

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**YEŞİL MİKROALG *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*'DE PİRUVAT,
ORTOFOSFAT DİKİNAZ (PPDK) KODLAYAN İKİ GENİN İZOLASYONU,
KLONLAMASI VE EKSPRESYON ANALİZİ**

Fadime DEMİREL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

MART 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**YEŞİL MİKROALG *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*'DE PİRUVAT,
ORTOFOSFAT DİKİNAZ (PPDK) KODLAYAN İKİ GENİN İZOLASYONU,
KLONLAMASI VE EKSPRESYON ANALİZİ**

Fadime DEMİREL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

MART 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YEŞİL MİKROALG *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*'DE *PİRUVAT*,
ORTOFOSFAT DİKİNAZ (PPDK) KODLAYAN İKİ GENİN İZOLASYONU,
KLONLAMASI VE EKSPRESYON ANALİZİ

Fadime DEMİREL
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

MART 2023

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YEŞİL MİKROALG *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*'DE PİRUVAT,
ORTOFOSFAT DİKİNAZ (PPDK) KODLAYAN İKİ GENİN İZOLASYONU,
KLONLAMASI VE EKSPRESYON ANALİZİ**

Fadime DEMİREL
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 09/03/2023 tarihinde jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV (Danışman)

Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY

Prof. Dr. İrfan TURHAN

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ

ÖZET

YEŞİL MİKROALG *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*'DE PİRUVAT, ORTOFOSFAT DİKİNAZ (PPDK) KODLAYAN İKİ GENİN İZOLASYONU, KLONLAMASI VE EKSPRESYON ANALİZİ

Fadime DEMİREL

Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Mart 2023; 80 sayfa

Günümüzde mikroalgler yenilenebilir enerji, ilaç, gıda ve kozmetik endüstrilerindeki geniş uygulama alanları nedeniyle dünya çapında büyük ilgi görmektedir. Yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii*, fotosentetik hücrenin kullanışlı bir modelidir ve bir dizi fizyolojik sürecin araştırılması için yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Son zamanlarda, *C. reinhardtii*'ye nükleer ve organel transformasyon (nükleer, kloroplast ve mitokondriyal) sistemleri, RNA etkileşimi, CRISPR vb. dahil olmak üzere birçok moleküler teknoloji uygulanmıştır. Bu nitelikler, *C. reinhardtii*'yi mikroalglerde lipit birikimini artırmak amacıyla *C. reinhardtii*'nin genetik ve metabolik mühendisliğini gerçekleştirmek için ideal bir alg organizması yapmaktadır. Şu anda mikroalglerde yağ birikimini kontrol eden moleküler mekanizmalar hakkında çok az bilgi mevcuttur. C4 fotosentez metabolik yolları (C4 metabolik yolu ile CO₂ fiksasyonu) bitkilerde yüksek oranda karbondioksit fiksasyonu için gereklidir. Alglerin yüksek biyokütle birikimi için yüksek fotosentez oranları önemlidir. Bununla birlikte şaşırtıcı bir şekilde, *C. reinhardtii*'deki fosfoenolpiruvat karboksilaz genlerinin moleküler karakterizasyonuna odaklanan çabalar dışında, C4 yolu enzimleri ve düzenleyici faktörleri herhangi bir yeşil algde moleküler seviyede incelenmemiştir.

Bu çalışmada, yeşil mikroalg *C. reinhardtii*'den iki Piruvat, ortofosfat dikinaz (PPDK) geni ilk kez izole edilerek klonlanmış ve farklı büyüme koşullarında ekspresyon analizi yapılmıştır. İki PPDK geninin *C. reinhardtii*'de fonksiyonel aktif PPDK enzimlerini kodladığını ve her iki genin de C- ve N-yanıt veren genler olduğunu ve büyüme sırasında [CO₂] veya [NH₄⁺]'deki değişikliklerle yukarı/aşağı regüle edildiğini gösterdik. PPDK1 ve PPDK2'nin ve diğer PPDK'lerin sayısının filogenetik analizi, üç genel grupta bir kümelenme ortaya çıkardı: (i) CrPPDK2, CrPPDK1 ve VcPPDK'nin (*Volvox carteri*, *C. reinhardtii* ile yakından ilişkili) uzak üyeler olduğu tipik vasküler bitki enzimleri; ii) bakteriyel ve iii) protozoal PPDK'ler. CrPPDK2, bitki PPDK'leri ile daha fazla benzerlik gösterirken, CrPPDK1 ise, VcPPDK ile daha fazla benzerlik göstermektedir. Bitki ve alg PPDK proteinleri, bakterilerden çok bazı protozoa ile yakından ilişkilidir. Kolektif bulgular, ökaryotik alglerde PPDK1 ve PPDK2 genleri ve karşılık gelen PPDK enzimleri hakkında temel moleküler bilgiler sağlamaktadır. Bu çalışmalar, alg biyokütlesini artırma ve yağ açısından zengin algler üretmek için alg hücrelerinde protein depolamaya karşı yağ depolama seviyelerini değiştirmeye yönelik uygulamalar üzerinde önemli bir etkiye sahip olacaktır.

ANAHTAR KELİMELER: Biyodizel, *Chlamydomonas reinhardtii*, CRISPR/Cas9 RNP, C4 fotosentezi, Pirüvat, ortofosfat dikinaz 2 (PPD2)

JÜRİ: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY

Prof. Dr. İrfan TURHAN

Prof Dr. Yaşar KARAKURT

Doç.Dr. Muhammet TONGUÇ



ABSTRACT

ISOLATION, CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF TWO GENES ENCODING PYRUVATE, ORTHOPHOSPHATE DIKINASE (PPDK) IN THE GREEN MICROALGAE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Fadime DEMİREL

PhD Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

March 2023; 80 pages

Recently, microalgae have attracted significant interest around the world due to their wide range of different applications in renewable energy, pharmaceutical, food and cosmetic industries. The green algae *Chlamydomonas reinhardtii* is a useful model of a photosynthetic cell and has been intensively used for studies of a number of physiological processes. Recently, several molecular technologies including nuclear and organellar transformation (nuclear, chloroplast and mitochondrial) systems, RNA interference, CRISPR etc. have been applied to *C. reinhardtii*. These attributes make *C. reinhardtii* an ideal algal organism to perform genetic and metabolic engineering of *C. reinhardtii* to increase oil accumulation in microalgae. At the moment a little information is available for molecular mechanisms that control oil accumulation in microalgae. C4 photosynthesis metabolic pathways (CO₂ fixation by C4 metabolic pathway) are essential for high rates of carbon dioxide fixation in plants. High rates of photosynthesis are important for high biomass accumulation of algae. However, surprisingly C4 pathway enzymes and its regulatory factors have not been studied at the molecular level in any green algae, except the efforts which were focused on the molecular characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase genes in *C. reinhardtii*.

