



*Derleme Makalesi / Review Article*

## **Biyofarmasötik Keşif, Geliştirme ve Üretimin Güncel Paradigması Olarak Mikroorganizmaların Metabolik Mühendisliği: Sentetik Biyolojinin Katkıları**

*Metabolic Engineering of Microorganisms as the Current Paradigm of Biopharmaceutical Discovery, Development and Production: Contributions of Synthetic Biology*

Esra GÜL <sup>1,\*</sup>, Venhar ÇELİK <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Malatya Turgut Özal Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 44210, Malatya, Türkiye

<sup>2</sup> Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 23119, Elazığ, Türkiye

<https://doi.org/10.55007/dufed.1187305>

### MAKALE BİLGİSİ

#### Makale Tarihi

Alınış, 11 Ekim 2022

Revize, 30 Kasım 2022

Kabul, 09 Aralık 2022

Online Yayınlama, 27 Aralık 2022

#### Anahtar Kelimeler

*Metabolik mühendisliği, Sentetik biyoloji, Biyofarmasötik, Mikroorganizma, Heterolog*

### ÖZ

Farmasötik endüstrisinde doğal bileşikler ve türevler önemli bir rol oynar. Ancak bu ürünlerin doğal konaktan izole edilmesindeki veya yeniden kimyasal olarak sentezlenmesindeki zorluklar, genellikle bunların bulunabilirliğini sınırlar, maliyeti yükseltir ve biyofarmasötik üretim sürecini yavaşlatır. Farmasötik metabolik mühendisliği, ilaçların ve ayrıca ilaç öncüllerinin keşif, tasarım ve üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. Mikroorganizmaların daha yüksek titreler ve daha az maliyetle büyütülme kolaylığı nedeniyle küçük molekülü ilaçların heterolog olarak bir mikrobiyal konakta yüksek hızda, düşük maliyet ve yüksek verimle istikrarlı olarak üretilmesi, bitkiler gibi doğal konaklarda üretimine veya kimyasal sentezine göre giderek daha popüler bir alternatif haline gelmektedir. Metabolik mühendisliği, mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlardaki belirli genetik farklılıkların fizyolojik sonuçlarını inceleyerek ve ayrıca genler ve hücre fonksiyonları arasındaki bağlantıları anlamak için matematiksel ve hesaplamalı yöntemler tasarlayarak yeni mikrobiyal hücre fabrikalarının geliştirilmesine ve mevcut endüstriyel organizmaların iyileştirilmesine olanak tanır. Mikroorganizmalardaki endojenik metabolik yollarla çeşitli heterolog biosentetik yolların entegre edilerek yeni sentetik yolların tasarlanması, inşası ve optimizasyonu için sentetik biyoloji metodolojilerini kullanır. Metabolik olarak tasarlanmış organizmaların optimizasyonu, bu endojenik ve heterolog yolak proteinlerinin dengeli düzeylerde üretilmesinin iyi anlaşılmasını gerektirir. Böylece, metabolik mühendisliğinin uygulanması, tüm üretim sürecini hızlandırmayı amaçlayan heterolog mikroorganizmalarda büyük miktarlarda biyofarmasötiklerin verimli bir

*\*Sorumlu Yazar*

*E-posta Adresleri:* [esra.oz@ozal.edu.tr](mailto:esra.oz@ozal.edu.tr)(Esra GÜL), [venharcelik@firat.edu.tr](mailto:venharcelik@firat.edu.tr) (Venhar ÇELİK)

şekilde üretilmesini sağlayabilir. Bu derleme çalışmasında biyofarmasötiklerin metabolik mühendisliği yaklaşımıyla mikrobiyal hücre fabrikalarında üretiminin tasarlanması, üretimi ve optimizasyon koşulları incelenmiştir.

## ARTICLE INFO

### Article History

Received, 11 October 2022

Revised, 30 November 2022

Accepted, 09 December 2022

Available Online, 27 December 2022

### Keywords

*Metabolic engineering, Synthetic biology, Biopharmaceutical, Microorganism, Heterologous*

## ABSTRACT

Natural compounds and derivatives play an important role in the pharmaceutical industry. However, difficulties in isolating or chemically resynthesizing these products from the natural host often limit their availability, increase costs, and slow down the biopharmaceutical production process. Pharmaceutical metabolic engineering plays an important role in the discovery, design and manufacture of drugs as well as drug precursors. Because of the ease with which microorganisms are grown at higher titers and less costly, the stable production of small molecule drugs heterologously in a microbial host at high speed, low cost, and high yield is becoming an increasingly popular alternative to their production or chemical synthesis in natural hosts such as plants. Metabolic engineering allows the development of new microbial cell factories and refinement of existing industrial organisms by examining the physiological consequences of certain genetic differences in microorganisms, plants and animals, as well as designing mathematical and computational methods to understand the links between genes and cell functions. It uses synthetic biology methodologies to design, construct and optimize new synthetic pathways by integrating various heterologous biosynthetic pathways with endogenous metabolic pathways in microorganisms. Optimizing metabolically engineered organisms requires a good understanding of the production of these endogenic and heterologous pathway proteins at balanced levels. Thus, the application of metabolic engineering can enable the efficient production of large quantities of biopharmaceuticals in heterologous microorganisms aimed at speeding up the entire production process. In this review study, the design, production and optimization conditions of the production of biopharmaceuticals in microbial cell factories with the metabolic engineering approach were examined.

## 1. GİRİŞ

Metabolik mühendisliği, sürdürülebilir kimya endüstrisine ulaşılmasında ve çeşitli kimyasalların ve malzemelerin üretimi için mikrobiyal hücre fabrikalarının geliştirilmesinde önemli roller üstlenmektedir. Mikroorganizmalar teorik olarak, metabolik ağlarında bulunan tüm metabolitleri üretebilirler, ancak doğal olarak oluşan bu kimyasalların birçoğunun, mikroorganizmaların kullanılarak üretilmesindeki verimlilik oldukça düşüktür. Ancak bunun aksine metabolik mühendisliği biyo-bazlı kimyasalların ve ilgilenilen diğer malzemelerin üretiminde üç ana performans endeksini (titre, verim ve verimlilik) geliştirmeyi mümkün kılmıştır. İstenilen kimyasalların ve materyallerin geliştirilmiş üretimi için metabolik mühendisliği sistemleri ile mikrobiyal suşların geliştirilmesine ilişkin başarılı örnekler giderek artmaya başlamıştır [1]. Metabolik mühendisliği, insanların ilgisini çeken belirli maddelerin üretimini artırmak için hücrelerdeki genetik ve düzenleyici süreçlerin optimizasyonunu ve belirli bir fenotip elde etmek için hücrelerin genetik yapısının değiştirilmesini sağlar [2]. Kimyasal bileşiklerin üretimi için mühendisliği yapılan biyosentetik yolların konak hücredeki hücresel metabolik

mekanizmaların kapsamlı optimizasyonunu gerektirir. Öncelikli olarak optimal bir tasarım belirlemek zor olduğu için, metabolik mühendisler genellikle biyokimyasal yolağın çok sayıda varyantını kurup değerlendirmelidirler. Örneğin; doğal hücreler nadir bulunan bir molekülü üretmek için optimize edilir ve bundan dolayı ekonomik olarak uygulanabilir üretimi sağlamak için, metabolit titresini, üretim hızı ve verimi iyileştirmek için konak hücre metabolizmasına kapsamlı değişiklikler yapmak gereklidir [3]. Bu bağlamda metabolik mühendisliği yaklaşımları, endüstriyel uygulamalar ve mikroorganizma tasarımı için kullanılmaktadır. Yüksek üretkenlik yeteneği ile geleneksel olmayan çevresel koşullar altında ve verimli şekilde işlev görebilecek suşların elde edilmesi mümkün görünmektedir [4].

Metabolik olarak tasarlanmış mikroorganizmalar tarafından ilaç üretimi, kimyasal sentez veya doğal kaynaklardan ekstraksiyona göre çeşitli avantajlara sahiptir. İlaç olarak kullanılan kimyasallar, genellikle kimyasal olarak sentezlenmesi oldukça zor olan kiralite dahil karmaşık yapılara sahiptir. Ayrıca, tıbbi açıdan değerli bileşiklerin doğal kaynaklardan üretilmesi genellikle verimsizdir ve kaynakları azaltarak ve üretilme alanını kirleterek çevre üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir. Aksine, ilaçlar kontrollü ve tutarlı bir şekilde nispeten ucuz substratlardan mikrobiyal fermentasyon yoluyla üretilebilir. Mikrobiyal hücrelerin daha yüksek organizmalara kıyasla çok hızlı büyümesi, bir başka bariz avantajdır. Ayrıca, mikroorganizmaların metabolik mühendisliği, poliketidler ve ribozomal olmayan peptidler durumunda olduğu gibi, güçlü biyolojik aktivitelere sahip yapısal olarak daha çeşitli analogların üretimi için metabolik yolların modifikasyonuna izin veren memeli ve bitki hücrelerinden daha kolay gerçekleştirilebilir. Bu avantajlar, ilaçların ve ilaç öncüllerinin mikrobiyal üretimi için temel itici güçlerdir [5].

Farmasötik olarak kullanım için biyofarmasötikler olarak adlandırılan rekombinant proteinlerin üretimi, milyarlarca dolarlık bir endüstridir. Biyofarmasötiklerin üretimi için birçok farklı hücre fabrikası kullanılmaktadır [6]. Doğal ürünler ve doğal ürünlerden türetilen bileşikler, modern sağlık hizmetlerinde birçok hastalık için ön tedaviler ve kimyasal şekilde sentezlenmiş terapötikler için ilham kaynağı olarak önemli bir rol oynamaktadır. DNA dizileme ve rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemelerle, bu kimyasal olarak karmaşık ve farmasötik açıdan değerli bileşiklerin üretiminden sorumlu olan biyokimyasal yolların çoğu açıklığa kavuşturulmuştur. Sürekli genişleyen biyosentetik bileşenler araç takımı ile metabolik mühendisliği, doğal ürün titrelerini iyileştirmek ve yeni bileşikler oluşturmak için giderek daha güçlü bir alan haline gelmektedir. Heterolog üretim platformları, zor olan üretimden daha kolay olan üretime olan yollara erişim sağlamıştır; sistem biyolojisi ve metabolik modelleme araçları, tahmine dayalı ve analitik yeteneklerin artmasıyla sonuçlanmıştır; Ekspresyon sistemlerindeki ve düzenlemedeki ilerlemeler, artan verimlilik için yolların hassas ayarını mümkün kılmıştır ve bireysel yolak bileşenlerinin karakterizasyonu, yeni bileşiklerin üretimi için hibrit yolların yapısını kolaylaştırmıştır. Metabolik mühendisliğinin pek çok yönündeki bu ilerlemeler, yalnızca

büyüleyici bilimsel keşifler sağlamakla kalmamıştır, aynı zamanda onu doğal ürün biyosentezinin optimizasyonu için giderek daha uygun bir yaklaşım haline getirmiştir [7]. Ayrıca metabolik mühendisliğin mikrobiyal üretim suşuna (yani *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae*) uygulanması, metabolik mühendislerin hem endüstriyel hem de farmasötik faydalar için çeşitli sekonder metabolitlerinin aşırı üretmesini sağlar [8].

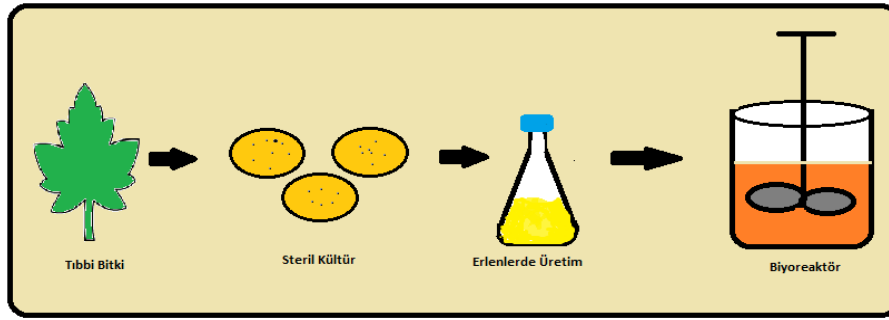
Bu derlemede, metabolik mühendisliği yaklaşımıyla biyofarmasötiklerin mikrobiyal hücre fabrikalarında üretiminin tasarlanması, üretimi ve optimizasyon koşulları araştırılmıştır. Metabolik mühendisliğinde doğal bileşiklerin kullanılmasıyla tasarım ve üretimde olası optimizasyon koşullarının oluşturulması için etkin olabilecek çözümler önerilmiştir.

## **2. İLAÇLARIN VE İLAÇ PREKÜRSÖRLERİNİN BİYOSENTEZİ: METABOLİK MÜHENDİSLİĞİ PARADİGMASI**

Metabolik mühendisliği, rekombinant DNA ve diğer moleküler biyolojik teknikleri kullanarak hücrel metabolizmanın amaca uygun modifikasyonu olarak tanımlanabilir. Metabolik mühendisliği, metabolik ve hücrel sistemi bir bütün olarak ele alır ve buna göre, kendisini basit genetik mühendisliğinden ayıran genel biyoprosesin verimliliği dikkate alarak sistemin manipülasyonuna izin verir. Bunlara ilaveten diğer endüstriyel olarak faydalı kimyasallar gibi, ilaçlar da metabolik mühendisliğinin ana hedefi olmuştur. Örneğin, artemisinik asit, taksol öncülü ve benzilizokinolin alkaloidleri gibi tıbbi değeri olan bitki sekonder metabolitleri, metabolik olarak tasarlanmış mikroorganizmalar tarafından başarıyla üretilmiştir [5]. İlaç endüstrisi, farmakolojide mümkün olan en fazla sayıda, önemli olan maddeyi elde etmek için metabolik mühendisliğini kullanır. Ayrıca öncül ilaç da olabilirler. Öncül ilaç tasarımının temel amacı, su veya lipid membranlarda düşük çözünürlük, düşük hedef seçicilik, kimyasal kararsızlık, istenmeyen tat, lokal uygulama sonrası tahriş veya ağrı, sistem öncesi metabolizma ve toksisite gibi istenmeyen ilaç özelliklerini maskelemektir [9].

