni bir sentetik ekosistemin (ko-kültür) oluşturulmasından bahsedilmektedir. Bu çalışmadaki sentetik ekosistemde, Quorum Sensing mekanizmasını iki ayrı modüle ayırmaktadır. Bu oluşturulan ko-kültür sisteminde, iki farklı hücre populasyonu (sinyal gönderici ve sinyal alıcı) oluşturulacaktır. Sinyal üretiminden sorumlu olan gen mekanizması gönderici hücresine yerleştirilirken, resepsiyon proteinden ve violasein üretiminden sorumlu olan gen devreleri alıcı hücreye yerleştirilmektedir. Böylece çoğunluğu algılama mekanizmasına bağlı violasein rimi için gönderici-alıcı hücre aralarında madde alışverişi izlenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Sentetik Biyoloji ve Metabolik Mühendisliği

2.1.1.Sentetik Biyoloji Nedir?

Sentetik biyoloji, yeni biyomoleküler parçaları, ağları ve yollarını inşa edip canlı organizmaları yeniden programlamak adına biyologları ve mühendisleri bir araya getiren yeni bir araştırma disiplini. Biyolojik parçaların elektronik devrelere benzedikleri ve mantıksal işlemleri topluca işleme yeteneğine sahip oldukları yaklaşık 50 yıl önce farkedilmiştir [1]. Bununla beraber, biyolojik regülasyon şemaları matematiksel modeller ile gösterilerek anlatılmaya başlandı ve elektrik devrelerin analogisi biyolojik yollara uygulanmıştır [5-7]. Aynı zamanda, genomik ve genetik alanlarındaki gelişmeler (örneğin, rekombinant DNA teknolojisi) biyomoleküler parçaların inşa edilmelerine yol açmıştır. Sentetik biyoloji, mühendislik prensiplerine dayanan yaklaşımları ile (modelleme ve rasyonelizasyon gibi) çok hızlı bir şekilde ilerleme kaydetmiş bulunmaktadır, bununla birlikte son yıllarda birçok genetik cihazı ve biyolojik modülü geliştirmiştir [6, 8-13]. Sentetik biyolojinin nihai amaçları, doğada biyolojik tasarım prensiplerini, gen ve protein devrelerinin rasyonel inşası ile anlamaktır [14].

Bu süreçlerde, en basit tasarımlardan başlayarak (örneğin, sentetik promotor tasarlamak), daha kompleks tasarımlara geçerek (örn. hücre-hücre etkileşimini kontrol etmek), biyolojik sistemlerin doğada nasıl bir araya getirilip işlev gördüklerini daha iyi anlamamızı sağlamıştır [1, 14]. Genetik cihazlar ve biyolojik modüller icat edilmiştir ve daha sonra optimize edilmiştir. İlk inşa edilen sentetik gen ağı-genetik geçiş anahtarı ve represilatör, mühendisliğe dayanan metodların kullanımı ile sofistike, gelişmiş ve sayısal işlem davranışlarının biyolojik sistemlere entegre edilebildiğini göstermiştir [6, 7]. Bu ilk iki sentetik gen ağı, temel transkripsiyonel regülasyon fragmanlarının tasarlanıp, elektronikte hafıza depolamasını ve zamanlamasını biyolojik parçalarda nasıl işlediğini anlamak adına inşa edilmiştir. Ayrıca, bu iki sentetik sistemin çerçevesinde, kısa ve iyi bilinen biyolojik parçaları kullanarak birçok farklı sentetik gen devresi tasarlanabilmiştir. Elektronik alanından da ilham alınmış, örneğin dijital mantık kapısı [15-20], filtreler [21- 23] ve iletişim modülleri [21, 24-26] gibi genetik cihazları inşa edilmiştir.

2.1.2. Biyosensörler

Sentetik biyoloji alanının önemli bir kısmı biyosensörlerden oluşmaktadır. Biyosensörler, biyolojik yanıtı elektrik sinyale dönüştüren analitik cihazlardır. Doğada, hücrelerin çevreden çeşit çeşit sinyalleri algılamaları için birçok regülatör gen devresi bulunmaktadır. Bu devreler, analitlere bağlanan, sinyal algılama eşiği belirleyen özgül öğelerden ve sinyali filtreleyen, hücresel yanıtını sağlayan transdüsör öğelerden oluşmaktadır. Biyosensörler yüksek özgüllü, pH ve sıcaklık gibi fiziksel parametrelerden bağımsız olmalı ve tekrar kullanılabilir olmalıdır [27-28]. Kullanımları, gıda endüstrisini, klinik sektörünü vb. kapsamaktadır. Biyosensörler, hem transkripsiyon hem translasyon süreçleri esnasında hücrelerin gen yapısına değişiklik tanıtabilmektedir ve bu sebepten genel olarak ikiye ayrılırlar: transkripsiyonel ve translasyonel [29-30].

Transkripsiyonel biyosensörler, çevreye duyarlı promotorların sentetik tasarlanan gen devresine bağlanması ile meydana gelmektedir. Bu şekilde transkripsiyon esnasında programlanan değişiklikler olmaktadır. Sentetik biyolojide, antibiyotik ve hücre-hücre iletişim sistemini (Quorum Sensing) kullanarak transkripsiyonel biyosensörler inşa edilmiştir. Translasyonel biyosensörler ise, genelde RNA aptamer bölgelerinin RNA regülatör bölgelerine bağlanması ile oluşmaktadır. Translasyonel biyosensörlerde regülatör bölgeleri (antisense RNA, ribozomlar, ribozom bağlanma bölgeleri vb) önemli rol almaktadır [15].

Doğal olarak tüm-hücre biyosensör olan bazı bakteriler, örn. *Vibrio harveyi* ve *Vibrio fischeri*, sentetik olarak tasarlanan tüm-hücre biyosensörlere ilham olmuşlardır. Örnek verilen bu iki biyoluminesans (ışık saçan) bakterinin iletişim mekanizmaları (Quorum Sensing- çoğunluğu algılama mekanizması) yıllar boyunca çok detaylı bir şekilde incelenmiş ve sentetik biyolojide gen devrelerinin kurulmasında kullanılmıştır [31]. Bu şekilde birçok ilginç çalışma yapılmıştır, Tabor vd. tarafından yapılan görüntü kenarı algılama çalışması da bunlardan birine örnek oluşturmaktadır. Çalışmada, araştırmacılar sadece ışık alan hücreler ve onlara direkt komşu olan, ışık almayan hücreler pigment üreticileri olarak programlanmıştır ve projekte edilen görüntüler hücreler tarafından algılanmıştır [32]

2.1.3. Sentetik Biyolojide Pigmentler

Pigmentlerin kullanımı sentetik biyolojide oldukça geniştir ve sentetik gen devrelerinde pigment kodlayan genler kullanılabilir. Genetik mühendisliğinde, çıplak gözle görülebilir şekilde deneylerin çıktısını almak ciddi avantajları taşımaktadır ve deneylerin başarılı olup olmadıklarının hızlı bir şekilde anlaşılmasını sağlamaktadır. Fujimoto vd. tarafından yapılan çalışmada, karotenoid pigmentinin üretilmesinden sorumlu olan *crtA* geni, *E. coli* bakterisinde *ars* promotorun kontrolü altında olacak şekilde bir gen devresi inşa edilmiştir. Bu sistem, çevrede arsenit olduğu zaman bakterinin pigmentasyonunun sarı renkten kırmızı renge dönüşmesini sağlamaktadır [33, 34].

2.1.4. Sentetik Biyolojide Violasein Pigmenti

Son 10 yılda en yoğun ilgi gören pigmentlerden biri mor violasein pigmentidir. Oldukça değerli bir sekonder metabolit olan violasein doğada az miktarda üretilmektedir. Bu nedenle, violaseini konak hücrelerde stabil bir şekilde ve daha yüksek miktarda üretmek için sentetik biyoloji ve metabolik mühendisliği teknikleri kullanılmıştır. Sentetik operon tasarlanması ile sentetik promotorların kontrolü altında *vio* operonun ekspresyonunun gerçekleşmesi ve diğer yöntemler ile violasein yolağı optimize edilmiştir. Violasein, Quorum Sensing (çoğunluğu algılama) bakteriyel iletişim mekanizması üzerindeki çalışmalarda da kullanılmıştır ve hücreler arasındaki etkileşimi de incelenmiştir [35-38].

Güncel bilgilere göre, violasein pigmentinin 1 mg'ı, 394 EUR fiyatında bulunmaktadır [38, 39]. Pigmentin az maliyetli üretilmesi ve fiyatının düşmesi için merkezi Kanada'da olan ve sentetik biyoloji ile ilgilenen Synbiota toplumu 2014 yılından beri bilimsel kampları hazırlamaktadır. Sonuç olarak, violasein üretimi sağlamak adına 50'den fazla sayıda DNA sekansı tasarlanmış ve violasein üreten yüzlerce koloni izole edilmiştir [39].

2018 yılında, Lai vd. tarafından Golden Gate klonlama tekniğinin prensiplerine dayanan *E. coli*'de violasein üretimi amaçlı bir klonlama kiti yapılmıştır. Bu kit, promotor, RBS, ORF, terminator vb. biyolojik parçaları içeren belirli plazmid koleksiyonunu içermektedir [40].

2.1.5. Metabolik Mühendisliği Nedir?

Metabolik mühendisliği, genetik manipülasyon yapılarak metabolik yolların değiştirilmesidir [41-43] ve metabolik mühendislik değerli bileşenlerin üretimini maksimum düzeye getirmek için hücrelerin metabolizmasını hedefli bir şekilde modifiye etmektedir [35]. En bilinen örneği olarak *E. coli*'de ve mayada insülin üretimi gösterilmektedir. Metabolik mühendisliği, kendi belirgin odak noktasıyla genetik mühendisliğinden ayrılmaktadır. Genetik mühendisliği bireysel gen ve enzimleriyle uğraşırken, metabolik mühendisliği entegre olan metabolik yolları ve genetik regülatör (düzenleyici) ağları incelemektedir [43]. Metabolik mühendisliğin ayrı bir endüstri boyutu mevcuttur, çünkü kimyasalların, yakıtların ve ilaçların maliyetli üretimi için biyokatalist olarak kullanılabilen mikroorganizmaları inşa etmeye çalışmaktadır [42-43]. Örneğin, milyarlarca sayıda mikroorganizma içeren biyoreaktörler, eskiden bir kimya fabrikasının ürettiklerini çıkarabilmektedir [44]. Bu sebeple, mikroorganizmalar metabolik mühendisliğinde üretim tesisi olarak görülmektedir ve spesifik amaçla inşa edilen yolları içeren hücrelere, mikrobiyal hücre fabrikaları denmektedir [35]. Son yıllarda, karotenoid ailesine üye olan oksidatif strese karşı koruma sağlayan yüksek maliyetli birkaç terpenoid (likopen, beta karoten, zeaksantin) pigment sentezi *E. coli* konak hücresinde gerçekleştirilmiştir [45-48].

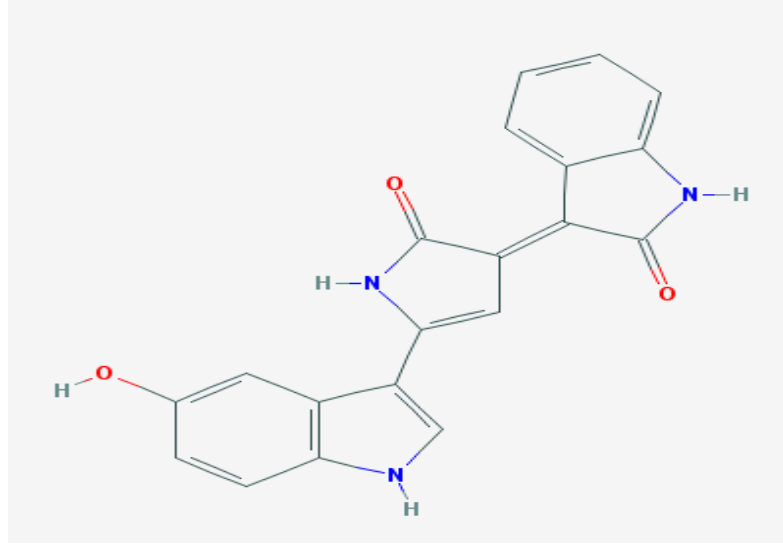
2.1.6. Metabolik Mühendisliğinde Violasein Pigmenti

Maliyetli ve değerli ürünler arasında birinci sıralarda olduğu için, özellikle son 5 yılda metabolik mühendisliği yaklaşımları kullanılarak violasein üzerinde yoğun araştırmalar yapılmıştır. Birkaç örnek araştırma göz önüne alındığında, Rodrigues vd. tarafından yapılan araştırmada *E. coli* bakterisinin sistem genelinde yüksek miktarda violasein ve deoksiviolasein üretmesi için metabolik mühendisliği prensipleri ile işlemler yapıldığı, Sun vd. tarafından yapılan çalışmada ise *Corynebacterium glutamicum* bakterisi üzerinde violasein üretimi için metabolik işlemlerin yapıldığı görülmektedir [50]. Fang vd. tarafından yapılan çalışmada *E. coli* bakterisi kullanılarak yüksek violasein üretimi hedeflenmiştir [51].

2.2. Violasein Pigmenti

Pigmentler, hem bilim dünyasında hem günlük hayatta farklı amaçlarla kullanılmaktadır. 19. yüzyıldan beri popülerliğini sürdürmüş olan sentetik pigmentlerin, kontrolsüz kullanımının insan sağlığını negatif şekilde etkileyebildiği, çevre için ise zararlı olduğu son yıllarda anlaşılmıştır [53]. Bu nedenle, sentetik pigmentlerin yerine doğal pigmentler; geri dönüşümlü özelliklerinden ve farklı kaynaklardan (örn. mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve mineraller) elde edilebildiklerinden dikkat çekmektedir. Doğal pigmentlerin arasında biyolojik aktivitelerinden dolayı yoğun ilgi çeken pigmentlerden birisi de violaseindir [54, 55]. Violasein mavi-mor renkli bir indolokarbazol pigmenttir ve bazı Gram-negatif bakteriler tarafından sekonder metabolit olarak üretilmektedir [53]. Violaseini üreten bakteri çeşitleri arasından, *Chromobacterium* cinsi kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve özellikle *Chromobacterium violaceum* üzerinde kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır [53-55]. Violasein, doğadan izole edilen violasein üreten bakteri suşlarının çoğunda bisindol, biyofilm üretimi ile ilişkilendirilmiş bir sekonder metabolittir. Sekonder metabolitler çoğunlukla, büyümede ve çoğalmada bakterilerin birincil ihtiyaçları dışındaki fonksiyonlara hizmet etmektedir. Bu moleküllerin çoğu biyolojik olarak aktif ve bazı bakterilere bir avantaj sağlayarak rakip türlere toksik özelliklere sahip oldukları için, farmakolojide ve klinik araştırmalarda önem kazanmaktadır [56, 57].

Violasein ile ilgili moleküler düzeyde araştırmalar devam etmektedir. Bu pigment 3 üniteden oluşmaktadır: 5-hidroksiindol, oksindol ve 2-pirolidin (Şekil 2.1). 1962 yılında *Nature* dergisinde yayınlanan makaleye göre, violaseinin biyosentezi için tek gerekli ana maddenin L-triptofanin olduğu ve çalışmada üretilen violaseinin miktarı, test edilen numunenin içinde mevcut L-triptofan değerinin fonksiyonu olarak tanımlanmaktadır [56]. Sonraki araştırmalarda ise violaseinin hidrojen, karbon ve nitrojen atomların tümünün L- triptofandan, bir oksijen atomunun ise moleküler oksijenden kaynaklandığı gösterilmiştir [56, 59].



Şekil 2.1. Violasein pigmentin moleküler yapısı.

Violasein pigmentinin, aseton ve metanolde yüksek çözünürlüğe sahip olduğu gösterilmiştir. Violasein, suda veya kutupsuz organik çözücülerde çözünmez. Violasein, ortamın pH değeri 5 ile 9 arası, sıcaklığın ise 25 ile 100 °C arasında iyi stabilite göstermektedir. Pigment ışığa maruz kaldığında yavaşça bozunmakta olduğu fark edilmiştir. Yüksek pH değerinde, pigmentin rengi değişmektedir. Örneğin, pH: 11 olduğunda, violasein 24 saat içinde renksiz olmaktadır; pH değeri 14 olduğunda renginin yeşile dönüştüğü fark edilmektedir. Düşük pH değerinde ise (örn. pH 2), violaseinin 30 gün içinde orta dereceli dekompozisyonu gözlemlenmiştir. Bu nedenle pigment üretimi, bulunduğu yere göre değişiklik gösterebilmektedir [52, 60-61].

Violaseinin biyolojik aktivitelerinin dışında, bu pigment tıp, kozmetik, oyuncak yapımı, böcek ilacı, tekstil ve gıda endüstriyel uygulamalarında da büyük ilgi çekmektedir. Violasein, patojen bakterilere karşı (örn. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) antibakteriyel özellik göstermiştir [61]. Violaseinin, *S. aureus*'a karşı önemli bir antibiyotik aktivitesinden dolayı ve ayrıca linoleik asit üzerinde antioksidan bir etki sergilediği için, violasein içeren bir kozmetik losyon da formüle edilmiştir [62]. Boya, lipofilik veya hidrofilik saç ve cilt bakımı için violasein içeren kozmetik ürünler üretilmiştir [63, 64]. Son yıllarda, violaseinin antitümör potansiyeli ile beraber violasein- indüklenen hücre ölümü de yoğun şekilde araştırılmaktadır. Yapılan araştırmalar violaseinin, HL60 ve TF1 lösemi hücrelerinin ölümünü indüklediğini göstermektedir [57- 58]. Violaseinin immünomodülatör potansiyeli de yoğun ilgi kazanmıştır. Fareler üzerinde yapılan araştırmada, violasein 40

mg/kg dozunda verildiği zaman merkezi ve periferik antinötrofik yanıtı indüklediği gösterilmiştir. Bu araştırmalar, otoimmün hastalıklardaki klinik uygulamalara yeni yollar açmaktadır [65-66]. Violaseinin aynı zamanda ultraviyole radyasyona karşı koruyucu olabileceği rapor edilmiştir. Araştırmalar, violaseinin içinde bulunan %10 deoksiviolaseinin, herpes ve poliovirüslere karşı aktivitesi olduğunu gösterirken, daha yüksek bir konsantrasyonda, HSV-1, *Poliovirus* tip 2 ve *Simian rotavirus* SA11'de viral replikasyonda zayıf bir inhibisyon sergilediğini ortaya koymuştur [67].

Violaseinin fotodinamik özellikleri, onun fotokemoterapötik ilacı olarak kullanılabilirliğini göstermektedir [58]. Bu potansiyel kullanım alanları ve özellikler ile beraber, violasein antitripanozomal, antinematodal, antimalarial, antileishmanisidal, antiprotozoanal, antiülser, antipiretik ve antioksidant özelliklere sahiptir [53-54]. Bu özelliklerle ilaç endüstrisinde ve klinik uygulamalarda çok geniş potansiyele sahip olduğu için, bilim dünyasında son yıllarda violasein hakkındaki araştırmalar çok ilgi görmektedir [57].

Mor renginden dolayı, klinik araştırmaları dışında da ilgi çekmektedir. Örnek olarak, tekstil endüstrisinde violasein, deoksiviolasein veya kendi sulu solüsyonlarının karışımları ile tiftoidle boyanmış elyafların işlenmesiyle hazırlanan hafif dereceli boyalı elyafları, mavimsi mor renkte dokunmuş bir ipek kumaş üretebilmektedir [68]. Violasein, renklendirici olarak geniş bir gıda endüstrisi ürünlerinde kullanılabilir. Yoğurt ve jöle bu toz boyayla renklendirilmiş, canlı bir menekşe rengi gıdalar üretilmiştir ve renklerinin bir aylık bir depolamadan sonra değişmeden kaldığı gözlemlenmiştir [53, 68- 69].

2.2.1 Chromobacterium violaceum ve Violaseinin Diğer Doğal Üreticileri

Violasein, *Chromobacterium*, *Collimonas*, *Duganella*, *Janthinobacterium*, *Alteromonas* gibi bazı Gram negatif bakteriler tarafından üretilmektedir. Pigment üreten suşlar, farklı ülkelerden ve farklı iklimlerden kaynaklanmaktadır (örn. İngiltere, Norveç, Brezilya, Malezya) [56, 70-71]. Daha önce de bahsedildiği gibi şimdiye kadar violaseini üreten bakteri çeşitleri arasından, *Chromobacterium* cinsine ait olan *C. violaceum* üzerinde en kapsamlı çalışmalar yapılmıştır [2, 56-57, 71-81], fakat son zamanlarda birçok araştırmacı *C. violaceum* dışında violasein üreten diğer organizmalara da odaklanmıştır. Örneğin, *Duganella* spp. suşları üzerinde fizyolojik, genetik ve

mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. *Duganella* spp.'nin izole edilen yedi suşunun violaseini yüksek miktarda *in vitro* ürettikleri rapor edilmiştir. Kurbağa ve semenderlerin derileri üzerinde bulunan, violasein üreten bir diğer bakteri cinsi olan *Janthinobacterium*, biyofilmler oluşturmaktadır. Buna karşılık, üretilen violasein amfibik konakçıları için antifungal bir koruma sağlamaktadır [56-65].

Doğal üreticiler violaseini düşük miktarda ve düşük kararlılıkta üretmektedir. Bu nedenle, violaseinin üretimini daha başarılı hale getirmek adına metabolik mühendislik yaklaşımı ile yapılan birçok çalışma mevcuttur [53, 60, 80].

Bu tez çalışmasında *C. violaceum* bakterisinden alınan genler ile çalışıldığı için, bu bakterinin daha detaylı anlatılması gerekmektedir. *C. violaceum*, Gram negatif bir bakteridir ve tropik ve subtropik bölgelerin topraklarında ve sularında bulunan bir saprofitir. Kolonileri hafif konveks olup, ürettiği violasein pigmentinden dolayı genelde mor renklidir [55, 57, 58, 74, 75, 79].