In this study, two *Pyruvate, orthophosphate dikinase (PPDK)* genes from green microalga *C. reinhardtii* were isolated and cloned for the first time and performed expression analysis at different growth conditions. We demonstrate that two PPDK genes encode functional active PPDK enzymes in *C. reinhardtii* and both genes are C- and N-responsive genes and up-/down-regulated by changes in [CO₂] or [NH₄⁺] during growth. Phylogenetic analysis of PPDK1 and PPDK2 and number of other PPDKs revealed a clustering into three general groupings: (i) the typical vascular-plant enzymes, of which CrPPDK2, CrPPDK1 and VcPPDK (*Volvox carteri*, closely related *C. reinhardtii*) are distant members; ii) bacterial and iii) protozoal PPDKs. CrPPDK2 shows more similarity with plant PPDKs, while CrPPDK1 has more similarity with VcPPDK. Notably, plant and algal PPDK proteins are more closely related to some protozoa than to bacteria. Collective findings provide key molecular insight into the PPDK1 and PPDK2 genes and corresponding PPDK enzymes in the eukaryotic algae. These studies will have a significant impact on applications for increasing algae biomass and altering oil storage levels versus protein storage in algae cells to produce oil-rich algae.

KEYWORDS: Biodiesel, *Chlamydomonas reinhardtii*, CRISPR/Cas9-RNP, C4 photosynthesis, Pyruvate, ortophosphate dikinase 2 (PPD2)

COMMITTEE: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Asst. Prof. Dr. Münevver AKSOY

Prof. Dr. İrfan TURHAN

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Assoc. Prof. Dr. Muhammet TONGUÇ



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında ilk defa *C. reinhardtii* PPD2 geni *C. reinhardtii*'den klonlanmıştır. Model organizma *C. reinhardtii*'deki PPDK genlerinin HS besiyerinde NH_4^+ ve CO_2 konsantrasyonundaki değişiklikler altındaki ekspresyonları araştırılmıştır. Ayrıca *C. reinhardtii* PPD1 ve PPD2 genlerinin biyoinformatik analizleri de gerçekleştirilerek fonksiyonları araştırılmıştır. CRISPR/Cas9 RNP sistemi kullanılarak *C. reinhardtii* PPD1 ve PPD2 genleri knockout edilerek *C. reinhardtii*'de lipid ve biyokütle artışı amaçlanmıştır. Ancak CRISPR/Cas9 RNP sistemi bütün optimizasyonlara rağmen başarı ile sonuçlandırılmamıştır. Hedeflenen genler herhangi bir fenotip göstermediği için mutantların belirlenemediği düşünülmektedir. Ayrıca karşılaşılan sorunlara ve denenen yöntemlere tezde yer verilmiştir. Bu nedenle bu araştırmanın *C. reinhardtii* CRISPR/Cas9 RNP sistemini kullanmak isteyen araştırmacılara yardımcı olacağı ortadadır.

Her şeyden önce beni elimden tutup ilk sınıfıma götüren ve beni sonuna kadar okutacağına dair kendine söz veren anneme, bu konuda anneme sonuna kadar destek olana babama ve bana onların en muhteşem hediyesi olan kız kardeşime teşekkürü bir borç bilirim.

Bana bu konuyu çalışma fırsatı veren, tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimi ile bana destek olan danışman hocam Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV'a (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi), bana kattığı bilgi, deneyim ve her türlü yardımı için sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY'a (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi), akademik hayatım boyunca bana yol gösteren, araştırmacı kimliği kazanmamı sağlayan ve öğrencilerini kendi evlatlarından ayırmayan çok kıymetli hocam Prof. Dr. İrfan TURHAN'a (Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi) teşekkür ederim.

Doktora tez savunması için jüri üyesi olarak katılan değerli hocalarım Prof. Dr. Yaşar KARAKURT (Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi) ve Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ'a (Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi) teze olan katkılarından dolayı teşekkür ederim. YÖK 100/2000 Doktora bursiyeri olarak doktora eğitimimde beni dört yıl boyunca destekleyen YÖK'e ve başarı burs (TÜBİTAK 2211-A) imkanları ile bu desteği ikiye katlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca aynı laboratuvarı paylaştığımız hem ekip arkadaşım hem de sevgili kardeşim Merve ILGIN BÜYÜKSİNDİR'a, tez çalışmamda bana yardımcı olan, teorik ve pratik bilgilerini benimle paylaşan Fatma AKÇAKALE KABA ve Arş. Gör. Adem KABA'ya (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi) diğer ekip arkadaşlarıma, yine her türlü destekleri için aynı odayı paylaştığımız lisansüstü öğrenci arkadaşlarıma ve kıymetli dostlarım Ayşe TORUN BAŞOĞLU, Emirhan CİHAN ve Muhammet Ali BÜYÜKSİNDİR'a teşekkür ederim. Ayrıca lisansüstü eğitimim ve öğretimim boyunca bana inanan, güvenen ve laboratuvar imkanlarını benden esirgemeyen bütün bölüm hocalarıma da teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Biyodizel	4
2.2. Mikroalgler.....	6
2.3. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8
2.4. Karbon Konsantrasyon Mekanizması	9
2.5. Piruvat, ortofosfat dikinaz.....	11
2.6. Mikroalglerde Genetik Düzenlemeler.....	12
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Kullanılan Materyaller	15
3.2. Mikroalg Suşları ve Kültür Koşulları.....	15
3.2.1. Besiyerleri ve Solüsyonlar	16
3.3. Hücre Sayımı.....	20
3.4. Kullanılan Primerler.....	20
Çizelge 3.2'in devamı.....	21
3.5. RNA İzolasyonu ve Kantifikasyonu	21
3.6. cDNA Eldesi ve Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu	21
3.7. DNA İzolasyonu.....	22
3.8. DNA ve RNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	23
3.9. <i>C. reinhardtii</i> PPD2 Geninin Amplifikasyonu	23
3.10. pET-28a(+) Plazmitinin Kesim İşlemi	23
3.11. pET-28a(+) Plazmitinin Jelden İzolasyonu.....	23
3.12. Bakteri Transformasyonu ve Plazmit İzolasyonu	23
3.13. Rekombinant <i>C. reinhardtii</i> PPP2 Proteininin Ekspresyonu	24