İlaç tasarımında doğal ürünler birincil kaynaklardır. Önceki yıllarda verilen raporlara göre, ilaçların %51'i doğal ürünlere dayalıyken, %49'u farmasötikler tarafından onaylandığı üzere sentetiktir. Doğal ürünlerden elde edilen farmasötikler, mikrobiyal olarak üretilen veya bitkiden ekstrakte edilen doğal bir ürünle başlayarak, daha sonra absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite gibi kimyasal olarak yarı modifiye edilen terapötik özellikleri geliştirmek için sentezlenir [10]. İlaçlar, hastalığın önlenmesi ve tedavisi için gereklidir. İnsan hayatı, kanser, diyabet ve kronik rahatsızlıklar gibi birçok hastalık tarafından sürekli tehdit altındadır. Bu nedenle, ideal ilaçlar her zaman büyük talep görmektedir. İdeal ilaçların zorluklarını karşılamak için etkili bir ilaç geliştirme yöntemi talep edilmektedir [11]. Bütün bunlar tipik olarak ürün oluşumuna yol açan yeni metabolik yollar

oluşturarak ve gelişmiş ürün oluşumuna yönelik mevcut metabolik yolları zorlayarak veya kaldırarak elde edilir. Son zamanlarda sistem biyolojisi ve sentetik biyolojide, ilaçların ve ilaç öncüllerinin verimli üretimi için bir mikroorganizmanın optimal tasarımında tüm hücre düzeyinde metabolik mühendisliğinin gerçekleştirilmesine izin verilmiştir. Stratejik olarak modifiye edilmiş ilaçların mikrobiyal üretimi, FDA (Food and Drug Administration) onaylı ilaçların üretimini hızlandırma ve maliyetini düşürme kabiliyetine sahiptir [10].



Şekil 1. Metabolik mühendisliği yaklaşımı ile farmasötik bileşiklerin mikroorganizmalarda üretimi

Metabolik mühendisliği, bu ilaçların ve ilaç öncüllerinin üretiminde giderek daha önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 1) [5]. Satish vd. [12] yaptıkları bir çalışmada, elisitörler, paklitaksel biosentezinde yer alan genlerin aşırı ekspresyonu ve daha yüksek miktarlarda paklitaksel üretmek için ektojik ekspresyon gibi moleküler mühendisliği stratejilerini incelemişlerdir. Redding-Johanson vd. [13] çalışmalarında, *E. coli*'de bir sıtma ilaç öncülü olan amorfadien'in biosentetik yolağındaki hız sınırlayıcı enzimlerini tanımlamak için hedeflenen proteomiklerin kullanımını tanımlamışlardır. Sarnaik vd. [14] yaptıkları bir çalışmada *Synechococcus elongatus* PCC 7942'de hem süpernatant hem de hücre biyokütlesinde mevcut olduğu farklı kültür koşulları altında önemli ölçüde heparosan üretimi sergilediğini göstermişlerdir. Basitrasin, esas olarak bir tür siklik dodekapeptid antibiyotiktir. Zhu vd. [15] yaptıkları çalışmada *B. licheniformis* DW2'de aspartik asit (Asp) akışını güçlendirerek basitrasin üretimini geliştirmek istemişlerdir.

### 3. İLAÇ FABRİKALARI OLARAK MİKROORGANİZMALAR

İstenen molekülün büyük ölçekli ve hatta laboratuvar ölçekli üretimi için kararlı, iyi huylu bir şasi (konak hücre) gereklidir. Minimal olmasına rağmen, bakteriyel konak önemli bir bilimsel ilgiye sahip olabilir, kimyasalların endüstriyel üretimi, özellikle ürün maliyetinin en fazla olduğu yakıtlar ve emtia kimyasalları kritik, basit, ucuz bir karbon kaynağından ve N, P, S ve benzerlerinin tuzlarından büyüme için tüm biyolojik makromolekülleri sentezleyebilen bir konak hücrenin kullanılmasını gerektirir. Minimal, ucuz karbon kaynakları üzerinde büyüeyebilen, sağlam, iyi karakterize edilmiş

organizmalar, muazzam pratik kullanımda olmuştur ve olmaya devam edecektir [16]. İlaç olarak kullanılan birçok kimyasal ve biyolojik molekül, mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunur. Bu ilaçlar çok az miktarlarda sentezlendiklerinden uygun miktarlarda elde edilmeleri güçtür. İşte burada metabolik mühendisliği devreye girmektedir. Çeşitli genetik ve analitik araçların geliştirilmesi ile birlikte bu ilaçların sentezi için metabolik yollar hakkındaki bilgilerimizde son gelişmeler, gelişmiş ilaç üretimi için mikroorganizmaların daha sistematik ve titiz mühendisliğini mümkün kılmıştır [5]. Böylece, mikroorganizmaları büyük miktarlarda aktif bileşik üretimi için optimize edilmiş hücre fabrikalarına dönüştürmeye odaklanan yeni metabolik yolları verimli bir şekilde tasarlamak mümkündür [17].

Endüstriyel biyoteknoloji hızla büyüyen bir alandır. Biyo-tabanlı bir ekonomiye doğru artan geçişle birlikte, yakıt, kimyasal, ilaç, malzeme, nutrasötikler ve hatta gıda bileşenleri üretebilen verimli hücre fabrikaları geliştirmeye yönelik artan talep olmuştur [18]. Rekombinant proteinler ve enzimler ile antikolar ve aşılarda önemli biyofarmasötiklerdir. Rekombinant somatostatin ve rekombinant insan insülini, bakterilerde ifade edilen ve Genentech tarafından ticarileştirilen ilk rekombinant terapötikler arasındaydı [19]. Nakagawa vd. [20] bir çalışmada, özel olarak hazırlanmış bir biyosentetik yola oluşturmak için seçilmiş enzimleri kullanarak basit karbon kaynaklarından bitki alkaloidlerini veren bir *Escherichia coli* fermentasyon sistemi geliştirmişlerdir. Badri vd. [21] yaptıkları çalışmada kondroitin sülfat (CS) üretimi için gerekli olan üç bileşenin tümünü (kondroitin, sülfat donörü ve sülfotransferaz) üretmek üzere *E. coli*'nin mühendisliğini yapmaktadırlar. Bu şekilde, sülfatlanmış disakkaritlerin yaklaşık %96'sı ile ~27 µg/g kuru hücre ağırlığında hücre içi CS üretimi elde etmişlerdir.

### 3.1 Prokaryotik Biosentez Platformu: *Escherichia coli*

Laboratuvarın temel konak hücresi –ya da diğer ifadelerle fabrikası veya şasisi- *Escherichia coli* gibi basit bir biyokatalizör bile tahmini 4603 gen, 2077 reaksiyon ve 1039 benzersiz metabolitten oluşan karmaşık bir sistemdir [22]. Gram-negatif bakteri olan *E. coli*, ayrıntılı olarak en çok çalışılan prokaryotik model organizmadır. 4.6 Mbp genomu, 4288 protein kodlayan genleri ve işlevi kanıtlanmış %85'i ile operonları ile çok iyi karakterize edilmiştir ve doğal ürün üretiminde birçok uygulamada kullanılmaktadır. *E. coli*, yakın zamanda başka bir çalışmada incelendiği gibi, terpenoidler, poliketidler, fenilpropanoidler ve alkaloidler dahil olmak üzere karmaşık doğal ürünler üretmek için başarıyla genetik olarak tasarlanabilmektedir. Birkaç isim vermek gerekirse, antibiyotik valinomisin, antikanser ilaç taksol öncülü taksadien ve morfin öncülü retikülin gibi karmaşık moleküller için üretim sağlanmıştır [23]. 1980'lerde biyofarmasötik endüstrisinin ortaya çıkmasından bu yana, *E. coli*, terapötik kullanım için rekombinant proteinlerin ve plazmid DNA'nın (pDNA) endüstriyel üretiminde önemli bir rol oynamıştır. Şu anda, rasyonel olarak tasarlanmış rekombinant proteinler ve viral vektör gen terapileri



dahil olmak üzere gelişmiş biyofarmasötik ürünler, uzun vadeli yönetim ve hatta hastalığın tedavisi için benzeri görülmemiş bir vaat sunmaktadır. Bu nedenle, *E. coli*, biyofarmasötik endüstrisi için önemli bir üretim konakçısı olmaya devam etmektedir [24]. *E. coli*, rekombinant protein üretimi (RPÜ) ve pDNA üretimi için en yaygın kullanılan, uygun maliyetli mikrobiyal “fabrika” olmaya devam etmektedir. Kabul görmüş protein terapötiklerinin üçte birinin üretilmesi için kullanılan konak hücreler, biyofarmasötik endüstrisinde glikosile edilmemiş rekombinant proteinlerin üretimi için ana iş gücü olarak kabul edilir. Moleküler biyoloji ve biyofarmasötik uygulamalardaki yaygın kullanımı, maliyet etkinliği ve ölçeklenebilirliği ile birleştirdiğinden dolayı, *E. coli* ayrıca terapötik pDNA üretimi için ana konak olarak seçilmiştir [24]. Örneğin; ilaç, gıda ve yem endüstrisi için önemli bir hammadde olan L-triptofanın *Escherichia coli* tarafından yüksek verimli üretimi büyük ilgi görmüştür [25]. Temel bir aromatik amino asit olarak L-fenilalanin (L-Phe), farmasötikler, yapay tatlandırıcılar vb. için öncüller olarak birçok uygulamaya sahiptir. Yapılan bir çalışmada büyük ölçekli biyoreaktörde L-Phe üretimi için ekonomik bir biyoproses geliştirmek üzere *E. coli* suşu geliştirmişlerdir [26]. Liu vd. (2021) yaptıkları çalışmada, retrobiyosentez analiz stratejisini kullanarak, yeni bir biosentetik yolak tasarlamışlardır ve glikozdan 3-fenilpropanolün de novo üretimini yapabilen rekombinant *E. coli* suşu tasarlamışlardır [27]. B12 vitamininin (adenosilkobalamin) bilinen tek kaynağı bakteri ve arkeadır. Yapılan bir diğer çalışmada, genetik ve metabolik mühendisliği kullanarak, tasarlanmış de novo aerobik biosentetik yolak yoluyla B12 vitamini üreten bir *E. coli* suşu oluşturmuşlardır [28]. Zhank vd. (2022) yaptıkları çalışmada shikimate yolunu genişleterek *E. coli*'de ucuz yenilenebilir karbon kaynaklarından salisin üretimini gerçekleştirmişlerdir [29]. Yapılan bir diğer çalışmada ise glikozu verimli bir şekilde bütül asetata dönüştüren, metabolik olarak tasarlanmış bir *E. coli* suşu geliştirilmiştir [30].

### 3.2 Ökaryotik Biosentez Platformu: *Saccharomyces cerevisiae*

Fırın mayası *Saccharomyces cerevisiae* çok iyi karakterize edilmiş bir ökaryotik model organizmadır. 12 Mbp'lik bir genom içeren ve 6049 proteini kodlayan 6275 gen ile %90'ının tanımlanmış bir fonksiyona sahip olduğu 16 kromozomu barındırır [23]. Mikroorganizmalar, geniş bir uygulama yelpazesine sahip çeşitli katma değerli bileşikler üretir. Çok sayıda mikroorganizma türü arasında maya, çeşitli biyomolekülleri sentezlemek için uzun süredir kullanılmaktadır. Bu biyomoleküller, biyotik ve abiyotik streslere karşı savunma, sinyal iletimi ve antimikrobiyal aktivite gibi çeşitli önemli biyolojik rollere sahiptir. Maya, mantar krallığına aittir ve tek hücreli ökaryotik bir mikroorganizmadır. İlk mayanın tanımlanmasından bu yana yaklaşık 1500 maya türü doğru olarak tanımlanmıştır. Maya türlerinin, tanımlanan tüm mantar üyelerinin %1'ini oluşturduğu rapor edilmiştir [31]. *S. cerevisiae*, insülin, aşı ve sıtma ilacı artemisinin dahil olmak üzere çeşitli ilaçların ticari üretimi için kullanılır. Ayrıca, *S. cerevisiae*, örneğin yaşlanma, nörodejeneratif hastalık, ilaç toksisitesi ve kanser üzerinde çalışılması için kullanılan bir hastalık modeli organizmadır. Örneğin, 4000'den fazla suştan

oluşan maya tek gen delesyon kütüphaneleri, büyük ölçekli birincil etkileşim alanlarını kullanarak sentetik öldürücü etkileşimleri bulmak için kullanılmış ve yeni kombinasyonel kanser tedavilerine ilişkin içgörülerini ortaya çıkarmıştır. İlaç taraması alanında, *S. cerevisiae*, maya yüzeyi görüntüleme teknolojisini kullanan yeni antikör varyantlarını bulmak için başarıyla kullanılmıştır [23]. *S. cerevisiae*, kannabinoidler, noskapin ve monotermen indol alkaloidleri (MIA) yollarının yeniden oluşturulmasında kullanılan tipik bir ökaryotik konaktır [32]. Diosgenin (DSG), çeşitli biyolojik aktiviteleri olan ve aynı zamanda çeşitli steroidal ilaçların sentezi için önemli bir öncül olan doğal olarak oluşan bir steroidal saponindir. Xu vd. [33] yaptıkları çalışmada, diosgenin sentez yolağını optimize ederek, yolak gen ekspresyonunun ince ayarını yaparak ve rekabet eden yolları kapatarak DSG aşırı üretimi için maya suşları geliştirmişlerdir. Meng vd. (2022) yaptıkları çalışmada modüler bir mühendislik stratejisi ile şekerden genistein üretmek için *S. cerevisiae*'yi tasarlamışlardır [34]. Yapılan bir diğer çalışmada ise, basit bir mineral ortam üzerinde *S. cerevisiae* mayasını tasarlayarak klorojenik asidin (CGA) ilk verimli mikrobiyal üretimi bildirilmektedir [35]. Bisquert vd. [36] yaptıkları çalışmada doğrudan glikoz gibi basit bir karbon kaynağından aşırı HT (hydroxytyrosol) üreten bir maya türü olan *S. cerevisiae* tasarlamayı amaçlamışlardır. Ayrıca Gao vd. [37] mühendislik ürünü *S. cerevisiae* kullanarak yüksek düzeyde fridelin üretebilen suşlar üretebilmek için, çoklu suşu başarıyla tasarlayan CRISPR/Cas9 teknolojisi ile endojenik yolak genlerinin genoma entegrasyonu ve inhibe edici genlerin devre dışı bırakılmasıyla kombine bir strateji kullanmışlardır.

Maya tarafından rekombinant proteinlerin üretimi, biyofarmasötik endüstrisinde hayati bir rol oynar. Bu nedenle, çeşitli biyofarmasötik proteinlerin aşırı üretimi için maya platformu suşlarının geliştirilmesi arzu edilir. Ancak bu hücrel mekanizma, özellikle protein ekspresyon yolları hakkında temel bilgi gerektirir [38].