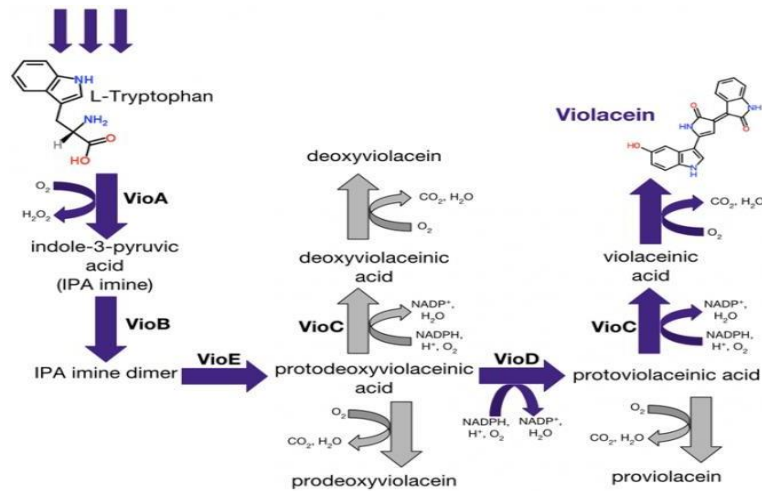
Genomu sekanslandığında, bakterinin genomunda sinyal transdüksiyonu, salgılama ve motilite ile ilişkili yüksek oranda açık okuma çerçevelerinin (ORF- open reading frames) bulunduğu gösterilmiştir. *C. violaceum* da fırsatçı patojen olarak algılanmaktadır. Mesela, genomunda *Pseudomonas aeruginosa* gibi fırsatçı patojenlerde bulunan stresli durumlarda bakteriyel dirençliği sağlayan OmlA lipoproteini kodlayan gen bulunmaktadır. Ancak, *C. violaceum* genomunda patojen bakteriler için bazı önemli genler (örneğin, *invH*) bulunmamaktadır. Bu da *C. violaceum* bakterisinin insanları enfekte etme yeteneğinin neden düşük olduğunu açıklayabilmektedir [56, 61-64].

2.3. Violasein Biyosentezi

Violasein biyosentezi, 80 yıldan fazla süredir araştırılmaktadır. İlk makaleler, 1934 yılına kadar dayanmaktadır [56]. Bisindol violasein, beş enzimin etkisiyle iki triptofan molekülünün yoğunlaştırılmasıyla oluşmaktadır [71-81]. Beş enzimi (VioA, VioB, VioE, VioD, VioC) kodlayan gen kümesi, violaseinin biyosentezi için sorumludur. Bütün VioA- E enzimleri klonlanmış ve *in vitro* incelenmiştir [53, 56, 75-81]. Bu beş enzim, vio operon (*vioA- vioE* genleri) tarafından kodlanmaktadır. Bu enzimler violaseini üretmek için, L- triptofan amino asidinin iki molekülünün modifikasyonunu ve kondenzasyonunu katalize etmektedir. Violasein biyosentezi iki L-triptofan molekülünün modifikasyonunu ve kondenzasyonunu katalizleyen beş enzimatik

reaksiyon (VioA-E) ve enzimatik olmayan bir oksidatif dekarboksilasyon adımı olmak üzere toplamda 6 adımdan oluşmaktadır. Violaseinin tüm karbon, nitrojen ve hidrojen atomları iki L-triptofan molekülünden kaynaklanmaktadır [56]. Violasein biyosentez yolağı şekil 2.2.'de gösterilmiştir. Violasein biyosentezine başlayan ilk enzim VioA, bir flavine bağımlı triptofan 2-monooksijenazdır. VioA ile katalize edilen reaksiyon, indol-3-piruvik asit imine (IPA) triptofan (Trp, W) oksidasyonu ile sonuçlanmaktadır ve eş zamanlı olarak eş faktör FAD'ın FADH₂'ye indirgenmesi eşlik etmektedir. İkinci reaksiyon adımında, VioB enzimi IPA'yı bir dimerizasyon işlemi ile çok kısa ömürlü bir imin-dimer oluşturarak dönüştürmektedir. Bu kısa ömürlü bileşik VioE enziminin etkisinde kalmaktadır ve prodeoksivolasetik asidine (PVA) dönüştürülmektedir. Son olarak, flavine bağımlı olarak VioC ve VioD olarak adlandırılan iki oksijenazın eşgüdümüyle eylemi bulunmaktadır. VioD indol halkasının 5- konumunda PVA'yı proviyolasein üretmek üzere hidroksilatlaştırmaktadır. VioC oksindol üretmek için diğer indol halkasını 2 konumunda okside etmekte ve sonunda violasein üretilmektedir. Indol çekirdeğinin violasein yapısının sol tarafındaki 1,2-vardiyası, önerilen tüm biyosentetik yolda en çekici biyosentetik mekanizma olarak düşünülmektedir çünkü bilinen diğer pigment sentezlerinde böyle bir olay bulunmamaktadır [72-75]. Violasein biyosentez mekanizması hakkında birçok biyokimyasal bilgi bulunsa da, VioD ve VioE haricinde, kimyasal yapıları ile ilgili az bilgi bulunmaktadır [53, 60-64].

Biyosentezin çoklu adımlarının *in vivo* koordine edilme konusu henüz anlaşılmamaktadır, çünkü enzimlerin kimyasal yapıları tam olarak bilinmemektedir [65].



Şekil 2.2. Violasein yolağı [54].

Violasein, önemli biyolojik aktivitelerinden dolayı ve çok geniş bir şekilde kullanılabilen bir pigment olduğu için birçok araştırmada daha yüksek miktarda nasıl üretilbileceği amaçlanmaktadır [49, 52-53]. Maalesef, violasein ve türevlerinin üretimi kolay değildir; bu nedenle çeşitli gruplar genetik mühendisliği ve sentetik biyoloji vasıtasıyla violaseinin fermantatif verimini geliştirmek için çalışmaktadır. Ayrıca, pigmentlerinin doğal mikrobik üreticileri düşük üretkenlik, üretmeyen varyantların kendiliğinden oluşumunu sergilemekte ve insan ölümlerine neden olan enfeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir [53, 76].

Bir araştırma grubu, *C. violaceum* ile violasein üretmek için en iyi koşulları belirlemek için tepki yüzeyi metodolojilerini (response surface methodologies- RSM) uygulamıştır. Başlangıçta 16 değişken analiz edilmiş ancak sonunda üç değişken yani glukoz, tripton ve maya özütü ile sınırlanmışlardır. Son ikisi hem hücre kütlesi hem de violasein verimlerini iyileştirirken, glukozun violasein verimi ile negatif korelasyonda olduğu ve kültüre eklenmesinde sınırlandırılmasının avantajlı olduğu bulunmuştur [80].

Güvenlik, bilinen genetik, yüksek dönüştürme verimliliği, ekim kolaylığı, hızlılık ve ucuzluk, terapötik maddeler için rekombinant konakçı olarak *E. coli*'nin tercih edilen seçimine katkıda bulunur [49, 58, 76]. 2013 yılında, Rodrigues vd. tarafından, *E. coli*'yi hedeflenen, sistem çapında metabolik mühendisliği yaklaşımı kullanılmıştır. Temel üretici *E. coli* dVio-1 suşu, uyarılabilir *araC* sisteminin kontrolü altında *C. violaceum*'dan elde edilen *vioABCE* gen kümesinin ekspresyonunu yapmış ve sonuç olarak deoksiviolasein birikimi oluşturulmuştur. Hücre içi metabolit analizini kullanarak triptofan destekleyici yollarındaki tıkanma noktaları başarıyla tespit edilmiştir. Böylece daha iyi şekilde yüksek akışlı triptofan yolağının sistemi, *J. lividum* bakterisinden alınmış olan *vioD* geninin genomik entegrasyonu ile yerine getirilmiştir. *E. coli* Vio-4, ana ürünü olarak violaseini biriktirmiştir [49].

Chaudhari ve diğerleri 2014 yılında, dimetil sülfoksidin (DMSO), *C. violaceum*'da (MTCC 2656) violasein üretiminin doz bağımlı bir şekilde arttırdığını ve aynı zamanda bakteri gelişimine inhibe edici bir etki yaptığını göstermiştir [81].

2015 yılında, Fang vd. violasein üretilmesini geliştirmek için farklı bir strateji uygulamıştır. Çeşitli triptofan üretkenlikleri, ilk önce *trpR/tnaA/pheA* genlerinin kombinasyonel knockout edilmesi ve yukarıdaki triptofan metabolik yoldan iki önemli gen *trpE/br/trpD*'nin aşırı ekspresyonu ile oluşturulmuştur. Daha sonra, violasein biyosentetik yolağının gen kümesi, üretilen triptofan yolağının aşağı akışına

sokulmuştur.

Sonra, daha ileri analiz için en yüksek violasein titerli en uygun suş seçilmiştir. Yolak ağındaki karbon akışı değişimini aydınlatmak için ¹³C etiketi kullanan metabolik yolak analizi yapılmıştır. İki yolağın kombinasyonu ile triptofan yolağının düzenlememiş olan sistemlere göre dört kat daha yüksek violasein üretimi elde edilmiştir [51].

2.3. Quorum Sensing: Hücreler Arasında İletişim Mekanizması

Bakteriler, toplu davranışlarına temel oluşturan gen ekspresyon programlarını düzenlemek için Quorum Sensing'i kullanmaktadır. Bir manada bakterilerin iletişim mekanizması olarak kabul edilen Quorum Sensing, "çoğunluk algılanması" demektir ve ilk defa 1979 yılında Nelson ve Hastings tarafından tarif edilmiştir [82]. Onların incelediği *Vibrio fischeri* bakterisinin Quorum Sensing sistemi bugünlerde de Gram negatif bakterilerinin Quorum Sensing modeli olarak kabul edilmektedir. Biyoluminesens, biyofilm oluşumu, antibiyotik sentezi, patogenez gibi toplu davranışları Quorum Sensing sayesinde var olmaktadır [83]. QS sistemlerinin, bakteriyel swarming'i, ekzoenzimlerin salgılanmasını, biyofilm oluşumunu ve genetik yeterliliği etkilediği rapor edilmiştir [83- 84].

Bir sinyal-yanıt sistemi olarak çalışan Quorum Sensing; otoindüktör denen hücre dışı küçük sinyal moleküllerinin üretimine, salgılanmalarına, algılanmalarına ve bakterilerin toplumsal yanıtlarına dayanmaktadır. QS ile potansiyel sosyal davranışın iki seviyesi birbirinden ayrılmalıdır: Birincisi, işbirliği davranışlarının iletişimini ve koordinasyonunu sağlayan bir sinyal ve ortak reseptörden oluşan QS devresi ve ikinci olarak, QS tarafından kontrol edilen gerçek, genellikle daha maliyetli işbirliği davranışları. Yüksek ve düşük bakteri konsantrasyonlarında davranışları değişmektedir. Genelde yüksek miktarda olup, sentezlenen ve hücre dışına çıkarılan otoindüktör konsantrasyonları çok yüksek oldukları için, spesifik reseptör taraflarından algılanıp, tekrardan Quorum Sensing genlerini tetkileyip kontrol ettiği bölgeleri aktiveleştirip olumlu geribildirim döngüsü (positive feedback loop) oluşturulmaktadır [82-85]. Populasyon kontrollü genlerin etkinleştirilmesi için gereken nüfus yoğunluğu, aktive edilmiş bir sistemi kapatmak için gereken yoğunluğunun çok üzerindedir [83].

Quorum Sensing Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerinde farklı olsa da, prensip aynıdır. Gram negatif bakterilerinde sinyal molekülleri olarak küçük AHL (asil

homoserin lakton) molekülleri, Gram pozitif bakterilerinde ise oligopeptid otoindüktörleri kullanılmaktadır. Bakterilerin türler arası iletişimde AI-2 denen otoindüktör ailesinden moleküller kullanılmaktadır [83, 85-91].

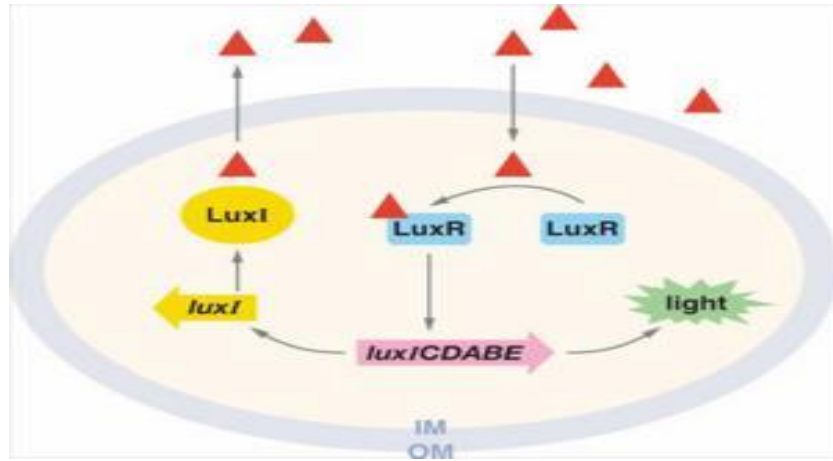
Birçok ilgili mikrobik davranışın düzenlenmesinde QS'in merkezi rol oynadığı fark edilmiştir [21, 96]. Tarımda ekolojik kontrol ve tıpta antivirülens gibi farklı uygulamalar için QS sistemlerini manipüle etme konusundaki yüksek ilgi halen sürmektedir [83].

Sentetik biyolojide, QS devresi çoğunlukla AND mantığı kapısının bir parçasıdır [1, 21, 83]. Biyolojik hesaplama, yani maddenin mantık fonksiyonlarını yerine getirme yeteneği, sentetik biyolojide ortaya çıkan bir konudur. Canlı hücrelerde mantık kapıları uygulanması, önceden tanımlanmış ve öngörülebilir bir şekilde bir veya birden fazla tetikleyici sinyal veya çevresel ipucuna yanıt vermelerini sağlamaktadır. Sentetik Boolean kapıları, sentetik AND kapılardan çok girişli veya analog işlevlere sahip daha karmaşık kapılar arasında değişen, *E. coli*'de başarıyla kurulmuştur. Sentetik biyoloji alanında, olayları saymak için sentetik devreler, itmeli itme anahtarları (push-on push-off switches) veya osilatörler veya aydınlatılmış desen kenarlarının belirlenmesi tasarlanmıştır. Birçok çalışmada, otoendüktörler tüm popülasyonun davranışını senkronize etmek için yapay hücresel iletişim üretmek üzere uygulanmıştır. Sentetik Quorum Sensing sistemlerinin tekrar yapılması, hedef gen ekspresyonunun hücre yoğunluğa bağlı bir şekilde kontrol edilmesini sağlar. Hücrelerin yanıtlarını ince ayarlamak ve performansını optimize etmek için sentetik QS sistemleri kullanılabilir. Sentetik QS sistemleri, ökaryotik ve prokaryotik konakçıda da uygulanmıştır [83, 94-95].

2.3.1. Gram Negatif Bakterilerde Quorum Sensing

Gram negatif bakterileri AHL (asil homoserin lakton) moleküllerini sentezleyip algılamaktadır. AHL sinyallemesi, LuxR ve 3-okso-heksanoil homoserin lakton (3OC6-HSL) tarafından biyoluminesens genleri de dahil olmak üzere yaklaşık 25 genden oluşan küçük bir setini kontrol etmek için QS kullanan deniz bakterisi *Vibrio fischeri*'de keşfedilmiştir. *V. fischeri*, ışık organlarını kolonize ettiği ve ışığı ürettiği belirli deniz hayvanlarının mutualist simbiyonttur [90, 93-94]. Tek hücreler, biyolojik tespit için yeterli ışık yaymazlar; ancak hücre grupları tarafından üretilen ışık kolayca çıplak gözle

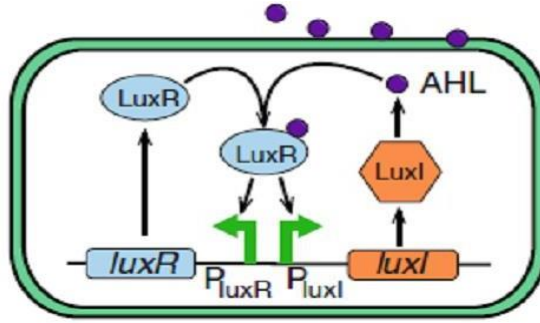
görülebilmektedir. Biyoluminesans kolaylıkla gözlemlenebildiği ve ölçülebildiğinden *V. fischeri*, QS mekanizmasını anlamak için bir model olarak kullanabilmektedir [83]. *Vibrio fischeri* bakterisinin Quorum Sensing mekanizmasını örnek alındığında anlaşılmaktadır ki *LuxI* gen ürünü tarafından biyoluminesans özelliği kontrol edilmektedir ve molekül düzeyinde *luxICDABE* (lusiferaz) operonu yönetmektedir (Şekil 2.3.). *LuxI* geni LuxI denilen proteini kodlamaktadır ve bu protein AHL'yi sentezlemektedir. Üretildikten sonra, AHL hücre dışına çıkıp bir başka bakteri hücresine serbest bir şekilde girerek LuxR olarak adlandırılan reseptör proteine bağlanmaktadır. AHL'nin konsantrasyonu, artan hücre yoğunluğu ile artmaktadır. LuxR de *luxR* geni tarafından kodlanmaktadır. LuxR ile AHL otoindüktörünün birbirine bağlanması, lusiferaz operona dahil olan genlerin ekspresyonunu tetiklemektedir. Otomatik olarak *luxI* geninin ekspresyonu da indüklenmektedir ve olumlu geribildirim döngüsü oluşturulmaktadır. Birçok Gram negatif bakterisinde LuxI/R Quorum Sensing mekanizması mevcuttur. İncelenen bakteri türlerinde, LuxR tip proteinlerin ve onlara özgü olan AHL molekülleri arasındaki aşırı özgüllüklerine göre LuxI/R Quorum Sensing mekanizmasını tür içi iletişim aracı olarak kullanılmaktadır diye bir sonuca varılmaktadır [83-84, 88, 91-95].



Şekil 2.3. Gram negatif bakterilerinin LuxI/R Quorum Sensing Modeli. AHL, kırmızı üçgen olarak gösterilmektedir. IM membran içi, OM membran dışı [83].

Lux operonunun minimal bileşenleri, iki gen *luxI* ve *luxR*, soydaş promotor PluxI ve PluxR'dan oluşmaktadır. Yukarıda bahsedildiği gibi *luxI* geni, AHL'yi üreten sentezi kodlamaktadır. LuxR/AHL kompleksi oluşturulunca P_{luxR} promotoruna bağlanır ve böylece aşağı akış genlerinin transkripsyonu hücre yoğunluğuna bağlı olarak gerçekleşir (Şekil 2.4.) [83, 85].

Mühendislik bakış açısından, LuxI/R tipi Quorum Sensing sistemleri iki ayrı modüle ayrılabilir. Bir modülü sinyal üretmek ve diğeri sinyale yanıt vermek için iki farklı hücrede yapıldığında hücrelerin iletişime geçmeleri ile sonuçlanmaktadır [21, 83, 96].



Şekil 2.4. LuxI/R Mekanizması [87].

2.4. Ko-kültür

Ko-kültür sistemleri, hücre populasyonları arasındaki etkileşim hakkında araştırma yapmak için kullanılmaktadır. Son yıllarda, ko-kültür sistemlerine sentetik biyoloji alanında ilgi artmaktadır. Kompleks, çok hücreli sistemleri araştırmak ve düzenlemek için ko-kültür ideal bir yöntemdir. Ko-kültür, hücre ekim kuruluşudur, iki ya da daha fazla sayıda birbirinden farklı, aralarında bir dereceye kadar temas kurulmuş, hücre populasyonu büyütülmektedir [4, 97-107]. Böyle bir kuruluşu kullanmak için birkaç sebep bulunmaktadır; populasyonlar arasında doğal etkileşimleri araştırmak, populasyonlar arasında sentetik etkileşimleri kurmak ve bazı populasyonların kültürleşme başarılarını arttırmak. Ko-kültür sistemlerinin kullanım alanları geniştir. Örneğin; enfeksiyon araştırmalarında, ilaç endüstrisinde, yapay dokularda ko-kültür sistemleri kullanılmaktadır [104-105].

2.4.1. Ko-kültürde Değişkenler

Ko-kültürler, farklı populasyon sayısı, populasyonlar arasındaki benzerlik derecesi, populasyonlar arasında ayırma derecesi, populasyonların çevre farkları, kültürlerin hacmi ve zaman ölçeği gibi konularda birbirinden ayırt edilmektedir. Daha az kompleks olan sistemler kurulmaktadır, fakat yüksek derecede kompleks kurulan sistemler nadiren bulunmaktadır. Hatta üçten fazla hücre populasyonunun etkileşimi yönetilemez

karmaşıklık derecesine yol açabileceği düşünülmektedir. Bugüne kadar ko-kültür araştırmalarının büyük çoğunluğu iki popülasyonu kapsayacak şekilde yapılmıştır [97].

Ko-kültürde hücre popülasyonları birbirine çok benzer olabilir: örneğin bir gen ekspresyonunda farklı, ama aynı suşa ait olan iki hücre popülasyonundan oluşan sistemler. Hücre popülasyonları iki farklı türden oluşarak birbirinden farklı da olabilir. Ko-kültür popülasyonları arasındaki benzerlikler onların ekolojik bağlarını etkileyebilir.