3.14.	Kompotent Hücre Hazırlanması.....	24
3.15.	PPDK Enzim Aktivitesi	24
3.16.	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	26
3.17.	CRISPR/Cas9 RNP Sistemi	26
3.17.1.	<i>PPD1</i> ve <i>PPD2</i> genleri için sgRNA'ların tasarlanması.....	26
3.17.2.	pHyg3 plazmiti ve kesim işlemi.....	26
3.17.3.	Transformasyon.....	27
3.17.4.	Cas9 proteini tarafından hedef DNA'ların <i>in vitro</i> kesimi.....	28
3.17.5.	Mutant hücre kontrolü.....	28
3.18.	İstatiksel Analiz.....	28
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	29
4.1.	<i>C. reinhardtii</i> PPDK Genlerinin Amplifikasyonu ve Klonlanması	29
4.2.	pET-28a (+)-PPD1 ve PPD2 Plazmitlerinin Heterolog Ekspresyonu.....	29
4.3.	Biyoinformatik Analiz Bulguları	30
4.3.1.	PPDK genlerinin çoklu amino asit hizalanması.....	32
4.3.2.	Domain analizi	33
4.3.3.	Filogenetik analizler.....	35
4.4.	Rekombinant PPDK Proteinlerinin Enzim Aktivitesi.....	36
4.5.	RT-PCR Analiz Sonuçları.....	37
4.6.	qRT-PCR Analiz Sonuçları.....	39
4.6.1.	<i>C. reinhardtii</i> PPDK genlerinin NH ₄ ⁺ değişikliklerindeki ekspresyonları	39
4.6.2.	<i>C. reinhardtii</i> PPDK genlerinin artan CO ₂ koşullarındaki ekspresyonları	41
4.7.	CRISPR/Cas9-RNP Deneme Sonuçları	42
4.7.1.	sgRNA bölgelerinin belirlenmesi ve elde edilmesi.....	42
4.7.2.	pHyg3 kasetinin elde edilmesi	44
4.7.3.	CRISPR/Cas9 RNP denemeleri	45
4.7.4.	Cas9 proteini tarafından hedef alınan DNA'ların <i>in vitro</i> kesim sonuçları.....	50
5.	SONUÇLAR.....	52
6.	KAYNAKLAR.....	54
7.	EKLER.....	64
ÖZGEÇMİŞ		

AKADEMİK BEYAN

Doktora tezi olarak sunduğum “YEŞİL MİKROALG *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*’DE *PİRUVAT*, *ORTOFOSFAT DİKİNAZ (PPDK)* KODLAYAN İKİ GENİN İZOLASYONU, KLONLAMASI VE EKSPRESYON ANALİZİ” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

09/03/2023

Fadime DEMİREL



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µL	: mikrolitre
bp	: baz çifti
dk	: dakika
g	: gram
G	: Gravite (dönme hızı)
kb	: kilobaz
M	: molar
mg	: miligram
mL	: mililitre
mM	: milimolar
ng	: nanogram
nm	: nanometre
°C	: santigrat
rpm	: dakikadaki devir sayısı
sn	: saniye
V	: volt

Tezde ondalık ayırıcı olarak virgül (,) kullanılmıştır.

Kısaltmalar

AMT4	: Amonyum ve metilammonyum transport geni 4
aph7	: Aminoglycoside phosphotransferase
CAH1	: Karbonik anhidraz 1
CBLP	: <i>Chlamydomonas</i> β-subunit-like polypeptide

cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CRISPR	: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
ddH ₂ O	: Double distile su
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNase	: Deoksiribonükleaz
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
IPTG	: isopropyl-b-D-thiogalactoside
kDa	: Kilo Dalton
LB	: Luria-Bertani
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NEB	: New England Biolabs
NH ₄ ⁺	: Amonyum
OD	: Optik dansitesi
ORF	: Open Reading Frame
PCR	: Polymerase Chain Reaction/ Polimer Zincir Reaksiyonu
pI/Mw	: İzoelektrik noktası / Moleküler ağırlık
RNA	: Ribonükleik Asit
RNP	: Ribonükleoprotein
RNase	: Ribonükleaz
RT-PCR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sgRNA	: single-chain guide RNA
TAE	: Tris-Asetik Asit-EDTA
TAP	: Tris Asetat Fosfat
qPCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>C. reinhardtii</i> 'nin hücre yapısı	9
Şekil 3.1. <i>C. reinhardtii</i> hücrelerinin HS besiyerinde kültüre edilmesi	16
Şekil 3.2. pHyg3 plazmitinin şematik gösterimi.....	27
Şekil 4.1. PPD1 ve PPD2 genlerinin PCR amplifikasyonu	29
Şekil 4.2. <i>E. coli</i> suşu BL21(DE3)'den eksprese ve ekstrakte edilen PPD2 rekombinant proteininin görüntüleri	30
Şekil 4.3. <i>C. reinhardtii</i> PPD1 ve PPD2 proteinlerinin çoklu amino asit hizalamaları ..	33
Şekil 4.4. Farklı PPDK proteinlerinin domain şeması.....	35
Şekil 4.5. <i>C. reinhardtii</i> ve bazı diğer organizmalardaki PPDK protein dizilerinin filogenetik ağacı	36
Şekil 4.6. Farklı NH_4^+ konsantrasyonlarında yapılan RT-PCR sonuçları.....	38
Şekil 4.7. Farklı CO_2 konsantrasyonlarında yapılan RT-PCR sonuçları.....	38
Şekil 4.8. <i>C. reinhardtii</i> PPD1 geninin NH_4^+ değişikliklerindeki ekspresyonları.....	40
Şekil 4.9. <i>C. reinhardtii</i> PPD1 geninin artan CO_2 koşullarındaki ekspresyonları	41
Şekil 4.10. <i>In Vitro</i> koşullarda elde edilen sgRNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	43
Şekil 4.11. PPDK genleri için tasarlanan sgRNA bölgelerinin şematik gösterimi.....	44
Şekil 4.12. pHyg3 kasetinin elde edilmesi.....	45
Şekil 4.13. CRISPR/Cas9 Deneme 4 sonucu elde edilen transformantlar.....	47
Şekil 4.14. Antibiyotikli petri kaplarına transfer edilen transformantlar.....	48
Şekil 4.15. Cr5P7T3 ile yapılan PCR reaksiyonlarının agaroz jel sonuçları	49
Şekil 4.16. Nested PCR analizleri için tasarlanan primerlerin ve ürünlerin şeması	49
Şekil 4.17. Cr5P7T3 ile yapılan Nested PCR reaksiyonlarının agaroz jel sonuçları	50
Şekil 4.18. Cas9 proteini tarafından hedef DNA'ların <i>in vitro</i> kesimi	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Mikroalglerin diğer hammaddelerle karşılaştırılması.....	5
Çizelge 3.1. Kullanılan materyaller ve katalog numaraları	15
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primerler.....	20
Çizelge 3.3. Tasarlanan gRNA’ların nükleotit dizileri	26
Çizelge 4.1. Çeşitli PPDK genleri ve Pytozome /NCBI erişim numaraları.....	31
Çizelge 4.2. Pürifiye edilmiş rekombinant <i>E. coli</i> PPDK enzimlerinin aktivite testleri	37
Çizelge 4.4. CRISPR/Cas9 RNP Denemeleri	46