#### **4. İLAÇ ETKEN MADDELERİNİ ÜRETMEDE METABOLİK YOLAK TASARIMI VE İNŞASI**

İlaç olarak kullanılan birçok kimyasal ve biyolojik molekül, mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunur. Bu ilaçlar çok küçük miktarlarda sentezlendiklerinden uygun miktarlarda elde edilmeleri güçtür. Bu noktada metabolik mühendisliği devreye girmektedir. Çeşitli genetik ve analitik araçların geliştirilmesi ile birlikte bu ilaçların sentezi için metabolik yollar hakkındaki bilgilerimizdeki son gelişmeler, gelişmiş ilaç üretimi için mikroorganizmaların daha sistematik ve titiz mühendisliğini mümkün kılmıştır [5]. Yerli konaklarda ilaç üretmeye kıyasla, iyi çalışılmış bir heterolog konak daha ucuz hammadde kullanır, daha sağlamdır, büyümesi daha kolaydır ve yüksek üretim elde etmek için verimli genetik modifikasyona izin vermek için iyi tasarlanmış genetik araçlardan oluşan bir panele sahiptir. Küçük molekülü ilaçların kimyasal sentezi ile karşılaştırıldığında, heterolog bir konakta



üretim, tehlikeli çalışma koşulları kullanılmadan genellikle daha az maliyetlidir ve potansiyel olarak daha yüksek enantiyo seçicilik sağlayabilir [39]. Bu bağlamda metabolik mühendisliği, yenilenemeyen kaynaklardan veya sınırlı doğal kaynaklardan elde edilen çok sayıda kimyasal basit, hazır, ucuz başlangıç malzemelerinden üretme potansiyeline sahiptir. Doğal ürünlerin mikrobiyal üretimi, ürüne özgü enzimlerin veya tüm metabolik yolların nadir veya genetik olarak dirençli organizmalardan kolayca tasarlanabilenlere aktarılmasıyla elde edilmiş ve enzimlerin birleştirilmesiyle veya farklı konak hücrelerden tek bir mikroorganizmaya giden yollar ve enzimlerin yeni işleve sahip olmasıyla doğal olmayan özel kimyasalların, bazı moleküllerin üretimi mümkün olmuştur [16]. Son birkaç yılda, doğal ürünlerden, özellikle sekonder metabolitlerden ilaç keşfinde hızlı bir artış olmuştur. Artan küresel pazar talebini karşılamak için bu sekonder metabolitlerin üretim sistemini geliştirmek ve optimize etmek için çeşitli çabalar üstlenilmiştir [31]. Son zamanlarda, küçük molekül ilaçlardan ikisi, artemisinik asit ve opioidler, eksojen genler (heterolog) ve yan yolların öncül molekül (prekürsör) arzını artırmak ve azaltmak gibi metabolik mühendisliği tekniklerinin bir kombinasyonu kullanılarak *S. cerevisiae*'da başarıyla üretilmiştir [39].

Metabolik mühendisliği, yenilenebilir kaynaklardan elde edilen kimyasalların ve malzemelerin mikrobiyal fabrikaları olarak kullanımları için uygun suşlar geliştirmemizi sağlamıştır. Geliştirilmekte olan suşta istenen ürünlere metabolik akışları maksimize eden yeni ve hassas kontrollü metabolik ve düzenleyici devreler yaratmamıza izin veren gelişmiş sentetik biyoloji ile yakın zamanda daha güçlü hale gelmiştir. Bu, konak mikroorganizmaları, doğuştan gelen metabolik yeteneklerini geliştirmek veya hedef bileşiklerin üretiminde yeni yetenekler kazandırmak için tasarlamamızı sağlar [40]. Küçük molekül ilaçların üretimi için heterolog bir konak mühendisliğinin ilk adımı, ilaç sentez genlerini endüstriyel bir mikroorganizmaya aktarmaktır. Bazı ilaçlar için biyosentetik yollar iyi çalışılmışken, diğer birçok durumda metabolik yolak veya biyosentetik yolla ilişkili fonksiyonel enzimler bilinmiyordu. Bu nedenle, heterolog bir konakta eksprese edilecek doğru yolak proteinlerinin belirlenmesi, küçük molekül bir ilacın üretimi için metabolik mühendislikteki en önemli adımlardan biridir [39].

Mühendisliğin gelişmesiyle birlikte, Genentech, *Escherichia coli* tarafından rekombinant insan insülini üretimi için bir süreç geliştirmiştir ve bu, 1982'de Eli Lilly tarafından ilk biyofarmasötik olarak pazarlanmıştır. O zamandan beri, biyoteknolojiye dayalı ilaç üretimi hızla büyümüş ve 2015 yılında 176,9 milyar ABD Doları tutarında küresel bir biyofarmasötik pazarı ve 2021 yılına kadar yıllık %8,6 büyüme oranı oluşturmuştur [38]. İlaçların nihai formlarında üretilmesi en çok arzu edilen olsa da, ilaç öncül moleküllerinin biyosentezi de bazı durumlarda deneysel ve ekonomik olarak tercih edilir. Mikrobiyal olarak üretilen ilaç öncül moleküllerinin kimyasal dönüşümünü nihai formuna getirmenin yolları varsa, öncülün üretimi zaten değerlidir. Metabolik olarak tasarlanmış *Saccharomyces*

*Cerevisiae*'da üretilen artemisinik asit bu durumlardan biri olabilir; sıtma önleyici ilaç artemisinin bir öncülüdür ve kimyasal olarak iki indirgeme ve oksidasyon adımıyla nihai forma dönüştürülebilir. Böylece, biyolojik olarak üretilen öncül molekül kullanılarak yüksek verimli artemisinin üretimi mümkündür [5]. Mikrobiyal konak organizmalara heterolog biyosentetik yollar tanıtmak için metabolik mühendisliği, yalnızca “doğal” ürünlerin üretimi için değil, aynı zamanda yolları aydınlatması ve biyokimyasal enzimatik araştırma için de değerli bir yöntem sunar. Varsayılan, rekombinant olarak birlikte eksprese edilen biyosentetik enzimler için substratlar olarak uygun öncüllerin *in vivo* üretimi, ortaya çıkan ürünün karakterizasyonu ile birleştiğinde, enzimatik spesifikliğı ve dolayısıyla metabolik yollardaki rollerini araştırmak için bir araç sağlar. Çeşitli organizmalardan ortaya çıkan genomik diziler, kodlanmış çok yönlü metabolizmayı işlevsel olarak araştırma ihtiyacını vurgular. Herhangi bir metabolik mühendisliği çabasının merkezinde, kayda değer karbon akışını merkezi metabolizmadan istenen heterolog son ürünlere yönlendirme yeteneğı vardır [41]. Doğal ürünlerin en büyük ailesi, izopentenil difosfat (IPP) ve dimetilalil difosfat (DMAPP) öncüllerinden türetilen çeşitli sayıda beş karbon izopren biriminden oluşan terpenoidler veya izoprenoidlerdir (>40.000). Doğada, IPP ve DMAPP'ye giden iki yol vardır, metil eritritol fosfat (MEP) ve mevalonik asit (MVA) yollarıdır. Esas olarak ökaryotlarda bulunan MVA yoluğı asetil-CoA ile başlarken, prokaryotik ve bitki plastid MEP yoluğı, gliseraldehit-3-fosfat ve piruvatın yoğunlaştırılmasıyla başlatılır [41,42]. Prokaryotlar, bazı istisnalar dışında, piruvat ve gliseraldehit-3-fosfat arasındaki ilk kondenzasyon reaksiyonu yoluyla IPP ve DMAPP üretmek için MEP yolunu kullanır [42]. Doğal ürünlerin mikrobiyal üretimi, ürüne özgü enzimlerin veya tüm metabolik yolların nadir veya genetik olarak dirençli organizmalardan kolayca tasarlanabilenlere aktarılmasıyla elde edilmiş ve enzimlerin birleştirilmesiyle doğal olmayan özel kimyasalların yakıtların üretimi mümkün olmuştur [43].

Kimyasalların, yakıtların ve ilaçların üretimi için metabolik mühendisliği, tipik olarak, gelişmiş üretkenlik için hücrel metabolizmanın kapsamlı modülasyonunu gerektirir. Gen silme, aşırı ekspresyon ve hassas düzenleme dahil olmak üzere çeşitli genetik modifikasyon türlerini tanıtmak için genom mühendisliği, yollar verimliliğini ve ürün verimini iyileştirmek için gereklidir [44]. Endüstriyel olarak faydalı kimyasallar gibi, ilaçlar da metabolik mühendisliğin ana hedefi olmuştur. Artemisinik asit, taksol öncülü ve benzilzokinolin alkaloidleri gibi tıbbi değeri olan bitki sekonder metabolitleri, metabolik olarak tasarlanmış mikroorganizmalar tarafından başarıyla üretilmiştir. İnsan insülininin rekombinant *Escherichia coli* tarafından üretilmesi, basit rekombinant DNA teknolojisinin bir sonucu olarak kabul edilir, ancak mikroorganizmaların metabolik ve hücrel mühendisliği ile büyük terapötik değerlere sahip daha karmaşık proteinler de üretilir. Metabolik mühendisliği tarafından yapısal ve işlevsel olarak çeşitli antibiyotiklerin geliştirilmesi, ortaya çıkan ilaca dirençli patojenlere karşı savaşmak için büyük önem taşımaktadır [5].

#### 4.1 Mikrobiyal Biyokatalizi Yeniden Tasarlama

Metabolik ve enzim mühendisliği araçları akademik çalışmalar için laboratuvarlarda iyi bir şekilde geliştirilmiştir ve farmasötik açıdan önemli moleküllerin geniş bir yelpazesinin üretiminde kullanılan biyokatalizörlerin optimizasyonu için uygulanmaktadır. Çok çeşitli modifiye edilmiş veya doğal olmayan enzim aktivitelere sahip tasarlanmış mikroorganizmalar hem yeni ürünler üretmek hem de öncüllerin, ara ürünlerin ve hayati önem taşıyan bileşiklerin üretimi gibi yerleşik ürünlerin üretiminde gelişmiş prosesler sağlamak için kullanılmaktadır [45].

Yeni mikrobiyal biyokatalizörler, esas olarak sentetik parçalar kullanılarak *E. coli* ve *S. cerevisiae* gibi platform organizmalarının genomlarının yeniden inşa edilmesi yoluyla, sentetik biyoloji yaklaşımları kullanılarak geliştirilmektedir. Bu, sentetik bir hücre durumunda olduğu gibi metabolizmayı toplam genom ölçekli mühendisliğine dönüştüren basit genetik değişiklikler olabilir. *E. coli* ve *S. cerevisiae* genetik manipülasyon kolaylığı ve büyük miktarda fizyolojik bilginin mevcudiyeti nedeniyle genetik ve metabolik mühendisliği için tercih edilir [46]. Doğal ürünler insanlar için geniş bir farmakolojik aktivite yelpazesine sahiptir. Bununla birlikte, orijinal organizmalardan doğal ürünlerin çıkarılması, genellikle mevsim ve bölge sınırlamaları olan büyük ekim ve üreme kaynakları gerektirir. Bu nedenle, doğal ürünlerin *in vitro* veya model mikroorganizmalarda heterolog biyosentezi daha umut verici bir yoldur ve yıllardır bir araştırmanın temel noktası olmuştur. Halihazırda, doğal ürünler için heterolog yolların kullanımı hala esas olarak orijinal konaklarda bulunan biyosentetik yolları kopyalamaktadır. Bununla birlikte, orijinal konak organizma ve hücre içi ortamdaki enzim ekspresyonu ve koenzim/enerji döngülerinin bağımlılığı nedeniyle, aynı sentetik yolun model mikroorganizmalarda veya *in vitro* olarak kopyalanması zordur [47]. Bu nedenle, biyokimya ve organik kimya bakış açısından bazı optimizasyon stratejileri bulunmaktadır. Bunlar ; (i) yeni enzim araçları sağlamak için iyi çalışılmış katalitik ve etkileşim mekanizmaları ile orijinal metabolik yollarda yeni enzimlerin ve protein etkileşimlerinin keşfi dahil sentetik yolak tasarımı, (ii) doğal sentetik yollardaki enzimlerin mikroorganizmalardan türetilen izoenzimlerle ikame edilmesi, (iii) doğal sentetik yolların mikrobiyal bozunma yolları ve yapay enzimatik kaskadlarla değiştirilmesi, (iv) yapay koenzim rejenerasyon yollarının tasarımı ve (v) Aktivitelerini, özgüllüklerini, substrat kapsamını ve ekspresyon seviyesi ve stabilitesini geliştirmek için rasyonel tasarım ve/veya yönlendirilmiş evrim ile anahtar enzimlerin protein mühendisliğiyle birlikte [48] ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere yaygın olarak kullanılmaktadır [47].

Spesifik ve hacimsel üretkenlik, biyokatalizör potansiyelinin iki önemli ölçüsüdür ve ikincisi endüstriyel üretim için özellikle önemlidir. Spesifik üretkenlik, bir mikrobiyal biyokatalizörün şekerleri veya diğer substratları istenen ürüne dönüştürme hızıdır. Bir ürünün hacimsel üretkenliği, mikrobiyal biyokatalizörün spesifik üretkenliği ve birim hacim başına hücre konsantrasyonu ile belirlenir. Daha

yüksek hücre yoğunluğu, tüm spesifik üretkenlik seviyelerinde daha yüksek hacimsel üretkenliğe yol açtığından, yüksek büyüme oranı ve hücre verimini desteklemek için koşulların optimize edilmesi önemlidir [46].

On yıllar boyunca, farmasötik maddeler giderek daha karmaşık hale gelmiştir ve yeşil teknolojiler için kamu ve çevre üzerinde arayışlar artmıştır. Bu nedenle endüstri, geleneksel kimyasal katalize alternatif olarak düşük maliyetli, daha güvenli ve daha yeşil biyokatalitik süreçler arayışı içerisinde. Farmasötiklerin sentezinde, kiral amin sentezi, kompleks moleküllerin stereo ve bölgeye özgü hidroksilasyonu ve diğer redoks reaksiyonları dahil olmak üzere, biyokataliz ile değiştirilebilen spesifik reaksiyonlar tanımlanmıştır [48]. Yeni ve geliştirilmiş özelliklere sahip biyokatalizörler, endüstriyel talebi karşılamak için esasen önemlidir. Halihazırda güçlü biyokatalizörlere büyük talep olmuştur ve yüksek değerli kimyasal sentez için daha yeşil alternatifler olarak kabul edilmektedir. Hedef bölgeye yönelik mutajenez (site-directed mutagenesis) ve protein mühendisliği gibi çeşitli teknolojiler aracılığıyla doğal biyokatalizörün biyomühendisliği için birkaç başarılı ilerleme kaydedilmiştir [49].