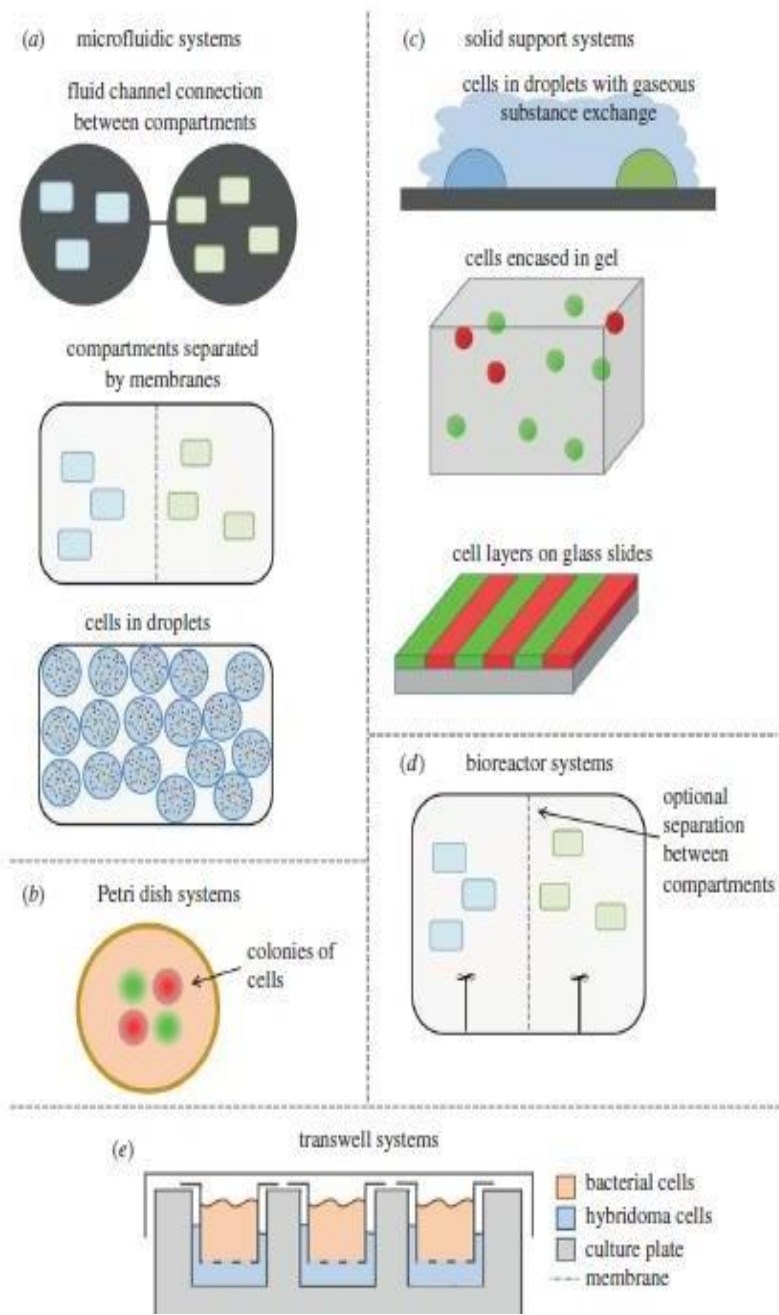
Ko-kültür deneyinin kuruluşuna göre kültürler, birbiriyle tamamen karışık ya da kısmen ayrılmış olabilirler. Popülasyonları ayırma metodu dikkatli seçilmelidir çünkü popülasyonların etkileşimleri kontrol altında kalmalıdır ve kararlı bir sistem amaçlanmalıdır [4,97-102].

Kültür hacmi ve hücre yoğunluğu da önemli faktörlerdir. Deney hacimlerinin ölçeklendirilmesi konusunda iki farklı girişim vardır; birisi deneyleri endüstriyel hacimlere, diğeri ise farklı sistemleri ve çeşitli şartları araştırmak adına mikrolitrelik ölçeğe getirmeyi amaçlamaktadır [4, 97].

Ko-kültür deneylerinde zaman ölçeği de önemli bir parametre olmaktadır. Farklı uzunlukta ve zaman ölçeklerinde yer alan ko-kültür model sistemlerinin etkileşimleri oldukça karmaşıktır. Hücre çeşitleri arasındaki etkileşimleri araştırmayı hedefleyen deneylerde dakika ya da saat ölçeği kullanılabilir, ancak endüstriyel üretimi hedefleyen deneylerde daha uzun olan zaman ölçekleri kullanılmalıdır [98-99, 100-102].

2.4.2. Ko-kültür Teknolojileri

Sentetik biyoloji alanında ucuz ve kolay erişilebilir tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Belirli ayırma derecesiyle popülasyonları ko-kültür sistemi olarak kurmak için, mikrofluidik platformları, petri kutuları gibi sağlam yüzeyleri, üç boyutlu iskeleler, hidrojeller, transwell tabakları ve mikrodiziler sıkça kullanılan seçeneklerdir (Şekil 2.5.). Spesifik olarak ko-kültürler için, birçok mikrofluidik cihazı tasarlanmıştır. Bunların en önemli avantajlarından biri yüksek verim elde edilebilmesidir. Ancak, mikrofluidik kuruluşları daha büyük hacimlerde kullanılmayabilir [97-100]. Monokültür teknikleri de ko-kültür için hızlı bir şekilde adapte edilmektedir (örneğin; hücre göç tahlileri). Monokültürlerin agar tabaklara ve sıvı medyaya kultivasyonunda genelde aynı model kullanılmaktadır, ancak son zamanlarda ileride kullanılacak yeni metodlar geliştirilmektedir (mikrotaşıyıcı boncuklar, mikro-petri kutusu, difüzyon odaları, diyaliz reaktörü) [97, 99, 101-102].



Şekil 2.5. Ko-kültür teknolojileri. (a) Mikrofluidik sistemler. (b) Petri kutu sistemi. (c) Sağlam destek sistemi. (d) Biyoreaktor sistemleri. (e) Transwell sistemleri [4].

2.4.3. Ko-kültür Sistem Mühendisliğinin Sentetik Biyolojide Kullanımı

Yapay hücre-hücre iletişiminin genetik devre tasarımlarına dahil edilmesi sentetik

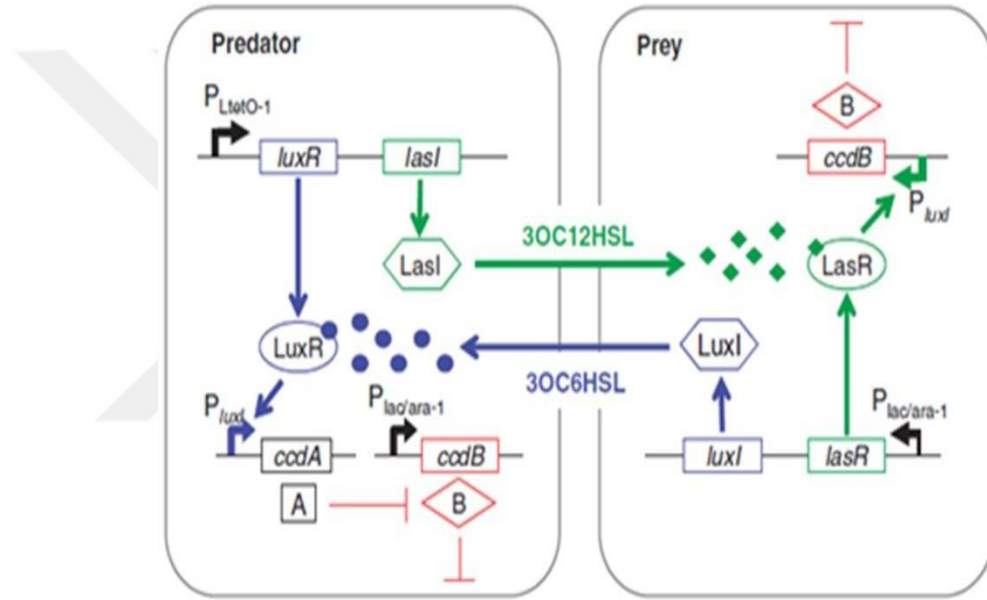
biyologların, tek hücrelerin programlanmasından çeşitlendirme, mekansal organizasyon, senkronizasyon ve koordine edilmiş bilgi işleme gibi nüfus düzeyindeki davranış ve işlevlerin mühendisliğine doğru hareket etmesini mümkün kılmaktadır [21, 32, 98, 104]. Biyoyakıtlar, terapötikler, biyolojik sensörler, tarım ve biyolojik giderme gibi pratik uygulamalar karmaşıklığı artan devre tasarımlarını motive etmektedir. Doğada biyolojik karmaşıklık, hücre-hücre iletişimiyle uzmanlaşmış hücre tiplerinin organizasyonu ve koordinasyonundan kaynaklanmaktadır. Doğada çok hücreli stratejilerin yararları göz önüne alındığında, sentetik biyologlar hücrelerin popülasyonlarının davranışlarını, etkileşimlerini veya dinamiklerini kontrol etmek için heterolog hücre-hücre iletişim modüllerini genetik devre tasarımlarına dahil etmektedirler.

Sentetik biyoloji, doğal biyolojik sistemlerde örgütsel ve tasarım ilkelerinin yeni analitik yaklaşımlarla incelenmesini kolaylaştırmaktadır ve bu mutualizm, predator-prey ve üretici olan-olmayan gibi spesifik ilişkileri yeniden üretmek için mühendislik ile tasarlanan suşların nüfus etkileşimleri üzerine geliştirilmiştir [96, 98]. Yukarıdaki örnek ilişkiler, doğal sistemlerle ilgili çalışmaları tamamlayan, ekolojik ya da toplumsal evrim sorularını incelemek için basitleştirilmiş ve manipüle edilebilir deneysel sistemler görevi görebilirler. Ko-kültür teknikleri, hücre popülasyonları arasındaki doğal veya sentetik etkileşimleri incelemek için biyolojide sayısız uygulama bulundurmaktadır. Genelde iki hücre popülasyonu ile çalışılmaktadır, ancak daha az sayıda araştırmacı tanımlanmış sentetik ekolojiler ve organ model sistemleri de dahil olmak üzere üç hücre popülasyonu arasındaki etkileşimleri incelemiştir. Üçten fazla farklı hücre popülasyonunun birlikte kültürlenmesi üzerine yapılan çalışmalar nadirdir, ancak küçük çaplı in vitro doku modelleri veya endüstriyel olarak umut verici işlevlerle birlikte daha az tanımlanmış konsorsiyum içermektedir [4].

Sentetik biyoloji alanında ko-kültür teknolojisi ile yapılan bir örnek araştırma olarak, Balagadde vd. tarafından sentetik predator-prey (avcı-av) sistemi gösterilebilir (Şekil 2.6.). Doğada bilindiği üzere avcı, avı öldürmektedir ve av onun için besin kaynağı olmaktadır. Bu kurulan sentetik ekosistemde de doğadaki gibi, aynı olmasa da benzer, etkileşim bulunmaktadır. İki hücre popülasyonu kurulmaktadır: avcı ve av hücreleri. Bu hücre popülasyonlarında, iki modüle ayrılmış iki Quorum Sensing mekanizması (LuxIR ve LasIR) mevcuttur. Her mekanizmanın otoindüktörleri sentezleyen kısım bir hücre popülasyonunda bulunmaktadır, tamamlayıcı reseptör kısmı ise diğer hücre popülasyonunda bulunmaktadır. Quorum Sensing aracılığı ile haberleşip

bu hücreler birbirlerinin gen ekspresyonu değiştirebilmektedir. Hatta birbirlerinin hayatta kalıp kalmamalarına dair karar verebilmektedir. Bu da av hücresine *ccdB* “killer gene”–öldürücü gen konulmakla beraber gerçekleştirilmiştir. Diğer, avcı hücre popülasyonunda ise, hem *ccdB* hem de onun antitoksini *ccdA* geni bulunmaktadır.

Ko-kültür teknolojisinin geliştirilmesine daha fazla odaklanma gereklidir. Ko-kültür teknolojisi, genetik mühendisliği ile kompleks sistemlerin uygulanması arasındaki bağlantıyı temsil etmektedir. Bu teknolojinin yaygın olarak bulunması çok çeşitli biyolojik soruları cevaplamaya izin getirebilir [96].



Şekil 2.6. Sentetik predator-prey sistemi [96].

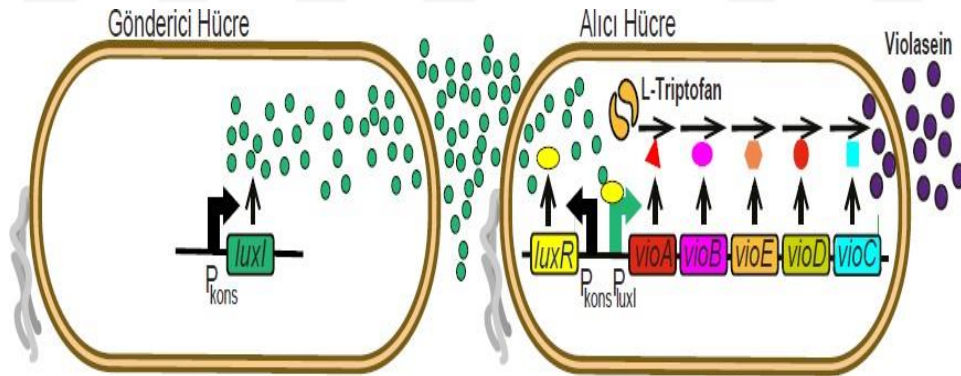
2.5. Sentetik Ekosistem Oluşturarak Quorum Sensing Mekanizmasına Bağlı Violasein Üretimi

2.5.1. Sentetik Ekosistemler Üzerinde Benzer Çalışmalar

Doğada karmaşık biçimde yaşayan bakterilerin davranışlarını ve etkileşimi anlamak için ko-kültür prensiplerine uygun farklı sentetik ekosistemler kurulup araştırmalar yapılmıştır. Özellikle bakteriyel simbiyoz ve mutualistik (karşılıklı) ilişkide olan iki bakteri çeşidi arasındaki iletişim mekanizmaları yoğun araştırılmaktadır. Bakteriyel etkileşim ve iletişim sonucu ya da çıktısı kolay ölçülebilecek şekilde

ayarlanarak kolayca tanımlanabilir. Örneğin, Basu vd. yapılan çalışmada, konak hücrelerin içine gen devresinin bir parçası olarak GFP floresan protein üretiminden sorumlu olan gen konulmuştur. Bu şekilde, gen devrelerinin planlandığı gibi çalışıp çalışmadıklarını teyit etmektedir [1, 21].

Dünyada en kapsamlı sentetik biyoloji IGEM adlı yarışmasında, 2012 yılında San Francisco Kaliforniya Üniversitesi tarafından yapılan çalışmada, violasein pigmenti kullanılmıştır. Çalışmada, biyosentetik yolağı ikiye bölünerek ve her bir kısmı iki ayrı suşta konularak tek bir suşun metabolik yükü hafifletilmeye çalışılmaktadır [108]. Bu çalışma Kerner vd. tarafından yapılan çalışmaya benzerlik göstermektedir. Kerner ise deneysel çalışması ile iki oksotropik *E.coli* suşun kontrol edilebilir simbiyoz oluşturduklarını kanıtlamıştır. Araştırmada YFP-sarı floresan protein kullanılmıştır [109]. Ko-kültür, Quorum Sensing ve violasein biyosentezi hakkında olan bilgiler birleştirilip, metabolik mühendislik yaklaşımıyla çoğunluğu algılama mekanizmasına bağlı violasein pigment üretimi için sentetik bir ekosistem (ko-kültür sistemi) oluşturulabilir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Violasein pigmentinin üretimi için oluşturulmuş olan ko-kültür tasarımı.

2.5.2. Çalışmadaki Ekosistemin Amacı

Bu sistemle, violasein pigmentinin üretileceği sentetik bir ekosistem (ko-kültür) oluşturularak senkronize populasyon davranışının bir heterolog biyosentetik operonun pigment biyosentez verimi üzerinde etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Amaç özellikle hücre populasyon arasındaki etkileşimlerini anlamak, hücre dinamiklerini aydınlatmak, Quorum Sensing haberleşme mekanizmasının hücre populasyon davranışlarını nasıl etkileyeceğini anlamak ve son olarak violasein pigmentini başarılı bir şekilde üretmektir. Violaseinin değerli bir sekonder metabolit olarak yüksek miktarda ve kararlı üretilmesi amaçlanmaktadır. Violasein üretimi üzerinde farklı plazmidler denenmektedir ve pigment oluşumu yakından takip edilmektedir.

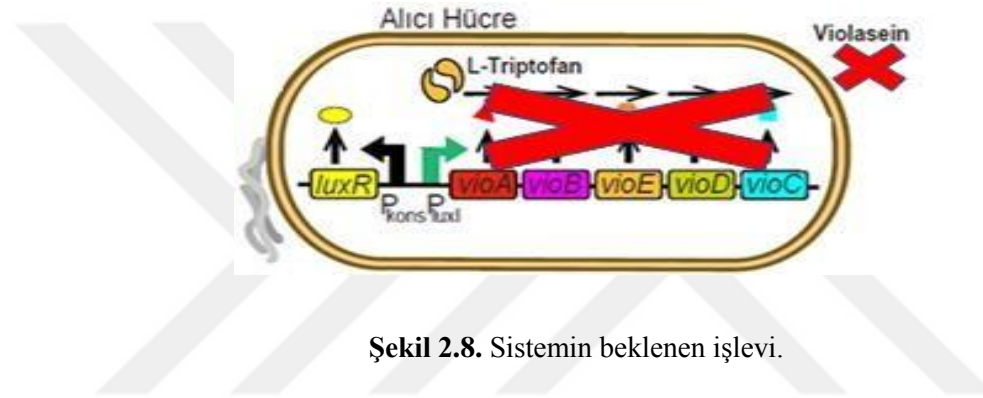
2.5.3. Sistemin Beklenen İşlevi

Violaseini doğada üreten *C. violaceum* bakterisinden bu pigmentin biyosentezinden sorumlu olan violasein operonu (*vioABCDE*) elde edilip model organizmasına *E. coli*'ye aktarılacaktır. Neden *E. coli*'ye aktarılacaktır ve neden bu sentetik ekosistem farklı türlerden değil de, aynı türe ait iki hücre populasyonundan oluşturulacaktır? Farklı türlerden ziyade aynı türe ait iki hücre populasyonu (örn. iki *E. coli* hücresi) benzer büyüme hızına sahip olmaktadır. Ayrıca, *E. coli-E. coli* ko-kültür sisteminin kullanımı ile populasyon içerisindeki bir türün baskınlığının ve kültür stabilitesi gibi problemlerin azaltılabilmesi mümkün olduğu için bu mikroorganizmalar seçilmiştir. Son olarak, aynı tür olsa da *E. coli* suşlarının farklı olması ile özellikle heterolog enzimlerin fonksiyonlarını desteklemek için değişen yeteneğe sahip olmalarından böyle bir seçim yapılmaktadır.

Violasein biyosentetik yolak, çoğunluğu algılama (Quorum Sensing) mekanizmasının kontrolü altında olacaktır. Quorum Sensing sistemi için *Vibrio fischeri*'de bulunan ve iyice bilinen *luxI*, *luxR* genleri ve P_{luxI} promotörü kullanılacaktır. Sistem iki modüllü olacaktır: Quorum Sensing promotörü (P_{lux}) tarafından kontrol edilen violasein yolak bir hücreye yerleştirilirken bu mekanizmanın çalışması için gerekli olan difüze edilebilir sinyaller diğer hücreye yerleştirilmiş olan modülden gönderilecektir.

Böylece alıcı ve gönderici hücre arasında madde alışverişi gerçekleşecektir. Violaseinin üretimi, gönderici hücrenin konsantrasyonuna bağlı olacaktır ve populasyon düzeyinde koordineli bir şekilde gerçekleşecektir. Alıcı hücrenin içindeki violasein

yolağının çalışması için gerekli olan difuze edilebilir sinyaller, gönderici denen hücreye yerleştirilmiş olacaktır. Otoindüktör sentezleyen gen (*luxI*) gönderici hücre popülasyonunda olduğu için, alıcı hücre popülasyonu violaseini üretebilmek için gönderici hücreye ihtiyaç duyacaktır. Eğer alıcı hücre popülasyonu gönderici hücre popülasyonundan ayırırsak, LuxR /AHL kompleksi oluşturulmayacak. Bu nedenle, *vio* operon Quorum Sensing mekanizmasına bağlı olduğu için, bu operonun genleri eksprese olmayacak ve violasein pigmenti üretilmeyecektir (Şekil 2.8.). Bu ko-kültür sistemi aynı zamanda ortamdaki sinyal molekülünün konsantrasyonunu belirleyen bir biyosensör olarak çalışacaktır.



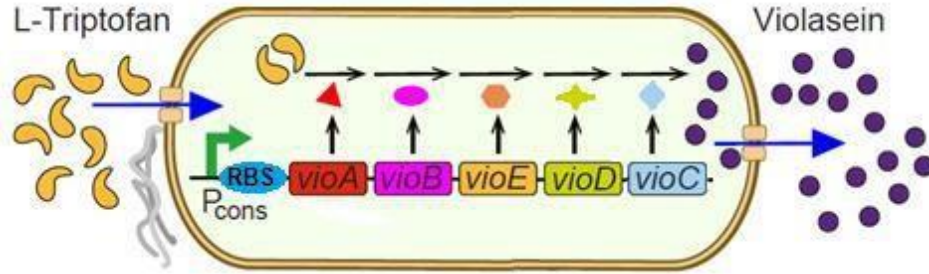
Şekil 2.8. Sistemin beklenen işlevi.

2.5.4. Konstitütif Promotorun Kontrolü Altında *E. coli*'de Vio Operonunun Heterolog Ekspresyonu

Sentetik ekosistem için tasarlanan plazmitler dışında bir de violasein üretiminden sorumlu olan *vio* operonu *E. coli* konak suşunda konstitütif bir promotorun kontrolü altında pigment üretimi sağlamayı denemekteyiz. Daha verimli pigment ekspresyonu için RBS (ribozom bağlanma sitesi- ribosome binding site) de hesaplanmıştır.