1. GİRİŞ

İçinde yaşadığımız yüzyıl boyunca bütün alanlarda enerjiye duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Enerji ihtiyacını karşılamak için kullanılan fosil yakıtların ekolojik ve çevresel yönden verdiği zararların yanı sıra bu enerji kaynağına bağlılık da ülkeler arası anlaşmazlıklara kadar uzanan sorunlar çıkarmaktadır. Ayrıca fosil yakıtların sınırlı olması ülkeleri ve özellikle araştırmacıları alternatif ve yenilenebilir enerji arayışlarına yönlendirmiştir. Yenilenebilir enerji kaynakları güneş, rüzgar, biyokütle, jeotermal, hidroelektrik, hidrojen ve dalga enerjisi olarak kabul edilmektedir. Özellikle gıda ve tarım atıkları biyokütle enerjisi olarak biyoetanol, biyodizel, biyohidrojen gibi yenilenebilir yakıtlara dönüştürülerek uzun zamandır kullanılmaktadır. Ancak, küresel nüfus yaklaşık 80 milyon/yıl olarak artmaktadır ve 2050 yılına kadar 9 milyarı aşması beklenmektedir. Bu durum %50 daha fazla yakıt (Paramati vd. 2022), %50 daha fazla tatlı su ve %70 daha fazla gıda (OECD 2022) gerektirerek dünya çapındaki enerji talebini radikal bir şekilde artıracaktır. Benzer şekilde Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün raporunda, 2050 yılında insanların besin ihtiyacının karşılanabilmesi için gıda gereksiniminin %70 artacağı, küresel su gereksiniminin %55 artacağı ve dünya nüfusunun %40'ının su sorunu yaşayacağı vurgulanmaktadır (Arısoy ve Yücel 2020). Yapılan araştırmalarda bütün dünyanın önümüzdeki süreçlerde stratejik öneme sahip su, enerji ve gıda ihtiyaçlarının giderilmesi konusunda sorunlar ile karşılaşacağı açık olarak bildirilmektedir. Ayrıca, CO₂ küresel ısınmaya neden olan ana sera gazıdır ve atmosferdeki artan emisyonları kaçınılmaz olarak yıkıcı çevresel sonuçları tetikleyecek ve küresel sağlığı, yaşamı ve ekonomiyi etkileyecektir. Bu nedenle, küresel CO₂ emisyonlarının 2050 yılına kadar %50 oranında azaltılması gerekmektedir. Tüm bu gerekçelerden dolayı, gıda ve su talepleriyle rekabet etmeyen CO₂ nötr yenilenebilir yakıtların gelişimini hızlandırmak çok önemlidir (Özgür 2022).

Son zamanlarda, yenilenebilir enerji kaynağı mikroalg biyokütlesinden elde edilen organik maddelerden oluşmaktadır. Mikroalgler, bünyelerinde enerji değeri yüksek bileşikler depolaması ve güneş enerjisini kimyasal enerjiye çeviren fotosentez işlemi aracılığı ile CO₂'yi kullanarak oksijen üretmesi nedeniyle yenilenebilir enerji üretimi alanında gözde kaynaklar olarak düşünülmektedir. Alg kültürünün yararları ve potansiyelleri ile ilgili dünya çapında birçok üniversite ve araştırma enstitüsünde yürütülen araştırma ve bilimsel çalışmalar, alglerin gelecekteki küresel enerji ihtiyacını sürdürülebilir ve uygun maliyetli bir şekilde sağlayabileceğini kanıtlamıştır.

Mikroalgler, geniş ekolojiye sahip çeşitli ökaryotik organizmalardan biridir. Atmosferdeki CO₂'i organik şekere çevirerek insanlar dahil birçok heterotrof canlıya besin sağlarlar ve ayrıca küresel karbon döngüsüne aktif olarak katılmaktadırlar. Mikroalgler, iki entegre süreçte meydana gelen oksijenli fotosentez gerçekleştirirler. Bunlar fotokimyasal ışık reaksiyonu ve Calvin Benson Bassham (CBB) döngüsü olarak bilinmektedir. Fotokimyasal ışık reaksiyonları elektronları sudan çıkarmak ve indirgeyici eşdeğer (NADPH) üretmek için güneş enerjisini kullanmaktadır.

Fotosentez işlemi sırasında, triasilgliserol gibi polar olmayan lipidler mikroalg hücrelerinde depolanmaktadır (Sasso vd.). Bu lipidlerin üretiminin mikroalg hücrelerine enerji depolama işlevi gördüğü yaygın olarak kabul edilmiştir. Trans esterleştirme işlemi yoluyla triasilgliseroller, biyodizelin önemli ve çok yönlü bir biçimi ve üretimi için mihenk taşı olan yağ asidi metil esterlerine kolayca dönüştürülebilirler.

Fotosentez ayrıca kloroplastik ATP sentez yoluyla ATP üretmek için kullanılan bir proton gradyanı da üretir. Üretilen kimyasal enerjiler (NADPH ve ATP) daha sonra CBB döngüsü yoluyla CO₂ asimilasyonunu yürütmek için kullanılır. Bu nedenle, fotosentezin küresel çıktıları, bir hücredeki ana metabolik ara maddeleri oluşturan trioz fosfat gliseraldehit 3-fosfat, NADPH ve ATP'den oluşmaktadır. Bu üç bileşik, bir hücredeki tüm aktiviteleri, yani hücre bölünmesini, büyümesini ve biyokütle birikimini desteklemek için gereklidir. Mikroalgler bu nedenle güneş enerjisini, H₂O ve CO₂'i organik ürünlere dönüştüren yenilenebilir hücre fabrikalarıdır. Üç ana fotosentetik ürünün (C, ATP ve NADPH) verimli üretimi, yönetimi ve bölünmesi, yalnızca sağlıklı bir alg kültürünü sürdürmek için değil, aynı zamanda küresel gıda, yakıt ve yakıt talebini karşılamak için alg biyokütlesinin sürdürülebilir üretiminin anahtarıdır.