#### **4.2 Sentetik Yolakların Mikrobiyal Tasarımı, İnşası ve Optimizasyonu**

Metabolik mühendisliği, yenilenebilir kaynaklardan elde edilen kimyasalların ve malzemelerin mikrobiyal fabrikaları olarak kullanımları için uygun suşlar geliştirmemizi sağlamıştır. Geliştirilmekte olan suşta istenen ürünlere metabolik akışları maksimize eden yeni ve hassas kontrollü metabolik ve düzenleyici devreler oluşturmamıza izin veren gelişmiş sentetik biyoloji ile yakın zamanda daha güçlü hale gelmiştir. Bu durum, konakçı mikroorganizmaların, doğuştan gelen metabolik yeteneklerini geliştirmek veya hedef bileşiklerin üretiminde yeni yetenekler kazanmak için tasarlamamızı sağlamıştır [33]. Birçok madde için kanıtlama sistemiyle elde edilen kapsamlı başarıya rağmen, endüstriyel olarak ilgili titreler, verimler ve üretkenliklere ulaşmak için hala optimizasyona ihtiyaç vardır. Metabolik yolak optimizasyonu ve dengeleme alanı, bu ihtiyacı bilimsel ve sistematik bir yaklaşımla karşılamak için oluşturulmuştur [50]. Metabolik ağ oluşturma yöntemimizin iki ana adımı vardır: (1) başlangıç ana yollarını oluşturmak için genleri referans yollara eşlemek ve (2) gen ekspresyonu verilerine ve gözlemlenen ilişkilere ve reaksiyonlara dayalı olarak başlangıç yollarının genişletilmesi ve rafine edilmesi [51].

Heterolog enzimlerden oluşan sentetik bir metabolik yolak oluşturulduğunda ve bir konak suşa dahil edildiğinde, genellikle metabolik akışları kontrol eden düzenleyici mekanizmalardan yoksundur [33]. Bu ürünlerin endüstriyel üretim için gerekli titreleri, verimleri ve üretkenlikleri elde etmek için üstesinden gelmesi gereken birçok zorluk vardır. Bu ihtiyaçları karşılamak için rekombinant mikroorganizmaların kullanılması metabolik mühendisler için bir sonraki adımdır [52]. Mikrobiyal konaklarda biyosentetik yolların fonksiyonel ifadesinin gösterilmesi, temel bir ilk adımdır, ancak

endüstriyel üretime hazır suşlar elde etmek genellikle yeterli değildir. Tipik olarak, ilgilenilen ürüne doğru metabolik akışı artırmak ve yan ürünleri en aza indirmek için endojen genleri aşırı eksprese ederek, ekspresyonu düşürerek, mutasyona uğratarak veya silerek doğal metabolizmayı yeniden düzenlemek de gereklidir. Tasarlanmış metabolizmayı doğal konak fizyolojisi ile uyumlu hale getirmek, sağlam ve yüksek verimli suşların gelişimi için de çok önemlidir. Aşırı eksprese edilen biyosentetik yollar, mikrobiyal konak için olumsuz etkilere (örneğin toksik) veya olumlu etkilere (örneğin enerji sağlama) sahip olabilir. Tersine durum, doğal fizyolojiyi (örneğin, zayıf substrat asimilasyonu) veya faydalarını (örneğin, ilgili biyosentetik yolağa bol miktarda kofaktör temini veya aşırı koşullara tolerans) engeller. Bu nedenle, metabolizma ve konak fizyolojisi arasındaki etkileşimleri tanımak ve manipüle etmek, yüksek verimli suşlar için gereken sağlamlığı, üretkenliği ve nihayetinde genel performansı elde etmenin anahtarıdır [53]. Küresel metabolik akış dağılımının yanı sıra, nispeten düşük doğal katalitik aktiviteye sahip olabilen veya diğer enzimlere kıyasla daha düşük bir seviyede eksprese edilebilen bir hız kontrol edici (darboğaz) enzimin varlığından dolayı aynı yolda, sonuç olarak üretkenliği azaltan sentetik yolak içindeki akış dengesizliği gözlemlenebilir. Farklı promotör gücüne sahip alternatif bir protein ekspresyon kasetinin kullanılması, protein üretimini kontrol etmek için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır, ancak protein kodlama sekansı tarafından ribozom bağlanma bölgesindeki ikincil yapının değiştirilmesi nedeniyle genellikle beklendiği gibi çalışmaz. Yapı değişikliği, ribozom bağlama veriminin artması veya azalması ile sonuçlanır ve böylece mRNA translasyonunun verimini etkiler [33]. Sentetik biyomühendislik, tekrar eden bir tasarım, inşa, test etme ve öğrenme döngüsünü içerir ve hedef maddeyi üretmek için çok sayıda düşünce vardır. Bununla birlikte, heterolog genler kullanılarak anahtar reaksiyonun ilerlemesi için, göz önünde bulundurulması gereken önemli bir nokta, enzimatik aktiviteye sahip heterolog proteinlerin kararlı ifadesidir [54]. Örneğin, Park vd. [55] yakın zamanda, haşhaş hücrelerinde berberin köprüsü enziminin antisens baskılanmasını, benzoferantridin alkaloidlerinin miktarını azaltarak, ancak birkaç amino asit seviyelerini artırdığını göstermiştir. Antikanser ilaçları vinblastin ve vinkristin gibi önemli farmasötik bileşikler üreten indol alkaloid biyosentetik yolunu modüle etmek için birçok girişimde bulunulmuştur. Bir diğer örnekte ise; Öz [56] yaptığı çalışmada biyofarmasötik olarak ve çeşitli kullanıma sahip safran bitkisinin yolak genlerini *E. coli*'de heterolog olarak ekspresyonlarını gerçekleştirmiştir.

#### **4.2.1 Genetik Optimizasyon**

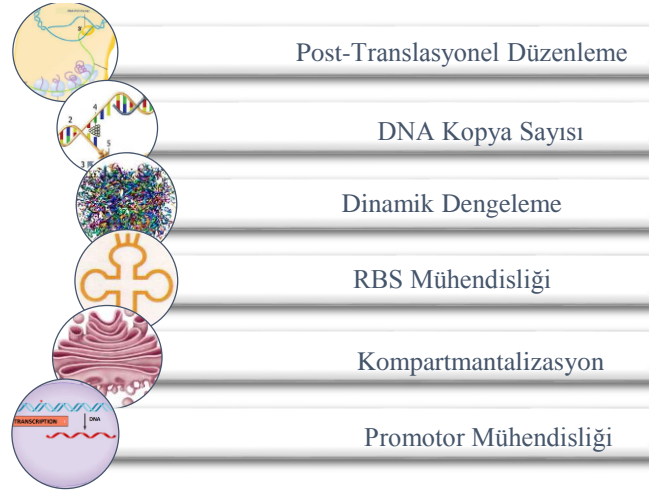
Katma değerli bileşiklerin mikrobiyal sentezi, tipik olarak, üretim konaklarına heterolog metabolik yolların elde edilmesine veya sunulmasına bağlıdır. Çoğu zaman, bu bileşiklerin ticari olarak uygun üretimini sağlamak için, belirli genlerin aşırı ekspresyonundan kaynaklanan metabolik yükten, eşleşmeyen kofaktör spesifitesinden kaynaklanan redoks dengesizliğinden, kararsız veya büyüme inhibisyonu ile sonuçlanan hız sınırlayıcılar ve toksik ara maddelerin veya diğerlerinin

birikmesinden kaçınmak için heterolog yollardaki metabolik akış optimize edilmelidir [57]. Genetik optimizasyon, belirli bir oranda ürünü üretmek için en etkili suş platformunun geliştirilmesine odaklanmaktadır. Bu, arzulanan ürüne giden yolları aşırı sentezlemek ve rakip yolları silmek veya azaltmak için geleneksel metabolik mühendisliği yaklaşımlarını içerir [50]. Metabolik mühendisler, bir mikroorganizmanın genetik kodunu manipüle ederek, hücrenin biyokimyasal ağını yenilenebilir hammaddelerin katma değerli bileşiklere dönüştürülmesini yönlendirmek için yeniden yapılandırabilirler. Bununla birlikte, endojen genlerin manipülasyonu ve heterolog yolların tanıtılması yoluyla bir mikroorganizmanın dikkatlice ayarlanmış (evrimleşmiş) doğal metabolizmasını yeniden kullanmak, sıklıkla yolak akışında önemli dengesizliklere yol açar ve bu da birkaç istenmeyen sonuca neden olur [58].

Genetik optimizasyon stratejileri statik veya dinamik olarak kategorize edilebilir. Statik yaklaşımlar, hücreler arası metabolit konsantrasyonlarına bağlı olarak tepki vermeye veya ayarlanmaya yönelik olmayan sabit bir enzim ekspresyon seviyesi olarak karakterize edilir. Bu yöntemler, değişen plazmid omurgaları, promotor güçleri ve ribozom bağlama bölgesi (RBS) güçleri gibi geleneksel genetik optimizasyon yöntemleri olarak görülmektedir [50]. Dinamik dengeleme yöntemleri, değişen hücre içi metabolit konsantrasyonlarını algılamak ve buna tepki vermek için biyosensör kullanır. Bu sistemlerin geçiciliği onları metabolik mühendisliği için güçlü bir araç yapar, ancak artan güç karmaşıklığı artırır ve deneysel optimizasyon görevini daha da zorlaştırır. Dinamik denge sistemleri son zamanlarda gerçek zamanlı olarak hücre içi metabolit konsantrasyonlarına göre metabolit akışlarını kontrol etme yeteneklerinde güçlü olduğu kanıtlanmıştır [50]. Suş ve yolak optimizasyonu için evrensel olarak genelleştirilebilir bir yaklaşım olmadan, metabolik mühendisliğindeki ilerlemeler, potansiyel konaklar veya hedef ürünler arasında çevrilebilirliği olmayan karmaşık ancak izole gösterimler üretmeye devam edecektir [58].

Metabolik mühendisliğinde merkezi bir görev, metabolit veya biyokütle üretimini en üst düzeye çıkarmak için yolak akışının optimizasyonudur. Gen ekspresyonunu ve enzim aktivitesini dinamik olarak kontrol etmek için “dinamik metabolik mühendislik” veya “dinamik kontrol” stratejileri önerilmiştir; bunlar, büyüme ve üretim arasındaki dengeyi sağlamak için kullanılır. Dinamik metabolik kontrol, genetik sensörleri ve aktivatörleri oluşturmak için sentetik biyolojideki ilerlemelere dayanmaktadır. Metabolik üretim oranını veya verimi en üst düzeye çıkarmanın yanı sıra, özellikle “dinamik kontrol” stratejisinin etkili bir şekilde uygulanması için yolak homeostazisinin sağlanması ve bozukluklara karşı güçlü adaptasyon önemlidir [59].





Şekil 2. *E. coli* ve *S. cerevisiae* laboratuvar bakterilerinde uygulanan optimizasyon yöntemleri

Temel mikrobiyal fonksiyonların sistemik davranışını nicel olarak tanımlamak için dinamik modellerin geliştirilmesi, metabolik mühendisliği uygulamalarının rasyonel tasarımı için çok önemlidir. Karbon akışlarını karbon ürünlerinin oluşumuna yönlendiren türlerin merkezi karbon metabolizmasının incelenmesi, sistem biyolojisi yaklaşımları için büyük önem kazanmıştır. *E. coli*, endüstride yararlı materyaller üretmek için kullanıldığından ve merkezi karbon metabolizmasının üzerinde çalışıldığı bir merkez olarak uzun yıllardır üzerinde çalışıldığı için en çok çalışılan mikrobiyal organizma ve mikrobiyoloji ve biyoteknoloji alanlarında önemli bir türdür [60]. Bunun yanısıra ürünlerin veya yolak ara ürünlerinin toksisitesi, üretken olan mikrobiyal fabrikaların gelişimine engel olabilir. Metabolik ağların modellenmesi ile birlikte hedef yolların dinamik düzenlenmesi, metabolik homeostaziyi korumak için çok önemlidir. Bu dinamik düzenleme, çevresel sinyaller veya hücrel metabolitleri tespit eden ve önceden belirlenmiş bir sonuç üreten hücrel biyosensörler ile gerçekleştirilebilir. Bazı metabolit algılayan transkripsiyon faktörleri, çeşitli bileşiklerin saptanmasını sağlayan sentetik düzenleyici devrelere başarıyla entegre edilmiştir [61]. Ayrıca suşların optimizasyonu, eksojen ürünler üreten mikrobiyal hücre fabrikalarının geliştirilmesi için kullanılmıştır. Hedef bileşiğin/bileşiklerin sentezi için enzimler ve yolaklar belirlendikten ve yeniden oluşturulduktan sonra, konak organizmanın doğal metabolizmasının sistem düzeyinde optimizasyonu, hedef bileşiğin verimli bir şekilde biyosentezi için gereklidir (Şekil 2) [62]. Karmaşık biyokimyasal sistemleri veya süreçleri temsil eden dinamik modeller (kinetik tabanlı modeller olarak da bilinir), yeni hücre fabrikalarının tasarımı için biyoteknoloji endüstrisinde geniş bir etki yaratmaya başlamıştır. Bu, metabolik bir ağdaki değişen bileşenlerin etkilerini doğru bir şekilde tahmin etme ve metabolit konsantrasyonlarındaki ve enzim kinetiğindeki değişiklikler gibi süreçleri tanımlama potansiyellerinden kaynaklanmaktadır. Hücre metabolizması gibi doğal bir sürecin zaman içindeki kinetiği genellikle doğrusal veya durağan değildir; bir model içindeki temsilleri, biyokimyasal sistemde geçici veya durağan fazlarda reaksiyonların gerçekleştirilme oranlarını tanımlayan matematiksel ifadeleri kullanır. Aslında, genom ölçeğinde metabolik modellerden

sistemik olarak dinamik modeller oluşturma çabaları, reaksiyon akışları, metabolit konsantrasyonları ve kinetik sabitler gibi verilerin kullanımına dayalı olarak yakın zamanda geliştirilmiştir [60]. Genetik ve fenotipik stabilite endüstriyel biyoprosesler için büyük bir endişe kaynağı olduğundan, doğrudan kromozom üzerinde çalışmanın yollarını bulmak da yüksek bir öncelik olacaktır [58]. Endüstriyel biyoteknoloji bağlamında, çoğu hücre fabrikası modelinin amacı, bir sisteme uygulanan genetik veya çevresel bozulmaların etkilerinin anlaşılması ve tahmin edilmesi ile bağlantılıdır. Bu bozulmaların örnekleri, bir metabolik enzimin ekspresyonunun modülasyonu veya seyreltme hızı veya substrat alımı gibi biyoreaktör proseslerinin parametrelerinin değiştirilmesidir. Spesifik uygulamalar için, özellikle gerinim tasarımı için oluşturulan modeller, sistemin tüm çıktıları arasında istenen ürünle ilgili reaksiyon akışını maksimize etmeye yönelik bir ilgiyle endüstriyel bileşiklerin üretimine odaklanmıştır [60].

