

## ÖZET

### ***Chlamydomonas reinhardtii* FOSFOENOLPİRÜVAT KARBOKSİKİNAZ 1 GENİNİN A VE B KESİM VARYANTLARININ İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE *Escherichia coli*'de HETEROLOG EKSPRESYONU**

**Nicat CEBRAİLOĞLU**

**Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV**

**Ağustos 2017, 30 sayfa**

Yürütülen bu çalışmada, alglerde yağ oranı seviyesiyle ilişkili olduğu düşünülen *Pck1* geninin *Chlamydomonas reinhardtii*'den klonlanması, ilk defa olarak tanımlanması, karakterizasyonu ve ekspresyon analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular, bir sonraki çalışmalarda alglerde yağ oranının artırılarak, alglerden endüstriyel olarak yüksek verimli yağ elde edilmesi amacıyla kullanılabilir. Yapılan analizlerde, *Chlamydomonas reinhardtii* 2137 (CC-4886) suşu kaynak olarak kullanılmıştır. Mikroalgler, sabit sıcaklık ve ışıklı ortam şartlarında TAP besiyerinde büyütülmüştür. Moleküler analizler, mikroalg kütlelerinin sıvı azot yardımıyla ekstrakte edilmesiyle elde edilen nükleik asit ve proteinlerle yapılmıştır. *Pck1* geninin, *Pck1a* ve *Pck1b* olmak üzere, iki farklı alternatif kesimi vardır, her iki kesim varyantı, PZR amplifikasyonları ile elde edilmiş ve *E. coli*'ye klonlanarak, enzim aktivasyon ölçümleriyle aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca SDS-PAGE ve Western Blot yöntemleriyle de proteinlerin boyutları gösterilmiştir. Mikroalg hücreleri TAP besiyerinde farklı azot ve karbondioksit oranlarında büyütülmüş, besiyerinde azalan azot oranlarıyla beraber enzim aktivitesinin azalmasıyla, PCK1 enziminin susuturulması halinde algal yağ oranının artabileceği gösterilmiştir. Karbondioksit oranı arttıkça enzim aktivitesinin arttığına saptanmasıyla da PCK1 enziminin fotosentetik bir enzim olabileceği gösterilmiştir, bu şekilde model bir organizma olan *Chlamydomonas reinhardtii*'de fotosentez sisteminin anlaşılmasına katkı sağlanmıştır. Ayrıca *Pck1*'in fotosentez sistemiyle ilişkili olması, susturulmasının algal yağ oranının artmasına sebep olacağına diğer bir işareti olarak ortaya koyulmuştur. PCK1 enziminin, mikroalglerde aktif bir enzim olduğunun gösterilmesi ve alglerde hücresel yağ oranıyla ilişkisinin ortaya çıkarılmasıyla, alglerde yağ oranının artırılmasına yönelik yapılacak çalışmalara önemli bir katkıda bulunulmuştur. Ayrıca bir model organizma olan *Chlamydomonas reinhardtii*'de fotosentez sistemiyle ilgili bu karakterizasyonun yapılması, bu çalışmayı referans alarak, diğer yakın türlerde ilgili enzim genlerinin karakterizasyonunun yapılması yönünde bir başlangıç olmuştur.

**ANAHTAR KELİMELER:** Algal Biyodizel, *Chlamydomonas*, C4 Fotosentez, PCK1

**JÜRİ:** Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV (Danışman)

Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK

Yrd. Doç. Dr. Ersin AKINCI

## ABSTRACT

### ISOLATION, CHARACTERISATION AND HETEROLOG EXPRESSION IN *Escherichia coli* OF A AND B SPLICING VARIANTS OF PHOSPHOENOLPYRUVAT CARBOXYKINASE 1 GENE FROM *Chlamydomonas reinhardtii*

Nicat CEBRAILOGLU

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology  
Supervisor: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV  
August 2017, 30 pages

In this study, for the first time cloning, identification, characterization and expression analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* *Pck1* enzyme gene thought to be related to the level of oil content in algae, was aimed. Findings can be used to increase the oil content of algae in subsequent studies and to provide industrially high yield oil from algae. In the analyzes made, *Chlamydomonas reinhardtii* 2137 (CC-4886) strains were used as the source. Microalgae were grown in TAP medium under constant temperature and light conditions. Molecular analyzes were performed with nucleic acids and proteins obtained by extracting microalgae mass with liquid nitrogen. *Pck1a* and *Pck1b*, two different variants of the *Pck1* gene with two alternative fragments, were obtained by PCR amplification and cloned into *E. coli* and their activities were determined by enzyme activation measurements. Besides, sizes of enzyme proteins were shown by SDS-PAGE and Western Blot methods. Microalgae cells were grown at different nitrogen and carbon dioxide ratios on TAP medium and decreased enzyme activity in decreasing nitrogen ratios indicated that the ratio of algal oil could be increased if PCK1 enzyme was suspended. It has also been shown that increasing the carbon dioxide content increases the enzyme activity and that the enzyme PCK1 may be a photosynthetic enzyme, contributing to the understanding of the C4 photosynthesis system in the model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. Furthermore, the fact that *Pck1* is associated with the photosynthesis system is another sign that silencing will cause an increase in the algal oil ratio. The demonstration of the enzyme PCK1 as an active enzyme in microalgae and the identification of the relation with the ratio of cellular oil in algae has made a significant contribution to the studies to increase the oil ratio in algae. Moreover, this characterization of the photosynthesis system in *Chlamydomonas reinhardtii*, a model organism, has been the starting point for the characterization of related enzyme genes in other closely related species, with reference to this study.

**KEYWORDS:** Algal Biodiesel, *Chlamydomonas*, C4 photosynthesis, PCK1

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV (Supervisor)  
Assoc. Prof. Dr. Mehtap SAHIN CEVIK  
Asst. Prof. Dr. Ersin AKINCI

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında algal yağ artışında etkisi olabileceği öngörülen PCK1 enziminin varyantlarının karakterizasyonu ve tanımlanması çalışmaları yürütülmüştür. Öncelikle tez konunun belirlenmesi aşamasından itibaren, yönlendirmeleri, teorik ve deneysel olarak yardımlarıyla tezimin sonuçlandırılmasında büyük katkıları olan tez danışmanım Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV'a teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalarım boyunca teknik olarak yardımlarını esirgemeyen bölüm laboratuvarlarımızın araştırmacılarına, uzun süreli çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen, eşim ve anne, babama teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
1.GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	3
2.1. Mikroalgler.....	3
2.2. Alglerde Yağ Depolanması .....	3
2.3. Model Organizma <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	4
2.5. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 'de Genetik Değişiklik Uygulamaları.....	6
2.6. Karbon Konsantrasyon Mekanizmaları .....	7
2.7. C3 ve C4 Fotosentez Sistemlerinin Karşılaştırılması.....	7
2.8. Sucul Fotosentetik Mikroorganizmalar .....	8
2.9. Fosfoenolpirüvat Karboksikaz.....	8
3. MATERYAL VE METOD .....	10
3.1 Algal Suş ve Kültür Koşulları .....	10
3.2. RNA İzolasyonu ve Tek Zincirli cDNA Sentezi .....	11
3.3. <i>C. reinhardtii</i> Pck1 Geni Varyantlarının Amplifikasyonu.....	11
3.4. Rekombinant His6 Etiketli <i>C. reinhardtii</i> PCK1 Proteininin Oluşturulması .....	12
3.5. SDS-PAGE ve İmmunoblotlama .....	13
3.6. PCK1 Enzim Aktivite Ölçümleri .....	13
3.7. <i>C. reinhardtii</i> Hücrelerinin Farklı Yetiştirme Koşullarında Büyütülmesi .....	13
3.8. kPZR'yle Gen Anlatımının Hesaplanması .....	13
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	15
4.1. <i>C. reinhardtii</i> Pck1 Geninin Varyantlarının Amplifikasyonu ve Klonlanması .....	15
4.2. pET-28a(+)-Pck1 Plazmidinin Oluşturulması ve Heterolog Ekspresyonu .....	16
4.3. Rekombinant His <sub>6</sub> Etiketli <i>C. reinhardtii</i> PCK1 Proteininin Saflaştırılması.....	17
4.4. Farklı Koşullarda Büyütülen <i>C. reinhardtii</i> 'lerde PCK1 Aktivitesi .....	20

5. SONUÇ.....	22
6. KAYNAKLAR.....	24
ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

µl	mikrolitre
µg	mikrogram
bp	baz çifti
dk	dakika
g	gram
h	hektar
kb	kilobaz
kDa	kilo dalton
kg	kilogram
l	litre
ml	mililitre
s	saniye
vd	ve diğerleri

### Kısaltmalar

CRISPR	Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri
DNA	Deoksiribonükleik asit
OAA	Oksaloasetik asit
ORF	Açık Okuma Çerçevesi
kPZR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonükleoprotein
PEP	Fosfoenolpirüvat
PEPC	Fosfoenolpirüvat Karboksilaz
PEPCK	Fosfoenolpirüvat Karboksikinaz
PPDK	Pirüvat Ortofosfat Dikinaz
TALEN	Transkripsiyon Aktivatörü Benzeri Efektör Nükleaz
TAG	Triaçilgliserol
TAP	Tris Asetat Fosfat

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 3 boyutlu görünümü (Dartmouth Koleji Elektron Mikroskobu Merkezi, 2015). .....	5
Şekil 2.2. <i>C. reinhardtii</i> 'nin yaşam döngüsü ( Harris, 2009). .....	6
Şekil 2.3. C3 ve C4 fotosentez sistemlerinin şematik diyagramı (Wang vd 2012).....	8
Şekil 3.1. <i>C. reinhardtii</i> hücrelerinin standart TAP besiyerinde 7 gün boyunca kültüre edilmesi. ....	10
Şekil 4.1. <i>C. reinhardtii</i> cDNA'sından <i>CrPck1</i> geninin varyantlarının PZR amplifikasyonu. ....	15
Şekil 4.2. pET-28a(+) plazmid vektörünün haritası (Snapgene). .....	16
Şekil 4.3. pET-28a(+)- <i>CrPck1a</i> ve pET-28a(+)- <i>CrPck1b</i> 'nin NdeI ve XhoI restriksiyon enzimleriyle kesimi. ....	17
Şekil 4.4. rCrPCK1b proteininin SDS-PAGE (Coomassie Blue'yla boyanmış) analizleri .....	18
Şekil 4.5. E. coli BL21(DE3) suşundan eksprese ve pürifiye edilmiş CrPCK1 rekombinant proteinin immunoblot analizi. ....	19
Şekil 5.1. Alglerde bulunan muhtemel C4 siklusu (Sültemeyer 1998). .....	23

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çeşitli tarımsal ürünler ile mikroalgerin yağ oranı, yağ üretimi, arazi kullanımını ve biyodizel üretimlerinin karşılaştırılması (Mata vd., 2010).....	4
Çizelge 2.2. Bazı mikroalg türlerinin kuru ağırlıkta yağ içeriklerinin karşılaştırılması (Chisti, 2007).....	4
Çizelge 3.1. <i>Pck1</i> varyantlarının amplifikasyonu ve klonlanmasında kullanılan primerler. ....	11
Çizelge 3.2. <i>Pck1</i> varyantlarının kPZR analizleri için kullanılan primerler. ....	14
Çizelge 4.1. Farklı CO <sub>2</sub> ve NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> oranlarında büyütülen <i>C. reinhardtii</i> 'lerin PCK1 enzim aktiviteleri. ....	20
Çizelge 4.2. Farklı CO <sub>2</sub> ve NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> oranlarında büyütülen <i>C. reinhardtii</i> 'lerin PCK1 enzim aktiviteleri. ....	21



## 1.GİRİŞ

Artan sanayileşme ve gelişen ulaşım ağlarının bir sonucu olarak, yakıt enerjisi ihtiyacı da giderek artmaktadır. Her geçen gün artan yakıt ihtiyacımıza karşı, yakıt kaynaklarımız hızla tükenmektedir. 2009’da yapılan araştırmalar göstermiştir ki; tüketim hızı değişmese bile, var olan kaynaklar, dünyanın 42 yıllık petrol ihtiyacını karşılayabilecektir (Owen vd 2010). Yenilenebilir enerji kaynakları olan biyoyakıtlar, hem karbon salımının düşük olması hem de sürekli olarak yenilenebilir olması dolayısıyla, fosil yakıtlara alternatif olabilme kapasitesine sahiptir. Bununla beraber bu yakıtların üretim süreçleri çok maliyetli olmaktadır. Yapılan bilimsel çalışmalar neticesinde farklı biyoyakıt türlerinin üretim maliyeti kısmen düşürülmüş ve biyoyakıtlar, fosil yakıtlarla kıyaslanabilir hale gelmiştir (Puhan vd 2005).