Violasein biyosentetik yolağının yeniden tasarlanması ve transkripsiyonel ve translasyonel kontrolünün sağlanması için bu yolağın genlerinin tamamı sentetik olarak tasarlanan bir konstitütif promotor ve sentetik bir RBS bölgesinin aşağı bölgesine (downstream) yerleştirilmiştir (Şekil 2.9). Konstitütif promotor, güçlü bir promotor olup istenen genlerin ekspresyonu sağlanmıştır. RBS bölgesi ise, Pennsylvania Üniversitesine bağlı Salis Lab tarafından tasarlanan RBS Calculator biyoinformatik programı ile hesaplanmaktadır. Violasein biyosentetik yolağının tamamının yeni bir hücre konakta yeniden inşası için bu pigmentin biyosentezinde rol alan genler (*vioA*,

vioB, *vioE*, *vioD*, *vioC*) ve tasarlanan sentetik konstitütif promotor ve ribozom bağlanma bölgesi (RBS) ile birlikte tüm sentetik operon *E. coli* bakterisine aktarılmıştır ve eksprese edilmiştir.



Şekil 2.9. Violasein metabolik yolağının metabolik mühendislik yaklaşımıyla *E. coli*'de yeniden inşa edilmesi (P_{cons} : Konstitütif promotor, RBS: Ribozom bağlanma bölgesi).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan bakteri suşları ve plazmidleri

Bu tezde *Chromobacterium violaceum* ATCC12472, *E. coli* NEB 10-beta ve *E. coli* EPI300 isimli suşlar ve pCC-Ptrc-RBS3-rnpT1, pCC1BAC-CcdB, pCC-Ptrc-RBS3-vioAE isimli plazmidler kullanılmıştır.

***Chromobacterium violaceum* ATCC 12472**

C. violaceum ATCC 12472 suşu, Aksaray Üniversitesi'nden alınmıştır. Doğal olarak Elazığ/ Doğu Anadolu Bölgesi'nde ve Türkiye genelinde topraklardan veya sulardan örnek olarak bu suşun toplanması hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Bu suşun yaşadığı bölgelerin iklimleri birbirinden farklı olsa da (Malezya, Brezilya, Avustralya, Vietnam vs), Türkiye'de bu suş ile pek çalışılmamaktadır [52, 110]. Bu sebepten çevreden örnekler toplanıp suşun izolasyonu yapılmamıştır.

***Escherichia coli* NEB 10-beta**

$\Delta(ara-leu) 7697 araD139 fhuA \Delta lacX74 galK16 galE15 e14- \phi 80dlacZ\Delta M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 \Delta(mrrhsdRMS-mcrBC)$

NEB suşları New England BioLabs şirketi tarafından tasarlanmaktadır. Kullandığımız NEB suşlarının en önemli özelliğinden biri elektrokompotent hücre olarak transformasyon deneylerinde kullanılmalarıdır. NEB 10-beta *E. coli* suşu, yaygın olarak kullanılan DH10B suşunun bir türevidir. Büyük plazmidlerin ve BAC plazmidlerin transformasyonu için uygundur. T1 faja dirençlilik taşımaktadır. Ayrıca, endonükleaz I aktivitesi *endA1* geninin bulundurması ile ortadan kaldırılmaktadır [111].

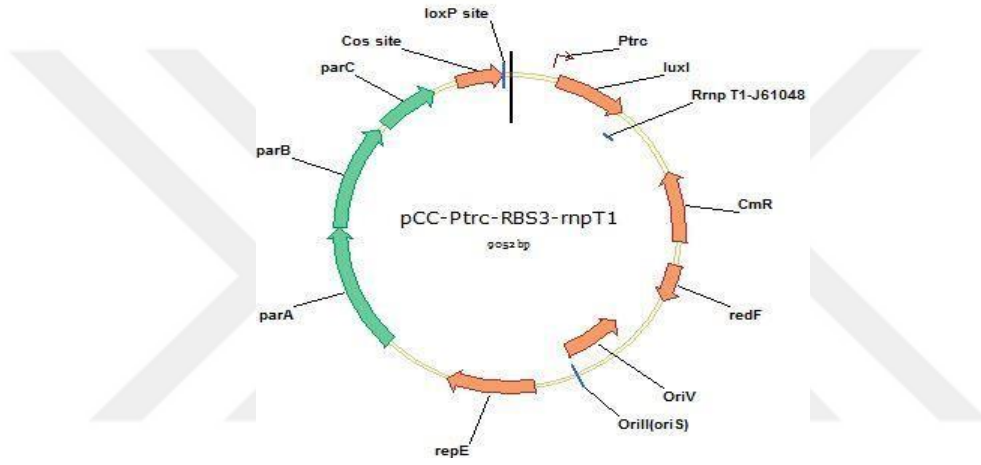
***Escherichia coli* EPI300**

$F-\lambda-mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lac)X74 recA1 endA1 araD139 \Delta(ara, leu)7697 galU galK rpsL (StrR) nupG' trfA dhfr$

E. coli EPI300 suşu elektrokompotent hücre olarak kullanılmaktadır. Suşun bazı özellikleri, streptomisin antibiyotiğe karşı dirençli olması; arabinoz, galaktoz ve laktoz ile indüklenme yapılabilmesi ve losin oksotrof olmasıdır [112].

pCC-Ptrc-RBS3-rnpT1 Plazmid

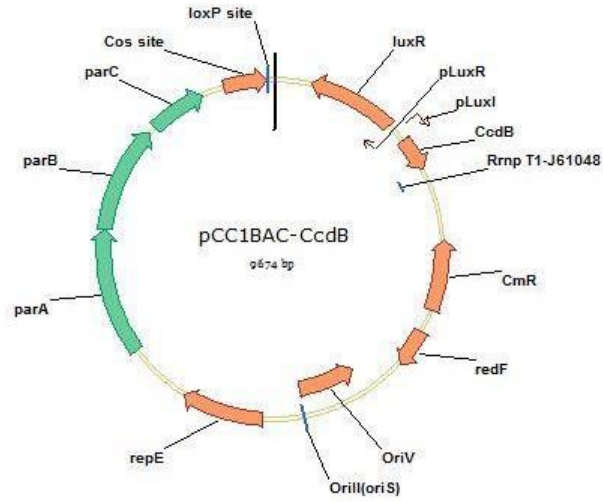
Bu plazmid, Quorum Sensing sinyalinin sentezlemesinden sorumlu olan *LuxI* genini içermektedir. *LuxI* gen, güçlü ve konstitütif sentetik Ptrc promotorun kontrolü altında bulunmaktadır. Ayrıca, plazmid kloramfenikol antibiyotiğine dirençlik genini taşımaktadır (*CmR*). Plazmid haritası, Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. pCC-Ptrc-RBS3-rnpT1 plazmid haritası.

pCC1BAC-CcdB Plazmid

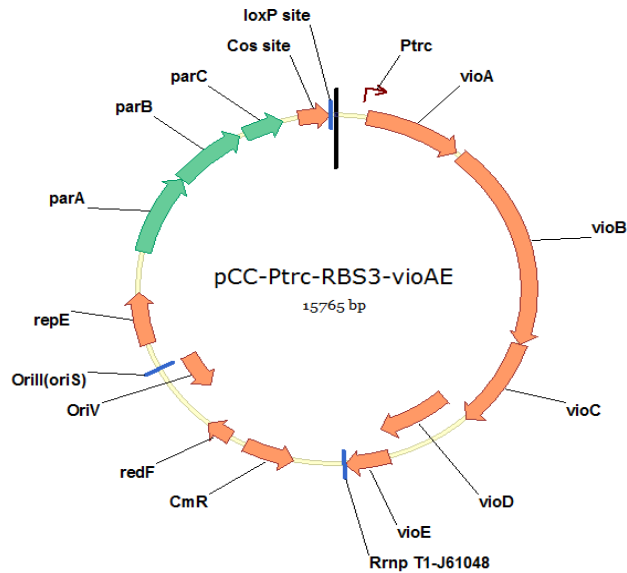
CcdB toksik proteini kodlayan *ccdB* geni sebebiyle böyle adlandırılmaktadır. Bu plazmid, P_{luxI} Quorum Sensing promotoru içermektedir ve diğer Quorum Sensing promotoru P_{luxR} 'yi de bulundurmaktadır. p_{luxR} promotorun kontrolü altında Quorum Sensing sinyalini algılayan reseptör proteini kodlamaktan sorumlu olan *LuxR* geni bulunmaktadır. Plazmid, kloramfenikol antibiyotiğine direnç genini taşımaktadır (*CmR*). Plazmid haritası, Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. pCC1BAC-CcdB plazmid haritası.

pCC-Ptrc-RBS3-vioAE Plazmid

Bu plazmid, *vio* operonu içermektedir ve operon, güçlü, konstitütif sentetik bir promotorun (*Ptrc*) kontrolü altında bulunmaktadır (Şekil 3.3). Kloramfenikol antibiyotiğine direnç genini taşımaktadır (*CmR*). Violasein pigmentinin zamana bağlı üretimi (time-course) deneylerinde karşılaştırmalı analiz için kullanılmaktadır.



Şekil 3.3. pCC-Ptrc-RBS3-vioAE plazmid haritası.

3.1.2. Besi yerleri

LB Broth Besi yeri

LB broth besinsel olarak zengin sıvı bir besi yeridir, hazırlanması kolay ve yaygın olarak bakterilerin büyütülmesi için kullanılmaktadır. Besi yerin hazırlanması için, tripton, maya ekstraktı ve NaCl bunlar sırasıyla 2:1:1 oranında karıştırılır [113]. Örneğin, 100 ml'ye tamamlayacağımız bir LB broth besi yeri için malzemelerin miktarı aşağıdaki gibidir:

- 1 gr tripton
- 0.5 gr maya ekstraktı
- 0,5 gr NaCl

121°C derecede 15 dk boyunca otoklavlanır.

LB Agar Besi yeri

LB agar besi yeri, besinsel olarak zengin katı bir besi yeridir. LB broth besi yerine benzemektedir, farklı olarak LB agar besi yerinin içeriğine agar girmektedir ve agardan dolayı katılaşmaktadır [114]. Agar, tripton, NaCl ve maya ekstraktı 3:2:2:1 oranında karıştırılır. Örneğin, 100 ml dH₂O ile tamamlayacağımız besi yeri için malzemelerin miktarı aşağıdaki gibidir:

- 0.5 gr maya ekstraktı
- 1 gr tripton
- 1 gr NaCl
- 1.5 gr agar

121°C derecede 15 dk boyunca otoklavlanır.

LB Broth+ Cm₂₅ ve LB Agar+ Cm₂₅

Bu çalışmada *CmR* genini yani kloramfenikol antibiyotiğine karşı dirençlilik sağlayan plazmidler kullanıldı. Bu nedenle, pCC plazmidleri içeren bakteriler büyütülmek istendiğinde besi yerine kloramfenikol antibiyotiği eklenmelidir.

Öncelikle, chloramphenicol stoku 34 mg/ml olarak yapıldı ve etanol içinde çözüldü. Daha sonra, 25 µg/ml konsantrasyonunda besi yerine eklenmektedir. Mesela, 100 ml LB broth besi yerine 73.5 µl kloramfenikol eklenmektedir [115].

SOB Medyum (Hanahan's Broth)

SOB (süper optimized broth) medyum, zengin bir medyumdur ve genel olarak transformasyon deneyinde kompetent *E. coli* hücrelerin büyütmesi için kullanılmaktadır [116]. SOB medyum, hazır bir karışım olarak satın alınmaktadır. Tripton, maya ekstraktı, MgSO₄, NaCl ve KCl içermektedir. 121 °C derecede 15 dk boyunca otoklavlanır.

SOC Medyum (SOB+ Glukoz)

SOC besi yeri, transformasyondan sonra kullanılan, hücrelerin elektro şoktan sonra toparlanmalarını (recovery) ve ilk büyüme aşamalarında antibiyotik dirençlik geni üretmelerini sağlayan zengin bir besi yeridir. SOC medyum, SOB medyum ile hemen hemen aynı malzemelerden oluşmaktadır. SOB Medyum hazırlanıp otoklavlandıktan sonra, filtre sterilize edilmiş glikoz ilave edilmektedir. Örneğin, 1 litre SOB medyum'a 20 ml steril %20 glikoz solüsyonu eklenmesi gerekmektedir [117].

3.1.3. DNA İzolasyon Kitleri

Farklı DNA çeşitleri (genomik ve plazmid DNA'ları) bakterilerden izole etmek ve saflaştırmak adına, QIAGEN firmasına ait kit protokolleri kullanıldı. Bütün protokoller, masa mikro santrifüj cihazı kullanılarak yapıldı.

QIAGEN DNEasy Kiti

Genomik DNA'yı kolay ve pratik bir şekilde izole etmek için, QIAGEN DNeasy kiti kullanıldı. Silika esaslı DNA saflaştırmasını sağlayan bu kitin, hem Gram pozitif hem Gram negatif bakterilerden, ilaveten hayvan kanı ve hayvan dokusundan DNA izolasyonu gerçekleştirmek için uygun protokoller bulunmaktadır [118].

QIAquick Jelden ve PCR'dan DNA Saflaştırma Kiti

PCR deneyi ardından diyagnostik elektroforezi yaptıktan sonra, istenen bantlar UV

ışığında görüldüğü takdirde, keskin ve temiz bir bisturi yardımıyla bant jelden çıkartılır. Bu bantta, istediğimiz DNA sekans mevcuttur. Bandı keserken hızlı olunmalıdır, çünkü UV ışığın altında DNA zarar görmektedir. DNA sekansı zarar gördüğü takdirde, PCR ürünü saflaştırma kiti uygulanır. Böyle bir durumda yine saflaştırdığımız ürünü elektroforez deneyinde doğrulamak mecburiyetindeyiz. Bu yöntem, pek tercih edilmemektedir. Bandı kestikten sonra, steril bir 2 ml'lik eppendorf tüpüne alınır ve QIAquick jelden DNA saflaştırma kiti uygulanır [119].

QIAprep Spin Miniprep Kit

Bu kit özellikle plazmid DNA'ları bulunduğu bakterilerden saflaştırmak ve izole etmek için kullanılmaktadır. Kit, hem yüksek kopya hem de düşük kopya olan plazmidleri için kullanılabilir. Kitin uygulaması pratik ve fazla zaman almamaktadır [120].

3.1.4. PCR Reaksiyonu ve Bileşenleri

PCR (polymerase chain reaction- polimeraz zincir reaksiyonu), istenen DNA sekansın çoğalmasını ve izole edilmesini sağlayan rutin bir deney türüdür. İsteddiğimiz genleri taşıyan plazmidleri tasarlamak için, öncelikle bu inşa edeceğimiz plazmidlerin DNA parçalarını elde etmemiz gerekmektedir. Alıcı hücre 'ye ait olacak plazmid için *vio* operonu (*vioA-E*), Quorum Sensing promotörü ve *luxR* genini aktarmak gerekmektedir.

Ayrıca, plazmidimizi oluşan iki tane backbone DNA parçası da gerekmektedir. Plazmid backbone, genelde genetik olarak manipüle edilmiş bir plazmid parçası olmakla beraber, genelde en az bir tane selektif marker sağlayabilmektedir. Bu markerin sayesinde, bir bakteriye istenen plazmidin aktarılıp aktarılmadığını daha kolay anlaşılabilir. Örneğin, backbone sayesinde inşa edeceğimiz plazmidin sekansında *CmR* (kloramfenikol dirençliği) geni bulunmaktadır. Bu sebepten dolayı, bu plazmidi taşımayan konak hücreler kloramfenikol antibiyotikini içeren bir besi yerinde çoğalmamaktadır. Bu plazmidi taşıyan konak hücreler ise, plazmid sayesinde kloramfenikole karşı dirençlik kazanıp, bu antibiyotik içeren besi yerde büyüebileceklerdir.

PCR reaksiyonu için gerekli olan bileşenler sırayla bunlardır: nukleaz – free saf

suyu, HF tamponu, dNTP, forward ve reverse primer, DNA numunemiz ve son olarak polimeraz enzimi. Bu malzemeler tek bir PCR tüpünde karıştırılır ve thermocycler cihazına konulur. Thermocycler cihazı, gerekli sıcakları değiştirerek DNA'nın denaturasyonu ( ift bazlı DNA molekülün tek iplik DNA'ya dönüştürülmesi), primerlerin sekansa bağlanması ve sekansın polimeraz aktivitesi ile uzamasını sağlayacaktır. Her PCR reaksiyonu için malzemelerin miktarı ve thermocycler şartları ayrı yazılmaktadır [116].

Nukleaz-free Saf Suyu

Saf suyu, reaktiflerin konsantrasyonu sulandırmak ve son hacmini doğru ayarlamak için kullanılmaktadır. PCR deneylerinde kullanılan saf suyu, nukleaz-free olmalıdır. Bu suyun kullanımı, DNA molekülüne zarar verebilecek nukleazlardan koruma amaçlıdır. Ayrıca, PCR reaksiyonu iyonların karışmasından korumaktadır [121].

HF Tamponu

Tamponlar, bir medyumun pH'ini stabil etmek için kullanılmaktadır ve PCR reaksiyonlarda DNA molekülü pH duyarlı olduğu için gereklidir. Düşük pH seviyesinde, DNA nukleo bazlarının kimyasal bağlantıları hidroliz aracı ile kırılmaktadır. Yüksek pH'da (>10) ise, DNA'nın çift sarmalı oluşturan dinukleotid bağlantılar kırılır. Ayrıca, polimerazın DNA sentezi etkinliği de pH duyarlı olmaktadır. Bu sebeple, bir çok tampon, belirli enzimlerle ve protokollerle çalışmak için optimize olmuş bulunmaktadır [122].

dNTPler

PCR reaksiyonlar deneylerinde kullanılan dNTP karışım seti, dört deoksi nukleotidlerden oluşmaktadır (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). DNA molekülün ana yapısını oluşturan deoksi nukleotidlerin, PCR reaksiyonu esnasında başarılı DNA sentezi için ortamda bulunmaları gerekmektedir [116, 123].

Primerler

Primerler, PCR reaksiyonu için özgül bir şekilde tasarlanan kısa DNA sekanslarıdır ve genelde 18-25 bp uzunluğundadır. PCR reaksiyonu için primerler iki sebepten dolayı

önem taşımaktadır: 1- polimeraz enzimi tek baz DNA sekansı çoğaltamaz, var olan bir çift bazlı DNA sekansın 3' ucundan sentezi başlatmaktadır ve 2- primerlerin sekansı DNA molekülünün neresinin çoğaltacağını karar vermektedir. Başarılı bir PCR için forward ve reverse primer gerekmektedir. DNA çift bazlı ve anti paralel bir yapıya sahip olduğundan dolayı, bir primer bir DNA iplikçinin 3' ucuna, diğeri ise diğeri iplikçinin 3' ucuna bağlanmaktadır. Primerler, çoğaltmak istediğimiz sekansın upstream ve downstream bölgesine tamamlayıcı olmalıdır. Onların tasarımını yaparken, primer bağlanma sıcaklığı, primerlerin GC içeriğini, forward ve reverse primerlerin birbirine tamamlayıcı olmamalarına, tekrarlanan sekanslar vb. hususların göz önüne alınması gerekmektedir [116].

Primerler tasarlandıktan sonra dışardan hizmet alımı ile gelmektedir. Primerler kurutulmuş kalıntı halinde geldikleri için, onları belirtilen miktarda nukleaz-free su ile sulandırarak 100 µM derişimli stok haline getirmek gereklidir. Sulandırmadan önce de kısa bir spin yapması tavsiye edilmektedir. Sulandırılmış primerler, -20 °C dolabında muhafaza edilmektedir [124]. Bu çalışmada kullanılan primerler aşağıdaki gibidir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan primer listesi.

Primer adı	Sekansı	Tm
pCCLuxIRvioAE-Backb-F	atatcggaagaatgcttcataatttactcttcctcggaatg	67.3 °C
pCC-Backb-F	gcgctgagcgaagagctatctgacagaacagtcttc	70.6 °C
pCCLuxIRvioAE-Backb-R	tcttcgcccaagcgcctagtaattggggtgaataaccggc	76.2 °C
pCC-Backb-R	gaagaactgtctgtcagatagctcttacgctcagcgc	70.6 °C
pCC-LuxIR-vioAE-F	cgaaggaagagtaaattatgatgaagcattctccgatatctgcattgtcg	70.4 °C
vioCBR	ccgactatgattgctctttcatttcaggcctctctagaagc	67 °C
vioCBF	gctttctagagaggcctgaaatgaaaagagcaatcatagtcgg	67 °C
pCC-LuxIR-vioAE-R	ttattcaacccaattactagcgttgccggcgaagacggcg	76.3 °C

Phusion Polimeraz Enzimi

DNA polimeraz yeni bir DNA sekansı sentezleyebildiği için PCR reaksiyonların “olmazsa olmazıdır”. İlk PCR protokollerden bu yana, Taq DNA polimeraz en yaygın kullanılan polimeraz çeşitlerinden biridir. Taq polimerazın, farklı sıcaklıklara dayanıklılığı PCR reaksiyonlarının başarılı geçmesi için önemli bir adımdır. Günümüzde, birçok geliştirilmiş özel polimeraz enzimi bulunmaktadır. Bu polimerazlar,

spesifik DNA sekansı çoğaltır, termostabillerdir, ve güvenilirlerdir.Çalışmada, NEB şirketinin geliştirdiği High-Fidelity polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Bu enzim, klasik Taq polimeraza göre 50X daha yüksek güvenilirliği sağlamaktadır [125].