#### 4.2.2 Plazmid Seçimi

Plazmidler, soylar arasında niş-adaptif fonksiyonel genleri transfer ederek ve böylece genomik çeşitlendirmeyi yönlendirerek bakteri evriminde önemli bir rol oynar. Bakteriye genomlar yaygın olarak, seçim için mevcut olan gen fonksiyonlarının aralığını artırarak ve bunların rekombinasyonlarına izin vererek adaptasyonu besleyebilen, birlikte var olan çoklu plazmid replikonları içerir [63]. Sentetik biyoloji projeleri tipik olarak plazmid vektörleri, hücreler içinde genomdan bağımsız olarak çoğalabilen dairesel ekstra kromozomal DNA elemanları kullanır. Bu çalışmalarda kullanılan plazmidlerin birçok faydası vardır: manipüle edilmeleri kolaydır, güvenilir bir şekilde *E. coli* hücrelerine dönüştürülebilirler ve kısmen genomik DNA'dan daha yüksek bir kopya sayısına bağlı olarak yüksek düzeyde gen ekspresyonu elde edebilirler. Ayrıca, karmaşık sentetik genetik sistemlerin modüler montajına ve ayrıca sistemdeki her plazmidin basit bağımsız testine izin veren birkaç plazmid uyum içinde kullanılabilir. Sentetik genetik sistemler geliştirmenin ayrılmaz bir parçası, tasarla-yap-test et döngüsünde prototiplerin yinelenmesidir [64].

Konak suşun optimizasyonu, pDNA üretim süreçlerini iyileştirmek için değerli bir araçtır [65]. Plazmidler, mikrobiyal popülasyonlarda lateral gen transferinin araçları ve yardımcı gen fonksiyonlarının rezervuarları olarak mikrobiyal ekoloji ve evrimde önemli bir rol oynamaktadır. Bir popülasyondaki plazmid kalıcılığı, stabil plazmid kalıtımına (yani plazmid stabilitesine) bağlıdır. Plazmidlerin replikasyon kontrol mekanizmaları, hücre bölünmesinden önce hücrede yeterli plazmid kopyalarının bulunmasını sağladığından plazmid kalıtımının önemli belirleyicileridir. Hücre bölünmesi sırasında düşük kopyalı plazmidlerin ayrılması plazmid kopyalarını yavru hücrelere aktif olarak dağıtan bölme sistemlerine dayanır. Bir bölme sisteminin yokluğunda, başarılı plazmid ayrımı, çoklu kopya durumuna ve plazmidlerin hücre içindeki fiziksel dağılımına bağlıdır [66]. Bakteri hücrelerinde rekombinant DNA üretimi moleküler biyolojide önemli bir tekniktir. Plazmidler genellikle antibiyotik

seçimi ile bir *E. coli* konak hücresinde tutulur [67]. Geleneksel olarak yolak optimizasyonundaki ilk adım, istenen yolak genlerinin ifade edileceği plazmid omurgasının seçilmesidir. Plazmid omurgasının seçimini, kullanmak istediğiniz optimizasyon tekniklerine göre (yani, transkripsiyonel dengeleme, çeşitli güç kuvvetlendiricilerinin (enhancer) kolay bir şekilde birleştirilmesini gerektirir) yapmak önemlidir [50].

#### 4.2.3 DNA Kopya Sayısını Düzenleme

Ekolojistler, doğanın dengesini, etkileşimli ve bağlantılı parçalardan kaynaklanan karmaşık bir sistem olarak kabul ederler; dengeyi bozmak, diğer türleri doğrusal olmayan ve dinamik yollarla etkileyebilir. Ekosistemler gibi, hücre ve genom da çok sayıda moleküler etkileşimle geniş ölçüde birbirine bağlıdır. Gen düzenlemesindeki değişiklikler, anormal kopya sayısı varyantları ve hücre boyutundaki değişiklikler yoluyla moleküler dengeyi bozmak, genom ve organizma işlevi için sonuçlar yaratabilir [68]. Kopya sayısı değişkenleri (Copy Number Variant, CNV'ler), geçmiş yılların kapsamlı araştırma konusudur. Evrimde önemli bir rol oynayan, popülasyon çeşitliliğine, belirli hastalıkların gelişimine katkıda bulunan ve konak-mikrobiyom etkileşimlerini etkileyen insan genomunun ortak özellikleridir. CNV'ler moleküler tanıda birçok hastalıktan ve invaziv olmayan doğum öncesi bakımda uygulama alanı bulmuştur, ancak tam potansiyelleri daha yeni ortaya çıkmaktadır. CNV'lerin kanser ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere çeşitli bozuklukların taranması, teşhisi, prognozu ve izlenmesi üzerinde muazzam bir etkiye sahip olması beklenmektedir [69].

Gen kopya sayıları, heterolog gen ekspresyonunun optimizasyonu için önemli bir ayar valfidir. Bazı genler birçok gen kopyasından en iyi şekilde ifade edilirken, diğer genler için orta veya hatta tek kopya sayıları, inklüzyon cisimciklerinin, toksik gen dozaj etkilerinden kaçınmanın veya metabolik mühendisliği için istenen seviyelere ulaşmanın tek yoludur [70]. Plazmidler, konak genomundan bağımsız olarak çoğalan bakterilerdeki dairesel DNA'nın ekstra kromozomal elemanlarıdır. Plazmidler, replikasyonları için konakçı hücrenin mekanizmasından yararlanır, ancak birçoğu yararlı veya koşullu olarak avantajlı genler taşır ve bu nedenle parazit olarak genelleştirilemez [71]. Kopyalama sayısının dengelenmesi (CNB) ilk ve muhtemelen genetik optimizasyonun en yaygın kullanılan biçimidir. Kopyalama sayısının dengelenmesi, çeşitli ekspresyon seviyelerine sahip plazmidlerden gelen genlerin, modüllerin veya yolakların ifadesidir. Genellikle, istisnalar olmasına rağmen, bir plazmid kopyası sayısı, *in vivo* ekspresyon seviyesiyle ilgilidir [50]. Hücre başına plazmid sayısı olarak tanımlanan plazmid kopya sayısı, rekombinant mikroorganizmaların üretkenliği üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Yüksek bir plazmid kopya sayısı, yani yüksek bir gen dozajlaması, genellikle plazmid kodlu genlerin yüksek düzeyde eksprese edilmesine ve dolayısıyla rekombinant proteinlerin aşırı üretilmesine neden olur. Bu etki,  $\alpha$ -faktörlerinin yetersizliği gibi bazı hücre içi dar geçitlerde sınırlı olabilir [72]. Kısacası

plazmidler, laboratuvar ve endüstriyel ortamlarda moleküler klonlama veya protein üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Sürekli modifikasyon, ortalama plazmid kopya sayısı (Plazmid Copy Number, PCN) ve stabilitesi bakımından özellikleri nadiren bilinen sayısız plazmid vektörünü ortaya çıkarmıştır. PCN'yi belirleyen önemli faktör replikasyon sistemidir [73]. Yüksek bir plazmid kopya sayısının, yavru hücrelerde plazmidlerin sürekli olarak kalıcılık olasılığını arttırdığı gösterilmiştir [72]. Plazmid replikasyonu, hücre metabolizması üzerinde büyük bir yükür, bu nedenle üretim sırasında plazmid stabilitesini sağlamak için her zaman aktif bir seçim mekanizması gerektirir. Plazmidlerin kopya sayısı ne kadar yüksek olursa, bu yük o kadar yüksek olur ve plazmid DNA'sı o kadar az stabil yayılır [70]. Plazmidsiz hücrelerin sayısı ekim sırasında artarsa, spesifik büyüme oranlarının yüksek olması nedeniyle plazmid taşıyan hücreleri büyütebilir. Bir hücrenin bir plazmidini çoğaltmak ve eksprese etmek için gerçekleştirilmesi gereken ek çalışmaların plazmid taşıyan hücrelerin büyüme oranını düşürdüğü düşünülmektedir. Çoğunlukla plazmid içermeyen hücrelerden oluşan bir kültür, plazmid kodlu gen ürünlerinin verimliliğini düşürecektir. En kötü ihtimalle, plazmidsiz hücrelerin toplamda aşırı büyümesi nedeniyle herhangi bir ürün bulunmayacaktır. Bununla birlikte, yüksek bir plazmid kopya sayısı spesifik büyüme oranını önemli ölçüde etkileyebilir [72]. Başka bir yaklaşım, genetik yapıların kopya sayısını değiştirmektir. Daha önce gösterildiği gibi, bir hücrede bir genin bulunduğu sayı, söz konusu genin ekspresyon seviyesi ile ilişkilidir. En belirgin konak hücre *Escherichia coli*'de, yüksek kopya numaralı pUC vektörleri gibi farklı kopya numaralarına sahip plazmidler mevcuttur ve düşük kopya sayılı pBR322 tabanlı vektörler ve kromozoma destekli entegrasyon, yeniden birleştirme yoluyla mümkündür [70]. Ayrıca, herhangi bir plazmid kaynaklı gen için seçimin yokluğunda, plazmid içermeyen bir hücrenin seçici bir avantaja sahip olması gerektiği ve plazmidin stabilitesinin açıklanmasının zor olduğu öne sürülmüştür. Konak uygunluğundaki kaybı telafi etmek için konjugal transfer yoluyla plazmidin yayılması, telafi edici mutasyonlar, maliyeti azaltmak için konak ve plazmidin birlikte evrimi veya plazmid bağımlılığı gibi faktörler bir plazmidin korunmasından sorumlu olası mekanizmalardan bazılarıdır [71].

#### 4.2.4 Transkripsiyonel Düzenleme

Transkripsiyonel düzenleme, bir mRNA'nın belirli bir hücredeki bir genden kopyalanıp kopyalanmadığının kontrolüdür. Prokaryotik hücreler gibi, ökaryotlardaki genlerin transkripsiyonu, transkripsiyonu başlatmak için bir promotora bağlanmak için bir RNA polimeraz gerektirir. Ökaryotlarda, RNA polimeraz, transkripsiyonun başlamasını kolaylaştırmak için başka proteinlere veya transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duyar. Transkripsiyon faktörleri, hedef genin transkripsiyonunu kontrol etmek için promotor dizisine ve diğer düzenleyici dizilere bağlanan proteinlerdir. RNA polimeraz tek başına ökaryotik hücrelerde transkripsiyonu başlatamaz. Transkripsiyon faktörleri, önce promotor bölgeye bağlanmalı ve transkripsiyonun başlaması için bölgeye RNA polimerazı

yerleştirmelidir [74,75]. Enzim daha sonra DNA çift zincirini açar, RNA sentezlemeye başlar ve promotordan ayrılır. Ortaya çıkan uzama kompleksi, RNA zincirini bir sonlandırma sinyaline ulaşana kadar uzatır ve DNA ve RNA'yı serbest bırakır [75]. Transkripsiyon faktörleri tipik olarak güçlendirici elementleri bağlayarak ve kofaktörleri ve RNA polimeraz II'yi hedef genlere alarak gen ekspresyonunu düzenler. Çoklu transkripsiyon faktörleri tipik olarak bireysel geliştiricilere işbirlikçi bir şekilde bağlanır ve güçlendiriciler ve çekirdek promotorlar arasında DNA döngüsü içeren fiziksel temaslar yoluyla yakın veya uzak genlerin çekirdek promotorlarından transkripsiyonu düzenler. Transkripsiyonun başlamasının meydana geldiği bölgeleri içeren çekirdek promotor elementler, aynı zamanda belirli transkripsiyon faktörleri tarafından da bağlanabilirler [76].

Gen ekspresyonunda hassas ayar yapma yeteneği, ürün titrelerini, verimleri ve üretkenliği iyileştirmek için akış dengesini etkileyen çeşitli faktörlerin dikkatli bir şekilde modüle edildiği metabolik yolak optimizasyonu ve dengeleme alanını yaratmıştır [77]. Hücreler, genlerin ekspresyonunu kısmen, genom boyunca belirli bölgelere bağlanan ve böylece yakındaki genlerin transkripsiyonunu artıran veya engelleyen proteinler olan transkripsiyon faktörleri (TF'ler) aracılığıyla kontrol eder [78]. RNA seviyesinden dengelenen yolak, hızlandırıcı kütüphaneleri geliştirmek ve karakterize etmek ve transkripsiyonel tıkanıklıkları anlamak için önemli deneysel etkiler nedeniyle, enzim ekspresyon seviyesinin ön optimizasyonunda güçlü bir metodu temsil eder. Transkripsiyonel optimizasyon tarafından sağlanan mRNA düzeyinin dengelenmesi, diğer genetik optimizasyon yöntemlerine kıyasla doğal bir avantaj sağlayan önemli metabolik yük kaynaklarından birini azaltır [50]. Hücre metabolizmasının optimize edilmesinden sorumlu transkripsiyonel düzenleyici ağların kapsamlı bir şekilde anlaşılması, sadece bakteri fizyolojisi açısından değil endüstriyel uygulamalar ya da biyosensörlerin üretilmesi ve bu gibi ağların optimizasyonu için de gereklidir. Mevcut metabolik akışların hedef yollara veya heterolog yollara yönlendirildiği metabolik mühendisliğinin ilgisi, biyoyakıtlar ve polimer öncülleri gibi katma değerli bileşiklerin ticari olarak üretilmesi ve sürdürülebilir “yeşil” üretime geçilmesi beklentileri tarafından tetiklenir. Bununla birlikte, bağlantılı reaksiyonlardaki ara ürünlerin spesifik bir yolağa doğru kanalize edilmesiyle metabolik dengenin bozulmasına ve istenen bileşiğin veriminin azalmasına neden olmasından dolayı arzu edilen ürünleri üretmek için bakterilerin metabolik mühendisliği oldukça zorludur [43].