Biyoyakıt üretimi için çeşitli kaynaklar kullanılmaktadır. Bunların bazılarının gıda olarak kullanılıyor olması, bazılarının ise yeterli derecede verim vermemesi dolayısıyla, hem diğer kaynaklara göre çok yüksek verim kapasitesi bulunan hem de önemli bir gıda kaynağı olmayan algler üçüncü nesil biyoyakıt kaynağı olarak belirlenmiştir. Alglerin doğal olarak, yüksek oranda ürettikleri trigliseritler, biyodizele dönüştürülerek yakıt olarak kullanılabilir. Alglerin yüksek verimli yağ üretimi, biyoyakıt fiyatlarının düşürülebilmesi için bir avantaj olmakla beraber üretim süreçlerinin pahalı olması henüz tam olarak aşılammış bir sorundur. Algal yakıt üretim maliyetinin düşürülmesi amacıyla, üretilen yağın veriminin artırılması için bir çok farklı alg geni üzerinde moleküler çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar daha çok, model organizma *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgi üzerinde yürütülmüştür. Yapılan çalışmalarla sürdürülen bazı genlerin %169’a varan verim artışlarına sebep olabildiği görülmüştür (Goncalves vd 2015).

Azot açlığına maruz bırakılan *Chlamydomonas* hücrelerinin, protein biyosentezi, TCA döngüsü ve fotosentezle ilişkili genlerinin anlatımının azaldığı buna karşın TAG biyosenteziyle ilişkili genlerin anlatımının arttığı görülmüştür (Miller vd 2010). *Chlamydomonas reinhardtii*’de bulunduğu tahmin edilen C4 benzeri fotosentez sisteminin henüz tam olarak karakterize edilememesinden dolayı, yağ oranının artırılması için C4 benzeri fotosentez sistemi üzerinde hangi genlerde değişiklik yapılması gerektiği tam olarak bilinmemektedir. *Chlamydomonas*’ta C4 benzeri fotosentez sistemiyle ilişkili olduğu düşünülen PEPC1 geninin tanımlanmasıyla fotosentez ilişkili bir genin *Chlamydomonas reinhardtii*’deki durumu gözlenmiş ve azot açlığında genin anlatımında görülen değişiklikler, gen ifadesinin kısıtlanmasının hücresel yağ oranına gösterebileceği etkinin ipucunu vermiştir (Mamedov vd 2005, 2010). Bu çalışmalardan yola çıkarak PEPC1 geninin ifadesinin azaltılmasıyla hücresel yağ oranının artışı sağlamak için 3 farklı bilimsel çalışma yapılmıştır (Deng vd 2014, Kao vd 2017, Wang vd 2017). Yapılan çalışmalar sonucu %94’e varan oranlarda hücresel yağ artışı sağlanabildiği görülmüştür.

*Chlamydomonas reinhardtii*’de PEPC1 enzimiyle beraber C4 benzeri fotosentez sisteminde görev yaptığı tahmin edilen bir diğer enzim olan PCK1 enziminin, alglerde hem PEPC1’in katalizlediği reaksiyonun tersinirini katalizlediği, hem de PEPC1’le aynı reaksiyonu katalizleyebildiği tahmin edilmektedir (Raven ve Beardall 2003). PCK1 enziminin *Chlamydomonas reinhardtii*’de karakterizasyonu ve tanımlanması sonucu

elde edilen veriler bir model organizmanın C4 benzeri fotosentez sisteminin aydınlatılmasına yardımcı olacak, ayrıca PEPC1 enziminde olduğu gibi hücrel yağ oranı yüksek alglerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara yol gösterici olacaktır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

### 2.1. Mikroalgler

Mikroalgler prokaryotik ya da ökaryotik olabilen, hızlı büyüyen ve zor koşullarda yaşayabilen fotosentetik mikroorganizmalardır. Prokaryotlara, Siyanobakteriler, ökaryotlara yeşil algler ve diatomlar örnektir (Li vd 2008). Mikroalgler dünya üzerinde yaşayan bütün ekosistemlerde bulunmaktadır ve çok çeşitli çevre koşullarında yaşarlar. 50000'den fazla türü bulunduğu tahmin edilmektedir ve yaklaşık 30000'i analiz edilmiştir (Wang vd 2010). Mikroalgler sahip olduğu potansiyelden dolayı 3. nesil biyoyakıt kaynağı olarak kabul edilmektedir. Yenilenebilir ve sürdürülebilir bir yakıt kaynağı olmasından dolayı, karbon emüsyonunun azaltılması gibi çevresel problemlerin çözümünde fosil yakıtlar yerine kullanılacak bir alternatif olarak görülmektedirler (Ho vd 2014). Mikroalgler diğer biyoyakıt kaynaklarına göre de birçok avantaja sahiptir. Bunlar, yüksek fotosentetik verimlilik, yetiştirilmesi için daha az alan ihtiyacı, gıda kaynağı olmayışı ve katma değeri yüksek ürün elde edilmesidir (Wijffels vd 2010). Bütün bu avantajlara rağmen mikroalgal yakıtlar yüksek üretim maliyetlerine sahiptir. Mikroalg suşlarında yapılan genetik geliştirmelerle bu sorun kısmen çözülmüş olsa da hala geliştirilmeye ihtiyaç duyulmaktadır.

### 2.2. Alglerde Yağ Depolanması

Alglerden elde edilen yağ veriminin, performansı en yüksek olan yağ bitkisinden 200 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Çizelge 2.1). Bazı algler biyokütlesinin yarısına kadar yağ üretebilmektedir (Chisti 2007) (Çizelge 2.2). Doğal olarak ürettikleri yağ oranının yüksek olmasıyla beraber, farklı koşullarda bu oranlar daha da artırılabilir. Algler stres koşullarında, metabolizmalarını değiştirerek yüksek miktarlarda nötral lipid depolamaktadırlar (Griffiths ve Harrison 2009, Griffiths vd 2012, Markou ve Nerantzis 2013, Merchant vd 2012). Azot yokluğu sırasında, nişasta ve protein gibi birincil metabolizma ürünlerinin sentezinde kullanılacak olan, fotosentezle bağlanan atmosferik karbon ve organik karbon kaynakları, Triaçilgliserol (TAG) sentezine yöneltilmektedir (Deng vd 2013). Alglerde yapılan bir çok araştırma sonunda görülmüştürki nişasta sentezinin bloke edilmesi karbon akışının yönünün değiştirilmesi ve TAG sentezinin artırılması için etkili bir yoldur. Elde edilen TAG, çeşitli işlemlerden geçirilerek biyodizel olarak kullanılabilmesi açısından önemlidir (Li vd 2010, Ramazanov ve Ramazanov 2006, Wang vd 2009, Work vd 2010).

Çizelge 2.1. Çeşitli tarımsal ürünler ile mikroalgerin yağ oranı, yağ üretimi, arazi kullanımı ve biyodizel üretimlerinin karşılaştırılması (Mata vd., 2010).

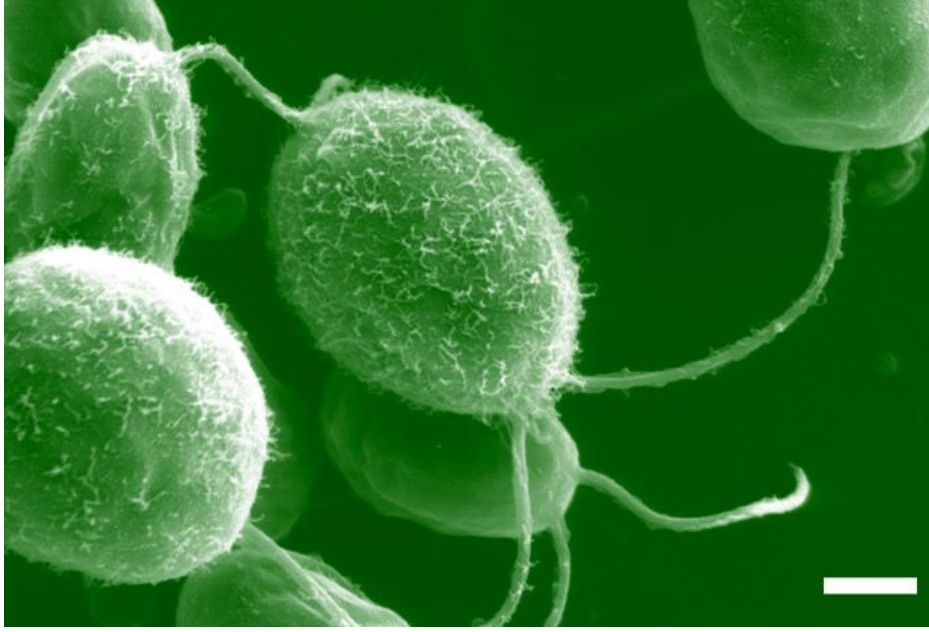
	Yağ oranı %	Yağ üretimi L/ha/yıl	Arazi kullanımı m <sup>2</sup> .yıl/kg.b.d	Biyodizel üretimi kg.b.d/ha.yıl
Mısır	44	172	66	152
Soya	18	636	18	562
Kanola (kolza)	41	974	12	862
Ayçiçeği	40	1070	11	946
Palmiye	36	5366	2	4747
Mikroalg(düşük)	30	58,700	0,2	51,927
Mikroalg(orta)	50	97,800	0,1	86,515
Mikroalg (yüksek)	70	136,900	0,1	121,104

Çizelge 2.2. Bazı mikroalg türlerinin kuru ağırlıkta yağ içeriklerinin karşılaştırılması (Chisti, 2007).