Birçok araştırmacı, mikroalglerden üretilen biyodizelin üçüncü nesil biyoyakıtlar olduğunu düşünmektedir. Mikroalgler, birinci ve ikinci nesil biyoyakıtların sınırlamalarının üstesinden gelmek için sürdürülebilir bir yenilenebilir enerji kaynağı olabilir. Mikroalgler tüm yıl boyunca lipid üretme yeteneğine sahiptir. Mikroalglerin lipid verimliliği, geleneksel mahsullere kıyasla çok daha yüksektir (Baliga ve Powers 2010). %20 ile %50 arasında değişen mikroalglerin lipid oranı diğer rakiplerine göre daha fazladır. Bazı mikroalgler, biyodizel üretimi için alan bazında geleneksel mahsullere göre 15–300 kat daha fazla lipid içeriğine sahiptir. Mikroalg lipidinden biyodizel oluşturulması toksik değildir ve büyük ölçüde biyolojik olarak parçalanabilir (Abd Ellatif Mohamed 2018). Mikroalgler tatlı su, deniz suyu, atık su veya tarıma elverişli olmayan topraklarda yetişirler ve ayrıca hemen hemen her yerde yetiştirilebilirler (Slade ve Bauen 2013). Bu nedenle, ormansızlaşma gibi minimum çevresel etkiye sahip olmanın yanı sıra mikroalgler, yakıta karşı gıda çatışmasını önleyebilecek alternatif bir yakıt hammaddesidir (Sawaengsak vd. 2014). Güneş, jeotermal, rüzgar, gelgit enerjisi gibi diğer yenilenebilir enerji kaynakları ile karşılaştırıldığında mikroalgler daha kontrollü ve karardır. Alg kültürü, temiz su ve toprak gibi zorunlu hiçbir kullanım olmaksızın daha büyük miktarlarda biyodizel üretme potansiyeline sahiptir. Ancak mikroalglerdeki TAG biyosentez yolları henüz moleküler biyoloji kullanılarak kapsamlı bir şekilde tasarlanmamıştır. En iyi bilinen; bu sentez sırasında mikroalgler, hücre stresine yanıt olarak karbon ve enerjinin depolanması konusunda önemli bir role sahip olmalarıdır.

Nitrojenin kontrolsüz hücre içi varlığı proteinler, DNA, lipidler ve karbonhidratlar dahil olmak üzere çoğu biyomolekülle negatif etkileşime girdiği için önemli toksik etki ortaya çıkarmaktadır. Çoğu organizma, bu stresin ortaya koyduğu oksidatif zorluğa yenik düşmektedir. Bununla birlikte, bazı canlıların bu zorluğu geçersiz kılmak için ince ayarlı moleküler stratejiler geliştirdikleri bilinmektedir. Metabolik olarak yeniden programlama, enzimatik detoksifikasyon, enzimatik olmayan reaksiyonlar ve genetik manipülasyon nitrojenik stresin doğasında var olan tehlikeleri engellemek için başvurulan stratejilerden bazılarıdır (Alhasawi vd. 2019). Nitrojen toksisitesine dirençli bazı mikroorganizmalar antimikrobiyaller üretmek, katma değerli metabolitler üretmek ve tarımsal verimi artırmak için çok sayıda biyoteknolojik fırsatlar sunmaktadır. Bu nedenle, çok çeşitli uygulamalar için tasarlanmış biyoteknolojik yöntemlere uyarlanabilirler.

C. reinhardtii'de bulunduğu tahmin edilen C4 benzeri fotosentez ve pirüvat sistemi henüz tam olarak karakterize edilememiştir. *C. reinhardtii*'de lipid ve

biyokütlenin arttırılması için metabolik yolak üzerinde hangi genlerde değişiklik yapılması gerektiği tam olarak bilinmemektedir. *PPDK* geninin kodladığı proteinler, trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne giren karbon akışını kontrol etmek için gereklidir ve lipid sentezi ile rekabet halinde substratların karbon bölünmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. *PPDK* enzimi mısır gibi C4 bitkilerinin mezofil kloroplastlarındaki piruvattan fosfoenolpiruvat (PEP) rejenerasyonundan sorumludur. *PPDK* enzimini kodlayan genin susturulması ile hücredeki piruvat PEP'e dönüştürülemeyecek ve daha fazla piruvat lipid sentezinin öncü elemanı olan asetil-CoA'ya dönüştürülecektir. Dolayısı ile hücrede sentezlenen lipid ve biyokütle miktarının artması beklenmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, *C. reinhardtii* *PPD2* geninin *C. reinhardtii* CC 125 mt(+)'den klonlanması, karakterizasyonu ve ekspresyon analizleri ilk defa tanımlanmıştır. (*C. reinhardtii* *PPD1*; daha önce aynı laboratuvarda klonlanmıştır). Mikroalg kültürleri farklı NH_4^+ , hava ve yüksek CO_2 (~%5) koşulları altında yetiştirilmiş ve bu koşullar altında *C. reinhardtii* *PPD1* ve *PPD2* genlerin ekspresyonları belirlenmiştir. Ekspresyon analizleri RT-PCR ile moleküler düzeyde qRT-PCR ile de kantitatif olarak tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan biyoinformatik analizler yardımı ile bu genlerin C4 metabolizmasındaki fonksiyonu tahmin edilmeye çalışılmıştır. CRISPR/Cas9 RNP yöntemi ile mutant suşlar elde edilerek lipid ve biyokütle içeriğinin arttırılması bu tez projesinin temel amacını kapsamaktadır. Ancak *C. reinhardtii* hücrelerinde bu sistemi çalıştırmanın zorlukları ve *C. reinhardtii* *PPDK* genlerinin herhangi bir fenotip göstermemesi nedeniyle mutant suşlar elde edilememiştir. Dolayısı ile lipid ve biyokütle artışları için analizler gerçekleştirilememiştir. Ancak yine de CRISPR/Cas9 RNP yöntemi tez içerisinde detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

Dünya nüfusunun sürekli bir artış içerisinde olması, artan sera gazı emisyonları, ilerleyen teknoloji ve insanların daha kaliteli yaşam isteği alternatif ve çevre dostu yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanılmasını zorunlu hale getirmiştir. Her geçen gün artan yakıt ihtiyacımız ile biyoyakıt kullanımı bunların en başında gelmektedir. Petrol rezervlerinin hızla tükenmesi, artan petrol fiyatları ve fosil yakıt kullanımının çevre üzerindeki olumsuz etkileri gibi sebeplerden dolayı araştırmacılar, alternatif biyoyakıt arayışına girmişlerdir. Son zamanlarda, özellikle ulaşım endüstrisinde biyodizel, biyoetanol ve jet yakıtı gibi sıvı biyoyakıt kullanımına ilgi oldukça artmıştır.