#### **4.2.5 Translasyonel Düzenleme**

Translasyonel kontrolün ana fikri, gen ekspresyonunun, protein sentezinin belirlenmesinde mRNA kullanımının etkinliği ile düzenlenebilmesidir. Bu kavram, moleküler biyolojinin merkezi dogmasının ifade edilmesinden sadece birkaç yıl sonra ve haberci hipotezinin formüle edilmesinden çok kısa bir süre sonra ortaya çıkmıştır [79]. Protein sentezi, gen ekspresyon yolunda vazgeçilmez bir

süreçtir ve kontrolünde önemli bir bileşendir. Translasyonun düzenlenmesi, hücredeki gerçekleşen birçok olayda önemli bir rol oynar. Ayrıca, hücrede ve organizmada homeostazın sürdürülmesi için kritiktir. Genel olarak bir proteinin sentez hızı, mRNA'sının konsantrasyonu ve translasyonel etkinliği ile orantılıdır. Translasyonel kontrol, mRNA'ların etkinliğini yönetir ve bu nedenle, besin kaynağı, hormonlar veya stres gibi endojen veya eksojen sinyallere yanıt veren birçok genin ekspresyonunun modüle edilmesinde önemli bir rol oynar [80]. Bir mRNA sitoplazmaya taşındıktan sonra proteinlere çevrilir. Bu sürecin kontrolü büyük ölçüde mRNA molekülüne bağlıdır. Daha önce tartışıldığı gibi, mRNA'nın stabilitesi, bir proteine çevrilmesi üzerinde büyük bir etkiye sahip olacaktır. Translasyon, mRNA'nın ribozoma bağlanma düzeyinde de düzenlenebilir. mRNA ribozoma bağlandıktan sonra, translasyon hızı ve seviyesi hala kontrol edilebilir. Translasyon kontrolünün bir örneği, endoplazmik retikulum (ER) adı verilen bir organelde sonuçlanması hedeflenen proteinlerde meydana gelir. Bu proteinlerin ilk birkaç amino asidi, sinyal dizisi adı verilen bir etikettir. Bu amino asitler çevrilir çevrilmez, bir sinyal tanıma parçacığı (SRP) sinyal dizisine bağlanır ve mRNA-ribozom kompleksi ER'ye gönderilirken translasyonu durdurur [74]. Hücresel fonksiyonun her yönü, o hücrede ifade edilen gen ürünlerine bağlıdır. Bu gen ürünlerinin ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalar çeşitlidir ve sabit bir fonksiyonel RNA veya protein seviyesi oluşturmak ve sürdürmek için gerekli adımların her birini etkileyebilir. Bu mekanizmalar, RNA sentezini, işlenmesini ve stabilitesini kontrol edenleri ve protein kodlayan genler durumunda, protein translasyonunu, modifikasyonunu ve bozulmasını içerir [81]. Kimyasal üretimin optimal kontrolünü sağlamak ve çevresel değişikliklere yanıt olarak yolağın dayanıklılığını korumak için, gen devrelerindeki bir dizi eleman transkripsiyon ve translasyon aşamasında tasarlanabilir ve ayarlanabilir. Translasyon sonrası kontrol, doğal alosterik modifikasyon ve iskele proteinlerinin tasarımı vasıtasıyla başarılabılır. Transkripsiyon başlatma oranını kontrol eden promotorlar, ribozom bağlama alanları, translasyon seviyelerini kontrol eden riboz şalterleri, gen kopya sayısını kontrol eden plazmid replikonları, küçük inhibitör RNA'lar ve uzun kodlamayan RNA'lar gibi gen devrelerindeki birçok önemli element, metabolizma üzerinde istenen bir kontrole ulaşma amacıyla ayarlanabilir ve manipüle edilebilir [59]. Metabolitler mRNA translasyonunu da kontrol edebilir. Pozitif düzenleme, öncüller birikirse biyosentezi başlatabilir ve reaksiyon ürünleri biriken gereksiz enzim üretimini önlemek için negatif düzenleme önemlidir. Negatif translasyonel düzenlemelerde; örneğin, yağ asidi desaturasyonu durumunda oluşur. Doymamış yağ asitleri bir translasyon aktivatörüne (Musashi-1) bağlanır ve konformasyonel bir değişime neden olur. Böylece RNA bağlanması önlenir ve bir yağ asidi desaturazı olan SCD1'in mRNA translasyonu engellenir. Translasyon faktörleri yoluyla translasyonun dolaylı olarak düzenlenmesinin yanı sıra, translasyon metabolitlerinin mRNA ile doğrudan etkileşimi ile de kontrol edilebilir [82].



Riboswitchler, belirli metabolitleri spesifik olarak bağlayabilen düzenleyici alanlardır. Eftörün bağlanması, translyasyonu etkinleştirmek veya inaktive etmek için mRNA'da konformasyonel bir değişikliği indükler. Bu algılama bakterilerde iyi bilinir ve son zamanlarda ökaryotlarda birkaç örneği bulunmuştur. Memelilerde potansiyel riboswitchlerin anlaşılması zor olmuştur. Bununla birlikte, mRNA translyasyonunun metabolik kontrolü için doğrudan bir araç sağladıkları için orada da bulunmaları şaşırtıcı olmazdı [82]. RBS dizisinin mutasyonu ile translyasyon oranının değiştirilmesi son zamanlarda RBS Calculator, RBS Designer vs. sonucunda yapılan araştırmalar nedeniyle çok öngörülebilir bir araç haline gelmiştir. Bu anlayış, dejenere primerler ve alana yönelik mutajenez protokolleri kullanılarak kolaylıkla ve verimli bir şekilde oluşturulabilen dinamik aralıkların ve RBS kütüphanelerinin duyarlılığının tahmin edilmesine olanak tanır. Bu öngörülebilirlik, diğer genetik optimizasyon biçimlerine göre bir avantaj olmasına rağmen, rasyonel tasarımın bir gerçeklik haline gelmeden önce protein-yolak akış ilişkisini anlamak için halen daha yapılması gerekmektedir [50].

#### 4.2.6 Posttranslasyonel Düzenleme

Ökaryotlarda gen ekspresyonunun son kontrol seviyesi, translyasyon sonrası düzenlemedir. Bu tip kontrol, proteinin yapıldıktan sonra, örneğin aktivitesini etkileyecek şekilde modifiye edilmesini içerir. Translyasyon sonrası düzenlemenin bir örneği, enzim inhibisyonudur. Bir enzime artık ihtiyaç duyulmadığında, onun substratına bağlanmasını önleyen rekabetçi veya allosterik bir inhibitör tarafından inhibe edilir. İnhibisyon tersine çevrilebilir, böylece enzim daha sonra yeniden etkinleştirilebilir. Bu, gerekli olmadığında enzimi parçalamaktan ve daha sonra tekrar ihtiyaç duyulduğunda daha fazlasını yapmaktan daha etkilidir. Proteinlerin aktivitesi ve/veya stabilitesi, metil, fosfat veya asetil grupları gibi fonksiyonel gruplar eklenerek de düzenlenebilir. Bazen bu modifikasyonlar, bir proteinin hücrede nerede bulunduğunu, örneğin çekirdekte, sitoplazmada veya plazma zarına bağlı olarak düzenleyebilir [74]. Nükleotitlerin transkripsiyon sonrası modifikasyonları, uygun RNA fonksiyonunda önemli ve her yerde bulunan, ancak henüz tam olarak anlaşılmamış bir rol oynar. Bugüne kadar, ribozomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA), haberci RNA (mRNA), küçük nükleer (snRNA) ve mikroRNA (miRNA) dahil olmak üzere çeşitli RNA molekülleri için 100'den fazla farklı modifikasyon türü rapor edilmiştir. Bu modifikasyonlar kimyasal olarak çeşitlidir ve birkaç isim vermek gerekirse metilasyon, hidroksilasyon, asetilasyon, deaminasyon, izomerizasyon, selenilasyon, indirgeme ve siklizasyondan oluşur [83].

Protein biyosentezinde sonraki aşamalardan biri olan proteinlerin translyasyon sonrası değişimi (Posttranslational Modification, PTM), proteinlerin translyasyondan sonra geçebilecek tersinir veya tersinmez kimyasal değişikliklere işaret eder. Başka bir deyişle, PTM'ler, DNA'dan RNA'ya kopyalandıktan ve proteine çevrildikten sonra ortaya çıkan bir polipeptid zincirinin kimyasal

modifikasyonlarıdır. Bu kimyasal değişiklikler, peptid bağlarının enzimatik yarılmışından belirli kimyasal grupların, lipitlerin, karbonhidratların ve hatta tüm proteinlerin kovalent ilavelerine, amino asit yan zincirlerine kadar değişir. Bir polipeptid zincirinin biyosentezinden sonraki bu kimyasal modifikasyonları, amino asit yapıları ve özelliklerinin aralığını genişletir ve sonuç olarak proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını çeşitlendirir. DNA tipik olarak 20 birincil amino asidi kodlamasına rağmen, proteinler çeşitli PTM'ler nedeniyle 140'tan fazla farklı kalıntı içerir [84]. Yolak enzimlerinin kendi kendine kenetlenerek veya sentetik protein iskeletlerinin kullanılmasıyla birlikte lokalize edilmesi, difüzyon sınırlandırılmış sistemlerde substrat yolunu kolaylaştırmak için kullanılır. Bu posttranslasyonel dengeleme tekniğini kullanmak için, istenen enzim(ler) ve bağlayıcı ligand(lar)ın transkripsiyonel bir füzyonu oluşturulmalı ve tamamlayıcı bağlanma alanları içeren bir sentetik protein iskelesi ile birlikte ifade edilmelidir. Birkaç sistem için etkili olmakla birlikte, protein iskelesinin aşırı ekspresyonu, sistemin metabolik yükünü artırır ve optimal dengeye ulaşamazsa, çoğu zaman büyüme hızını ve üretimini düşürebilir [50].

Metabolik akışların düzenlenmesi birçok mikrobiyal sürecin merkezinde yer alır ve transkripsiyonel düzenleme, posttranslasyonel modifikasyon ve allosterik gibi birçok düzenleyici katman içerir. Tüm bu düzenleyici katmanlar sonuçta metabolik enzimlerin kapasitelerini ekspresyonlarında veya aktivitelerindeki değişikliklerle değiştirerek etki ederler [85]. Hücre sel sinyalizasyonun düzenlenmesinde translasyon sonrası modifikasyonların (PTM'ler) oynadığı karmaşık rol için ilgi artmaktadır. Translasyon sonrası proteinlerin modifikasyonu, hücre fonksiyonunun ve sağ kalımın kontrolüne katkıda bulunur. Bunların insülin üreten pankreas beta hücrelerindeki dengesi, glikoz homeostazının korunması için önemlidir. Beta hücrelerinin hayatta kalması için reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinden korunmak gerekir, ancak bu insülin salgılama işlevi pahasına gerçekleşirse, adacıkların değişen metabolik koşullara cevap verme yeteneği tehlikeye girebilir [86]. Oldukça organize çok hücreli organizmaların hücreleri, homeostazı sağlamak için derhal hücre dışı ortamlarını birlikte kontrol edebilirler. Bu ayrıcalık olmadan, mikroorganizmalar her zaman öngörülemez şekilde değişen koşullara hızlı bir şekilde -genellikle iç akışlarını buna göre ayarlayarak- cevap vermeye hazır olmalıdır. Allosterik efektörlerin veya PTM'lerin yokluğunda bile, enzim kinetiğinin fiziksel doğası, doyumluk seviyesini ( $K_m$  değerine göre substrat konsantrasyonu) veya termodinamik sürüş kuvvetini (geri dönüşümlü reaksiyonlar için) değiştirerek akışın pasif olarak düzenlenmesine izin verir [85].

## 5. SENTETİK BİYOLOJİNİN KATKILARI

Sentetik biyoloji, araçlara (minimal konaklar, vektörler, genetik kontrolörler, karakterize edilmiş enzimler) katkıda bulunarak metabolik mühendisliği önemli ölçüde ilerletebilir. Bu araçların

geliştirilmesi, sıtmaya karşı ilaç artemisinin geliştirme maliyetlerini ve süresini önemli ölçüde azaltmıştır, ancak daha fazla aracın bulunması bu maliyetleri önemli ölçüde azaltabilirdi [16].

Doğal ürünler, bulaşıcı hastalıklar ve onkoloji gibi tedavi edici alanlarda değerli olmuştur. Ancak bu ilaçlar, doğal konaklarda küçük miktarlarda üretilir ve bu nedenle, bu ilaçların doğal konaklardan ekstraksiyonu genellikle ekonomik değildir veya çevre üzerinde olumsuz bir etkisi olabilir. Güçlü bir çözüm olarak, büyük ölçekli üretime uygun hale getirilebilen, metabolik olarak tasarlanmış mikroorganizmalarda veya bitki hücrelerinde ilaç üretimidir [87]. Sentetik biyoloji, farmasötiklerin ve diğer yüksek değerli kimyasalların biyoteknolojik üretimi için yeni nesil bir mikrobiyal mühendislik sağlar. Ayrıca, tüm mühendislik disiplinleri gibi, tasarla-yap-test et (ve öğren) döngüsü boyunca tüm adımlar için güçlü standartlaştırılmış araçların mevcudiyetine dayanır [88]. Yükselen bir alan olarak, sentetik biyoloji, yapay sentetik devreler kurarak hücresel ağların kesin düzenlemelerini gerçekleştirmeyi amaçlar ve hastalıkları tedavi etmek ve yeni ilaç hedefleri keşfetmek için büyük fırsatlar sunar. Farklı mantık kapılarının kombinasyon moduna bağlı olarak, çok seviyeli düzenlemeleri gerçekleştirmek için çeşitli sentetik devreler oluşturulur. Belirli sentetik devrelerde, ilaçlar genellikle devrelerin çalışmasını sağlamak için girdi görevi görür. Metabolik hastalık, bağışıklık hastalığı, kanser ve bakteriyel enfeksiyon dahil olmak üzere çeşitli hastalık modellerini deneysel olarak tedavi etmek için ilaca duyarlı gen devreleri oluşturmak mümkün hale gelmektedir [89].

Sentetik biyoloji, ilaç keşfi alanını yavaş yavaş yeniden yönlendiren gelişmekte olan bir disiplindir. Binlerce yıl boyunca, bitkiler gibi canlı organizmalar, insan ilaçlarının ana kaynağı olmuştur. Bununla birlikte, doğal ürünleri yeniden sentezlemenin zorluğu, ilaç endüstrilerini genellikle beşerî tıbbın bu zengin kaynağından uzaklaştırmıştır. Daha yakın zamanlarda, mikroorganizmalardaki biosentetik birimlerin genetik manipülasyonu yoluyla dönüşüm konusundaki ilerleme, doğal ürün türevlerinin geniş kimyasal alanının derinlemesine araştırılması olasılığını açmıştır. Sentetik biyolojinin ilaç sentezindeki başarısı, artemisinin mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak üretilmesiyle, protein ve metabolik mühendisliğinde güçlü doruğa ulaşılmıştır. Bugün, sentetik hücreler sadece biyofabrikalar olarak kullanılmazlar, aynı zamanda hem hedef tabanlı hem de fenotipik tabanlı yaklaşımlar için hücre tabanlı tarama platformları olarak kullanılırlar. Sentetik hücrelerde tasarlanmış genetik devreler ayrıca hastalık mekanizmalarını veya ilaç etki mekanizmalarını deşifre etmek ve bakteri konsorsiyumları içinde hücre-hücre iletişimini incelemek için kullanılır [90].