3.1.5. Agaroz Jel Elektroforez

Jel Hazırlama

Agaroz jel elektroforez, DNA fragmanlarını moleküler ağırlığına göre ayırt eden kolay ve toksik olmayan bir yöntemdir. Hazırlanan jel matriksi, horizontal bir şekilde tampon içine konulur ve elektroforez seti ile beraber elektrik alanı oluşturulur. DNA negatif yüklü bir moleküldür ve elektrik alanına konulduğu zaman, pozitif kutuba doğru yürümektedir. Agaroz bir polisakarittir ve genelde % 0.5-% 2 konsantrasyonunda jel hazırlanmada kullanılmaktadır. Çalışmada, % 1 konsantrasyonunda agaroz jel hazırlanmaktadır. %1 agaroz içeren 1xTAE çözeltisi kaynatıldıktan sonra, oda sıcaklığında soğuması için biraz bekletilmektedir. Çözelti, yaklaşık 55-65 °C dereceye geldikten sonra, son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür (EtBr) eklenmektedir. Etidyum Bromür, jelin UV ışığın altında görüntülenmesini sağlamaktadır [126]. Hazırlanan jel, tepsiye dökülür. Tarak yardımı ile kuyucuklar oluşturulur ve onlara DNA numuneler ile birlikte DNA Ladder Marker da yüklenir. Daha büyük DNA molekülleri (fragmanları), jelin başında, kuyucuklara daha yakın bölgelerde takılı kalıp, daha küçük DNA fragmanları ise kuyucuklardan daha uzak yürümektedir. DNA Ladder Marker standart yardımı ile DNA büyüklüklerini karşılaştırmaktayız. Bu çalışmada, Hibrigen markasına ait DNA Ladder Marker kullanılmıştır. Daha sonra jel elektroforez ile doğrulama yapılmaktadır. Beklenen büyüklükte bant çıktığı takdirde, PCR deneyimiz doğrulanmış olmaktadır [116].

Jel Görüntüleme

Çalışmada, jel görüntülemesi Syngene markasına ait G:Box model görüntüleme sistemi kullanılarak yapılmıştır [127].

3.1.6. Gibson Assembly Metodu ve Malzemeleri

Gibson Assembly Metodu, 2009 yılında Daniel Gibson tarafından geliştirilen,

verimi yüksek, DNA fragmanlarını uçlarından birbirine bağlamayı esas alan yeni bir klonlama metottur. “Dikişsiz” bir süreçtir ve yeni oluşan plazmidler de yara izi bulunmamaktadır.

Öncelikle, yeni inşa edilecek olan plazmidin parçalarına karar verilir. Uygun plazmid backbone seçilir ve insertler elde edilir. Birbirine bağlanacak olan farklı DNA fragmanların uçların dizileri birbirine uyumlu olmalıdır. Bu nedenle, DNA fragmanları PCR deneyi ile elde etmeden önce, Gibson Assembly’ye uygun primerleri tasarlamak gerekir. Doğru primerler ile birlikte, PCR reaksiyonlardan elde ettiğimiz ürünleri başarılı bir şekilde Gibson Assembly reaksiyonunda birleştirip yeni plazmid oluşturabiliriz.

Gibson reaksiyonu, 3 ana enzim ile çalışmaktadır. T5 enzimi, 5’ ucunun kesimi ile uçların açılmasını sağlamaktadır ve dolayısıyla yapışkan uçları oluşturmaktadır. Ortamda dNTPler mevcut olduğundan, baz eşleştirmesi yer almaktadır ve Phusion DNA Polimeraz enzimi ile yeni oluşan plazmidin boşlukları doldurulmaktadır. Son olarak, Taq Ligaz enzimi plazmiddeki yarıkları kapatmaktadır [128, 129].

Gibson reaksiyonu gerçekleştirmek için hazır Gibson Master Mix satın alınabilir veya laboratuvar ortamında hazırlanabilir [130].

Gibson Master mix laboratuvar ortamında hazırlamak için gerekli olanlar:

- 320 µl 5X ISO tamponu
- 0.64 µl 10 U/µl T5 egzonukleaz
- 20 µl 2 U/µl Phusion polimeraz
- 160 µl 40 U/µl Taq ligaz
- 1.2 ml’ye tamamlamak için nukleaz-free dH₂O
- 15 µl’ye bölünür ve -20 °C bir yıl kadar saklanabilmektedir.

ISO tamponu hazırlamak için:

- 3 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.5)
- 150 µl 2 M MgCl₂
- 60 µl 100 mM dGTP
- 60 µl 100 mM dATP
- 60 µl 100 mM dTTP

- 60 µl 100 mM dCTP
- 300 µl 1 M DTT
- 1.5 g PEG-8000
- 300 µl 100 mM NAD
- 6 ml'ye tamamlamak için nukleaz-free dH₂O eklenir.

3.1.7. Transformasyon

Rekombinant suşları elde etmek adına, bakterilere yabancı DNA'yı transformasyon deneyi ile tanıtmak gereklidir. Bu çalışmada, transformasyon aşaması elektroporasyon tekniği ile gerçekleştirildi. Elektroporasyon tekniğinde, elektroporator cihazın yardımı ile bakteri hücrelere kısa süreli bir elektriksel alanı uygulamaktadır. Böylece hücreler, etrafında bulunan yabancı DNA'ları içine alabilmektedir. Elektroporasyon işleminden sonra, hücreler zengin SOC medyumda 45 dk-1 saat inkube edilmektedir ve daha sonra selektif petrilere ekim yapılmaktadır.

Elektroporasyon zaman kazandırıcı ve pek masraflı olmayan bir tekniktir. Bu deneyi yapmak için kompetent hücreler, insert DNA (istediğimiz plazmid), SOC medyum, elektroporator küveti, elektroporator cihazı ve antibiyotik içeren agar besi yeri gerekmektedir [116]. Kullandığımız elektroporator cihazı, eppendorf markasına aittir.

3.2. METOT

3.2.1. *C. violaceum* bakterinin büyütülmesi ve genomik DNA izolasyonu

C. violaceum ATCC 12472 suşu, kanamycin ve ya ampicilin antibiyotiğini içeren, ya da hiç antibiyotik içermeyen LB besiyerine ekilebilir. Besiyerin pH değeri 7,0 olmalıdır. İnkübatörde 26-37 °C derecede bırakılabilmektedir. Bu suş, yavaş gelişmektedir ve oda sıcaklığında da çok fazla bekletilmemelidir [131]. Violasein pigmenti de yavaş üretmektedir. İnkübasyondan 24 saat sonra hafif mor, 48 saat sonra ise koyu mor rengi almaktadır (Şekil 3.4).

C. violaceum bakterisinin genomik DNA'sını elde etmek için QIAGEN DNEasy ticari kiti kullanıldı [118]. Kiti uygulamadan önce bakteri kültürü agar besi yeri

kullanarak hazırlandı ve overnight bırakıldı. Yine tek koloniyi seçerek, steril kürdan kullanarak sıvı LB besi yerine ekim yapıldı. Bu kültür DNA kaynağı olarak kullanıldı.

Kit, spin kolon teknolojisini kullanmaktadır. Bu çalışmada Gram negatif bakterilerle çalışıldığı için, QIAGEN Dneasy kitapçığından Gram negatif bakterileri için uygun bir protokolü kullanarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi [118]. Elde edilen genomik DNA konsantrasyonu Nanodrop cihazını kullanarak ölçüldü (62 ng/ μ l).



Şekil 3.4. *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472.

3.2.2. pCC1BAC-CcdB Plazmid DNA İzolasyonu

Alıcı hücrenin içereceği pCC1BAC-QS-vioAE plazmid inşasında, pCC1BAC-CcdB plazmid DNA önemli bir rol almaktadır. Backbone olarak kullanılmaktadır, kloramfenikol antibiyotikine karşı dirençlik sağlamaktadır ve gerekli olan Quorum Sensing gen (*luxR*) ve promotörü (P_{luxI}) taşımaktadır. Onu izole etmek için, onu içeren bakteri kültürü önce LB Agar +Cm₂₅ besiyerine ekildi ve overnight olarak büyütüldü. Ertesi gün, steril bir kürdan yardımı ile sıvı LB Broth+Cm₂₅ besi yerine ekildi ve overnight bırakıldı. Daha sonra, QIAGEN MiniPrep kiti kullanarak izole edildi [120]. Konsantrasyonu NanoDrop cihazını kullanarak ölçüldü. Plazmid tek kopya olduğu için relatif düşük bir değer çıkmaktadır (26.320 ng/μl).

3.2.3. pCC1BAC-QS-vioAE Plazmid İnşası

Primerlerin Tasarımı

Öncelikle yeni oluşturulacak olan plazmid (pCC1BAC-QS-vioAE) için hangi fragmanlardan oluşacağını karar verildi. İstenen DNA fragmanları elde etmek için spesifik primerler tasarımına başlandı. PCR reaksiyonlardan sonra bu DNA fragmanların Gibson Assembly tekniği ile birleştirileceği için, primerlerin uçları birbirlerine örtüşen sekanslardan oluşmaktadır [128]. Primerlerin erime sıcaklıkları (T_m) birbirine yakın veya denk olmaları sağlanmaya çalışılmıştır. Primerlerin sekonder bir yapı (primer dimer ve ya saç tokası) oluşturulmaması için dikkat edilmiştir [126].

PCR Reaksiyonları ve Şartları

pCC1BAC-QS-vioAE plazmidini oluşturmak adına violasein operona ve backbone'a ihtiyacımız vardı. Bu sebeple, plazmidi elde etmek için toplamda 4 tane farklı PCR reaksiyonu yapıldı. Vio operonun sekansı uzun (7361 bp) ve kompleks olduğundan, tek bir PCR reaksiyon ile değil, ikiye bölünerek iki ayrı PCR reaksiyon ile elde edildi. Backbone için ise, pCC1BAC-CcdB plazmidi modifiye edildi. Yapılan PCR reaksiyonlar sırayla aşağıda gösterilmiştir.

1) DNA Kaynağı: pCC1BAC-CcdB plazmidi

Kullanılan primerler: pCCLuxIRvioAE-Backb-F ve pCC-Backb-F

Beklenen uzunluk: 5014 bp Reaksiyon şartları:

- 32 µl Nukleaz free dH₂O
- 10 µl 5X HF Tamponu
- 1 µl dNTPler
- 2.5 µl Forward (pCCLuxIRvioAE-Backb-F) primer
- 2.5 µl Reverse (pCC-Backb-F) primer
- 1.5 µl pCC1BAC-Ccdb plazmid DNA
- 0.5 µl Phusion DNA Polimeraz enzimi Thermocycle cihaz şartları:

98°C	30 sn
98°C	10 sn
66°C	30 sn
72°C	75 sn
72°C	5 min
4°C	∞

Altı çizilen adımlar, döngü halinde 35 kez tekrarlanmaktadır.

2) DNA Kaynağı: pCC1BAC-CcdB plazmidi

Kullanılan primerler: pCCLuxIRvioAE-Backb-R ve pCC-Backb-R Beklenen uzunluk:

4435 bp

Reaksiyon şartları:

- 32 µl Nukleaz free dH₂O
- 10 µl 5X HF Tamponu
- 1 µl dNTPler
- 2.5 µl Forward (pCCLuxIRvioAE-Backb-R) primer
- 2.5 µl Reverse (pCC-Backb-R) primer
- 1.5 µl pCC1BAC-Ccdb plazmid DNA
- 0.5 µl Phusion DNA Polimeraz enzimi

Thermocycle cihaz şartları:

98°C	30 sn
<u>98°C</u>	<u>10 sn</u>
<u>72°C</u>	<u>90 sn</u>
72°C	5 min
12°	∞

Altı çizilen adımlar, döngü halinde 35 kez tekrarlanmaktadır.

3) DNA Kaynağı: *C. violaceum* ATCC 12472 (gDNA) Kullanılan primerler: pCC-

LuxIR-vioAE-F ve vioCBR Beklenen uzunluk: 4371 bp

Reaksiyon şartları:

- 32 µl Nukleaz free dH₂O
- 10 µl 5X HF Tamponu
- 1 µl dNTPler
- 2.5 µl Forward (pCC-LuxIR-vioAE-F) primer
- 2.5 µl Reverse (vioCBR) primer
- 1.5 µl gDNA (*C. violaceum* ATCC 12472)
- 0.5 µl Phusion DNA Polimeraz enzimi Thermocycle cihaz şartları:

98°C	3dk
<u>98°C</u>	<u>10 sn</u>
<u>66°C</u>	<u>30 sn</u>
<u>72°C</u>	<u>90 sn</u>
72°C	5 min
12°C	∞

Altı çizilen adımlar, döngü halinde 35 kez tekrarlanmaktadır.

4) DNA Kaynağı: *C. violaceum* ATCC 12472 (gDNA) Kullanılan primerler:

vioCBF ve pCC-LuxIR-vioAE-R

Beklenen uzunluk: 3032 bp Reaksiyon şartları:

- 32 µl Nukleaz free dH₂O
- 10 µl 5X HF Tamponu
- 1 µl dNTPler
- 2.5 µl Forward (vioCBF) primer
- 2.5 µl Reverse (pCC-LuxIR-vioAE-R) primer
- 1.5 µl gDNA (*C. violaceum* ATCC 12472)
- 0.5 µl Phusion DNA Polimeraz enzimi Thermocycle cihaz şartları:

98°C	3dk
98°C	10sn
71°C	30 sn
72°C	70 sn
72°C	5 min
12°C	∞

Altı çizilen adımlar, döngü halinde 35 kez tekrarlanmaktadır.

3.2.4. Gibson Assembly Reaksiyon Şartları

PCR reaksiyonlarda elde edilen 4 fragman QIAGEN kitleri kullanarak saflaştırıldı ve oldukça yüksek konsantrasyonlar elde edildi. Konsantrasyonlar Nanodrop cihaz yardımı ile ölçüldü.

- (1) PCR reaksiyonu sonucunda, 5014 bp uzunluğunda, 229.72 ng/µl konsantrasyonlu bir DNA ürünü elde edildi
- (2) PCR reaksiyonu sonucunda, 4435 bp uzunluğunda, 378,31 ng/µl konsantrasyonlu bir DNA ürünü elde edildi
- (3) PCR reaksiyonu sonucunda, 4371 bp uzunluğunda, 71.76 ng/µl konsantrasyonlu bir DNA ürünü elde edildi
- (4) PCR reaksiyonu sonucunda, 3032 bp uzunluğunda, 308.95 ng/µl konsantrasyonlu bir DNA ürünü elde edildi.

Yukarıda geçen bu 4 fragmanı Gibson Assembly deney yardımı ile birleştirmek üzere, elde ettiğimiz konsantrasyonlara göre reaksiyon şartı oluşturuldu.

0.9 µl 5014 bp DNA fragmanı

0.6 µl 4435 bp DNA fragmanı

2.9 µl 4371 bp DNA fragmanı

0.7 µl 3032 bp DNA fragmanı

5.1 µl toplam.

15 µl Gibson Master Mix içeren PCR tüpüne eklendi (son hacim 20.1 µl olacak şekilde). Reaksiyon tüpü, thermocycle cihazında, 50°C derecede, 1.5 saat boyunca inkube edildi.

3.2.5. Transformasyon Deneyi

Elektrokompetent Hücre Hazırlama

Kompetent hücre satın alma imkânı mevcut olsa da, laboratuvar ortamında da kolayca hazırlanabilmektedir.

Konak hücre olarak kullanılacak olan *E. coli* suşu seçilir ve overnight kültürü büyütülür. NaCl içermeyen bir şişe LB broth (antibiyotiksiz) hazırlanır ve overnight kültürü bu LB besi yerine ekilir (örn. 100 ml besiyere 500 µl kültür eklenir). Ekimden sonra, kültürler inkübasyona bırakılır ve ara sıra spektrofotometrik ölçümlerle OD₆₀₀ değerleri kontrol edilir. OD₆₀₀ değeri 0.35 ile 0.4 olduktan sonra (yaklaşık 2.5-3 saat), kültürler hemen inkubatordan alınır, falkon tüplere aktarılır ve 20 dakika buza gömülür. Daha sonra, soğutmalı santrifüjde 4000 rpm’de, 10 dk boyunca hücreler santrifüjlenir. Süpernatant atılır ve pelet 40 ml steril ve soğuk dH₂O’da çözülür.

Tekrardan 4000 rpm’de 10 dk boyunca santrifüjlenir. Süpernatant atılır ve pelet 10 ml steril %10 gliserol solüsyonunda çözülür.

Çözüldükten sonra, 4000 rpm’de 10 dk boyunca satrifüjlenir. Süpernatant atılır ve kalan pelet, 300 µl %10 gliserol solüsyonunda çözülür. Kompetent hücreleri hazırlama sürecinde, bütün malzemeler buzda gömülü olmalıdır. Hazır olan elektrokompetent

hücreleri, her Eppendorf tüpünde 100 µl olacak şekilde ayarlanmaktadır. Kompetent hücreler, -80 °C dolabında saklanmalıdır [116].

Elektroporasyon

Transformasyon aşamasından önce, Gibson ürünümüz veya elimizde hazır plazmid DNA'sı, 100 µl kompetent hücre ve elektroporator küveti buzda gömülü olmalıdır. SOC recovery besiyeri ve steril kültür tüpü 37 °C derecede olmalıdır.

Gibson ürünü veya plazmid DNA'sını 100 µl kompetent hücelere eklenmektedir. Pipetajla hafif karıştırılmaktadır ve elektroporator küvetine eklenmektedir. Küvet, elektroporator cihazına yerleştirilir ve hücelere çok kısa bir şok uygulanır. Cihaz sinyali verdikten sonra küvet hemen çıkarılır ve 900 µl SOC besi yeri eklenir. Küvet, ters düz çevirerek, SOC besiyerin ve hücrelerin karışmasını sağlanmaktadır. Karışım hemen kültür tüpüne eklenmektedir ve 45 dk-1 saat kadar 37 °C derecesinde inkübasyona bırakılmaktadır.

İnkübasyon bittikten sonra, daha önce hazırlanan iki tane LB agar + uygun antibiyotik içeren petri kutusu çıkarılır. Bir tane petri kutusuna 100 µl kültür ortasına ekilir ve Drigalski spatülü yardımı ile yayılır. Kültürün geri kalanını ise, bir eppendorf tüpüne eklenir ve 5000 rpm'de 3 dk boyunca santrifüjlenir. Süpernatant, peletin üstünde 100-200 µl arası kalacak şekilde atılmaktadır. Pelet ise kalan yaklaşık 100 µl süpernatanta çözülmemektedir. Böylece hücrelerin konsantrasyonu yüksek olan bir karışım elde etmekteyiz. Diğer petri kutusuna geri kalan bu karışımı ortasına ekilir ve Drigalski spatülü ile yayılır.

Petri kutuları, 37 °C derecesinde ayarlanmış etüvde bir geceliğine bırakılmaktadır.

3.2.6. Gönderici Hücrenin Tasarımı

Gönderici hücrenin tasarım özellikleri, AHL sinyalini üretmesini sağlayan *luxI* geni içermesi ve bu genin konstitütif bir promotorun (P_{kons}) kontrolü altında olmasıdır. Gönderici hücrede, *vio* operon ve *luxR* geni bulunmayacaktır. Alıcı hücre ile birlikte aynı antibiyotiğe karşı direnç sağlaması gerekmektedir.

Yukarıdaki şartları tamamlayan Fırat Üniversitesi Biyomühendislik bölümün plazmid kütüphanesinde bulunan pCC-Ptrc-RBS3-rnpT1 plazmididir.

Öncelikle, bu plazmid DNA'sı QIAprep Spin Mini Prep kiti kullanarak izole edildi

ve tek kopya olduğu için relatif düşük konsantrasyonlu bir DNA ürünü elde edilmektedir (15.23 ng/ μ l). İzole edildikten sonra, plazmidin hem NEB hem EPI300 kompetant *E. coli* suşlarına transformasyonu yapıldı.

3.2.7. Ko-kültür Deneyleri

Damlatma Deneyi

Deneyin amacı, bir petride alıcı ve gönderici hücre yan yana bulundurmaktır. Alıcı ve gönderici kültürler hazırlanır. Petrinin ortasına 1 μ l alıcı bir gecelik kültürü damlatılır, ve hemen yanına 1 μ l gönderici bir gecelik kültürü bırakılır. Kontrol olarak bir petriye tek alıcı hücre damlatılır. Böyle hazırlanan petriler oynatmadan 37 °C ayarlanmış etüve bırakılmaktadır. Belirli zaman dilimlerinde büyümeleri ve alıcı hücrenin renk değişimi takip edilmektedir.

Time-Course Deneyi

Time-Course deneyin amacı, farklı suşlarda zamana bağlı violasein üretimini takip edip karşılaştırmaktır. Aynı deney, hem NEB hem de EPI300 *E. coli* suşu için yapıldı. Deneylerde numune olarak, herhangi plazmidi içermeyen *E. coli* konak suşun orijinal hali, *C. violaceum* ATCC 12472, pCC-Ptrc-RBS3-vioAE plazmidi içeren konak hücre, ve 1:20 oranında karıştırılan alıcı ve gönderici ko-kültürü kullanılmıştır.

Rekombinant suşları elde edildikten sonra, bütün kültürler -80 °C dolabından stoktan alınarak, bir gece boyunca inkube edildi. 10 saat geçtikten sonra, kültürler yıkama aşamalarından geçirildi. Öncelikle, 10 saatlik kültürler 4000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüjlendi. Daha sonra, süpernatantı döküp uygun LB besiyeri eklendi ve pelet pipetajla çözüldü. Hücreler tekrardan 4000 rpm, 10 dk boyunca santrifüjlendi ve yine süpernatant dökülüp, üzerlerine uygun LB besiyeri eklendi. Son olarak, pelet pipetajla çözülür. Hücreleri yıkama amacı, pigmenti (az miktarda üretilmiş olsa bile) hücrelerden uzaklaştırmaktır.

Yıkama aşamalarından sonra, hücrelerin 600 nm'de optik yoğunluğu (OD₆₀₀) değeri ölçülür. Aşağıdaki formüle göre bütün kültürlerin OD₆₀₀ değeri 0.01'e çekilir.

$$\text{OD}_{600} \text{ değeri} * X = 0.1 * V$$

(X-alınacak kültür hacmi, V- tamamlanacak olan son hacim, örneğin 10 ml.) [132].

Ko-kültür durumunda, alıcı ve gönderici kültürü ayrı ayrı olarak 0.01'e çekilir ve daha sonra istenen oranda karıştırılır.