Mikroalgler	Yağ içeriği (% kuru ağırlık)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30

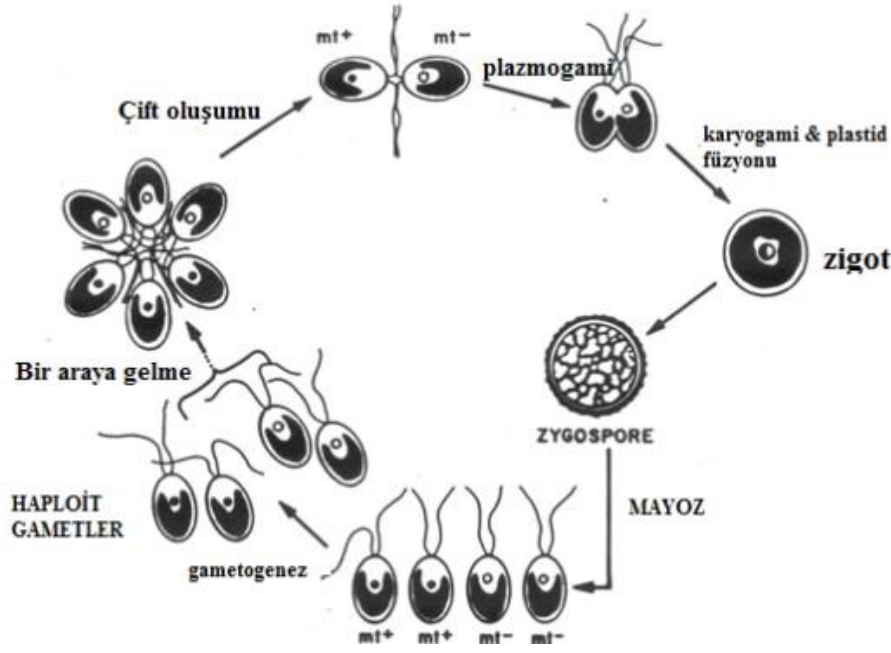
### 2.3. Model Organizma *Chlamydomonas reinhardtii*

Yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii*, fotosentez, fototaksi, algal karbon konsantrasyon mekanizması ve algal lipid metabolizması gibi konuların araştırılması için çok uygun bir model organizmadır. *Chlamydomonas*, bitkiler alemiyle köken ve biyolojik özellikler yönünden büyük benzerlikler bulundurmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucu bu alg türünün bitkiler aleminden olduğu kabul edilmiştir. Ayrıca biyoyakıt üretimi için algal metabolik yolların optimizasyonu ve terapötik protein üretimi gibi biyoteknolojik uygulamalarda çokca kullanılmaktadır (Şekil 2.1) (Hannon vd 2010, Jinkerson vd 2011, Rasala ve Mayfield 2011, Scranton vd 2015; Terashima vd 2015).



Şekil 2.1. *Chlamydomonas reinhardtii* 3 boyutlu görünümü (Dartmouth Koleji Elektron Mikroskobu Merkezi, 2015)

Bu organizmanın bazı özellikleri, birçok alanda kullanışlı bir platform olmasını sağlamaktadır. *Chlamydomonas* ışık altında fototrofik olarak yada asetatla beslenmesi halinde karanlıkta, heterotrofik olarak büyüebilmektedir. Bu organizmanın metabolik esnekliği, diğer organizmalarda öldürücü olabilecek, fotosentez sisteminin ana mekanizma genlerinin mutasyonu çalışmalarının yapılmasına olanak sağlamaktadır. Yüksek bitkilerdeki farklı dokulardan kaynaklanan kompleksliğe karşın *Chlamydomonas* tek hücre yapısındadır (Şekil 2.2.), sıvı hücre kültürleri laboratuvarında kolayca büyütülebilir ve hücre döngüleri ışıklı/karanlık ortamlarda senkronize edilebilir. Vejetatif hücreleri haploiddir ve resesif mutasyonlar kendini hemen fenotipte gösterir. Haploid nükleer genom yaklaşık olarak 111.1 Mb'dır (Blaby vd 2014) *Chlamydomonas* genom sekanslaması 2007 yılında tamamlanmıştır. Genomun G+C içeriği yüksektir ve %64 oranındadır (Merchant vd 2007).



Şekil 2.2. *C. reinhardtii*'nin yaşam döngüsü ( Harris, 2009).

## 2.5. *Chlamydomonas reinhardtii*'de Genetik Değişiklik Uygulamaları

*Chlamydomonas*'da genetik manipülasyon uygulamaları için uygulanabilirliği kanıtlanmış birkaç seçenek mevcuttur. Hedef gen, RNA intrefrans (Schroda 2006), suni miRNA'lar (Molnar vd 2009, Hu vd 2014) yada CRISPR intrefrans (Wang vd 2017) yöntemleriyle geçici olarak susturulabilmektedir. Bunların dışında nitrat, nikel ya da CO<sub>2</sub>'yle indüklenebilen promotörler kullanılarak, koşulsal geçici susturma gerçekleştirilebilir. Ne varki bütün bu yöntemlerin uygulandığı suşlar birkaç aydan sonra eski hallerine dönmektedirler, dolayısıyla ticari olarak kullanılamazlar.

Kalıcı olarak genetik değişiklik gerçekleştirmek amacıyla homolog rekombinasyon denemeleri yapılmış olmasına rağmen, *Chlamydomonas*'ta homolog rekombinasyon oranının aşırı derece düşük olması tek başına uygulanmasını güçleştirmektedir (Sizova vd 2013). Çinko parmak nükleazlar uygulaması etkinlik oranını arttırmasına rağmen kullanımı sınırlıdır (Zorin vd 2009).

Transkripsiyon aktivatörü benzeri efektörler (TALE) istenilen DNA dizisinin hedeflenebilmesi açısından uygulanabilir olmasına rağmen TALE-nükleazların (TALEN) hücrede toksik etkiye sebep olması TALE'nin *Chlamydomonas*'da sadece bir aktivatör olarak iş görebilmesine olanak sağlamıştır (Gao vd 2014).

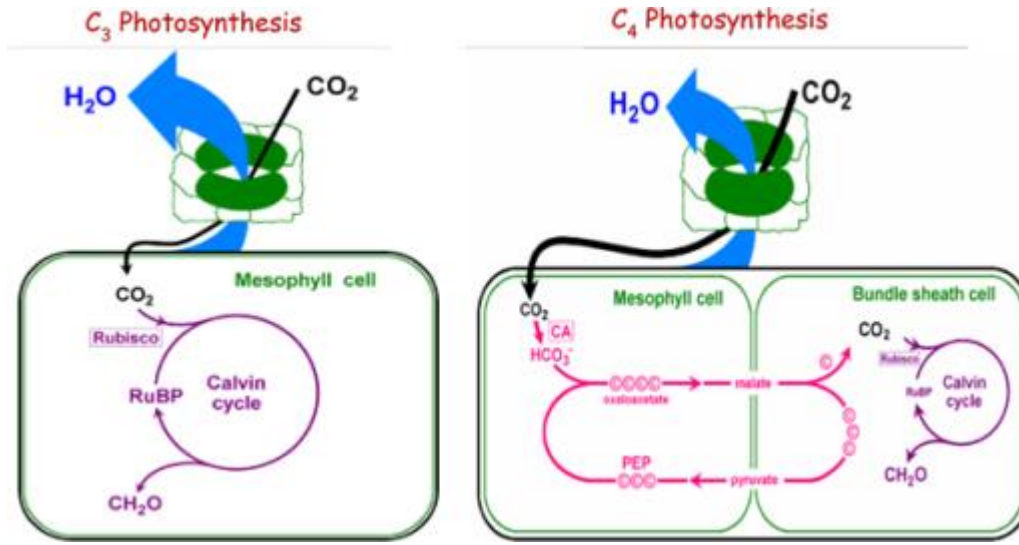
Son olarak, düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR)-Cas9 uygulaması araştırmacılar tarafından denenmiştir. Uygulamanın başarılı olduğunun gösterilmesine rağmen, sistem bileşeni olan Cas9'un bir vektör olarak hücreye aktarılmasının, 24 saat sonunda sitotoksik etkiye sebep olması, kalıcı mutant suşlar elde edilebilmesini zorlaştırmıştır (Jiang vd 2014). Cas9'un pürifiye protein olarak hücreye aktarılmasıyla toksisite tehlikesi atlatılmış olsa da mutasyon frekansının çok düşük olması uygulamanın hala geliştirilmeye ihtiyacı olduğunu göstermiştir (Jiang vd 2014, Shin vd 2016).

## 2.6. Karbon Konsantrasyon Mekanizmaları

Fotosentetik organizmalar, olumsuz çevre koşullarına uyum sağlamak için çeşitli stratejiler geliştirmiştir. CO<sub>2</sub> konsantrasyon mekanizması (CCM) bunlardan biridir. CCM, fotosentetik etkinliği artırarak, fotosentetik karbon asimilasyonu için merkezi enzim olan ribuloz-1.5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz'ın (Rubisco), düşük etkinliğini telafi etmektedir. Rubisco, CO<sub>2</sub> ve ribuloz-1.5-bifosfatı reaksiyona sokarak, Kalvin siklusunun ilk ve en önemli reaksiyonunu katalizlemektedir ve fotosentetik organizmalarda, yavaş katalitik hızı, CO<sub>2</sub>'ye olan düşük afinitesi ve karboksilaz ve oksijenazların katalitik fonksiyonlarını gösterebilmesiyle bilinmektedir (Spreitzer ve Salvucci 2002). Var olan atmosferik CO<sub>2</sub> konsantrasyonu, Rubisco'nun karboksilaz aktivitesini göstermesi için gerekli olan konsantrasyonun oldukça altındadır (Raven vd 2008) ve atmosferdeki yüksek O<sub>2</sub>/ CO<sub>2</sub> oranı enzimin oksijenaz aktivitesini artırarak enerji harcanmasına ve bağlanmış CO<sub>2</sub>'nin serbest bırakılmasına sebep olmaktadır. Tüm bu zorluklara karşı, Rubisco'nun etrafındaki CO<sub>2</sub> konsantrasyonunu artırmak ve aynı zamanda karboksilaz aktivitesinin artmasıyla, yüksek fotosentetik performans elde edebilmek için organizmalar tarafından çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejiler, farklı türlerde ortaya çıkarılmıştır ve yüksek bitkilerdeki C4 metabolik yollarından, mikroalglerdeki farklı CCM formlarına kadar çeşitlilik göstermektedir (Giordano vd 2005, Sage vd 2012).

## 2.7. C3 ve C4 Fotosentez Sistemlerinin Karşılaştırılması

Mısır, şeker kamışı ve sorgum gibi C4 bitkileri, pirinç, buğday ve patates gibi C3 bitkilerine oranla yaklaşık %50 daha fazla fotosentez etkinliğine sahiptir. Bu durum, iki farklı fotosentez sisteminde kullanılan farklı karbon fiksasyon mekanizmalarından kaynaklanmaktadır (Şekil 2.3). C3 bitkileri, CO<sub>2</sub>'yi bağlamak için sadece Kalvin siklusun'da bulunan Rubisco'yu kullanmaktadır ve bu reaksiyon mezofil hücrelerinin kloroplastında gerçekleşmektedir. C4 bitkileri ise fotosentetik reaksiyonlarını, mezofil ve demet kını hücrelerinde gerçekleştirirler: İlk karbon bağlanması fosfoenolpirüvat karboksikinaz (PEPC) enziminin katalizlemesiyle, CO<sub>2</sub> ve fosfoenolpirüvat'dan (PEP) oksaloasetat'ın (OAA) oluşumuyla gerçekleşmektedir. OAA, malata dönüşmekte ve malat Rubisco'nun bulunduğu demet kını hücrelerine geçerek, dekarboksile olmasıyla beraber Rubisco etrafında CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun artışına sebep olmaktadır. Son olarak C4 siklusunun başlangıç substratı olan PEP, pirüvat ortofosfat dikinaz (PPDK) tarafından tekrar oluşturulmaktadır (Kajala vd 2011) (Şekil 2.3). C4 fotosentez sistemi, dekarboksilasyon fazında kullanılan enzime göre, PEPC, NADP-malik enzim (ME) ve NAD-ME tipi olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Hatch vd 1975).



Şekil 2.3. C3 ve C4 fotosentez sistemlerinin şematik diyagramı (Wang vd 2012).