Farmasötiklerin sentetik biyolojisi ayrıca, analiz edilen hemen hemen her genomda keşfedilmemiş biosentetik kapasitelerin beklenmedik bir zenginliğini ortaya çıkaran mikrobiyal genom ve metagenom dizilerinin son çığından ilham almıştır [88]. Sentetik biyolojinin ilk aşamasında, mikroorganizma metabolizmalarını yeniden yapılandırarak doğal ürünleri optimize etmek veya keşfetmek çok dikkat çekmektedir. İleri teknoloji geliştikçe, sentetik biyoloji temelli terapötik

potansiyel, memeli hastalıklarının tedavisinde daha yaygın olarak uygulanmaktadır. Gen ve tasarlanmış hücre tedavileri fikrinin ortaya atılmasıyla birlikte kişiselleştirilmiş tıp giderek yaygınlaşıyor. İlaç hedef keşfi, yeni ilaç ve terapötiklerin geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır. Geleneksel olarak, ilaç hedef taraması ve doğrulaması genellikle karmaşık hücresel sistemde yüksek seçicilik gerektiren kimyasal problemlere bağlıdır. Ayrıca kimyasal problemlerin sentezi muhtemelen moleküler konformasyonun değişmesinden dolayı yanlış pozitif sonuçlar üretir. Kimyasal sondalar bazen küçük moleküllü ilaçların biyoaktivitesini etkiler ve daha sonra yanlış yargıya neden olur. Buna karşılık, sentetik biyoloji güdümlü ilaç hedef keşfi, hücre içi dinamik düzenlemenin tepkisine ve ilaçları değiştirmeden fenotipik değişime bağlıdır, bu da hedeflerin varlığını yansıtanın daha gerçekçi bir yoludur. Kısaca, sentetik biyoloji, yeni ilaç hedefi keşfetmek ve hastalıklar için yeni tedavi stratejisi tasarlamak için büyük bir potansiyeli temsil etmektedir [89].

## **6. SONUÇLAR**

Metabolik mühendisliği yaklaşımları, endüstriyel uygulamalarda mikroorganizmaları tasarlamak için kullanılmaktadır. Bu sayede, yüksek ürün üretme kabiliyeti ile geleneksel olmayan çevre koşullarında işlev görebilecek suşlar elde etmek mümkün olacaktır. Ayrıca, istenen ürünü üretmek için mikroorganizmaları tasarlayacak olan yeşil fabrika kavramı, bu teknolojilerin gelişmesiyle yakın gelecekte önemli bir yere sahip olacağı görülmektedir.

Metabolik mühendisliği, bir organizmanın metabolizmasını değiştirmek için genetik mühendisliğin kullanılmasıdır. Mevcut yolların optimizasyonu için farmakoloji veya biyoteknoloji için yüksek verimli spesifik metabolitlerin üretilmesi amacı ile, en yaygın olarak bakteriler, maya veya bitkilerdeki yolak bileşenlerinin dahil edilmesini içerebilir. Doğal ürünler ortam koşullarında kendini optimize etme yeteneğine sahiptir. Fakat endüstriyel ürünlerin üretiminde istenen ürünün aşırı miktarda üretimini sağlamak için optimizasyon en önemli adımlardan biridir. Gelecekte birçok ürünün çeşitli endüstri alanlarında üretiminde alternatif yöntemler gereklidir. Metabolik mühendisliği bu yönden birçok avantaja sahiptir.

Farmasötikler, sentetik biyolojinin en eski başarı öykülerinden bazılarında iki ana nedenden dolayı ilham vermiştir: bir yandan, mevcut kullanımda olan küçük moleküllü ilaçlar çok sık olarak doğal ürünlerden elde edilir, böylece mikrobiyal sistemleri görece olarak düz-ileri olarak üretime geri dönüşü sağlanır. Öte yandan, birçok doğal biyosentetik yolak, sentetik biyolojinin mühendislik yaklaşımlarından yararlanılabilen, birçok düzeyde şaşırtıcı düzeyde yerleşik modülerlik göstermektedir.

Genetik mühendisliğinin gelişmesiyle, heterolog ürünler üretmek mümkün hale gelmiştir: doğada bulunan ancak üretici tarafından üretilmeyen ürünler, tek bir genin transformasyonu yoluyla

üretilebilen proteinler olma eğilimindedir. Genetik mühendisliği aynı zamanda doğal üreticilerde belirli genler oluşturma ve mutajenez ve seleksiyon için gereken süreyi azaltma yeteneğini de getirmiştir. Genom dizilimi ve daha iyi araçlarla, daha küçük moleküller, bir organizmada doğal olarak üretilen ancak ekstraksiyonu ekonomik olarak mümkün olmayan seviyelerde üretilen kimyasalları, üretme yeteneği oluşmuştur. Protein mühendisliğinin gelişimi ve laboratuvar evrimi, doğada üretilmeyen kimyasalları üretebilen enzim katalizörleri sağlamıştır.

Gelecekteki uygulamalar, metabolik mühendisliğindeki araçların mevcudiyeti ile daha kolaylaşacaktır. Hedef proteinin üretimini maksimize etmek için genlerin yüksek oranda eksprese edildiği farmasötik proteinlerin üretiminden farklı olarak, metabolik mühendislikte transformasyonel enzimleri kodlayan genlerin yüksek oranda eksprese edilmesine gerek yoktur; bunun yerine enzimlerin, yalnızca metabolik ara ürünleri yeterince dönüştürmeye yetecek kadar katalitik miktarlarda üretilmesi gerekir. İstenilen ürünlere yeterli oranda istenen genlerin çok yüksek bir seviyede ekspresyonu, hücreyi, aksi takdirde ilgilenilen istenen molekülü üretmek için kullanılacak metabolitlerin (fazla mRNA için nükleotidler, fazla protein için amino asitler, vb.) azalmasına neden olacaktır. Ayrıca, yabancı bir metabolik yolağın ara ürünleri heterolog bir konak için toksik olabileceğinden, bu da istenen nihai bileşiğin üretiminin azalmasına neden olabilir; böylece yolaktaki hiçbir ara madde toksik düzeylerde birikir. Bu nedenle, metabolik mühendisliğinde hücre içindeki doğal ve heterolog reaksiyonları doğru bir şekilde kontrol etmeyi sağlayacak bir araç setine ihtiyaç vardır. Bundan dolayı bu sistemde kullanılan optimizasyon yöntemleri önemli bir role sahip olmaktadır.

Farmasötik endüstrisinin gelecekteki başarısı, yeni aktivitelere sahip veya daha spesifik hedeflere yönelik yeni bileşiklerin tanımlanmasına veya geliştirilmesine bağlıdır. Bazı bakterilerin metabolik mühendisliğinin son başarıları; özel, hassas moleküllerin sürdürülebilir biyoteknolojik üretimine yönelik bir gelişmenin başlangıcına işaret etmektedir. Genom, transkriptom, proteom ve diğer sistem biyolojisi analizlerinin sonucu olarak suş gelişimi için artan sayıda hedefin tanımlanması beklenmektedir. Mevcut başarılar ve gözlemlenen eğilimler, mikrobiyal biyoteknolojinin farmasötik üretim üzerindeki artan etkisine işaret etmektedir.

İlaç ham maddelerinin çoğunun bitkisel kaynaklı olduğu düşünüldüğünde bitki çeşitliliğinde ciddi bir azalma vardır ve türlerin çoğu yok olmaktadır. Dolayısıyla gelecekte ilaç ham maddeleri için bu bitkisel kaynakların bulunması imkânsız hale geleceğinden metabolik mühendisliği hem bitki kaynağından ilaç ham maddesinin eldesine ciddi bir alternatif olacak ve hem de bitkide bu ilaç ham maddelerinin üretildiği biyokimyasal yolların mikroorganizmalara taşınması ve entegrasyonu yoluyla korumaya alınmış olacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK 117M051 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmektedirler.

## ETİK BEYANI

Bu çalışmada, yazarlar “Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi” kapsamındaki tüm kurallara uydıklarını, ilgili yönergenin “Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler” olarak belirtilen başlığı altındaki eylemlerden hiçbirini gerçekleştirmediklerini taahhüt ederler.

## YAZARLARIN KATKILARI

Esra GÜL: Yazma-orijinal taslak hazırlama, veri toplama, verinin düzenlenmesi, inceleme, yazma-gözden geçirme ve düzenleme. Venhar ÇELİK: Kavramsallaştırma, orijinal taslak hazırlama, veri toplama, verinin düzenlenmesi, gözden geçirme ve düzenleme, gözetim ve liderlik sorumluluğu, doğrulama.

## KAYNAKLAR

- [1] T. U. Chae, S. Y. Choi, J. W. Kim, Y.-S. Ko, and S. Y. Lee, “Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 47, pp. 67–82, 2017.
- [2] A. J. van Maris, D. A. Abbott, E. Bellissimi, J. van den Brink, M. Kuyper, M. A. Luttik, H. W. Wisselink, W. A. Scheffers, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk, “Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *saccharomyces cerevisiae*: Current status,” *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 90, no. 4, pp. 391–418, 2006.
- [3] S. Raman, J. K. Rogers, N. D. Taylor, and G. M. Church, “Evolution-guided optimization of biosynthetic pathways,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 50, pp. 17803–17808, 2014.
- [4] M. Falb, K. Müller, L. Königsmaier, T. Oberwinkler, P. Horn, S. von Gronau, O. Gonzalez, F. Pfeiffer, E. Bornberg-Bauer, and D. Oesterhelt, “Metabolism of halophilic archaea,” *Extremophiles*, vol. 12, no. 2, pp. 177–196, 2008.
- [5] S. Y. Lee, H. U. Kim, J. H. Park, J. M. Park, and T. Y. Kim, “Metabolic Engineering of Microorganisms: General strategies and drug production,” *Drug Discovery Today*, vol. 14, no. 1-2, pp. 78–88, 2009.



- [6] J. Nielsen, "Production of biopharmaceutical proteins by yeast," *Bioengineered*, vol. 4, no. 4, pp. 207–211, 2013.
- [7] L. B. Pickens, Y. Tang, and Y.-H. Chooi, "Metabolic Engineering for the production of natural products," *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, vol. 2, no. 1, pp. 211–236, 2011.
- [8] A. Dasgupta, N. Chowdhury, and R. K. De, "Metabolic pathway engineering: Perspectives and Applications," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 192, pp. 105436, 2020.
- [9] A. Stryjewska, K. Kiepusa, T. Librowski, and S. Lochyński, "Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. part III. Biocatalysis, Metabolic Engineering and Molecular Modelling," *Pharmacological Reports*, vol. 65, no. 5, pp. 1102–1111, 2013.
- [10] K. Deo Pandey, "Metabolic Engineering: New Era in Pharmaceuticals," *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, vol. 2, no. 5, 2017.
- [11] S. Mandal, M. Moudgil, and S. K. Mandal, "Rational drug design," *European Journal of Pharmacology*, vol. 625, no. 1-3, pp. 90–100, 2009.
- [12] L. Satish, Y. Seher, K. Rakkammal, P. Muthuramalingam, C. R. Lakshmi, A. Hemasundar, K. Prasanth, S. Shamili, M. K. Swamy, M. S. Dhanarajan, and M. Ramesh, "Metabolic engineering strategies to enhance the production of anticancer drug, Paclitaxel," *Paclitaxel*, pp. 229–250, 2022.
- [13] A. M. Redding-Johanson, T. S. Batth, R. Chan, R. Krupa, H. L. Szmids, P. D. Adams, J. D. Keasling, T. Soon Lee, A. Mukhopadhyay, and C. J. Petzold, "Targeted proteomics for metabolic pathway optimization: Application to terpene production," *Metabolic Engineering*, vol. 13, no. 2, pp. 194–203, 2011.
- [14] A. Sarnaik, M. H. Abernathy, X. Han, Y. Ouyang, K. Xia, Y. Chen, B. Cress, F. Zhang, A. Lali, R. Pandit, R. J. Linhardt, Y. J. Tang, and M. A. G. Koffas, "Metabolic Engineering of cyanobacteria for photoautotrophic production of heparosan, a pharmaceutical precursor of heparin," *Algal Research*, vol. 37, pp. 57–63, 2019.
- [15] J. Zhu, L. Li, F. Wu, Y. Wu, Z. Wang, X. Chen, J. Li, D. Cai, and S. Chen, "Metabolic Engineering of aspartic acid supply modules for enhanced production of bacitracin in bacillus licheniformis," *ACS Synthetic Biology*, vol. 10, no. 9, pp. 2243–2251, 2021.
- [16] J. D. Keasling, "Synthetic Biology and the development of tools for metabolic engineering," *Metabolic Engineering*, vol. 14, no. 3, pp. 189–195, 2012.
- [17] V. V. C. Sinatti, C. A. Gonçalves, and A. S. Romão-Dumaresq, "Identification of metabolites identical and similar to drugs as candidates for metabolic engineering," *Journal of Biotechnology*, vol. 302, pp. 67–76, 2019.
- [18] J. Nielsen and M. C. Jewett, "Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Yeast Research*, vol. 8, no. 1, pp. 122–131, 2008.
- [19] I. A. Kurnaz, "A systematic review of Synthetic Biology - a new era in biopharmaceutical drug development," *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, vol. 29, no. 1, 2020.
- [20] A. Nakagawa, H. Minami, J.-S. Kim, T. Koyanagi, T. Katayama, F. Sato, and H. Kumagai, "A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids," *Nature Communications*, vol. 2, no. 1, 2011.
- [21] A. Badri, A. Williams, A. Awofiranye, P. Datta, K. Xia, W. He, K. Fraser, J. S. Dordick, R. J. Linhardt, and M. A. Koffas, "Complete biosynthesis of a sulfated chondroitin in *Escherichia coli*," *Nature Communications*, vol. 12, no. 1, 2021.