OD₆₀₀ değerleri eşleştirdikten sonra, kültürler erlende hafif karıştırılır ve hemen ardından OD₆₀₀ değerleri ölçülür ve pigment ekstraksiyonu yapılır. Ekstraksiyondan sonra da pigmentin spektrofotometrik ölçümü yapılmaktadır. Bu iki aşamalı deney (kültürlerin OD₆₀₀ lçm, ardından ekstraksiyon ve ekstrakte edilen pigmentin spektrofotometrik ölçümü), inkübasyonun 0, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 36, 48, 72 ve 96'inci saatlerinde yapılmaktadır.

Violasein ekstraksiyonu için; 1 ml kültürler 13 000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüjlenir. Süpernatant atılır ve pelet 1 ml DMSO içinde iyice pipetajla, daha sonra da 30 sn vorteksle üzülür. zldkten sonra tekrardan 13 000 rpm'de 10 dk boyunca numuneler santrifüjlenir. İkinci santrifüjden sonra, pelete bulaştırmadan süpernatant dikkatlice pipetle alınır [133, 134]. Ekstrakte edilen violasein pigmenti, Nanodrop veya spektrofotometrede 585 nm'de ölçülür [52, 134]. Kültürlerin büyümelerine bağlı violasein üretimi ünitesini oluşturmak için 585 nm'deki lçmleri, OD₆₀₀ değer ile bölünmektedir (585 nm/OD₆₀₀) [134].

4. BULGULAR

Bu projede, metabolik mühendislik yaklaşımıyla violasein pigmentinin üretileceği sentetik bir ekosistem oluşturarak senkronize populasyon davranışının bir heterolog biyosentetik operonun pigment biyosentez verimi üzerine etkisinin araştırılmasıdır, bu pigmentin doğal üreticiden (*C. violaceum*) daha yüksek miktarda üretilmesi ve dahası, farklı suşlarda ve oluşturulan ko-kültür ekosisteminde pigmentin üretmesinin analizi amaçlanmıştır.

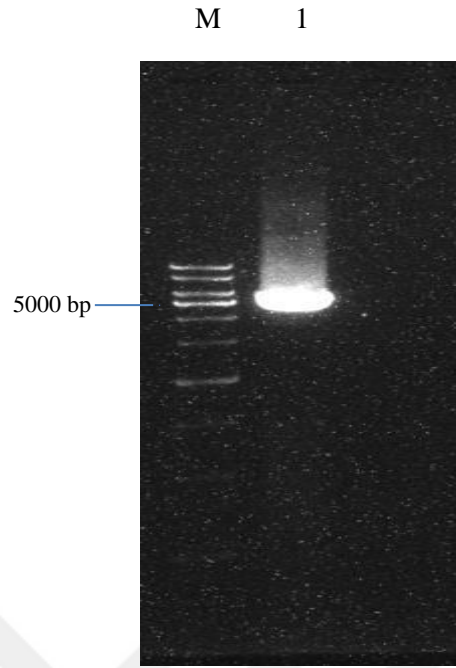
Bu tez çalışmasında, Quorum Sensing mekanizmasını içeren, violasein pigmentini üretecek sentetik bir ekosistem oluşturmak adına, “gönderici” ve “alıcı” hücre olmak üzere iki farklı hücre çeşidi oluşturulmuştur. Gerekli plazmidler tasarlanıp inşa edilerek bu hücreler başarılı bir şekilde elde edilmiştir ve ko-kültür deneylerine başlanmıştır.

4.1. pCC1BAC-QS-vioAE Plazmid İnşası İçin DNA Fragmentlerin Elde Edilmesi

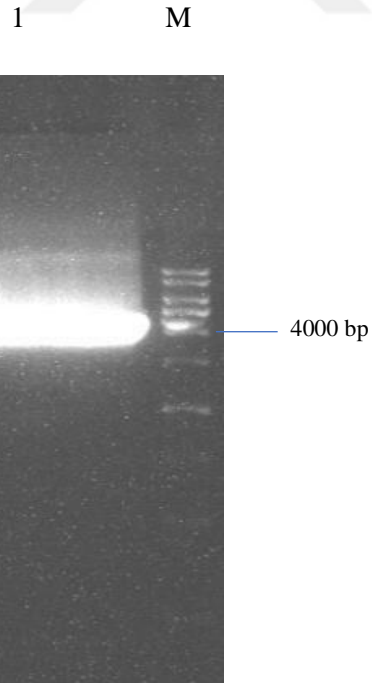
“Alıcı” hücreyi oluşturmak, istenen genlerin dizilmesini (Quorum Sensing ve vio operon) içeren yeni bir plazmid inşa ederek seçtiğimiz konak hücreye konularak gerçekleştirilmiştir. Yeni plazmidin inşasında, kaynak DNA’lar olarak Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünün kütüphanesinde bulunan pCC1BAC-CcdB plazmid DNA’si ve *C. violaceum* gDNA’si kullanılmıştır. pCC1BAC-CcdB plazmidinde bulunan *ccdB* geni, moleküler biyoloji teknikleri ile çıkarılmıştır ve onun yerine vio operon konulmuştur. Toplamda 4 fragment (2 backbone, 2 vio operon fragmenti) başarılı bir şekilde elde edilmiştir.

4.1.1. pCC1BAC-Ccdb Plazmitten Backbone Fragmentlerin Elde Edilmesi

Öncelikle, pCC1BAC-CcdB plazmidini kaynak olarak kullanarak 5014 bp uzunluğunda olan fragment elde edildi (Şekil 4.1.). Bu elde edilen DNA fragmenti, P_{luxR} promotorun kontrolü altında *luxR* genini içermektedir. Ayrıca, P_{luxI} promotoru da içermektedir.



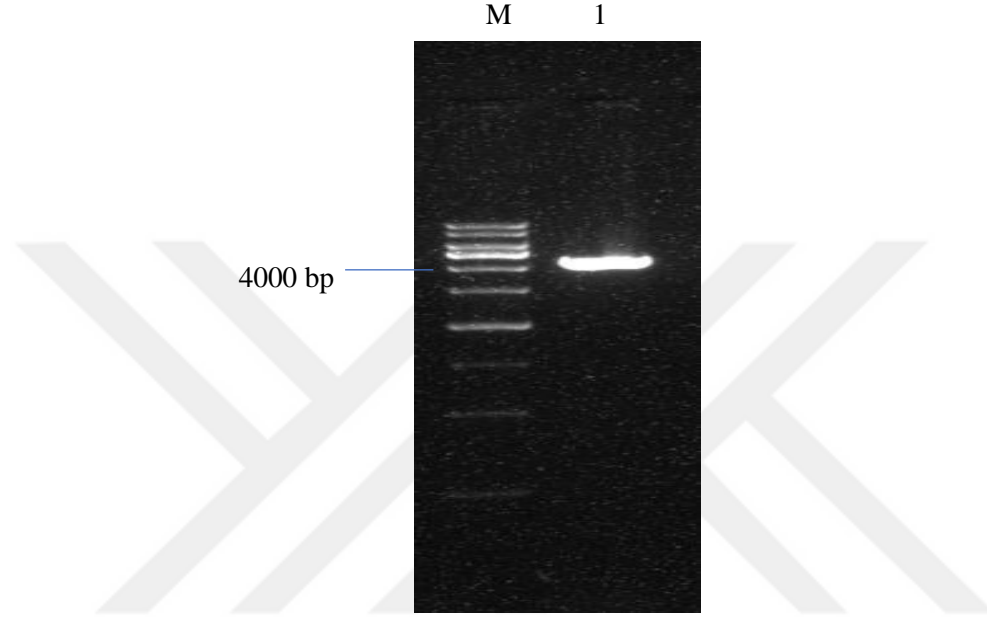
Şekil 4.1. pCC1BAC-CcdB Plazmitten Elde Edilen Backbone Fragment-1.



Şekil 4.2. pCC1BAC-CcdB Plazmitten Elde Edilen Backbone Fragment-2.

Sonrasında, Şekil 4.2.'de gösterilen 4435 bp uzunluğunda pCC1BAC-CcdB plazmidin bir fragmenti daha başarılı bir şekilde elde edildi. Bu DNA fragmentinde, selektif marker *CmR* bulunmaktadır.

4.1.2. *C. violaceum* gDNA'sından Vio Operonun Elde Edilmesi

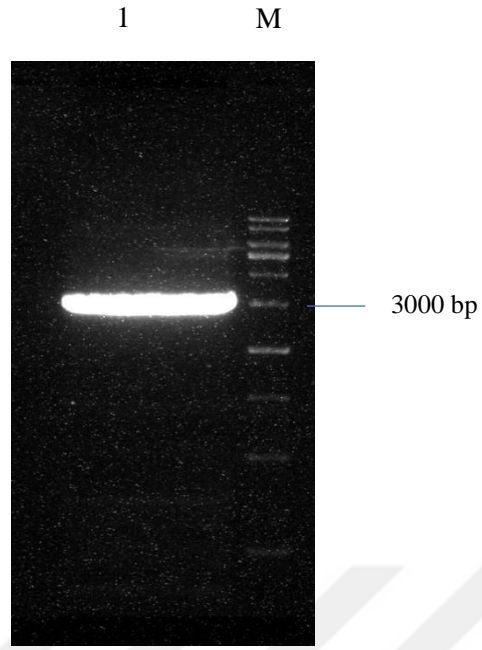


Şekil 4.3. *C. violaceum* gDNA'sından elde edilen Vio Operonun Fragmenti-1.

4371 bp uzunlukta olan fragment, vio operonun ilk kısmından oluşmaktadır (Şekil 4.3). Bu fragment, operonun başlangıç genini *vioA* ve ardından gelen, operonun en uzun genini (~3000 bp) *vioB*'yi içermektedir.

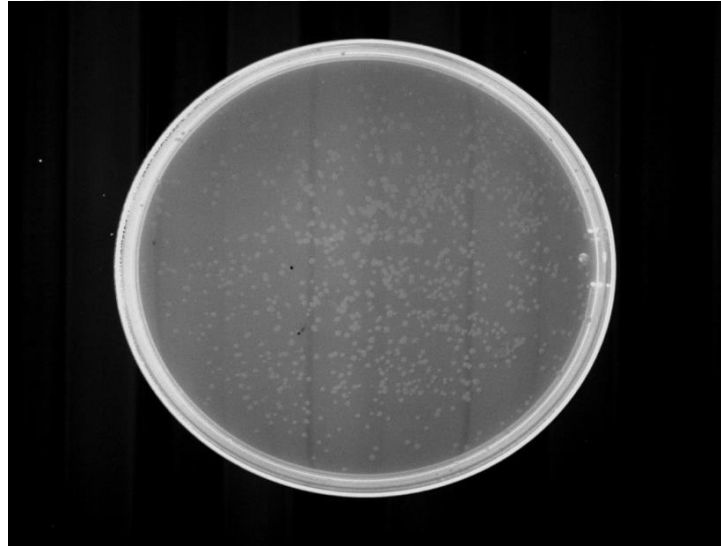
3032 bp uzunlukta olan fragment (Şekil 4.4.), vio operonun devamından oluşmaktadır. *VioC*, *vioD* ve *vioE* genlerinden oluşmaktadır.

Bu PCR'lar ile elde ettiğimiz sonuçlara göre, violacein pigment sentezinden sorumlu olan, beş bitişik genden oluşan vio operon, ~7361 bp uzunluğundadır. Sekansı uzun ve kompleks olduğundan dolayı, genelde ikiye bölünüp PCR ile iki reaksiyonda elde edilmektedir. Sonuçlar, önceki çalışmalar ile uyumludur.



Şekil 4.4. *C. violaceum* gDNA'sından elde edilen Vio Operonun Fragmenti-2.

4.1.3. pCC1BAC-QS-vioAE Plazmidin *E. coli* EPI300 ve 10-beta NEB Suşlarına Aktarılması



Şekil 4.5. Transformasyon sonucu petri kutusunun görüntüsü.

pCC1BAC-QS-vioAE plazmidi, *E. coli* EPI300 ve 10-beta NEB suşlarına aktarıldı. Transformasyon yapılmış LB agar+ Cm₂₅ Petri kutularında birkaç mor koloni gözükmemektedir (Şekil 4.5). Mor pigmentin üretilmesi, plazmidin konak hücrenin içine

girdiğinin göstergesi olmaktadır.

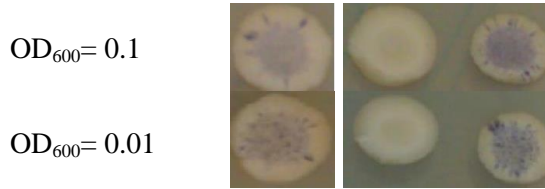
4.1.4. Damlatma Deneyi ve QS Mekanizması

Metot kısmında detaylı anlatılan bu deneyde, damlatma yapmadan önce, bir gecelik olan kültürlerin OD₆₀₀ değerleri eşleştirildi. Deneyde, 0.1 ve 0.01 OD₆₀₀ değerleri başlangıç noktası olarak kullanılmıştır. Bir petri kutusuna sadece alıcı hücre, diğer petri kutusuna ise birbirinden çok uzak olmayacak şekilde gönderici ve alıcı hücre birikildi. Deneyin amacı, gönderici hücre tarafından ortama gönderilen AHL iletişim sinyallerin, alıcı hücrenin üzerindeki etkisini görebilmektedir.

Önceki çalışmalara göre, Quorum Sensing mekanizmasının kararlı haline (steady-state) ulaşması için ortalama olarak 30 saate ihtiyaç duymaktadır [102]. Bizim ekosistemimize bakılarak benzer bir sonuç çıkmaktadır. Hücreler, 24 saat sonrasında hafif mor renk üretilse de, 36 saat ve sonrasında aralarında net bir fark görünmektedir.

Ekimden 36 Saat Sonrası

36 saat sonrasında, gönderici hücrenin yakınında bulunan alıcı hücrenin daha koyu mor renkte olduğunu görebilmekteyiz.



Şekil 4.6. Damlatma deneyi 36 saat sonrası.

Ekimden 48 Saat Sonrası

Ekimden 48 saat sonra, daha net bir fark meydana çıkmaktadır.



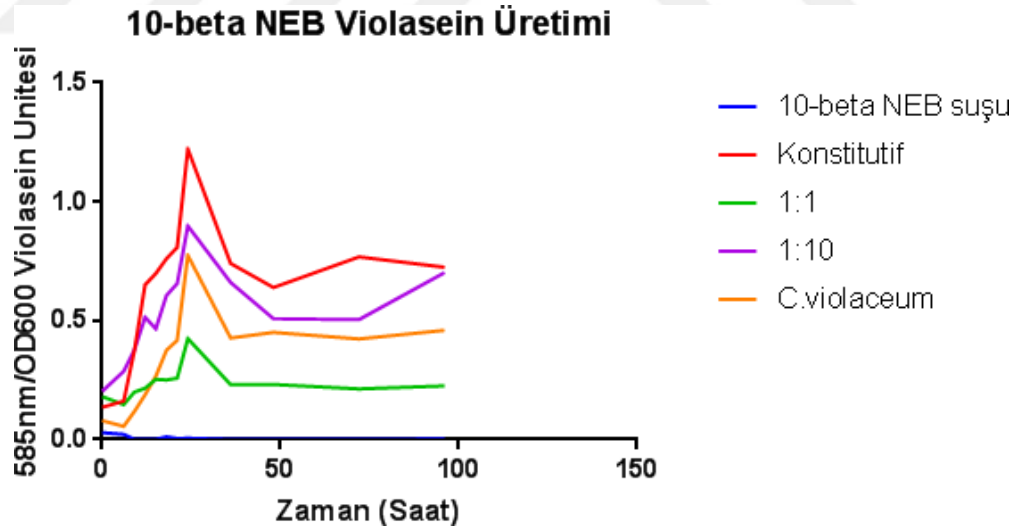
Şekil 4.7. Damlatma deneyi 48 saat sonrası.

4.1.5. Time-Course Deneyleri ve Bulguları

Time-course deneyin amacı, gönderici ve alıcı hücrelerinden oluşturulan ko-kültür sisteminin violasein üretimi üzerinde diğer pigment üreten suşlarla karşılaştırma yapmaktır. Deneylerde, gönderici ve alıcı hücrelerin farklı oranlarda içeren ko-kültürler, pCC-Ptrc-RBS3-vioAE –konstitütif promotörün kontrolü altında violasein üreten plazmidi içeren rekombinan *E. coli* suşları, doğal üretici *C. violaceum*, ve negatif kontrol olarak violasein üretmeyen *E. coli* suşları kullanılmıştır.

Bir Gecelik Kültürler ile Başlatılan Deneyler

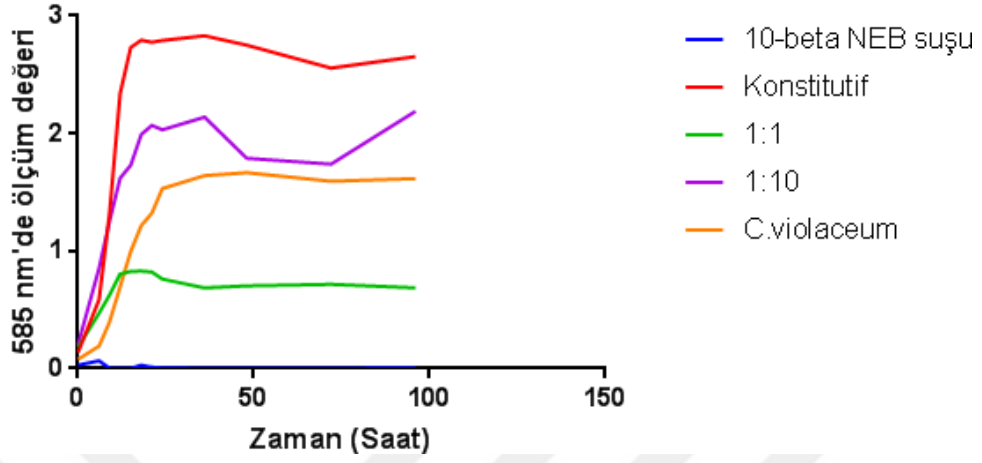
Deneyler, öncelikle bir gecelik kültürleri kullanılarak yapılmıştır. Deney sonuçları Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Bir gecelik kültürler 0.01 OD₆₀₀ değerine çekilmektedir. Kültürler hafif karıştırılıp, 0’ıncı saatteki ölçüm yapıldı. Ardından pigment ekstraksiyonu yapıldı ve 585 nm’de pigmentin ölçümü yapıldı. Pigmentin 585 nm’de ölçümleri, Şekil 4.9.’da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. 10-beta NEB suşunda violasein üretimi (585 nm/OD600)-1.

Ancak, bu şekilde violasein kültürlerde en baştan mevcut olmaktadır ve başlangıç noktaları çok yüksek olmaktadır (Şekil 4.8). Bu sebepten dolayı, time-course deneyi optimize etmeye karar verilmişti.

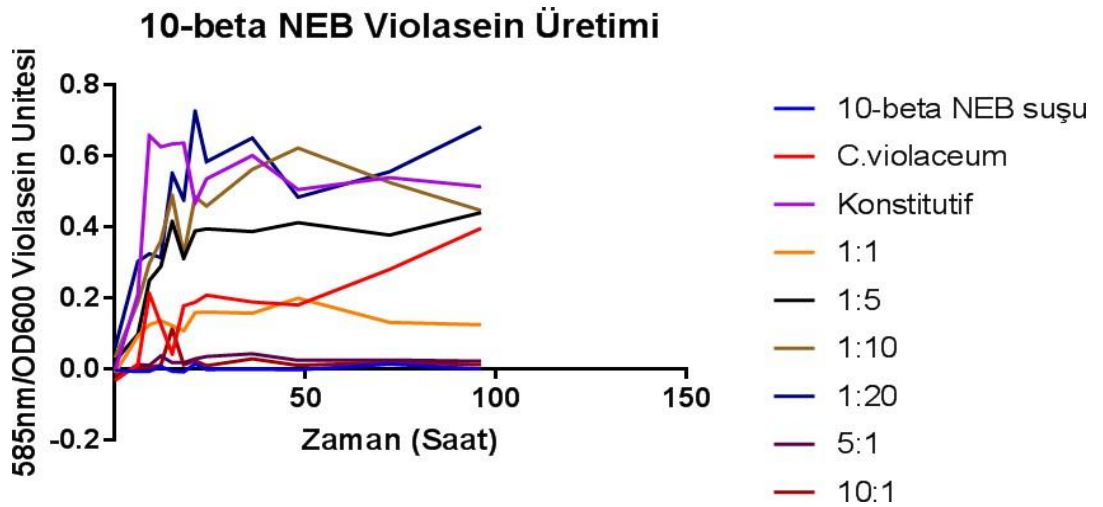
10-beta NEB Violasein Üretimi (585 nm'de)



Şekil 4.9. 10-beta NEB suşunda violasein üretimi (585 nm)- 1.