Biyoyakıtlar kullanılan hammaddenin cinsine ve üretim teknolojisine göre sınıflandırılmaktadır. Nişasta fermentasyonu (şeker pancarı, şeker kamışı, buğday, arpa vb) ve yağlı tohum bitkilerinin (soya, ayçiçeği, kolza vb.) ve hayvansal yağlar veya atık yağların transesterifikasyonu yoluyla üretilen biyoyakıtlar birinci nesil biyoyakıtlar, lignoselülozik maddelerden (saman, odun, kavuz, kepek vb) elde edilenler ikinci nesil biyoyakıtlar ve mikroalglerden üretilen biyodizel, biyoetanol, biyohidrojen vb. yakıtlar ise üçüncü nesil biyoyakıtlar olarak sınıflandırılmaktadır (Behera vd. 2015; Leong vd. 2018; Chowdhury ve Loganathan 2019). Birinci ve ikinci nesil biyoyakıtlar gıda güvenliği, küresel gıda pazarları, su kıtlığı ve ormanlar üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle birçok araştırmanın konusu olmuştur.

Petrol İhraç Eden Ülkeler Örgütü (OPEC)'ne göre, 2040 yılına kadar dünya akaryakıt talebi günde 109,4 milyon varile ulaşması beklenmektedir (OPEC 2016). Bunun sonucunda ise, dizel yakıt talebinin günde 5,7 milyon varil daha fazla olması tahmin edilmektedir.

2.1. Biyodizel

Biyodizel; dizel motorlar için alternatif bir yakıttır. Başlıca avantajları, yenilenebilir enerji kaynaklarından elde edilebilen yakıtlardan biri olması, ayrıca toksik olmaması ve biyolojik olarak parçalanabilir olmasıdır. Diğer bir deyişle biyodizel terimi, yağ asidi esterlerinin belirli koşullar altında metanol veya etanol gibi basit alkollerle reaksiyona girmesiyle elde edilen mono alkil esterlerini ifade etmektedir (Aktaş vd. 2020).

Biyodizel, genellikle B100 olarak adlandırılan sıvı bir yakıttır veya saf, harmanlanmamış formunda saf biyodizeldir. Petrol dizeli gibi, biyodizel de sıkıştırma ateşlemeli motorlara yakıt sağlamak için kullanılmaktadır. Ayrıca dizel motoru tasarımında herhangi bir değişiklik gerektirmeden saf biyodizel olarak kullanılabilir. Biyodizel yağ içermez; ancak saf veya herhangi bir yağ bazlı motorine her oranda karıştırılarak yakıt olarak tercih edilebilmektedir. Örneğin %20 biyodizel ve %80 dizel yakıt içeren bir karışım B20 olarak adlandırılmaktadır.

Alternatif yakıtlarla ilgili araştırmalar, II Dünya Savaşı'ndan sonraki yıllarda büyük ölçüde hareketsiz kalırken 1970'lerdeki enerji krizleri bu konuya olan ilgiyi yeniden canlandırmıştır (Knothe ve Razon 2017).

Biyodizelin başlangıçta “karbon-nötr” olduğu varsayılırken, hammaddeyi büyütmek için gereken tarımsal girdiler ve arazi kullanımı gibi nedenlerden dolayı, genellikle biyodizel kullanımının aslında petrodizel kullanılmasından daha fazla sera gazı emisyonuna yol açabileceği anlamına gelmektedir (Manik ve Halog 2013). Artan tarımın, gübre akışından kaynaklanan nitrifikasyon nedeniyle su yolları üzerinde de olumsuz etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle, biyodizelin yerel çevre için petrodizelden belirgin avantajları olmasına rağmen, küresel çevre üzerindeki etkisi daha az belirgindir.

Biyodizel ekonomisi, petrodizel ile rekabet edebilmek için genellikle, vergi indirimleri veya diğer düzenlemeler şeklindeki teşviklere bağımlı hale getirmiştir. Bu nedenle, biyodizelin teknik ve ekonomik olarak rekabetçi olabileceği diğer potansiyel uygulamaları araştırmak her zaman ilgi çekici olmuştur. Hem iş hem de çevre profillerini iyileştirmek için petrol dışı hammadde bileşenlerinden başka ürünlerin geliştirilmesi de kritik öneme sahip olacaktır. Biyodizel endüstrisinin karşılaştığı ticari zorluklar, birçoğu önemli sermaye girdileri gerektirdiğinden birçok avantajına rağmen yenilikçi yeni üretim teknolojilerinin yavaş benimsenmesine yol açmıştır. Bu nedenle, biyodizel yaygın olarak benimsenen bir alternatif yakıt haline gelse de daha yaygın olarak kullanılmasını engelleyebilecek birçok zorluk barındırmaktadır.

Biyodizel genellikle kolza tohumu, soya fasulyesi, hardal, keten, mısır, ayçiçeği, pamuk, hurma yağı, kenevir ve palm gibi yağ bitkileri, atık bitkisel ve hayvansal yağlar, bazı yağ içeren çamur atıkları ve mikroalgler gibi çok çeşitli hammadde kaynaklarından üretilmektedir. Biyodizel üretiminde hammadde kaynağı olarak kullanılan yağ çeşitleri oldukça önemlidir. Çünkü kullanılan yağdaki yağ asitlerinin türleri ve oranları üretilen biyodizelin yakıt kalitesini göstermektedir. Çizelge 2.1’de mikroalglerin diğer hammaddeler ile lipit içeriği, lipit verimi gibi parametreler ile karşılaştırılması verilmiştir. Yağlı tohum bitkilerine kıyasla lipit verimi düşük lipit içeriğe sahip mikroalglerde bile oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Zhang vd. 2022)

Çizelge 2.1. Mikroalglerin diğer hammaddelerle karşılaştırılması

Bitkiler/Algler	Lipit içeriği (%)	Lipit verimi (L/ha.yıl)	Kullanım alanı (m ² yıl/kg biyodizel)	Biyodizel verimi (kg/ha yıl)
Mısır	44	172	66	152
Kendir	33	363	31	321
Soya fasulyesi	18	636	18	562
Hint fıstığı	28	741	15	656
Kanola	41	974	12	862
Ketencik	42	915	12	809
Ayçiçeği	40	1,070	11	946
Palm	36	5,366	2	4,747
Mikroalg (düşük lipit içeriği)	30	58,700	0.2	51,927
Mikroalg (orta lipit içeriği)	50	97,800	0.1	86,515
Mikroalg (yüksek lipit içeriği)	70	126,900	0.1	121,104