## 2.8. Sucul Fotosentetik Mikroorganizmalar

Sucul fotosentetik mikroorganizmalar, dünya üzerindeki fotosentez miktarının %50'sini oluşturmaktadır. Bu organizmalar, doğadan CO<sub>2</sub> alırken bazı zorluklarla yüzleşmektedir. Bunlardan en önemlisi CO<sub>2</sub>'nin sıvı ortamdan difüzyonu, havadan difüzyonundan 10000 kat daha yavaş gerçekleşiyor olmasıdır.

Bu zorluklara karşı alglerin C4 benzeri fotosentez sistemleri geliştirdiği düşünülmektedir ve bu C4 benzeri sistemler, yeşil makroalg *Udotea flabellum* ve planktonik diatom *Thalassiosira weissflogii*'da ortaya çıkarılmıştır (Reiskind vd 1988, 1991).

## 2.9. Fosfoenolpirüvat Karboksikinaz

Fosfoenolpirüvat karboksikinaz (PEPCK), tersinir reaksiyonlar olan, oksaloasetatın (OAA) dekarboksilasyonu ve fosfoenolpirüvatın (PEP) karboksilasyonunu katalizleyen bir enzimdir (Hatch ve Mau 1973). PEPCK tarafından katalizlenen, OAA'nın dekarboksilasyonu, C4 fotosentez sisteminin temel reaksiyonlarından birini oluşturmaktadır. Enzimin, fotosentetik olarak sadece PEPCK tipi C4 fotosentez sistemindeki görevi anlaşılacakla beraber, mısır, *Flaveria* türleri, *Cleome gynandra*, ve Guinea grass gibi diğer C4 sistemlerinde de dekarboksilaz aktivitesine rastlanmaktadır (Christin vd 2011, Koteyeva vd 2015, Walker vd 1997, Wang vd 2014).

PEPCK, C4 siklusu dışında, OAA'nın PEP'e dönüşümünü sağlayarak glukoneogenez reaksiyonunun erken aşamasını katalize etmektedir ve bitki gelişiminin farklı aşamalarında görev almaktadır. Tohum çimlenmesi sırasında yağların şekere dönüştürülmesi (Leegood ve Rees 1978, Martín vd 2007), meyve olgunlaşması sırasında çözülebilir şekerlerin depolanması ve organik asitlerin ayrışması (Famiani vd 2016, Huang vd 2015), azot asimilasyonu metabolizması ve tohum protein miktarının artışı (Beihaghi vd 2015, Delgado-Alvarado vd 2007, Leegood ve Walker 2003) etkili olduğu düşünülmektedir. Bitkilerdeki görevlerinin dışında PEPCK bilinen bütün



organizmalarda bulunan bir enzimdir (Aich ve Delbaere 2007). PEPCCK enzimleri nükleotid substrat spesifitesine göre iki gruba ayrılmaktadır: genel olarak bakteri, maya ve bitkilerde bulunan ATP-bağlı PEPCCK ve yüksek ökaryotlarda ve arkelerde bulunan GTP-bağlı PEPCCK (Aich ve Delbaere 2007, Fukuda vd 2004)

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Algal Suş ve Kültür Koşulları

*Chlamydomonas reinhardtii* 2137 (CC-4886) suşu, Minnesota Üniversitesi *Chlamydomonas* Kaynak Merkezi'nden elde edildi. Tris Asetat Fosfat (TAP) agar plaklarda büyütüldü ve 100 ml TAP sıvı besiyeri içeren 500 ml erlen'lere ekildi. TAP besiyerinin içeriği;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (7.48 mM),  $\text{MgSO}_4$  (406 mM),  $\text{CaCl}_2$  (340 mM),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (540 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (463 mM), 20 mM Tris, 17.4 mM asetat,  $\text{H}_3\text{BO}_4$  (184mM),  $\text{ZnSO}_4$  (76.5mM),  $\text{MnCl}_2$  (25.5 mM),  $\text{FeSO}_4$  (17.9 mM),  $\text{CoCl}_2$  (6.77 mM),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  (0.88 mM),  $\text{CuSO}_4$  (6.29 mM), ve  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (148 mM) şeklindedir.

Hücreler geç log faza kadar büyütüldü, sonra santrifüjle hasat edildi ve başlangıç yoğunluğu  $2 \times 10^6$  hücre/ml'ye gelecek şekilde 3 farklı koşullu (azot azlığı: standart koşul ve standart koşulun %25 ve %0'ı) TAP besiyeriyle sulandırıldı. Bütün kültürler  $25^\circ\text{C}$  ve  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  şartlarında 200 rpm'de karıştırılarak sürdürüldü. Büyümüş kültürler 5000 rpm 15 dakikada santrifüjle besiyerinden ayrıldıktan sonra, tuzlardan arındırılmak için distile suyla iki kez yıkandı, sonra pelletler sıvı nitrojen içeren havanlarda dövüldü ve toz örnekler sonraki analizler için  $-80^\circ\text{C}$ 'de saklandı.



Şekil 3.1. *C. reinhardtii* hücrelerinin standart TAP besiyerinde 7 gün boyunca kültüre edilmesi.

### 3.2. RNA İzolasyonu ve Tek Zincirli cDNA Sentezi

Total RNA TRIzol reaktifi kullanılarak hazırlandı (Ambion, ABD). ~100 mg sıvı nitrojenle dondurulmuş mikroalg biyokütlesine 1 ml TRIzol eklenerek 5 dakika inkübe edildi. Sonrasında 0.2 ml kloroform eklenerek tüp 15 saniye nazikçe karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi. Örnek 12000 x g'de 15 dk 4°C'de santrifüj edildi. RNA içeren ~400 µl renksiz üst faz, yeni RNase'siz bir tüpe aktarıldı ve aynı miktarda %70 etanol üzerine eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Total RNA TRIzol ekstraktının sıvı fazından PureLink RNA Mini (Invitrogen, ABD) kitiyle, üreticisinin tavsiyelerine uygun olarak pürifiye edildi. RNA örnekleri 2 ünite DNase I'le 1 saat 37°C'de ön muamele edildi, sonrasında, enzim, 65°C'de 2 mM EDTA eklenilerek inaktive edildi. DNA'dan arındırılmış bu RNA örnekleri tek zincirli cDNA sentezi için kullanıldı. Tek zincirli cDNA, Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, ABD) Kiti'yle üretici tavsiyelerine uygun olarak sentezlendi. Aşağıda bahsedildiği gibi tek zincirli cDNA örnekleri, tam uzunluktaki *Pck1* geninin amplifikasyonu için yapılan PZR reaksiyonlarında kullanıldı.

### 3.3. *C. reinhardtii* *Pck1* Geni Varyantlarının Amplifikasyonu

Tek zincirli cDNA örnekleri, PZR'yle (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) *CrPck1* (*C. reinhardtii* *Pck1*) geninin varyantlarının tüm kodlama bölgesinin, gen spesifik primer çiftleriyle amplifiye edilmesinde kullanıldı: PCKaF1/R1, PCKbF1/R1 (Çizelge 3.1) PZR reaksiyonu 50 µl'lik final hacim içeriğinde; 1× PZR reaksiyon tamponu, 0.2 µmol her primer'den, 0.2 mM dNTP, 1 M Betain, 0.01 U Q5 DNA polimeraz ve (NEB, ABD) 200 ng cDNA kullanılarak, 98°C başlangıç denatürasyonu, 35 döngüde 98 °C denatürasyon 10 sn, 54 °C bağlanma periyodu 20 sn ve 72 °C uzama periyodu 1 dk, ve son uzama 72°C 2 dk programıyla gerçekleştirildi. *CrPck1* ORF'si (kodlama bölgesi) pJet 1.2 vektörüne (Thermo Scientific) klonlandı ve Macrogen firmasına gönderilerek sekanslaması yaptırıldı.

Çizelge 3.1. *Pck1* varyantlarının amplifikasyonu ve klonlanmasında kullanılan primerler.

	<b>Primer dizileri</b>
PCK1aF1	5'- ATGCAGTTCGTCCTGGACTCC -3'
PCK1aR1	5'- CTTACTGCGTCTTGAAGGCGC -3'
PCK1bF1	5'-ATGGCACTCCTTTCATCACGTTC-3'
PCK1aR1	5'-CTTACTGCGTCTTGAAGGCGC-3'
pETPCK1aF1	5'- GATCACCATATGCAGTTCGTCCTGGAC -3'
pETPCK1aR1	5'- ACTGTCCTCGAGCTTACTGCGTCTTG -3'
pETPCK1bF1	5'- GATCACCATATGGCACTCCTTTCATCACGTTC-3'
pETPCK1aR1	5'-ACTGTCCTCGAGCTTACTGCGTCTTGAAGGCGCCGC-3'

### 3.4. Rekombinant His6 Etikteli *C. reinhardtii* PCK1 Proteininin Oluşturulması

pET-28a(+)-*Pck1* protein ekspresyon plazmidini oluşturmak amacıyla özel olarak dizayn edilmiş ileri ve geri primerler kullanıldı: pETPCK1aF1/R1 ve pETPCK1bF1/R1 (Çizelge 3.1) Çizelgede koyu olarak işaretlenmiş nükleotid bazları ile NdeI ve XhoI restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri belirtildi. Amplifikasyondan sonra PZR ürünü, DNA Clean and Concentrator Kit'le (Zymo Research, ABD) saflaştırıldı. Konsantre edilmiş PZR ürünü ve pET-28a(+) vektörü Fast Digest(FD) NdeI ve FD XhoI tarafından 37°C'de 10 dakikada kesildi ve sonrasında FD NdeI ve FD XhoI 65°C'de 5 dakikada inaktive edildi. Kesilmiş PZR ürünü ve pET-28a(+) vektörü, jelden geri kazanım için %1'lik agaroz jele yüklendi ve 130 V'da 1 saat elektroforezle yürütüldü.

Geri kazanım için üreticisinin tavsiyelerine uygun olarak Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, ABD) kullanıldı. Sonra pET28a(+) vektörü, *CrPck1* geniyle ligasyona uğratıldı. Ligasyon reaksiyonu 2 µl pET28a(+) vektörü, 1 µl *CrPck1* geni, 10 µl 2x Ligasyon Tamponu ve 1 µl Quick Ligase (NEB, ABD) 20 dakikada oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Hemen sonra ligasyon ürünü plasmid, sıcak şoku metodu kullanılarak, *E. coli* DH5α suşuna transforme edildi. Bu metoda göre, ligasyon ürünü, DH5α kompotent hücrelerinin üzerine eklendi ve buzda 5 dakika inkübe edildi. Sonrasında karışım 42°C'de su banyosunda 50 saniye bekletildi ve hemen buza aktarılarak 5 dakika buzda bekletildi. Örneğe, 400 µl LB Besiyeri eklendi ve 37°C'de 225 rpm'de 1 saat inkübe edildi. Sonuçta elde edilen kültürden 50 µl alınarak 50µg/ml kanamisin içeren LB plakaya yayma yapıldı ve 37°C'de bir gece inkübe edildi. Yaklaşık 16 saat sonra plakalardan koloniler seçildi ve 50µg/ml kanamisin içeren 3 ml LB besiyerine ekilerek 37°C'de bir gece inkübe edildi. Plazmidler, DH5α'dan, Zippy Plasmid Miniprep Kitiyle (Zymo Resaearch, ABD), üreticinin tavsiyelerine uygun olarak saflaştırıldı. DH5α'dan pürifiye edilen plazmidler, recombinant CrPCK1 proteinini eksprese etmek için, *E. coli* BL21(DE3) suşu kompetent hücrelerine (Novagen) tekrar transforme edildi. pET-28a(+)-*Pck1* transforme edilmiş, *E. coli* BL21(DE3) suşu kültürü 50 µg/ml kanamisin içeren 200 ml LB besiyerinde 37°C'de OD600 ~0,6 olana kadar büyütüldü. rCrPCK1 ekspresyonu için, rekombinant protein 1 mM isopropyl-b-D-thiogalactoside (IPTG) varlığı veya yokluğunda 37°C'de 3 saat boyunca indüklendi. Sonrasında, hücreler 4°C'de 5000 x g'de 15 dakika santrifüjle hasat edildi ve sıvı nitrojen içeren havanda dövüldü. Toz haline gelmiş örnek, buzda soğutulmuş ekstrasyon tamponuyla (10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 300 mM Sukroz, 200 mM KCl, 3 mM EDTA, 25 mM DTT, 5% (v/v) gliserol, 1 mM PMSF) sulandırıldı, 15 000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve 0.45 µM membranlı filtreden geçirildi.