- [22] L. R. Jarboe, X. Zhang, X. Wang, J. C. Moore, K. T. Shanmugam, and L. O. Ingram, “Metabolic Engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: Contributions of Synthetic Biology,” *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, pp. 1–18, 2010.
- [23] F. David, A. M. Davis, M. Gossing, M. A. Hayes, E. Romero, L. H. Scott, and M. J. Wigglesworth, “A perspective on synthetic biology in drug discovery and development—current impact and future opportunities,” *SLAS Discovery*, vol. 26, no. 5, pp. 581–603, 2021.
- [24] T. Selas Castiñeiras, S. G. Williams, A. G. Hitchcock, and D. C. Smith, “E. coli strain engineering for the production of advanced biopharmaceutical products,” *FEMS Microbiology Letters*, vol. 365, no. 15, 2018.
- [25] S. Liu, J.-Z. Xu, and W.-G. Zhang, “Advances and prospects in metabolic engineering of escherichia coli for L-tryptophan production,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 38, no. 2, 2022.
- [26] H. B. Bang, I. H. Choi, J. H. Jang, and K. J. Jeong, “Engineering of escherichia coli for the economic production L-phenylalanine in large-scale bioreactor,” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 26, no. 3, pp. 468–475, 2021.
- [27] Z. Liu, X. Zhang, D. Lei, B. Qiao, and G.-R. Zhao, “Metabolic engineering of escherichia coli for de novo production of 3-phenylpropanol via retrobiosynthesis approach,” *Microbial Cell Factories*, vol. 20, no. 1, 2021.
- [28] H. Fang, D. Li, J. Kang, P. Jiang, J. Sun, and D. Zhang, “Metabolic engineering of escherichia coli for de novo biosynthesis of vitamin B12,” *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, 2018.
- [29] M. Zhang, C. Liu, D. Xi, H. Bi, Z. Cui, Y. Zhuang, H. Yin, and T. Liu, “Metabolic engineering of escherichia coli for high-level production of salicin,” *ACS Omega*, vol. 7, no. 37, pp. 33147–33155, 2022.
- [30] J. T. Ku, A. Y. Chen, and E. I. Lan, “Metabolic engineering of escherichia coli for efficient biosynthesis of butyl acetate,” *Microbial Cell Factories*, vol. 21, no. 1, 2022.
- [31] E. Rahmat and Y. Kang, “Yeast metabolic engineering for the production of pharmaceutically important secondary metabolites,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 104, no. 11, pp. 4659–4674, 2020.
- [32] I. Carqueijeiro, C. Langley, D. Grzech, K. Koudounas, N. Papon, S. E. O’Connor, and V. Courdavault, “Beyond the semi-synthetic artemisinin: Metabolic Engineering of Plant-derived anti-cancer drugs,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 65, pp. 17–24, 2020.
- [33] L. Xu, D. Wang, J. Chen, B. Li, Q. Li, P. Liu, Y. Qin, Z. Dai, F. Fan, and X. Zhang, “Metabolic engineering of saccharomyces cerevisiae for gram-scale diosgenin production,” *Metabolic Engineering*, vol. 70, pp. 115–128, 2022.
- [34] Y. Meng, X. Liu, L. Zhang, and G.-R. Zhao, “Modular engineering of saccharomyces cerevisiae for de novo biosynthesis of genistein,” *Microorganisms*, vol. 10, no. 7, pp. 1402, 2022.
- [35] F. Xiao, J. Lian, S. Tu, L. Xie, J. Li, F. Zhang, R. J. Linhardt, H. Huang, and W. Zhong, “Metabolic engineering of saccharomyces cerevisiae for high-level production of chlorogenic acid from glucose,” *ACS Synthetic Biology*, vol. 11, no. 2, pp. 800–811, 2022.
- [36] R. Bisquert, A. Planells-Cárcel, E. Valera-García, J. M. Guillamón, and S. Muñoz-Calvo, “Metabolic engineering of saccharomyces cerevisiae for hydroxytyrosol overproduction directly from glucose,” *Microbial Biotechnology*, vol. 15, no. 5, pp. 1499–1510, 2021.

- [37] H.-Y. Gao, H. Zhao, T.-Y. Hu, Z.-Q. Jiang, M. Xia, Y.-F. Zhang, Y. Lu, Y. Liu, Y. Yin, X.-C. Chen, Y.-F. Luo, J.-W. Zhou, J.-D. Wang, J. Gao, W. Gao, and L.-Q. Huang, "Metabolic engineering of *saccharomyces cerevisiae* for high-level Friedelin via genetic manipulation," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 10, 2022.
- [38] G. Wang, M. Huang, and J. Nielsen, "Exploring the potential of *saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 48, pp. 77–84, 2017.
- [39] H. Huttanus, J. Sheng, and X. Feng, "Metabolic Engineering for production of Small Molecule Drugs: Challenges and Solutions," *Fermentation*, vol. 2, no. 1, pp. 4, 2016.
- [40] D. Na, T. Y. Kim, and S. Y. Lee, "Construction and optimization of synthetic pathways in Metabolic Engineering," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 13, no. 3, pp. 363–370, 2010.
- [41] D. Morrone, L. Lowry, M. K. Determan, D. M. Hershey, M. Xu, and R. J. Peters, "Increasing diterpene yield with a modular metabolic engineering system in *E. coli*: Comparison of MeV and MEP isoprenoid precursor pathway engineering," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, no. 6, pp. 1893–1906, 2009.
- [42] A. Das, S.-H. Yoon, S.-H. Lee, J.-Y. Kim, D.-K. Oh, and S.-W. Kim, "An update on microbial carotenoid production: Application of recent Metabolic Engineering Tools," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 77, no. 3, pp. 505–512, 2007.
- [43] J. D. Keasling, "Manufacturing molecules through metabolic engineering," *Science*, vol. 330, no. 6009, pp. 1355–1358, 2010.
- [44] Y. Li, Z. Lin, C. Huang, Y. Zhang, Z. Wang, Y.-jie Tang, T. Chen, and X. Zhao, "Metabolic engineering of *escherichia coli* using CRISPR–cas9 mediated genome editing," *Metabolic Engineering*, vol. 31, pp. 13–21, 2015.
- [45] M. Chartrain, P. M. Salmon, D. K. Robinson, and B. C. Buckland, "Metabolic Engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 11, no. 2, pp. 209–214, 2000.
- [46] K. T. Shanmugam and L. O. Ingram, "Principles and practice of designing microbial biocatalysts for fuel and Chemical production," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 49, no. 2, 2021.
- [47] D. Yi, T. Bayer, C. P. Badenhorst, S. Wu, M. Doerr, M. Höhne, and U. T. Bornscheuer, "Recent trends in biocatalysis," *Chemical Society Reviews*, vol. 50, no. 14, pp. 8003–8049, 2021.
- [48] A. Illanes, A. Cauerhff, L. Wilson, and G. R. Castro, "Recent trends in Biocatalysis Engineering," *Bioresource Technology*, vol. 115, pp. 48–57, 2012.
- [49] A. Madhavan, R. Sindhu, P. Binod, R. K. Sukumaran, and A. Pandey, "Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications," *Bioresource Technology*, vol. 245, pp. 1304–1313, 2017.
- [50] J. A. Jones and M. A. G. Koffas, "Optimizing metabolic pathways for the improved production of natural products," *Methods in Enzymology*, pp. 179–193, 2016.
- [51] Q. Qi, J. Li, and J. Cheng, "Reconstruction of metabolic pathways by combining probabilistic graphical model-based and knowledge-based methods," *BMC Proceedings*, vol. 8, no. S6, 2014.
- [52] A. Perl, H. Dalton, Y. J. Yoo, and M. A. Koffas, "Methods for the development of recombinant microorganisms for the production of natural products," *Plant Metabolic Engineering*, pp. 1–17, 2021.

- [53] J. Montaña López, L. Duran, and J. L. Avalos, "Physiological limitations and opportunities in microbial metabolic engineering," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 20, no. 1, pp. 35–48, 2021.
- [54] Y. Mori and T. Shirai, "Designing artificial metabolic pathways, construction of target enzymes, and analysis of their function," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 54, pp. 41–44, 2018.
- [55] S.-U. Park, M. Yu, and P. J. Facchini, "Antisense RNA-mediated suppression of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in transgenic cell cultures of California Poppy," *Plant Physiology*, vol. 128, no. 2, pp. 696–706, 2002.
- [56] E. Öz, "Zeaksantin Öncül Maddesini Kullanarak Safran Apokarotenoidlerinin Heterolog Mikrobiyal Biyosentezi," Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik AnaBilim Dalı, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 2019.
- [57] J. Du, Y. Yuan, T. Si, J. Lian, and H. Zhao, "Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering," *Nucleic Acids Research*, vol. 40, no. 18, 2012.
- [58] B. W. Biggs, B. De Paepe, C. N. Santos, M. De Mey, and P. Kumaran Ajikumar, "Multivariate modular metabolic engineering for pathway and strain optimization," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 29, pp. 156–162, 2014.
- [59] F. He, E. Murabito, and H. V. Westerhoff, "Synthetic Biology and Regulatory Networks: Where Metabolic Systems Biology Meets Control Engineering," *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 13, no. 117, pp. 20151046, 2016.
- [60] O. D. Kim, M. Rocha, and P. Maia, "A review of dynamic modeling approaches and their application in computational strain optimization for Metabolic Engineering," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 2018.
- [61] R. Mahr and J. Frunzke, "Transcription factor-based biosensors in Biotechnology: Current State and future prospects," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 1, pp. 79–90, 2015.
- [62] M.-K. Kang and J. Nielsen, "Biobased production of alkanes and alkenes through metabolic engineering of Microorganisms," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 44, no. 4-5, pp. 613–622, 2017.
- [63] L. Carrilero, A. Kottara, D. Guymer, E. Harrison, J. P. Hall, and M. A. Brockhurst, "Positive selection inhibits plasmid coexistence in bacterial genomes," *mBio*, vol. 12, no. 3, 2021.
- [64] A. Kan, I. Gelfat, S. Emani, P. Praveschotinunt, and N. S. Joshi, "Plasmid vectors for in vivo selection-free use with the probiotic E.&nbsp;coli nissle 1917," *ACS Synthetic Biology*, vol. 10, no. 1, pp. 94–106, 2020.
- [65] G. A. Gonçalves, D. M. Bower, D. M. Prazeres, G. A. Monteiro, and K. L. Prather, "Rational engineering of escherichia coli strains for plasmid biopharmaceutical manufacturing," *Biotechnology Journal*, vol. 7, no. 2, pp. 251–261, 2011.
- [66] T. Wein, N. F. Hülter, I. Mizrahi, and T. Dagan, "Emergence of plasmid stability under non-selective conditions maintains antibiotic resistance," *Nature Communications*, vol. 10, no. 1, 2019.
- [67] C.-W. Jang and T. Magnuson, "A novel selection marker for efficient DNA cloning and recombineering in E. coli," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 2, 2013.
- [68] J. H. Malone, "Balancing copy number in ribosomal DNA," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 9, pp. 2635–2636, 2015.

- [69] O. Pös, J. Radvanszky, G. Buglyó, Z. Pös, D. Rusnakova, B. Nagy, and T. Szemes, “DNA copy number variation: Main characteristics, evolutionary significance, and pathological aspects,” *Biomedical Journal*, vol. 44, no. 5, pp. 548–559, 2021.
- [70] F. Nadler, F. Bracharz, and J. Kabisch, “Copyswitch—in vivo optimization of gene copy numbers for heterologous gene expression in bacillus subtilis,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 6, 2019.
- [71] M. M. Watve, N. Dahanukar, and M. G. Watve, “Sociobiological control of plasmid copy number in bacteria,” *PLoS ONE*, vol. 5, no. 2, 2010.
- [72] T. Schmidt, K. Friehs, and E. Flaschel, “Rapid determination of plasmid copy number,” *Journal of Biotechnology*, vol. 49, no. 1-3, pp. 219–229, 1996.
- [73] M. Jahn, C. Vorpahl, T. Hübschmann, H. Harms, and S. Müller, “Copy number variability of expression plasmids determined by cell sorting and droplet digital PCR,” *Microbial Cell Factories*, vol. 15, no. 1, 2016.
- [74] E. J. Nestler and S. E. Hyman, “Regulation of gene expression,” *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*, pp. 217-228, 2002.
- [75] P. Cramer, “Organization and regulation of Gene Transcription,” *Nature*, vol. 573, no. 7772, pp. 45–54, 2019.
- [76] T. I. Lee and R. A. Young, “Transcriptional regulation and its misregulation in disease,” *Cell*, vol. 152, no. 6, pp. 1237–1251, 2013.
- [77] J. A. Jones, V. R. Vernacchio, D. M. Lachance, M. Lebovich, L. Fu, A. N. Shirke, V. L. Schultz, B. Cress, R. J. Linhardt, and M. A. Koffas, “EPathOptimize: A combinatorial approach for transcriptional balancing of metabolic pathways,” *Scientific Reports*, vol. 5, no. 1, 2015.
- [78] G. Tkačik, C. G. Callan, and W. Bialek, “Information flow and optimization in transcriptional regulation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 34, pp. 12265–12270, 2008.
- [79] F. Jacob and J. Monod, “Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 3, no. 3, pp. 318–356, 1961.
- [80] J. W. B. Hershey, N. Sonenberg, and M. B. Mathews, “Principles of Translational Control,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 11, no. 9, 2018.
- [81] V. Reinke, “Transcriptional regulation of gene expression in *C. elegans*,” *WormBook*, pp. 1–31, 2013.
- [82] A. Wegner, J. Meiser, D. Weindl, and K. Hiller, “How metabolites modulate metabolic flux,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 34, pp. 16–22, 2015.
- [83] V. Stojković and D. G. Fujimori, “Radical SAM-mediated methylation of ribosomal RNA,” *Methods in Enzymology*, pp. 355–376, 2015.
- [84] V. N. Uversky, “Posttranslational modification,” *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, pp. 425–430, 2013.
- [85] K. Kochanowski, U. Sauer, and E. Noor, “Posttranslational regulation of Microbial Metabolism,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 27, pp. 10–17, 2015.
- [86] P. E. MacDonald, “A post-translational balancing act: The good and the bad of sumoylation in pancreatic islets,” *Diabetologia*, vol. 61, no. 4, pp. 775–779, 2018.
- [87] Z. Abil, X. Xiong, and H. Zhao, “Synthetic Biology for Therapeutic Applications,” *Molecular Pharmaceutics*, vol. 12, no. 2, pp. 322–331, 2014.
- [88] R. Breitling and E. Takano, “Synthetic Biology advances for pharmaceutical production,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 35, pp. 46–51, 2015.

- [89] Y. Xie, Y. Yang, Y. He, X. Wang, P. Zhang, H. Li, and S. Liang, “Synthetic biology speeds up drug target discovery,” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 11, 2020.
- [90] J.-Y. Trosset and P. Carbonell, “Synthetic Biology for Pharmaceutical Drug Discovery,” *Drug Design, Development and Therapy*, pp. 6285, 2015.

*Copyright © 2022 Gül and Çelik. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).*