2.2. Mikroalgler

Mikroalgler, tatlı sularda, deniz suyunda veya atık sular gibi çok farklı habitatlarda yaşayabilen tek hücreli, fotoototrofik mikroskobik organizmalardır. Çeşitli çevre koşullarında 50.000'den fazla prokaryotik ve ökaryotik tek hücreli mikroorganizma tanımlanmıştır. Akarsular, nehirler, göller, okyanuslar gibi su alanları ve karasal alanlar da dahil olmak üzere çok geniş ekosistemlerde gelişebilmektedir. Siyanobakteriler prokaryotik mikroalglerden (*Cyanophyta*) oluşurken, ökaryotik mikroalgler arasında ise *Bacillariophyta* (diyatomlar), *Cryptophyta* (altın algler), *Rhodophyta* (kırmızı algler), *Xanthophyta* (sarı/yeşil algler) ve *Chlorophyta* (yeşil algler) bulunmaktadır (Hemaiswarya vd. 2013). Doğadaki karbon döngüsünün önemli bir parçası olan bu organizmalar, su ve topraktaki karbon kaynağını verimli bir şekilde kullanabilirler. Mikroalglerin CO₂ emisyonunu azaltma ve yüksek verimlilikle lipid üretme yetenekleri birçok araştırma tarafından kanıtlanmıştır (Zhang vd. 2022). Ayrıca mikroalg yetiştiriciliğinde, atık su kaynaklarından besin olarak fosfor ve azot kullanılabilir. Bu nedenle, mikroalgler atık suların biyolojik iyileştirmesi için de ek avantaj sağlayabilirler. Biyokütleleri hem ticari hem de endüstriyel kullanım için yüksek potansiyele sahip çok sayıda biyoaktif madde içermektedir. Mikroalgler, gıda/yem, kozmetik, alternatif enerji endüstrileri, proteinler, lipidler, karbonhidratlar, boyalar ve vitaminler gibi çeşitli hücresel metabolitler üretebilmektedir (Dębowski vd. 2020).

Fizyolojik olarak mikroalgler aerobik fotosentetik organizmalardır, dolayısıyla çoğu klorofil ve diğer fotosentetik pigmentleri içermektedir. Mikroalgler en yaygın olarak su ortamlarında bulunmaktadır. Çoğunlukla diğer organizmalar için besin kaynağı olarak hizmet eden ve organik maddelerin birincil üreticileri veya önemli bir oksijen kaynağı olan ve sudaki besin zincirinin temelini oluşturan fitoplankton olarak bulunurlar. Fotosentetik organizmalar olarak mikroalgler, karasal bitkiler tarafından üretilenlere benzer şekilde organik karbon bileşiklerini üreticileridir (Rinanti 2016).

Mikroalg hücreleri, ökaryotik hücre organellerinin yanı sıra, gruplar halinde düzenlenmiş nişasta granülleri, yağ damlacıkları ve vakuoller de içerir (Graham ve Wilcox 2000). Her mikroalg hücresi, bitkilerde bulunanlar gibi şerit veya disk şeklinde olabilen bir veya daha fazla kloroplast içermektedir. Kloroplast matrisi içinde tilakoid adı verilen düz veziküller bir yapı bulunmaktadır. Tilakoid zarı, fotosentezin fotokimyasal reaksiyon bölgeleri olarak klorofil ve diğer tamamlayıcı pigmentleri içermektedir. Ayrıca araştırmalar mikroalglerin üç tip fotosentetik pigmente sahip olduğunu da göstermektedir; bunlar kloroplastta bulunan klorofiller, karotenoidler ve fikobilinler. Klorofil a, b, c, d ve e olarak adlandırılan ve tümü yeşil renkte olan beş tür klorofil vardır. Tüm mikroalgler klorofil a içermektedir. Diğer bir araştırmada, karotenoidlerin karotenler ve ksantofiller olmak üzere iki tip olan suda çözünmeyen hidrokarbonlar olduğunu tanımlamıştır (Othman vd. 2010). Fikobilinler veya biliproteinler, fikosiyanin ve fikoeritrin olmak üzere iki türe ayrılan suda çözünür protein kompleksleridir. Mikroalglerin kahverengimsi rengi, karotenlerin ve ksantofillerin baskınlığından kaynaklanırken, mikroalglerin kırmızımsı rengi, yüksek oranda fikobilin içeriğinden kaynaklanır (Rinanti 2016).

Mikroalgler açık sistemler (doğal göletler, kanal veya dairesel havuzlar ve tanklar) ve kapalı sistemler (tübüler ve düz-levha fotobiyoreaktörler) olmak üzere iki farklı şekilde yetiştirilebilirler. Açık sistemler, fotobiyoreaktörlerle karşılaştırıldığında

inşa edilmesi daha ucuz, ölçeklenmesi daha basit ve çalıştırılması daha kolay olduğu için uygun maliyetli olarak kabul edilir. Diğer bir avantajı da serbest güneş ışığı enerjisidir. Ancak, açık sistemlerin düşük biyokütle üretkenliği, yüksek hasat maliyetleri, yüksek su buharlaşma oranları ve diğer algler, bakteriler, mantarlar, virüsler ve protozoa türleri ile yüksek kontaminasyon riski gibi birçok dezavantajı da içermektedir. Ayrıca, atmosferik CO₂ açık havuzlarda mikroalginin genellikle üretkenlik gereksinimlerini karşılamaz bu nedenle havalandırma gereklidir. Hava koşulları ve mevsimsel değişimler gibi çevresel faktörler üzerinde kontrol eksikliği mikroalg üretkenliği etkilemektedir (Hossain ve Mahlia 2019). Bu nedenle, açık sistemlerde mikroalg yetiştiriciliği için yer seçimi çok önemlidir ve arazi maliyetlerinin yanı sıra güneş radyasyonu ve yerel sıcaklıklar gibi parametreler de dikkate alınmalıdır. Mikroalg yetiştiriciliği için en uygun yerler, yıl boyunca yüksek güneş ışınlamına sahip tropikal bölgelerdeki kuru kıyı bölgeleridir. Kapalı sistemlerde kültürleme, açık sistemlerdeki sınırlamalarının üstesinden gelebilir. Daha yüksek derecede proses kontrolü ve sonuç olarak daha yüksek üretkenlik sağlamaktadır. Kapalı sistemler, çeşitli tasarımları sayesinde büyük birçok yönlülüğe sahiptir. Dolayısı ile güneş ışığı dahil çeşitli ışık kombinasyonları kaynak olarak kullanılabilir. Ayrıca, daha iyi CO₂ kullanımı ve maksimum ışık verimi sağlarlar (Hossain ve Mahlia 2019). Avantajlarına rağmen, kapalı sistemleri büyük ölçekli uygulamalar için kullanmanın sermaye ve işletme maliyetleri gibi önemli sınırlamaları vardır. Bunların enerji tüketimi sistemleri önemli bir endişe kaynağıdır (Pawar 2016).