Rekombinant PCK1 proteini, nikel yüklenmiş, immobilize metal afinite kromatografisi kolonuyla (HisPur Ni-NTA resin, Thermo Fisher Scientific, ABD) üreticinin talimatlarına uygun olarak, süpernatant fraksiyonundan pürifiye edildi. Rekombinant CrPCK1, Ph7.4 250 Mm imidazolele ayrıştırıldı. Fraksiyonlar yüksek PCK1 aktivitesi gösterebilmesi için, Centricon YM-30 santrifüjal konsantre ediciyle, 50 mm HEPES/KOH, pH 7.5, içerisinde 20% (v/v) gliserol, 1 mm EDTA, 5 mm MgCl<sub>2</sub>, 2 mm DTT, 1 mM PMSF tamponunda birleştirildi, tuzları giderildi ve konsantre edildi ve -20°C'de kullanılabilecek kadar saklandı.

### 3.5. SDS-PAGE ve İmmunoblotlama

SDS-PAGE %10 akrilamid jellerde uygulandı ve sonrasında jeller coomassie blue boyasıyla boyandı. İmmunoblot analizi için, %10 akrilamid jelde örneklerin yürütülmesinden sonra, jel 25 mM Tris base/150 mM Glisin, pH 8.3, transfer tamponu kullanılarak 100 V'da 1 saat polivinil diflorid membranlara blotlandı. Membranlar ilk olarak, I-Block reaktifli TBS'le (Tris Tamponlanmış Salin) oda sıcaklığında 1 saat bloklandı ve I-Block reaktifli TBS'e eklenmiş His6.Tag monoklonal antikora (Novagen, ABD), oda sıcaklığında 1 saatte işaretlendi. 10 dakika'lık 3 yıkamadan sonra, membranlar, goat anti-mouse IgG H&L (HRP)'yle (Abcam, ABD) 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi, devamında TBS'le 10 dakikalık 5 yıkama yapıldı ve son olarak, kemiluminesans tespit, ECL western-blotting reaktifleriyle (Amersham Biosciences) uygulandı. Fotoğraflar GeneGnome XRQ Chemiluminescence görüntüleme sistemi (Syngene, ABD) kullanılarak çekildi.

### 3.6. PCK1 Enzim Aktivite Ölçümleri

PCK1 enzim aktivite ölçümleri daha önceden oluşturulmuş bir protokole göre yapıldı (Osorio vd. 2013, 2014). 150-200 mg sıvı nitrojenle dondurulmuş *C. reinhardtii* ya da *E. coli* hücrelerinin örnekleri, buzda soğutulmuş ekstraksiyon tamponunda homojenize edildi. PCK1 için ekstraksiyon tamponunun içeriği; 10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 300 mM Sukroz, 200 mM KCl, 3 mM EDTA, 25 mM DTT, 5% (v/v) gliserol, 1 mM PMSF'den, oluşmaktadır. Enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak,  $A_{340}$ 'ta 25°C'de belli aralıklarla saptanan değişikliklerle ölçüldü. PCK1 ölçüm karışımının içeriği; 100 mM Hepes-KOH (pH 6.8), 100 mM KCl, 0.14 mM NADH, 25 mM DTT, 6 mM MnCl<sub>2</sub>, 6 mM PEP, 1 mM ADP, 90 mM NaHCO<sub>3</sub>, 6 U/ml MDH'den oluşmaktadır. Bir enzim aktivite ünitesi, 25°C'de dakikada oluşan 1 µmol enzimin oluşturduğu ürün hesaplanarak belirlenmiştir. Çözülebilir protein konsantrasyonu, Bradford reaktif (Bio-Rad, ABD) kullanılarak belirlenmiştir.

### 3.7. *C. reinhardtii* Hücrelerinin Farklı Yetiştirme Koşullarında Büyütülmesi

PCK1 enzim aktivitesi yüksek ve düşük CO<sub>2</sub> ve NH<sub>4</sub><sup>+</sup> oranlarında yetiştirilen *C. reinhardtii* hücrelerinde ölçülmüştür. Hücreler, % 2-5 CO<sub>2</sub> ve havada yetiştirilen ve 7.5, 1.9 ve 0 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>'de yetiştirilenler olarak gruplandırılıp bu gruplar kendi içlerinde karşılaştırılmıştır.

### 3.8. kPZR'yle Gen Anlatımının Hesaplanması

İzole edilen RNA'ların miktarı BioDrop spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. İzole edilen RNA'lardan 3µg alınarak Maxima first strand cDNA sentez kiti (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokolle cDNA sentezlendi. cDNA örnekleri reaksiyona özel olarak dizayn edilen primerlerle kantitatif PZR (kPZR) yapılarak Light Cycler 96 (Roche, İsviçre) cihazında analiz edildi.

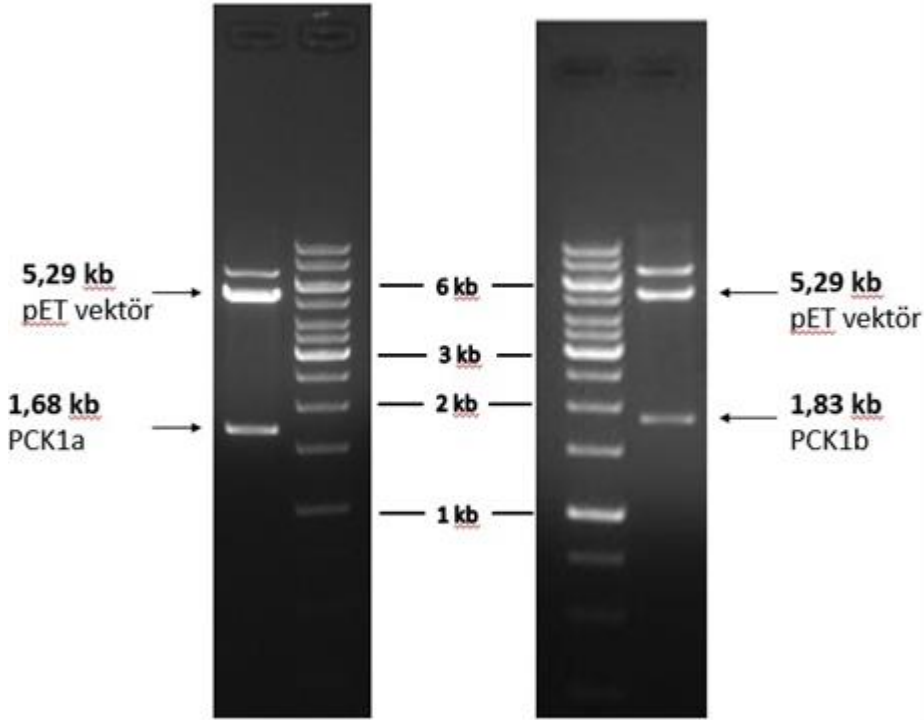
Çizelge 3.2. *Pck1* varyantlarının kPZR analizleri için kullanılan primerler.

	İleri Primer	Geri Primer
<i>Pck1a</i>	5'- GTCCTCCGTCATTTTG ACC -3'	5'- CACCACACGCTTGCCT TAG -3'
<i>Pck1b</i>	5'-ATGGCACTCCTTTCATCAC GTC-3'	5'- CACCACACGCTTGCCT TAG -3'

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

##### 4.1. *C. reinhardtii* *Pck1* Geninin Varyantlarının Amplifikasyonu ve Klonlanması

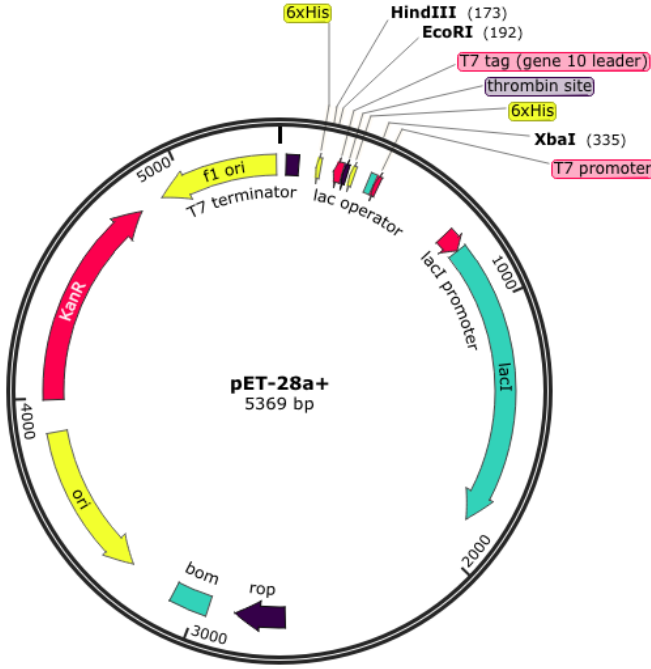
En son yayınlanmış *C. reinhardtii* genomik verilerine dayanarak *CrPck1* geninin NCBI veri tabanında bulunduğu teyit edildi. *Pck1* geninin kesim varyantlarının, nükleotid dizisi verileri (mRNA dizisi) NCBI veri tabanında XM\_001694911 ve XM\_001694912 kayıt numaralarıyla mevcuttur. Bu dizilere dayanarak, *Pck1* kesim varyantlarının kodlama bölgelerini *C. reinhardtii* cDNA'sından amplifiye etmek üzere primerler dizayn edildi. RNA izolasyonu ve tek zincirli cDNA sentezi Materyal ve Metod'da belirtilen şekilde uygulandı. *CrPck1* geninin a ve b varyantlarının PZR amplifikasyonu Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Şekilden de görülebileceği gibi beklenen boyuttaki: 1,83 ve 1,68 kb PZR ürünleri amplifiye edildi. Elde edilen gen varyantlarının pJet1.2 vektörüne klonlanarak sekanslatılması sonucu doğru bölgelerin amplifiye edildiği kesinleştirildi.



Şekil 4.1. *C. reinhardtii* cDNA'sından *CrPck1* geninin varyantlarının PZR amplifikasyonu.