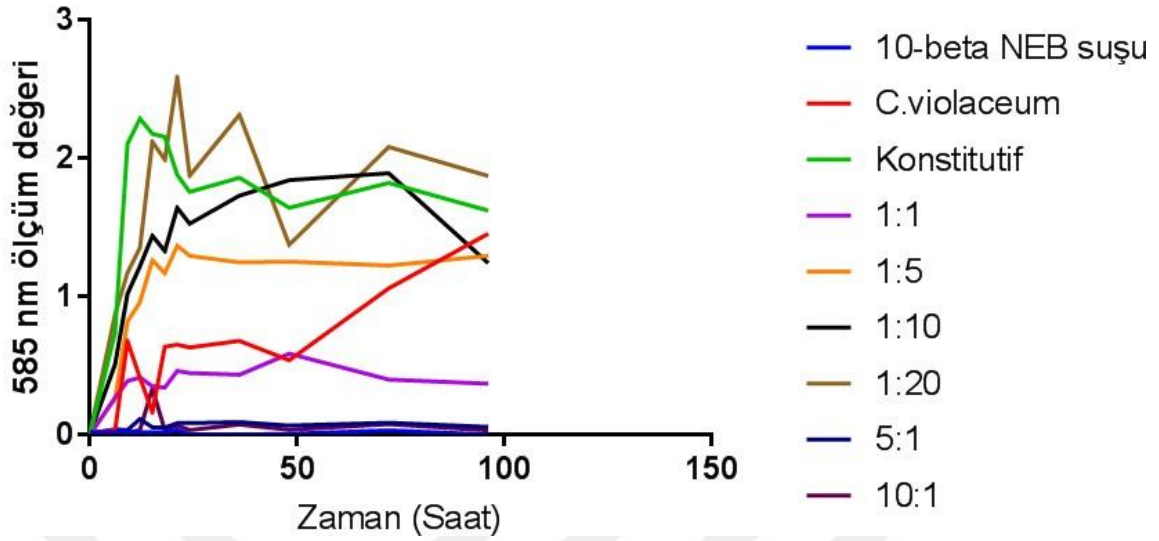
Time-Course Deneyin Optimizasyonu

Hücrelerden violasein pigmentini uzaklaştırmak için, kültürlerin bir gecelik hali değil, 10 saatlik inkübasyondan sonra alınmaktadır. Ayrıca, hücreleri yıkama aşamaları da tanıtılmaktadır. Böylece, başlangıç değerleri daha düşük (0'a yakın) olmaktadır. Bu şekilde, violasein üretimini farklı suşlarda ilk üretim noktasından başlayarak, daha güvenilir bir şekilde takip edilebilmektedir (Şekil 4.10). Pigmentin 585 nm'de ölçümlerin sonuçları, Şekil 4.11.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. 10-beta NEB suşunda violasein üretimi (585 nm/OD600)-2.

10-beta NEB Violasein Üretimi (585 nm'de)



Şekil 4.11. 10-beta NEB suşunda violasein üretimi (585 nm)- 2.

Farklı Suşların Violasein Üretimi Konusunda Karşılaştırılması

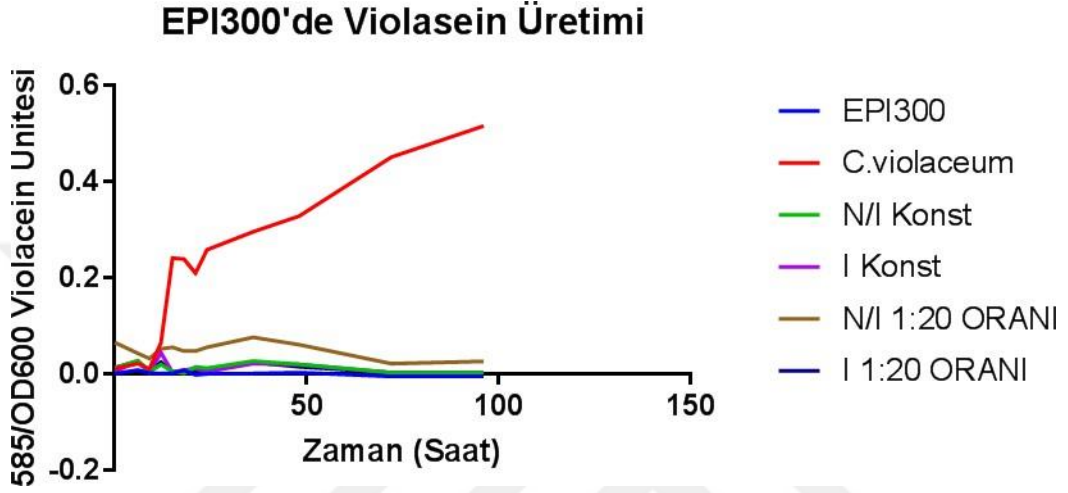
pCC-Ptrc-RBS3-vioAE plazmidi, violaseini en yüksek miktarda üretecek şekilde tasarlanmıştır. Grafiklerden, bu plazmidi taşıyan kültürün, violaseini bu pigmentin doğal üretici olan *C. violaceum*'dan da daha yüksek miktarda üretebildiğini görebilmekteyiz (Şekil 4.10, Şekil 4.11). Ko- kültür şeklinde 1:20 oranında karıştırılan alıcı ve gönderici hücreler, bu plazmidi içeren suşuna violasein üretim konusunda yakın değerlerde bulunmaktadır. Hatta bazı saatlerde violasein üretiminde daha başarılı olmaktadır. Bununla beraber, 1:5 ve 1:10 oranında karıştırılan gönderici ve alıcı hücre kültürleri, doğal üreticiden *C. violaceum*'dan daha başarılı sonuçları vermektedir.

E. coli EPI300 Suşunda Violasein Üretimi

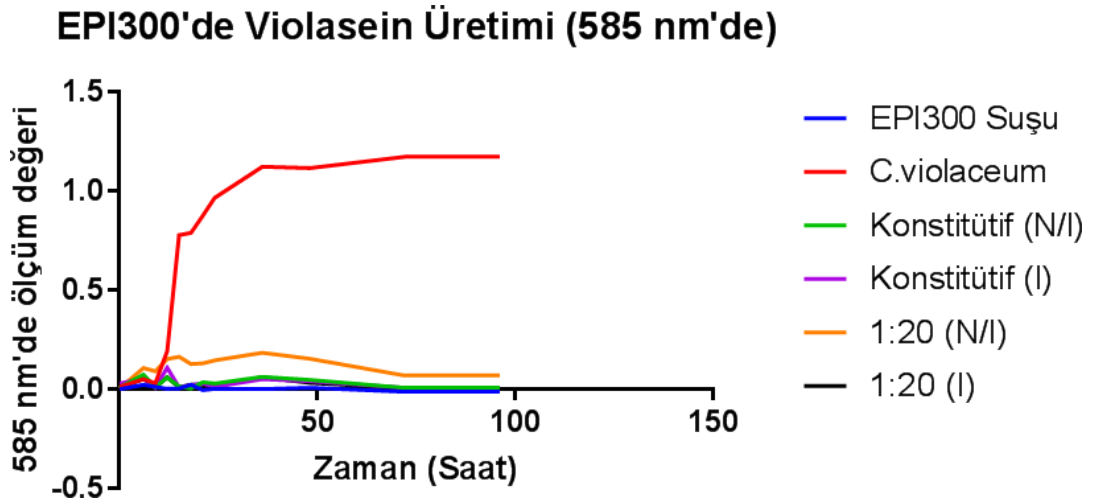
E. coli EPI300 suşuna, pCC-Ptrc-RBS3-vioAE plazmid, gönderici ve alıcı hücre aktarıldı. Gönderici ve alıcı hücreleri, ko-kültür halinde 1:20 oranında karıştırılmıştır. EPI300 suşun, arabinoz indüklemesi yapılabilmektedir. Bu sebepten dolayı, kültürlerin yarısına besi yerlerine 1.33 mM L-arabinoz eklenmişti. Ancak, indükleyici maddeler, metabolit salgısını daha başarılı bir şekilde getirebilmeleri ile beraber, hücrelerin büyümelerini daha azalttırabilmektedir. Bazı ko-kültür deney çalışmalarında, indükleyici eklendiği zamanda ko-kültür halinde olan hücrelerin büyümelerinde keskin

bir düşüş görülmektedir.

Bu çalışmada yapılan deneyde ise, EPI300 soyuna ait hücrelerin hem indüklenmiş hem de indüklenmemiş hali ile çalışılmıştır. İndüklenen ve indüklenmeyen hücre kültürleri arasında pek fark görülmemiştir ve EPI300 suşundaki violasein üretimi, 10-beta NEB suşuna göre daha düşük olmaktadır (Şekil 4.12. ve Şekil 4.13).



Şekil 4.12. EPI300 suşunda violasein üretimi (585 nm/OD₆₀₀).



Şekil 4.13. EPI300 suşunda violasein üretimi (585 nm)-2.

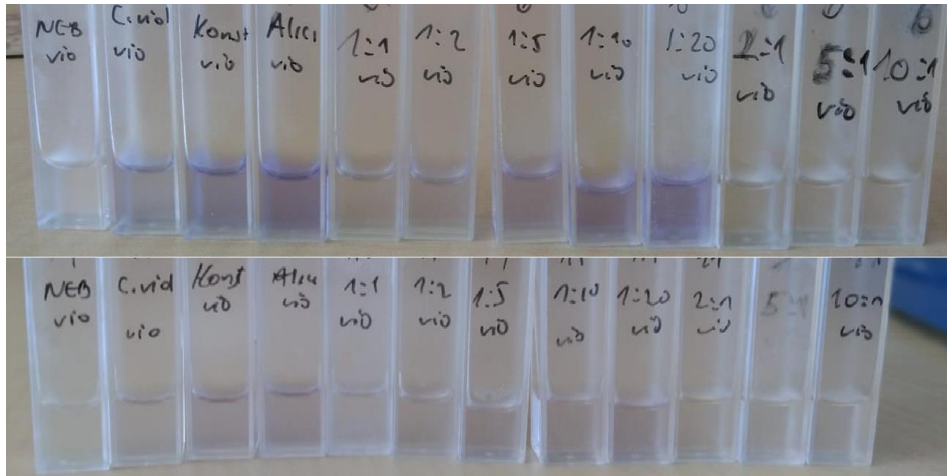
Violasein Pigmentin Özelliklerinin Doğrulanması

Violasein pigmenti DMSO'da çözülebilmektedir ve onu kullanılarak ekstraksiyon yapılabilmektedir. pH 7 değerinde stabil pigment üretimi gerçekleşmektedir. Yapılan spektrofotometrik ölçümlerde, ekstrakte edilen violasein Şekil 4.14.'de gösterildiği gibi 585 nm'de net bir pik göstermektedir. Bu bulgu, önceki çalışmalar ile uyumludur ve doğrudan violaseinin kimyasal yapısının hakkında elde edilen bilgileri doğrulamaktadır. Alken ve karbonil gibi kromofor grupların varlığı, violaseinin 585.72 nm'de güçlü absorpsiyonu sağlamaktadır.



Şekil 4.14. Violaseinin 585 nm'de spektrofotometrik ölçümü.

Violasein pigmenti ilk ekstrakte edildiği anlarda mor renge sahiptir. Saatler geçince, violasein pigmenti rengini kaybetmektedir ve yapısında bozulma olmaktadır. Gün ışığında bırakılan violasein pigmenti, 72 saat sonrasında rengini kaybetmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Farklı suslardan ekstrakte edilen violasein pigmenti. Aşağı: 72 saat sonra gün ışığına maruz kaldığında pigment rengini kaybetmektedir.

5. TARTIŞMA

Bakteriler, günlük hayatımızda önemli rol almaktadır ve bakteriler olmadan, bildiğimiz dünya olmazdı. İnsanlara ciddi zarar verebilecek, patojen olarak sınıflandırılan bakteriler hemen hemen başında bütün şöhreti alsalar da, yine de iyi ve yararlı olarak nitelendirdiğimiz bakterilerden de bahsedilmelidir. “İyi” mikroorganizmalar, insan sindiriminde, bağışıklık sisteminde, vitamin sentezinde vb. önemli rol almaktadır ve onların varlığı insanları sağlıklı duruma getirmektedir. Günlük kullandığımız birçok ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (örn. yoğurt, peynir, sirke vd.) Bakterileri artık daha farklı yararlı fonksiyonlarda da kullanabilmekteyiz, mesela petrol sızıntıları temizlemek için.

Bu sebeplerden dolayı, mikroorganizmalara olan ilgi daha da artmaktadır ve metabolik mühendisliği ile sentetik biyoloji gibi yeni çıkan disiplinler, mikroorganizmaların metabolizmalarını değiştirmek, onlardan yeni parçaları- sentetik gen devrelerini oluşturmak, bakterilerin önemini insanlık için daha farklı bir seviyeye getirmektedir. Sentetik biyoloji prensiplerine dayanan yeni araştırmalar, bakterileri kullanarak ve modifiye ederek, sofistike genetik “cihazları” oluşturabilmektedir. Bu çalışma da Türkiye’de daha yeni adı duyulan bu disiplinin bir parçasıdır.

Deneysel çalışmayı tasarlarken, birkaç önemli husus göz önüne konulmuştur. Öncelikle, rekombinan DNA’ları oluşturmak bu projede çok önemli bir nokta olmaktadır. Birçok plazmid vektör, stabil bir şekilde 10 kb uzunluğunda ya da daha kısa fragmentleri taşıyabilmektedir. Ancak, daha fazla uzunlukta olan klonlama vektörlerde, bazı sorunlar ortada çıkmaktadır, örneğin hücrelerin büyümesi etkilenmektedir ve ya plazmid klonun replikasyon esnasında sıkıntı olabilmektedir. Bu sebeplerden ötürü, BAC (bacterial artificial chromosome) vektör çeşidi seçilmiştir. BAC plazmid vektörler, *E. coli*’de uzun DNA parçaları (100-200 kb kadar) klonlamak ve stabil ekspresyonları sağlamak için tasarlanmıştır. *E. coli* F plazmid’den türev olan BAC replikasyon sistemi, klonlanan vektörlerin hücredeki kopya numarasını kararlı bir şekilde tek kopya olarak tutmaktadır. Bazı DNA parçaları, yüksek kopya olan plazmidlerde stabil olmamaktadır ve BAC plazmidlerde herhangi bir delesyon meydana gelmeden kararlı bir şekilde eksprese edilebilmektedir. BAC plazmitlerin temel inşası genelde, ökaryotik promotor içeren genomik DNA parçası, regülatör öğeler (örn. lokus kontrol bölgesi), istenen

genlerin kodlamasını sağlayan bir ORF (open reading frame), ve ökaryotik poliadenilasyon sinyalinin oluşmaktadır. İlgili alanındaki genleri, genelde marker genleri *lacZ* ve ya *gfp* gibi, bu çalışmada ise mor violasein pigmentin üretmesinden sorumlu olan genler (*vioA-E*) olmaktadır. Bu tez çalışmasında ise, 16 kb uzunluğunda olan bir BAC plazmidi inşa edilip başarılı bir şekilde konak hücreye konulmuştur.

Sistemi tasarlariken önemli bir husus daha Quorum Sensing mekanizmasıdır. Quorum Sensing (oğunluğu algılama) kendinden ayarlı (self-regulated) bir sistem olduğundan herhangi bir indükleyici madde gerektirmemektedir. Bu şekilde QS, mekanizmasını kullanan hücreleri kontrol altında tutabilen, fazla masraf gerektirmeyen bir yaklaşımdır.

Quorum Sensing sistemin çalışmasının güvenilirliği, daha önce yapılan benzer çalışmalarında (predator prey sistemi) ve ya daha yeni araştırmalarda (örn. rekombinan *E. coli*'de QS mekanizmasına dayanan bisabolen üretimi) alınan başarılı sonuçlardan kaynaklanmaktadır. Yapılan bu çalışmalarda, Quorum Sensing genleri ve promotorleri kullanılarak sentetik gen devreleri oluşturulmuştur. Genel olarak P_{luxI} promotorun kontrolü altında ilgili alanlardaki genler konulmuştu. Bu tez çalışmasında da *vio* operonu P_{luxI} promotorun kontrolü altında bulundurmayı karar verilmiştir.

Quorum Sensing mekanizması, yaptığımız literatür taramalarına göre genel yaklaşık 30 saatte steady-state haline ulaşmaktadır. Bu durum, hücre türünden türüne değişebilse de, genel olarak 30 saat ve daha fazlası olabilmektedir. Bu özelliği göz önüne bulundurarak sistemi kurup gelişmesini takip etmek gerekmektedir.

Sentetik gen devrelerini kurmak ile beraber, hücrelerin metabolik yükünü mümkün olduğu kadar hafifletmeye çalışılmalıdır. Fazla metabolik yükünden dolayı, hücrelerin büyüme oranı ve biokütle verimi azaltılabilmektedir. Metabolik mühendisliği ve sentetik biyoloji disiplinleri sekonder metabolit üretmesini daha başarılı hale getirilmesi amaçlanmakta olduğundan dolayı, metabolik yük kesinlikle istenmeyen bir durum olmaktadır ve onu hafifletmek için bazı yöntemlere dayanılmaktadır. Örneğin, maksimum rekombinant gen ekspresyonu sağlamak için çoklu kopya olan plazmidler yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak bu durumda fazla metabolik yükünden oluşan zararlı yan etkiler, bazı metabolik mühendisliği uygulamalarında maksimum üretimini engellemektedir. Bu sebepten dolayı, birçok çalışmada düşük veya tek kopya plazmidi (BAC vektörü gibi) tercih edilmiştir. Endüstri uygulamalarında ise, suşları tasarımında metabolik yükü öngörüleebilecek olan genom ölçekli modeller (genome-scale models-

GSM), 13C metabolik fluks analizi ve makine-öğrenme yaklaşımı (machine-learning approach) gibi yeni yöntemler kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, sentetik ekosistem dikkatlice tasarlanıp kurulmuştur. *E.coli* bakterisinde heterolog pigment üretimi başarı ile gerçekleştirilmiştir. Sistem kurulma aşamasında, violasein operonu ve içeren genler hakkında yapılan önceki çalışmalar doğrulanmıştır. Vio operonun sekansı, PCR çalışmalar ile doğrulanmıştır ve pigmentin doğada üretmesi, tamamen vio operonda olan beş bitişik gene bağlı olduğunu kanıtlamaktadır. Vio operondaki gen sırası (*vioABCDE*) şeklinde olması doğrulanmıştır.

Amaçlarımızdan biri olarak bu değerli pigmenti doğal üreticiden bağımsız bir şekilde konak hücrelerde üretmek ve bu başarı ile gerçekleştirmiştir. Violasein üreten rekombinant 10-beta NEB *E. coli* suşları, daha doğrusu ekosistem haline getirilen bu suşlarda, doğal üreticiden *C. violaceum* ATCC 12472 suşundan daha yüksek miktarda ve daha az süre zarfında violasein üretimi gerçekleştirilmiştir.

Violasein ekstraksiyonu yapmakla beraber, bu yüksek lisans çalışması pigment hakkında önce yapılan karakterizasyon çalışmalar ile uyumludur. Violasein ekstraksiyon protokolü ve üretim ölçümü denenmiştir ve optimize edilmiştir. Pigmentin spektrofotometrik ölçümleri, farklı dış etkenlere (ışık, pH gibi) gösterdiği özellikleri ile beraber, önceki araştırma literatürlere uyumlu olmaktadır. Bütün violasein üreten suşlardan ekstrakte edilen violasein, aynı özellikleri göstermiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu yüksek lisans çalışmasında, bulgular kısmında verilen sonuçlara ulaşılmıştır. Violasein verimi üzerinde kurulan Quorum Sensing mekanizmasına bağlı olan ekosistem, yapısı ve fonksiyonu ile sentetik biyoloji trendlerin de mevcut yapılan benzer araştırmalara eklenmiştir. Türkiye’de sentetik biyoloji alanı ve sentetik gen devrelerin tasarım konusunda ilk öncü çalışmalardan biridir. Böyle çalışmalar şüphesiz hücre-hücre etkileşimlerini aydınlatmaktadır. Bununla beraber, bu çalışma değerli olan bir sekonder metabolitin üretimini daha başarılı hale getirebilmektedir.

Mevcut çalışmaya ek olarak değinilebilecek birkaç konu vardır. Gönderici ve alıcı hücrelerden oluşturulan bu sentetik ekosistemin dinamiğini daha da optimize edilebilir ve aydınlatılabilmektedir. Optimizasyon, farklı parçaları, örneğin farklı promotorleri tanıtarak sistemi denenebilmektedir. Bu adımların ardından, diğer sentetik çalışmalarında yapıldığı gibi ekosistemin ince ayarlanması (fine tuning) yapılabilir. Transkripsiyon ve translasyon aşamasında çeşitli metotlar ile gen regülasyonu sağlayabilmektedir. AHL sinyallerin ortamdaki sayısı ve ölçümü daha detaylı bir şekilde ayarlanıp, gönderici ve alıcı hücrelerden oluşan farklı desenler tasarlanabilmektedir. Sistem, farklı konak hücrelere de taşınabilir ve farklı vektör çeşitlerini kullanarak aktivitesi ölçülebilir.

Farklı endüstriyel alanlarda bu pigmentin ne kadar değerli olduğunu göz önünde bulundursak (özellikle tıbbi uygulamalarında), daha büyük çaplı üretimi için ve endüstri uygulamalarında daha kolay ulaşılabilir hale gelmesi için ilerideki çalışmalarda gerekli adımlar atılabilir.

KAYNAKLAR

1. S Khalil, Ahmad & J Collins, James. (2010). Synthetic Biology: Applications Come of Age. *Nature reviews. Genetics*. 11. 367-79. 10.1038/nrg2775.
2. N. Durán et al. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnology Advances* 34 (2016) 1030–1045
3. B. Miller, Melissa & Bassler, Bonnie. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual review of microbiology*. 55. 165-99. 10.1146/annurev.micro.55.1.165. Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*. 2000;403:339–42.
4. Goers L, Freemont P, Polizzi KM. (2014). Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J. R. Soc. Interface* 11: 20140065. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0065>
5. Atkinson MR, Savageau MA, Myers JT, Ninfa AJ. Development of genetic circuitry exhibiting toggle switch or oscillatory behavior in *Escherichia coli*. *Cell*. 2003;113:597–607
6. Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*. 2000;403:339–42.
7. Elowitz MB, Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*. 2000;403:335–8.
8. Dueber JE, Yeh BJ, Chak K, Lim WA. Reprogramming control of an allosteric signaling switch through modular recombination. *Science*. 2003;301:1904–8.
9. Friedland AE, et al. Synthetic gene networks that count. *Science*. 2009;324:1199– 202.
10. Ham TS, Lee SK, Keasling JD, Arkin AP. A tightly regulated inducible expression system utilizing the *fim* inversion recombination switch. *Biotechnol Bioeng*. 2006;94:1–4.
11. Ham TS, Lee SK, Keasling JD, Arkin AP. Design and construction of a double inversion recombination switch for heritable sequential genetic memory. *PLoS ONE*. 2008;3:e2815.