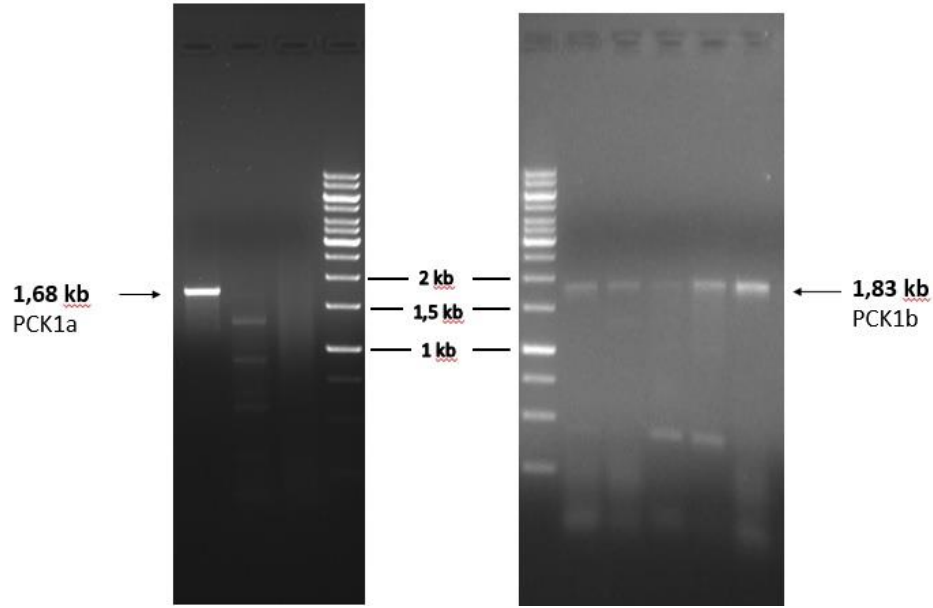
#### 4.2. pET-28a(+)-*Pck1* Plazmidinin Oluşturulması ve Heterolog Ekspresyonu

*CrPck1* geni varyantlarının fonksiyonel bir enzimi kodladığını deneysel olarak kanıtlamak amacıyla, genin varyantlarının ORF'leri *E. coli* ekspresyon vektörü pET-28a (+)'ya (Şekil 4.2) klonlandı ve ekspresyon suşu BL21(DE3)'e transforme edildi. pET-28a(+)-*Pck1a* ve pET-28a(+)-*Pck1b* plazmidlerinin, bağlanma bölgeleri olan *NdeI* ve *XhoI* enzimleriyle kesilmesiyle plazmidlerin doğru şekilde kurulduğu gösterildi. Rekombinant CrPCK1a ve CrPCK1b, BL21(DE3) kompetent hücresinde, fazladan 20 N-bakiyeli terminal uzamayla (Histidin etiketi), füzyon proteini olarak eksprese edildi. Beklenen protein boyutları Western Blot ve SDS-PAGE analizleriyle gösterildi. rCrPCK1b proteinin IPTG indüklemesi sonucu ekspresyonundaki artış gösterildi, negatif kontrol kullanılarak *E. coli*'de heterolog ekspresyon gerçekleştirildiği kesin olarak gösterildi (Şekil 4.4, Şekil 4.5). Büyüklükleri sırayla, 67,4 kDa ve 61,8 kDa olan PCK1b ve PCK1a proteinlerinin arasındaki, fonksiyonel açıdan önemli olabilecek boyut farkı görüldü (Şekil 4.5).



Şekil 4.2. pET-28a(+) plazmid vektörünün haritası (Snapgene).

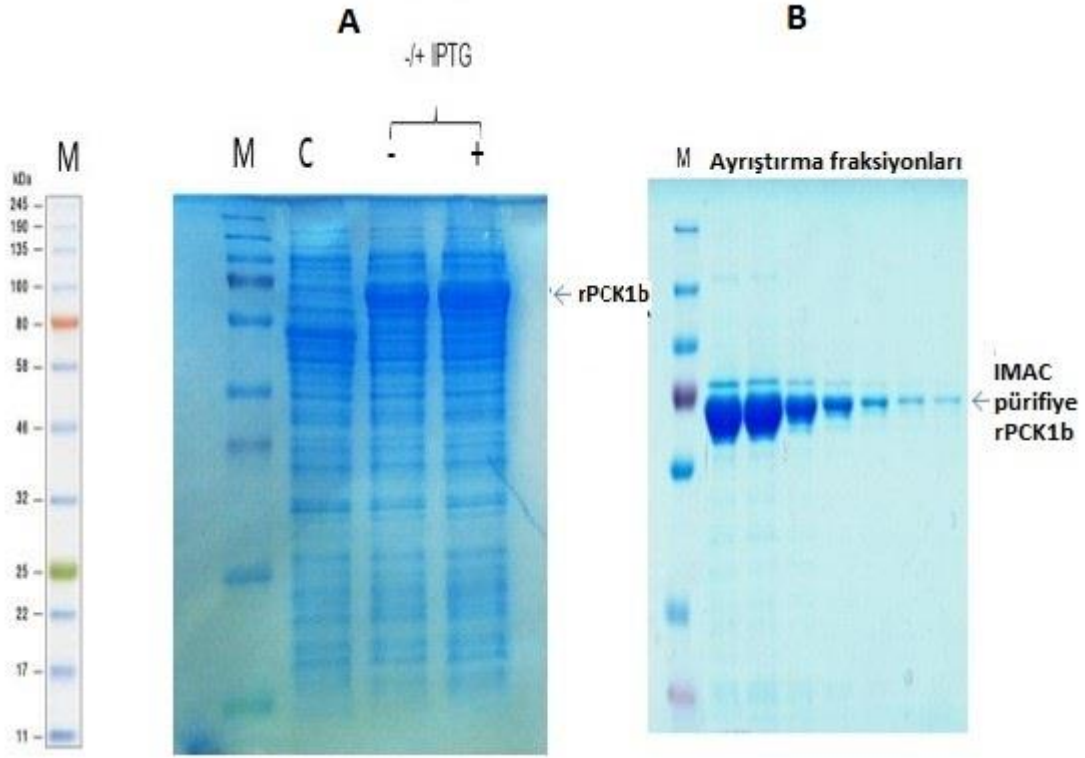




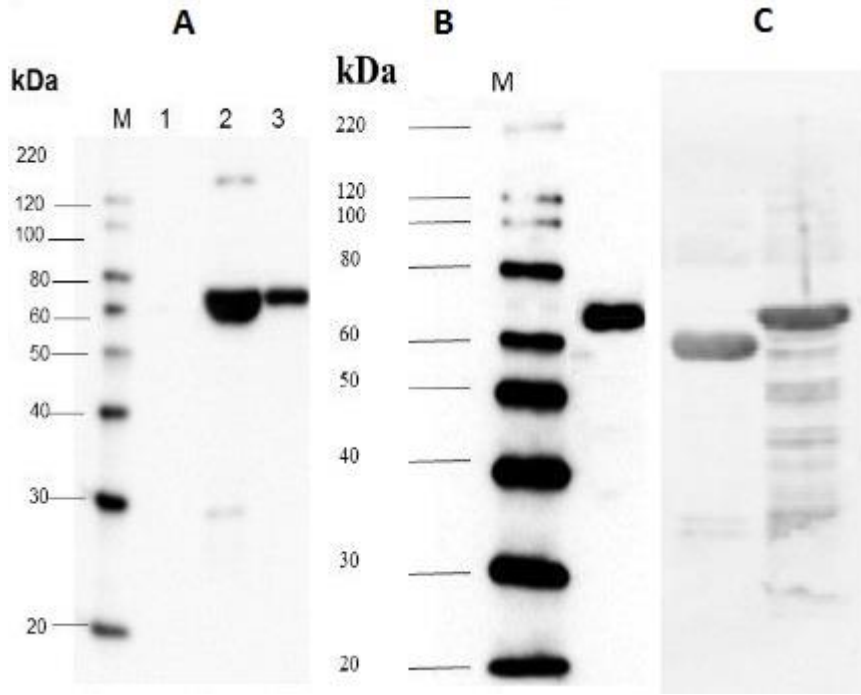
Şekil 4.3. pET-28a(+)-*CrPck1a* ve pET-28a(+)-*CrPck1b*'nin NdeI ve XhoI restriksiyon enzimleriyle kesimi.

#### 4.3. Rekombinant His<sub>6</sub> Etiketli *C. reinhardtii* PCK1 Proteininin Saflaştırılması

Rekombinant PCK1b proteinin, nikel yüklenmiş, immobilize metal afinite kromatografisi kolonuyla (HisPur Ni-NTA resin, Thermo Fisher Scientific, ABD) süpernatant fraksiyonundan etkili şekilde pürifiye edilmesiyle, proteinin yüksek derecede çözülebilir olduğu görülmüştür (Şekil 4.4, Şekil 4.5).



Şekil 4.4. rCrPCK1b proteininin SDS-PAGE (Coomassie Blue'yla boyanmış) analizleri. A) C- Transforme edilmemiş *E. coli* protein ekstraktı (negatif kontrol). -IPTG: Transforme edilmiş *E. coli* protein ekstraktı, IPTG eklenmemiş. +IPTG: Transforme edilmiş *E. coli* protein ekstraktı, IPTG eklenmiş. B) Ayrıştırma fraksiyonları; HisPur Ni-NTA resin kolonundan ayrıştırılmaya devam edilmiş CrPCK1 protein fraksiyonları. M- Önceden renklendirilmiş protein standartı (NEB, ABD).



Şekil 4.5. *E. coli* BL21(DE3) suşundan eksprese ve pürifiye edilmiş CrPCK1 rekombinant proteinin immunoblot analizi.

- A) 1. Transforme edilmemiş *E. coli* protein ekstraktı (negatif kontrol),  
 2. Transforme edilmiş *E. coli* protein ekstraktı, IPTG eklenmiş,  
 3. Transforme edilmiş *E. coli* protein ekstraktı, IPTG eklenmemiş.  
 B) HisPur Ni-NTA resin kolonundan pürifiye edilmiş PCK1 proteini.  
 M – Markır (Protein standartı). C) Sırayla, rCrPCK1a ve rCrPCK1b proteinleri.

Optimal şartlarda ölçüldüğünde, PCK1b spesifik aktivitesi, transforme edilmiş hücre ekstraktlarında, negatif kontrol hücre ekstraktlarındakine göre 5.22 kat daha fazla bulundu. Bu sonuçlar göstermektedir ki *C. reinhardtii* rekombinant PCK1b proteini *E. coli*'de tamamiyle aktif olarak üretilmiştir ve 20 bakiyeli N-terminal uzamanın aktivite üzerinde zararlı bir etkisi yoktur. Ayrıca pürifiye edilmiş PCK1b proteinin de aktivitesi ölçülmüştür. Bu sonuçlar, pürifiye edilmiş PCK1 proteininin yüksek spesifik aktiviteye sahip olduğunu teyit etmiştir. Bütün bu bilgiler göstermiştir ki *CrPck1b* geni, *C. reinhardtii* hücrelerinde, fonksiyonel ve enzimatik olarak aktiftir ve *C. reinhardtii* hücrelerinde muhtemel yağ artışı sağlanması amacıyla gen susturulması için uygun bir adaydır.

#### 4.4. Farklı Koşullarda Büyütülen *C. reinhardtii*'lerde PCK1 Aktivitesi

Farklı şartlar altında büyütülen *C. reinhardtii*'lerin PCK1 aktivite ölçümleri. Sonuçlar Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Çizelge 4.1'den de görülebileceği gibi PCK1'in spesifik aktivitesi küçük farklılıklar göstermesine rağmen, PCK1'in total aktivitesi, TAP besiyerinde artan NH<sub>4</sub> konsantrasyonlarıyla beraber önemli derecede artış göstermiştir ve azalan NH<sub>4</sub> konsantrasyonlarıyla beraber total enzimatik aktiviteler azalmıştır; bu durum yağ içeriğinin artışıyla ilişkilidir. NH<sub>4</sub> azlığında büyütülen *C. reinhardtii* hücreleri yüksek yağ içeriği açısından karşılaştırılabilir, bu bilgiler göstermektedir ki *CrPck1*'in susturulması *C. reinhardtii* hücrelerinde yağ içeriğini artırabilir. Ayrıca CO<sub>2</sub> seviyesindeki artışın enzim aktivitesinde gösterdiği pozitif etki, PCK1'in fotosentetik enzim fonksiyonu olabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.2'de görülebileceği üzere *Pck1a* ve *Pck1b* kesim varyantlarının enzim aktivitelerinin birbirine çok yakın oluşu bu iki enzimin dizi farklılığının sadece *Pck1b*'deki olası organel yönlendirici sinyal dizisinden dolayı kaynaklandığını göstermektedir.

Çizelge 4.1. Farklı CO<sub>2</sub> ve NH<sub>4</sub><sup>+</sup> oranlarında büyütülen *C. reinhardtii*'lerin PCK1 enzim aktiviteleri.

NH <sub>4</sub> Cl konsantrasyonu TAP-medium (mM)	Protein konsantrasyonu (mg/ml)	Total enzim aktivitesi (U)	Enzim aktivitesi (U/mg çözülebilir protein)	Enzim aktivitesi, (U/g yağ ağırlık)
7.5	5.07	1.09	0.21	4.36
1.9	1.49	0.21	0.14	0.84
0	1.10	0.072	0.068	0.29
Hava (~0,036% CO <sub>2</sub> )				
7.5	6.72	1.88	0.28	7.52
2-5% (v/v) CO <sub>2</sub>				
7.5	8.64	3.41	0.39	13.64

Çizelge 4.2. Farklı CO<sub>2</sub> ve NH<sub>4</sub><sup>+</sup> oranlarında büyütülen *C. reinhardtii*'lerin PCK1 enzim aktiviteleri.

<i>E. coli</i>	Protein konsantrasyonu, (mg/ml x10 <sup>-2</sup> )	Total enzim aktivitesi, (U x10 <sup>-2</sup> )	Enzim aktivitesi, (U/mg çözülebilir protein x10 <sup>-2</sup> )
Negatif Kontrol	5,8	57	9,8
PCK1a	6,5	948	145,8
PCK1b	2,1	277	131,9

## 5. SONUÇ

Mikroalgler çok çeşitli mikroorganizmalardır ve foto-oksidatif stres ya da diğer olumsuz çevre koşulları altında büyük miktarlarda TAG üretebilirler. TAG sentez yolları, moleküler biyoloji yöntemleri kullanılarak alglerde henüz yeterince aydınlatılmamıştır. TAG biyosentez yolları, hücrel stres durumlarında, karbon ve enerjinin depolanması için merkezi konumda bulunmaktadır. Alglerin fotosentetik etkinliği ve büyüme potansiyelinin sayesinde, 1 hektar alandan, günlük olarak, yaklaşık 200 varil algal yağ elde edilmesi mümkündür. Fakat bu yağın izolasyonu ve dönüştürülmesi aşamalarındaki maliyet artışlarından dolayı, algal yağ üretiminin daha fazla artırılması gerekmektedir.

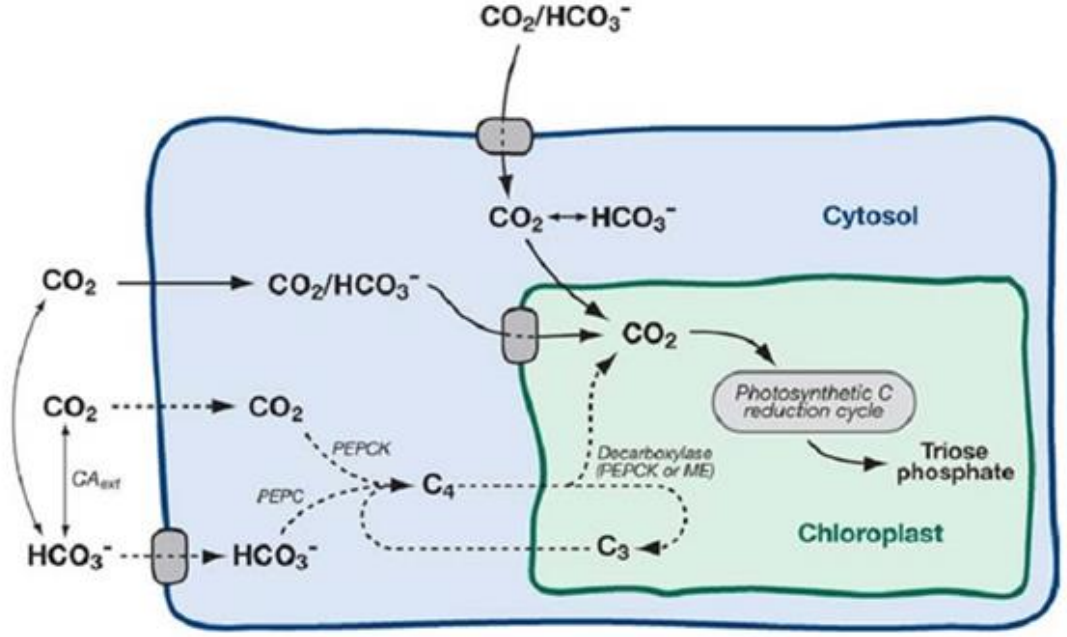
Yeşil alg *C. reinhardtii*, fotosentetik organizmalar için kullanışlı bir modeldir ve birçok fizyolojik süreç araştırması için kullanılmıştır. Son dönemlerde bir çok moleküler teknolojinin, çekirdek, organel transformasyonu, RNAi gibi, *Chlamydomonas*'ta uygulanabilirliği görülmüştür. Bu özellikler *Chlamydomonas*'ı TAG biyosenteziyle ilişkili yolların araştırılması için ideal algal organizma yapmaktadır.

C4 fotosentez metabolik yolları, bitkilerde, yüksek oranlarda karbon dioksit bağlanması için esastır. Fotosentez sistemlerinin araştırılması, sadece mahsul üretimi için değil aynı zamanda yüksek yağ içerikli bitkilerin üretilmesi için de önemlidir. Ne varki C4 yolağı enzimlerinin alglerde, moleküler anlamda yeterli derecede araştırılmadığı görülmüştür. PEPC genlerinin *C. reinhardtii*'de araştırılması bu alanda yapılan ilk çalışmalardandır (Mamedov vd 2005). Bu alandaki çalışmaların yetersizliğinden dolayı, C4 metabolizmasının, model organizma genlerinin *C. reinhardtii*'de çok önemlidir. PEPC, PPK ve PEPCK, C4 siklusunun ana enzimleridir. PEPCK, enziminin, alglerde TAG sentezi için önemli olan pirüvatı reaksiyona sokarak, TAG depolanmasını olumsuz etkilediği düşünülmektedir. PEPCK enziminin, aktivitesinin düşürülmesiyle beraber, alglerdeki TAG oranının artacağı tahmin edilmektedir.

Yapılan bu çalışmada *Pck1a* ve *Pck1b*'nin *E. coli*'ye klonlama ve enzim aktivasyonu ölçümü ve kPZR çalışmalarıyla, her iki enzim varyantının oldukça aktif olduğu gösterilmiştir. Ayrıca western blot ve SDS-PAGE yöntemleriyle de beklenen protein boyutları ve her iki protein arasındaki boyut farkı gözlemlenmiştir. *C. reinhardtii*'de farklı  $\text{NH}_4^+$  ve  $\text{CO}_2$  oranlarında PCK1'in gösterdiği değişimler enzimin fotosentetik yönünün olabileceğini ve yağ artışıyla negatif yönde ilişkisi olduğunu göstermiştir. Ayrıca kPZR sonuçlarında görüldüğü üzere ortamdaki  $\text{CO}_2$  konsantrasyonunun azalmasıyla her iki varyantında ekspresyonunun azalması, bu iki varyantın da organizmadaki karbon akışıyla ilişkili olduğunu göstermektedir.

PCK1b varyantının PCK1a'dan farklı olarak başlangıç bölgesinde bulundurduğu bölgenin, bir organel prekürsörü olduğu tahmin edilmekle beraber, hangi oranele ait olduğu kesin olarak anlaşılamamıştır. Bu durumda daha önce diatomlarda ortaya çıkarılmış olan iki ihtimal ortaya çıkmaktadır: PCK1b varyantı mitokondride glukoneogenez siklusunda ya da kloroplastta bitkilerde bulunandan farklı bir C4 siklusunda görev yapıyor olabilir (Yang vd 2016, Cabello-Pasini vd 2001). Her iki

durumda sitoplazmda bulunan PCK1a varyantı için tek ihtimal, C4 siklusunun ilk aşamasını PEPC1 enzimiyle ortak gerçekleştiriyor olmasıdır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Alglerde bulunan muhtemel C4 siklusu (Sültemeyer 1998).

Tüm bu incelemeler neticesinde *Pck1* geninin tek başına veya diğer fotosentetik enzim genleriyle beraber, alglerde susuturulmasının, yağ oranını büyük oranda artırarak endüstriyel olarak önemli bir alg suşu oluşturulmasını sağlayabileceği anlaşılmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- AICH, S., DELBAERE, L.T., 2007. Phylogenetic study of the evolution of PEP-carboxykinase. *Evol Bioinform Online* 3, 333-340
- BLABY, I.K., BLABY-HAAS, C.E., TOURASSE, N. 2014. The *Chlamydomonas* genome project: a decade on. *Trends Plant Sci.* 19, 672–680.
- BEIHAGHI, M., BAHRAMI, A.R., BAGHERI, A., MEHRJERDI, M.Z., 2015. Supplementary Analysis of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene Expression in Developing Seeds of Chickpea. *Journal of Cell and Molecular Research* 7(2), 102-107.
- CABELLO-PASINI, A., SWIFT, H., SMITH, G.J., ALBERTE, R.S. 2001. Phosphoenolpyruvate carboxykinase from the marine diatom *Skeletonema costatum* and the phaeophyte *Laminaria setchellii*. II. Immunological characterization and subcellular localization.
- CHENG, X., LIU, G., KE, W., ZHAO, L., LV, B., MA, X., HUANG, K. 2017. Building a multipurpose insertional mutant library for forward and reverse genetics in *Chlamydomonas*. *Plant methods*, 13(1), 36.
- CHISTI, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, , 25.3: 294-306.
- CHRISTIN, P.A., SAGE, T.L., EDWARDS, E.J., OGBURN, R.M., KHOSHRAVESH, R., SAGE, R.F., 2011. Complex evolutionary transitions and the significance of c(3)-c(4) intermediate forms of photosynthesis in Molluginaceae. *Evolution* 65(3), 643-660.
- DELGADO-ALVARADO, A., WALKER, R.P., LEEGOOD, R.C., 2007. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in developing pea seeds is associated with tissues involved in solute transport and is nitrogen-responsive. *Plant, cell & environment* 30(2), 225-235
- DEMIRBAS MF. 2010. Microalgae as a feedstock for biodiesel. *Energy Educ Sci Technol Part A* ;25:31–43.
- DENG, X., CAI, J. AND FEI, X. 2013. Effect of the expression and knockdown of citrate synthase gene on carbon flux during triacylglycerol biosynthesis by green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Biochem.* 14, 38.
- DENG, X., CAI, J., LI, Y., FEI, X. 2014. Expression and knockdown of the PEPC1 gene affect carbon flux in the biosynthesis of triacylglycerols by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology letters*, 36(11), 2199-2208.
- FAMIANI, F., PAOLETTI, A., BATTISTELLI, A., MOSCATELLO, S., CHEN, Z.H., LEEGOOD, R.C., WALKER, R.P., 2016. Phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate orthophosphate dikinase and isocitrate lyase in both tomato fruits and