12. Kramer BP, Fussenegger M. Hysteresis in a synthetic mammalian gene network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:9517–22.
13. Kramer BP, et al. An engineered epigenetic transgene switch in mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 2004;22:867–70.
14. Mukherji S, van Oudenaarden A. Synthetic biology: Understanding biological design from synthetic circuits. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(12):859-871. doi:10.1038/nrg2697.
15. Anderson JC, Voigt CA, Arkin AP. Environmental signal integration by a modular AND gate. *Mol Syst Biol*. 2007;3:133.
16. Guet CC, Elowitz MB, Hsing W, Leibler S. Combinatorial synthesis of genetic networks. *Science*. 2002;296:1466–70.
17. Rackham O, Chin JW. Cellular logic with orthogonal ribosomes. *J Am Chem Soc*. 2005;127:17584–5.
18. Rinaudo K, et al. A universal RNAi-based logic evaluator that operates in mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 2007;25:795–801.
19. Stojanovic MN, Stefanovic D. A deoxyribozyme-based molecular automaton. *Nat Biotechnol*. 2003;21:1069–74.
20. Win MN, Smolke CD. Higher-order cellular information processing with synthetic RNA devices. *Science*. 2008;322:456–60.
21. Basu S, Gerchman Y, Collins CH, Arnold FH, Weiss R. A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature*. 2005;434:1130–4.
22. Hooshangi S, Thiberge S, Weiss R. Ultrasensitivity and noise propagation in a synthetic transcriptional cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:3581–6.
23. Sohka T, et al. An externally tunable bacterial band-pass filter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:10135–40.
24. Danino T, Mondragon-Palomino O, Tsimring L, Hasty J. A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature*. 2010;463:326–30.
25. Kobayashi H, et al. Programmable cells: interfacing natural and engineered gene networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:8414–9.
26. You L, Cox RS, 3rd, Weiss R, Arnold FH. Programmed population control by cell-cell communication and regulated killing. *Nature*. 2004;428:868–71.
27. Mehrotra P. Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2016;6(2):153-159.

doi:10.1016/j.jobcr.2015.12.002.

28. Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Anal Lett.* 2001;34:635–659.
29. Neddermann P, et al. A novel, inducible, eukaryotic gene expression system based on the quorum-sensing transcription factor TraR. *EMBO Rep.* 2003;4:159–65.
30. Boorsma M, et al. A temperature-regulated replicon-based DNA expression system. *Nat Biotechnol.* 2000;18:429–32.
31. French CE, de Mora K, Joshi N, et al. SYNTHETIC BIOLOGY AND THE ART OF BIOSENSOR DESIGN. In: Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats. The Science and Applications of Synthetic and Systems Biology: Workshop Summary. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. A5.
32. Tabor JJ, et al. A synthetic genetic edge detection program. *Cell.* 2009;137:1272–81.
33. Fujimoto H, Wakabayashi M, Yamashiro H, Maeda I, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Miyasaka H, Yagi K. Whole cell arsenite biosensor using photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2006;73(2):332–338.
34. Yoshida K, Inoue K, Takahashi Y, Ueda S, Isoda K, Yagi K, Maeda I. Novel carotenoid-based biosensor for simple visual detection of arsenite: Characterization and preliminary evaluation for environmental application. *Applied and Environmental Microbiology.* 2008;74:6730–6738.
35. Improving Metabolic Pathway Efficiency by Statistical Model-Based Multivariate Regulatory Metabolic Engineering Peng Xu, Elizabeth Anne Rizzoni, Se-Yeong Sul, and Gregory Stephanopoulos *ACS Synthetic Biology* 2017 6 (1), 148-158 DOI: 10.1021/acssynbio.6b00187.
36. Antiplasmodial and trypanocidal activity of violacein and deoxyviolacein produced from synthetic operons. Elizabeth Bilslund et.al. *BMC Biotechnology* 2018;18:22 <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0428-z>
37. Synthetic and systems biology for microbial production of commodity chemicals Victor Chubukov, Aindrila Mukhopadhyay, Christopher J Petzold, Jay D Keasling, Héctor García Martín *NPJ Syst Biol Appl.* 2016; 2: 16009. Published online 2016 Apr 7. doi: 10.1038/npjbsa.2016.9 PMCID: PMC5516863
38. <https://www.sigmaldrich.com/catalog/search?term=violacein&interface=All&N>

=0 &mode=match%20partialmax&lang=en®ion=TR&focus=product

39. Biohackers: The Science, Politics, and Economics of Synthetic Biology. Robert Bolton, Richard Thomas., Innovations: Technology, Governance, Globalization Volume 9 | Issue 1-2 | Winter-Spring 2014 p.213-219, The MIT Press Journals.
40. EcoFlex: A Multifunctional MoClo Kit for E. coli Synthetic Biology. Simon J. Moore, Hung-En Lai, Richard J. R. Kelwick, Soo Mei Chee, David J. Bell, Karen Marie Polizzi, Paul S. Freemont ACS Synth Biol. 2016 May 2 Published online 2016 May 2. doi: 10.1021/acssynbio.6b00031
41. Ranjan, Ravi & Prasad, Satish. (2011). Metabolic Engineering of Bacteria. Indian journal of microbiology. 51. 403-9. 10.1007/s12088-011-0172-8.
42. Engineering Cellular Metabolism Nielsen, Jens et al. Cell, Volume 164, Issue 6 , 1185 – 1197
43. Metabolic Engineering: Past and Future. Benjamin M. Woolston, Steven Edgar, Gregory Stephanopoulos. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering 2013 4:1, 259-288
44. Fisher AK, Freedman BG, Bevan DR, Senger RS. A review of metabolic and enzymatic engineering strategies for designing and optimizing performance of microbial cell factories. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2014;11(18):91-99. doi:10.1016/j.csbj.2014.08.010.
45. Nishizaki T, Tsuge K, Itaya M, Doi N, Yanagawa H. Metabolic Engineering of Carotenoid Biosynthesis in *Escherichia coli* by Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis* . *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(4):1355-1361. doi:10.1128/AEM.02268-06.
46. Lu, Q.; Bu, Y.-F.; Liu, J.-Z. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Producing Astaxanthin as the Predominant Carotenoid. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 296.
47. Li, XR., Tian, GQ., Shen, HJ. et al. J Ind Microbiol Biotechnol (2015) 42: 627. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1565-6>
48. Yang J, Guo L. Biosynthesis of β -carotene in engineered E. coli using the MEP and MVA pathways. *Microbial Cell Factories*. 2014;13:160. doi:10.1186/s12934-014-0160-x.
49. Rodrigues, A.L., Trachtmann, N., Becker, J., Lohanatha, A.F., Blotenberg, J., oltten, C.J., et al.,2013. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein. *Metab. Eng.* 20, 29–41.

- 50.** Mengmeng Li, Ying Sun, Si-an Pan, Wei-wei Deng, Oliver Yu and Zhengzhu Zhang *RSC Adv.*, 2017, **7**, 56382 DOI:10.1039/C7RA10986E
- 51.** Fang, M.-Y., Zhang, C., Yang, S., Cui, J.-Y., Jiang, P.-X., Lou, K., et al., 2015. High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway. *Microb. Cell Factories* (2015)
- 52.** Ahmad, W.A., Yusof, N.Z., Nordin, N. et al. *Appl Biochem Biotechnol* (2012) 167: 1220. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9553-7>
- 53.** Durán, M., Faljoni-Alario, A., Durán, N., 2010. *Chromobacterium violaceum* and its important metabolites – review. *Folia Microbiol.* **55**, 535–547.
- 54.** Lee ME, Aswani A, Han AS, Tomlin CJ, Dueber JE. Expression-level optimization of a multi-enzyme pathway in the absence of a high-throughput assay. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(22):10668-78.
- 55.** Corpe, WA (1961) Accumulation of Indole Compounds in Cultures of *Chromobacterium violaceum*. *Nature*, April 1961 vol.190 no. 4711 113 -198
- 56.** Sebek OK, Jager H (1962) Divergent Pathways of Indole Metabolism in *Chromobacterium violaceum*. *Nature*, November 1962 vol.196 no.4856 703 -798
- 57.** Queiroz, K.C., Milani, R., Ruela-de-Sousa, R.R., Fuhler, G.M., Justo, G.Z., Zambuzzi, W.F., et al., 2012. Violacein induces death of resistant leukaemia cells via kinome reprogramming, endoplasmic reticulum stress and Golgi apparatus collapse. *PLoS One* **7**, e45362.
- 58.** Ferreira, C.V., Bos, C.L., Versteeg, H.H., Justo, G.Z., Durán, N., Peppelenbosch, M.P., 2004. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood* **104**, 1459–1464.
- 59.** Castro-Gomes, T., Cardoso, M.S., Da Rocha, W.D., Laibida, L.A., Nascimento, A.M.A., Zuccherato, L.W., et al., 2014. Identification of secreted virulence factors of *Chromobacterium violaceum*. *J. Microbiol.* **52**, 350–353.
- 60.** Ballestrero, F., Daim, M., Penesyan, A., Nappi, J., Schleheck, D., Bazzicalupo, P., et al., 2014. Antinematode activity of violacein and the role of the insulin/IGF-1 pathway in controlling violacein sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **9**, e109201.
- 61.** Becker, M.H., Brucker, R.M., Schwantes, C.R., Harris, R.N., Minbiole, K.P., 2009. The bacterially produced metabolite violacein is associated with survival of

- amphibians infected with a lethal fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6635–6638.
62. Cazoto, L.L., Martins, D., Ribeiro, M.G., Durán, N., Nakazato, G., 2011. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J. Antibiotics (Tokyo)* 64, 395–397.
63. Berni, E., Marcato, P.D., Nakazato, G., Kobayashi, R.K.T., Vacchi, F.I., Umbuzeiro, G.A., et al., 2013. Violacein/poly(ϵ -caprolactone)/chitosan nanoparticles against bovine mastitis: antibacterial and ecotoxicity evaluation. *J. Phys. Conf. Ser.* 429, 012030.
64. Kallmayer, V., Lanzendoerfer, G., Meiring, U., Mocigemba, N., Riedel, H., Schaefer, J., et al., 2007. Cosmetic preparations containing violacein as dye. *Ger Offen DE 102005051869 (A1)*.
65. Subramaniam, S., Ravi, V., Sivasubramanian, A., 2014. Synergistic antimicrobial profiling of violacein with commercial antibiotics against pathogenic micro-organisms. *Pharm. Biol.* 52, 86–90.
66. Andrighetti-Fröhner, C.R., Antonio, R.V., Creczynski-Pasa, T.B., Barardi, C.R.M., Simões, C.M.O., 2003. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio J.)* 98, 843–848.
67. Konzen, M., De Marco, D., Cordova, C.A., Vieira, T.O., Antônio, R.V., Creczynski-Pasa, T.B., 2006. Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 8307–8313.
68. Venil, C.K., Zakaria, Z.A., Ahmad, W.A., 2013. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochem.* 48, 1065–1079.
69. Suryawanshi, R.K., Patil, C.D., Borase, H.P., Narkhede, C.P., Stevenson, A., Hallsworth, J.E., et al., 2015. Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens. *Intern. J. Cosm. Sci.* 37, 98–107.
70. Choi, S.Y., Kim, S.B., Mitchell, R.J., 2015b. High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigra* str. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 5, 15598.
71. Alkhalaf, L.M., Ryan, K., 2015. Biosynthetic manipulation of tryptophan in bacteria: pathways and mechanisms. *Chem. Biol.* 22, 317–328.
72. Balibar, C.J., Walsh, C.T., 2006. In vitro biosynthesis of violacein from L-

tryptophan by the enzymes VioA–E from *Chromobacterium violaceum*. *Biochemistry* 45, 15444–15457.

73. DeMoss RD, Evans NR (1957) L-Tryptophan metabolism in *Chromobacterium violaceum*. *Bacteriol Proc.* 117

74. Hirano, H., Asamizu, S., Onaka, H., Shiro, Y., Nagano, S., 2008. Crystal structure of VioE, a key player in the construction of the molecular skeleton of violacein. *J. Biol. Chem.* 283, 6459–6466.

75. Ryan, K.S., Balibar, C.J., Turo, K.E., Walsh, C.T., Drennan, C.L., 2008. The violacein biosynthetic enzyme VioE shares a fold with lipoprotein transporter proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 6467–6475.

76. Yang, C.H., Li, Y.H., 2011. *Chromobacterium violaceum* infection: a clinical review of an important but neglected infection. *J. Chin. Med. Assoc.* 74, 435–441.

77. Rai, R., Karnaker, V.K., Shetty, V., Krishnaprasad, M.S., 2011. *Chromobacterium violaceum* septicaemia-a case report. *Al Ameen J. Med. Sci.* 4, 201–203.

78. Hoshino, T., 2011. Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 1463–1475.

79. Seong Yeol Choi, Kyoung-hye Yoon, Jin Il Lee, and Robert J. Mitchell, “Violacein: Properties and Production of a Versatile Bacterial Pigment,” *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 465056, 8 pages, 2015. doi:10.1155/2015/465056

80. A. S. Mendes, J. E. de Carvalho, M. C. T. Duarte, N. Durán, and R. E. Bruns, “Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production,” *Biotechnology Letters*, vol. 23, no. 23, pp. 1963–1969, 2001.

81. Chaudhari, V., Gosai, H., Raval, S., Kothari, V., 2014. Effect of certain natural products and organic solvents on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *Asian Pac J Trop Med* 7 (Suppl. 1), S204–S211.

82. Nealson KH, Hastings JW. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43:496–518

83. Bassler BL, Losick R (2006) Bacterially speaking. *Cell* 125(2):237–246

84. Czarán T, Hoekstra RF. 2009. Microbial communication, cooperation and cheating: Quorum sensing drives the evolution of cooperation in bacteria. *PLoS ONE* 4:e6655
85. Dandekar AA, Chugani S, Greenberg EP. 2012. Bacterial quorum sensing and metabolic incentives to cooperate. *Science* 338:264–66
86. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176:269–75
87. Kong, W., Celik, V., Liao, C. et al. *Bioresour. Bioprocess.* (2014) 1: 24. <https://doi.org/10.1186/s40643-014-0024-6>
88. Xavier JB, Foster KR. 2007. Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:876–81
89. Xavier JB, Kim W, Foster KR. 2011. A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 79:166–79
90. Schuster M, Sexton D, Joseph, Diggle, SP, Greenberg EP. Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing: From Evolution to Application *Annu. Rev. Microbiol.* 2013.67:43-63.
91. Aranda, S., Montes-Borrego, M., Landa, B.B., 2011. Purple pigmented violacein- producing *Duganella* spp. inhabit the rhizosphere of wild and cultivated olives in Southern Spain. *Microbial. Ecol.* 62, 446–459.
92. Maeda T, Garcia-Contreras R, Pu M, Sheng L, Garcia LR, et al. 2012. Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. *ISME J.* 6:493–501
93. Kohler T, Perron GG, Buckling A, van Delden C. 2010. Quorum sensing inhibition selects for virulence and cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 6:e1000883
94. Keller L, Surette MG. 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:249–58
95. Diggle SP. 2010. Microbial communication and virulence: lessons from evolutionary theory. *Microbiology* 156:3503–12
96. Balagaddé FK, Song H, Ozaki J, Collins CH, Barnet M, Arnold FH, et al. A synthetic *Escherichia coli* predator–prey ecosystem. *Mol Syst Biol.* 2008;4:187.
97. Jones, John & Wang, Xin. (2017). Use of bacterial co-cultures for the efficient production of chemicals. *Current opinion in biotechnology.* 53. 33-38.

10.1016/j.copbio.2017.11.012.

- 98.** Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. 1998 Microfabrication of hepatocyte/fibroblast co-cultures: role of homotypic cell interactions. *Biotechnol. Progress* 14, 378–387. (doi:10.1021/bp980036j)
- 99.** Mehes E, Mones E, Ne'meth V, Vicsek T. 2012 Collective motion of cells mediates segregation and pattern formation in co-cultures. *PLoS ONE* 7, e31711. (doi:10.1371/journal.pone.0031711)
- 100.** Harcombe W. 2010 Novel cooperation experimentally evolved between species. *Evolution* 64, 2166–2172. (doi:10.1111/j.1558-5646.2010.00959.x)
- 101.** Zeidan AA, Radstrom P, van Niel EW. 2010 Stable coexistence of two *Caldicellulosiruptor* species in a de novo constructed hydrogen-producing coculture. *Microb. Cell Factories* 9, 102. (doi:10.1186/1475-2859-9-102)
- 102.** Weber W, Baba M, Fussenegger M. 2007 Synthetic ecosystems based on airborne inter- and intrakingdom communication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 10435–10440. (doi:10.1073/pnas.0701382104)
- 103.** Payne S, Smith RP, You L. 2012 Quantitative analysis of the spatiotemporal dynamics of a synthetic predator–prey ecosystem. *Methods Mol. Biol.* 813, 315–330. (doi:10.1007/978-1-61779-412-4_19)
- 104.** Bacchus W, Lang M, El-Baba MD, Weber W, Stelling J, Fussenegger M. 2012 Synthetic two-way communication between mammalian cells. *Nat. Biotech.* 30, 991–996. (doi:10.1038/nbt.2351)
- 105.** Jessup CM, Kassen R, Forde SE, Kerr B, Buckling A, Rainey PB, Bohannan BJ. 2004 Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. *Trends Ecol. Evol.* 19, 189–197. (doi:10.1016/j.tree.2004.01.008)
- 106.** Fukuda J, Khademhosseini A, Yeh J, Eng G, Cheng J, Farokhzad OC, Langer R. 2006 Micropatterned cell cocultures using layer-by-layer deposition of extracellular matrix components. *Biomaterials* 27, 1479–1486. (doi:10.1016/j.biomaterials.2005.09.015)
- 107.** Shou WY, Ram S, Vilar JMG. 2007 Synthetic cooperation in engineered yeast populations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 1877–1882. (doi:10.1073/pnas.0610575104)
- 108.** <http://2012.igem.org/Team:UCSF>

- 109.** Kerner A, Park J, Williams A, Lin XN. A Programmable *Escherichia coli* Consortium via Tunable Symbiosis. Sandler SJ, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e34032. doi:10.1371/journal.pone.0034032.
- 110.** Kumar, M. R. (2012). *Chromobacterium violaceum*: A rare bacterium isolated from a wound over the scalp. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 2(1), 70–72. <http://doi.org/10.4103/2229-516X.96814>
- 111.** <https://international.neb.com/products/c3019-neb-10-beta-competent-e-coli-high-efficiency#Product%20Information> , (28.08.2018)
- 112.** <https://www.lucigen.com/docs/manuals/MA172E-TMax-EPI300-cells.pdf>
- 113.** Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D’Ari, R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746–8749. <http://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
- 114.** <https://www.addgene.org/protocols/pouring-lb-agar-plates/>
- 115.** <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/antibiotics/>
- 116.** Sambrook, J. and D. Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* . 2001.
- 117.** <https://qa-preproduction.qiagen.com/br/resources/faq?id=d3be05d0-ec02-4ced-aabe-dcd2a1061920&lang=en>
- 118.** http://diagnostics1.com/MANUAL/General_Qiagen.pdf
- 119.** http://www.indiana.edu/~lchenlab/protocol_files/agarose_gel_extraction.pdf
- 120.** <https://www.qiagen.com/gb/resources/resourcedetail?id=89bfa021-7310-4c0f-90e0-6a9c84f66cee&lang=en>
- 121.** <https://www.neb.com/products/b1500-nuclease-free-water#Product%20Information>
- 122.** <https://international.neb.com/products/b0518-phusion-hf-buffer-pack#Product%20Information>
- 123.** <https://international.neb.com/products/n0447-deoxynucleotide-dntp-solution-mix#Product%20Information>
- 124.** <https://genplaza.com.tr/primer-sentezi/>
- 125.** <https://international.neb.com/products/m0530-phusion-high-fidelity-dna-polymerase#Product%20Information>
- 126.** Celik, V., 2010. *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enzimindeki aktif bölge halkasının ve kofaktör bağlanma bölgesinin diğer apikompleksan laktat dehidrogenaz

enzimleri ile karşılaştırmalı analizi. *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 51-52s.

127. <http://genplaza.com.tr/kemiluminesans-goruntuleme-sistemleri/syngene-gbox-chemi-xrq/>

128. Gibson, D.G. *et al.* *Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases.* *Nat. Methods* **6**, 343–345 (2009).

129. <https://www.addgene.org/protocols/gibson-assembly/>

130. <http://miller-lab.net/MillerLab/protocols/molecular-biology-and-cloning/gibson-assembly/>

131. https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/12472.aspx?geo_country=tr#generalinformation

132. http://2010.igem.org/wiki/images/f/fd/OD600_Cell_Dilution_Protocol.pdf

133. Choo JH, Rukayadi Y, Hwang JK. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Lett Appl Microbiol* 2006;42:637-41.

134. RAVAL, Shreya *et al.* Effect of low power microwave radiation on pigment production in bacteria. *Microbiology Research*, [S.1.], v. 5, n. 1, dec. 2014. ISSN 2036-7481.

ÖZGEÇMİŞ

Ivona POCRNJA

Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü

23119 ELAZIĞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Yeri: Ilidza, Bosna Hersek Doğum Tarihi: 11.08.1993.

Medeni Durum: Bekâr Ana Dil: Boşnakça

Yabancı Dil: İngilizce, Türkçe

Elektronik posta: ivonapocrnja@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

2015-2018: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

2012-2015: International Burch University, Mühendislik ve Bilgi Teknoloji Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü

2008-2012: Richmond Park International High School Sarajevo

İŞ TECRÜBESİ

Araştırmacı, Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Sentetik Biyoloji ve Metabolik Mühendisliği Laboratuvarı, Elazığ 2018.

PROJELER

Sentetik Bir Ekosistem Oluşturarak Çoğunluğu Algılama Mekanizmasına Bağlı Violasein Üretimi (FÜBAP M.F.17.07), 2016-2018.