- leaves, and in the flesh of peach and some other fruits. *Journal of plant physiology* 202, 34-44.
- FUKUDA, W., FUKUI, T., ATOMI, H., IMANAKA, T., 2004. First characterization of an archaeal GTP-dependent phosphoenolpyruvate carboxykinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of bacteriology* 186(14), 4620-4627.
- GAO, H., WRIGHT, D. A., LI, T., WANG, Y., HORKEN, K., WEEKS, D. P., SPALDING, M. H. 2014. TALE activation of endogenous genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*, 5, 52-60.
- GIORDANO, M., BEARDALL, J. AND RAVEN, J.A. 2005 CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56,99–131.
- GONCALVES, E.C., WILKIE, A.C., KIRST, M. AND RATHINASABAPATHI, B. 2015. Metabolic regulation of triacylglycerol accumulation in the green algae: Identification of potential targets for engineering to improve oil yield. *Plant Biotechnol. J.*, doi: 10.1111/pbi.12523
- GRIFFITHS, M. AND HARRISON, S. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21, 493–507.
- GRIFFITHS, M., VAN HILLE, R. AND HARRISON, S.L. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J. Appl. Phycol.* 24, 989–1001.
- HANNON, M., GIMPEL, J., TRAN, M., RASALA, B. AND MAYFIELD, S. 2010 Biodiesels from algae: challenges and potential. *Biofuels*, 1, 763–784.
- HARRIS, E. H. 2009. The *Chlamydomonas* sourcebook: introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use (Vol. 1). *Academic Press*.
- HATCH, M.D., MAU, S.L., 1973. Activity, location, and role of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase isoenzymes in leaves with C<sub>4</sub> pathway photosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics* 156(1), 195-206.
- HATCH, M. D., KAGAWA, T., & CRAIG, S. 1975. Subdivision of C<sub>4</sub>-pathway species based on differing C<sub>4</sub> acid decarboxylating systems and ultrastructural features. *Functional Plant Biology*, 2(2), 111-128.
- HO, S. H., YE, X., HASUNUMA, T., CHANG, J. S., KONDO, A. 2014. Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae - A critical review. *Biotechnol Adv* 32, 1448–1459

- HU J, DENG X, SHAO N, WANG G, HUANG K. 2014. Rapid construction and screening of artificial microRNA systems in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.*;79(6):1052–64.
- HUANG, Y.-X., GOTO, Y., NONAKA, S., FUKUDA, N., EZURA, H., MATSUKURA, C., 2015. Overexpression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene (*SlPEPCK*) promotes soluble sugar accumulation in fruit and post-germination growth of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Biotechnology* 32(4), 281-289.
- HUANG, Y.X., YIN, Y.G., SANUKI, A., FUKUDA, N., EZURA, H., MATSUKURA, C., 2015. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) deficiency affects the germination, growth and fruit sugar content in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 96, 417-425.
- JIANG, W., BRUEGGEMAN, A. J., HORKEN, K. M., PLUCINAK, T. M., & WEEKS, D. P. 2014. Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic cell*, 13(11), 1465-1469.
- JINKERSON, R.E., SUBRAMANIAN, V. AND POSEWITZ, M.C. 2011. Improving biofuel production in phototrophic microorganisms with systems biology. *Biofuels*, 2, 125–144.
- KAJALA K, COVSHOFF S, KARKI S, WOODFIELD H, TOLLEY BJ, DIONORA MJ, MOGUL RT, MABILANGAN AE, DANILA FR, HIBBERD JM, QUICK WP. 2011. Strategies for engineering a two-celled C4 photosynthetic pathway into rice. *J Exp Bot.*, 62: 3001-3010. 10.1093/jxb/err022.
- KAO, P. H., and NG, I. S. 2017. CRISPRi mediated phosphoenolpyruvate carboxylase regulation to enhance the production of lipid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology*.
- KOTEYEVA, N.K., VOZNESENSKAYA, E.V., EDWARDS, G.E., 2015. An assessment of the capacity for phosphoenolpyruvate carboxykinase to contribute to C4 photosynthesis. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 235, 70-80.
- LEEGOOD, R.C., AP REES, T., 1978. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and gluconeogenesis in cotyledons of *Cucurbita pepo*. *Biochimica et biophysica acta* 524(1), 207-218.
- LEEGOOD, R.C., WALKER, R.P., 2003. Regulation and roles of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. *Archives of biochemistry and biophysics* 414(2), 204-210.
- LI, Q., DU, W., & LIU, D. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(5), 749-756.

- LI, Y., HAN, D., HU, G., DAUVILLEE, D., SOMMERFELD, M., BALL, S. and HU, Q. 2010. Chlamydomonas starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metab. Eng.* 12, 387–391.
- MAMEDOV TG, MOELLERING ER, CHOLLET R 2005. Identification and expression analysis of two inorganic C- and N-responsive genes encoding novel and distinct molecular forms of eukaryotic phosphoenolpyruvate carboxylase in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 42:832–843.
- MAMEDOV TG, CHOLLET R 2010. Discovery of novel phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) genes and their active polypeptides in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc ANAS (Biol Sci)* 65:99–105.
- MAMEDOV, T., CHICHESTER, J. A., JONES, R. M., GHOSH, A., COFFIN, M. V., HERSCHBACH, K., YUSIBOV, V. 2016. Production of Functionally Active and Immunogenic Non-Glycosylated Protective Antigen from Bacillus anthracis in Nicotiana benthamiana by Co-Expression with Peptide-N-Glycosidase F (PNGase F) of Flavobacterium meningosepticum. *PloS one*, 11(4), e0153956.
- MARKOU, G. and NERANTZIS, E. 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnol. Adv.* 31, 1532.
- MARTIN, M., PLAXTON, W.C., PODESTA, F.E., 2007. Activity and concentration of non-proteolyzed phosphoenolpyruvate carboxykinase in the endosperm of germinating castor oil seeds: effects of anoxia on its activity. *Physiologia plantarum* 130(4), 484-494.
- MERCHANT, S.S., PROCHNIK, S.E., VALLON, O. 2007. The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318, 245–250.
- MERCHANT, S.S., KROPAT, J., LIU, B., SHAW, J. AND WARAKANONT, J. 2012. TAG, You are it! Chlamydomonas as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 352–363.
- MILLER, R., WU, G., DESHPANDE, R.R., VIELER, A., GARTNER, K., LI, X., MOELLERING, E.R. 2010. Changes in transcript abundance in Chlamydomonas reinhardtii following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. *Plant Physiol.* 154, 1737–1752.
- MOLNAR A, BASSETT A, THUENEMANN E, SCHWACH F, KARKARE S, OSSOWSKI S, WEIGEL D, BAULCOMBE D. 2009. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga Chlamydomonas reinhardtii. *Plant J.*;58(1):165–74.

- OWEN, N. A., INDERWILDI, O. R., and KING, D. A. 2010. The status of conventional world oil reserves-Hype or cause for concern?. *Energy policy*, 38(8), 4743-4749.
- PUHAN, S., VEDARAMAN, N., RAMBRAHAMAN, B.V., NAGARAJAN, G. 2005. Mahua (*Madhuca indica*) seed oil: a source of renewable energy in India. *J Sci Ind Res* 64:890–896.
- QI, L. S., LARSON, M. H., GILBERT, L. A., DOUDNA, J. A., 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152, 1173-1183.
- RAMAZANOV, A. and RAMAZANOV, Z. 2006. Isolation and characterization of a starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* STL-PI with a high growth rate, and high protein and polyunsaturated fatty acid content. *Phycol. Res.* 54, 255–259.
- RAVEN JA, BEARDALL J. 2003. Carbon acquisition mechanisms in algae: carbon dioxide diffusion and carbon dioxide concentrating mechanisms. In *Photosynthesis in Algae*, ed. AWD Larkum, SE Douglas, JA Raven, pp. 225–44.
- RASALA, B.A. and MAYFIELD, S.P. 2011. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. *Bioengineered*, 2, 50–54.
- RAVEN, J.A., COCKELL, C.S. AND DE LA ROCHA, C.L. 2008. The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis. *Philos.Trans. R. Soc. Biol. Sci.* 363, 2641–2650.
- REISKIND, J. B., P. T. SEAMON, AND G. BOWES. 1988. Alternative methods of photosynthetic carbon assimilation in marine macroalgae. *Plant Physiol.* 87:686–692.
- REISKIND, J. B., and G. BOWES. 1991. The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in a marine macroalga with C<sub>4</sub>-like photosynthetic characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2883–2887.
- SAGE, R.F., SAGE, T.L. AND KOCACINAR, F. 2012. Photorespiration and the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63,19–47.
- SCRANTON, M.A., OSTRAND, J.T., FIELDS, F.J. AND MAYFIELD, S.P. 2015. *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production. *Plant J.* 82, 523–531.
- SCHRODA M. 2006. RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools. *Curr Genet.*;49(2):69–84.

- SHİN SE, LIM JM, KOH HG, KIM EK, KANG NK, JEON S, KWON S, SHIN WS, LEE B, HWANGBO K, 2016. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci Rep.*;6:27810.
- SIZOVA I, GREINER A, AWASTHI M, KATERIYA S, HEGEMANN P. 2013. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *Plant J.*;73(5):873–82.
- SULTEMEYER, D. 1998. Carbonic anhydrase in eukaryotic algae: Characterization, regulation and possible functions during photosynthesis. *Can J Bot* 76: 962-972.
- SPREITZER, R. J., & SALVUCCI, M. E. 2002. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual review of plant biology*, 53.
- TERASHIMA, M., FREEMAN, E.S., JINKERSON, R.E. AND JONIKAS, M.C. 2015. A fluorescence-activated cell sorting-based strategy for rapid isolation of high-lipid *Chlamydomonas* mutants. *Plant J.* 81, 147–159.
- WALKER, R.P., ACHESON, R.M., TECSI, L.I., LEEGOOD, R.C., 1997. Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in C4 Plants: Its Role and Regulation. *Australian Journal of Plant Physiology* 24(4), 459.
- WANG, Z.T., ULLRICH, N., JOO, S., WAFFENSCHMIDT, S. AND GOODENOUGH, U. 2009. Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 8, 1856–1868.
- WANG, L., MIN, M., LI, Y., CHEN, P., CHEN, Y., LIU, Y., RUAN, R. 2010. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(4), 1174-1186.
- WANG, C., GUO, L., LI, Y., WANG, Z. 2012. Systematic comparison of C3 and C4 plants based on metabolic network analysis. *BMC systems biology*, 6(2), S9.
- WANG, Y., BRAUTIGAM, A., WEBER, A.P., ZHU, X.G., 2014. Three distinct biochemical subtypes of C4 photosynthesis? A modelling analysis. *Journal of experimental botany* 18 65(13), 3567-3578.
- WANG, C., CHEN, X., LI, H., WANG, J., HU, Z. 2017. Artificial miRNA inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase increases fatty acid production in a green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 91.
- WIJFFELS, R. H., BARBOSA, M. J. 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science* 329, 796–799

- WORK, V.H., RADAKOVITS, R., JINKERSON, R.E., MEUSER, J.E., ELLIOTT, L.G., VINYARD, D.J., LAURENS, L.M. 2010. Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas reinhardtii* sta7-10 starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in complemented strains. *Eukaryot. Cell* 9, 1251–1261.
- YANG, J., PAN, Y., BOWLER, C., ZHANG, L., HU, H. 2016. Knockdown of phosphoenolpyruvate carboxykinase increases carbon flux to lipid synthesis in *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research*, 15, 50-58.
- ZORIN B, LU Y, SIZOVA I, HEGEMANN P. 2009. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* as exemplified by disruption of the PHOT gene. *Gene.*;432(1–2):91–6.

## ÖZGEÇMİŞ



Nicat Cebraioğlu, 10 Temmuz 1992 Bakü/Azerbaycan doğumludur. 1999 yılından bu yana Türkiye’de yaşamaktadır. 2010 yılında kazandığı İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümün’den 2015 yılında mezun olmuştur. 2015 yılından beri Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölmü’nde yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.