Biyoyakıt üretimi için mikroalglerin kullanımı diğer biyoyakıt üretim kaynaklarına göre bir dizi avantaj sundukları için araştırmacılar, hükümet ve yerel ve uluslararası girişimcilerden büyük ilgi görmektedir. Bu avantajlar basit hücresel bölünme döngüsüne sahip olmaları, CO₂ yoluyla güneş enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürebilmeleri, yüksek büyüme hızı ve verimliliğe sahip olmaları olarak sıralanabilmektedir. Mikroalgler büyümek için ekilebilir araziye ihtiyaç duymazlar ve bu nedenle geleneksel gıda mahsulleriyle (buğday, mısır, şeker pancarı vb.) rekabet etmezler. Karada bulunan yağlı tohumlu bitkilerden en az 15-20 kat daha yüksek yağ içeriğine sahip hızlı biyokütle üretimi göstermektedirler (Aratboni vd. 2019). Bununla birlikte, mikroalg kullanmanın bir dezavantajı ise bazı mikroalg biyokütlesindeki düşük lipid içeriği, hasat sırasında karşılaşılan zorluklar gibi nedenlerle biyoyakıt üretiminin yüksek maliyetli olmasıdır. Bu nedenle, mikroalg biyokütlesini ve hücrelerindeki lipid içeriğini arttırmak için farklı yöntemlerin geliştirilmesi, biyoyakıt üretmek için sürdürülebilir düşük maliyetli bir sürecin gelişmesine yol açacaktır.

Birçok mikroalg türleri lipid açısından zengindir. Mikroalglerin lipid fraksiyonu esas olarak asilgliseroller, serbest yağ asitleri ve karotenoidleri içeren nötr lipidlerden ve çeşitli fosfolipitler ve galaktolipitleri içeren polar lipidlerden oluşmaktadır. *Botryococcus braunii*, *Nannochloropsis sp.*, *Dunaliella primolecta*, *Chlorella sp.* ve *Cryptocodinium cohnii* gibi çeşitli mikroalg türleri büyük miktarda hidrokarbon ve lipid üretirler. Mikroalglerin yağ asidi profili genellikle C16 ve C18 doymuş ve doymamış yağ asitlerinin bir karışımının yanı sıra birçok omega yağ asidi de dahil olmak üzere daha uzun karbon zinciri uzunluklarıyla karakterize edilmektedir. Birçok mikroalg türünün lipid içeriği belirlenmiştir ve bu oran kuru biyokütlenin %20 ila %50 (w/w)'sini temsil etmektedir. Ancak %1 ila %70 arasında değişen başka değerler de rapor edilmiştir (Barkia vd. 2019). Genellikle çoğu mikroalg türü ekspanansiyel

büyüme fazında polar lipitler açısından zengindir ve stres koşulları altında TAG biriktirirler (Rodolfi vd. 2009). Lipit birikimi mikroalg türlerine bağlıdır ve farklı lipit tiplerinin sentezi; büyüme fazı, besin varlığı, tuzluluk, ışık yoğunluğu, sıcaklık ve pH gibi yetiştirme koşullarından büyük ölçüde etkilenmektedir (Guschina ve Harwood 2006). Mikroalgler stres koşulları altında metabolizmalarını değiştirerek hücrelerinde yüksek miktarlarda nötral lipit depolamaktadırlar (Griffiths ve Harrison 2009; Markou ve Nerantzis 2013). Mikroalglerde lipit birikimini etkileyen azot (N) eksikliği (Yeh ve Chang 2011; Li vd. 2014; Ördög vd. 2016; Aratboni vd. 2019; Hopkins vd. 2019; Mori vd. 2020), fosfor stresi (Lin vd. 2018; Aratboni vd. 2019), sıcaklık (Ördög vd. 2016), yüksek ışık yoğunluğu (Kim vd. 2013; Aratboni vd. 2019), ağır metaller (Kadar vd. 2012; Sibi vd. 2017; Sati vd. 2019), CO₂ (Zhu vd. 2016b; Aratboni vd. 2019) ve tuz (Zhu vd. 2016b; Hopkins vd. 2019; Mori vd. 2020) gibi stres koşullarında birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan araştırmalar özellikle N eksikliği koşulu altında *Chlamydomonas*'taki biyolojik süreçler incelenmiş ve protein biyosentezi, trikarboksilik (TCA) döngüsü ve fotosentez ile ilgili genlerin aşağı regüle edildiği ve TAG biyosentezine dahil olan genlerin ise yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (Miller vd. 2010; L. Zhu vd. 2016b; Aratboni vd. 2019).

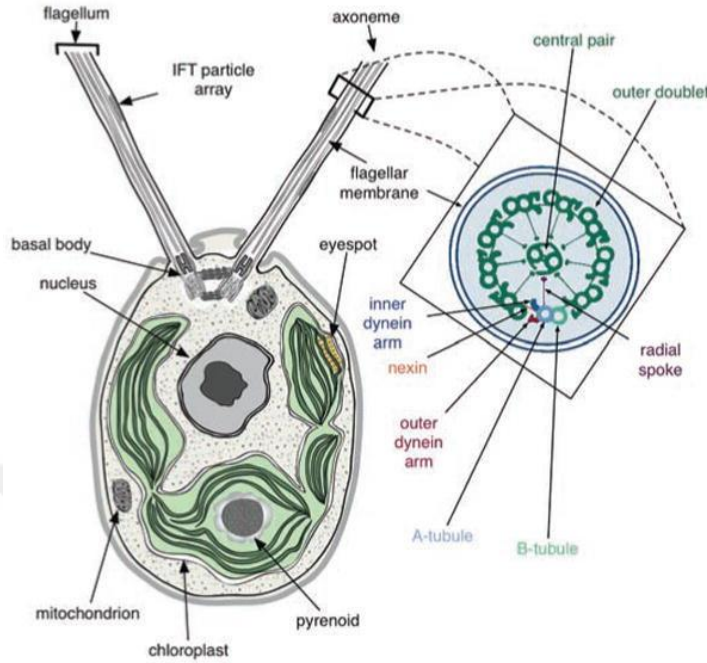
2.3. *Chlamydomonas reinhardtii*

C. reinhardtii, bir milyar yıl önce kara bitkilerinden ayrılan *Chlorophyta* şubesine ait tek hücreli, iki kamçılı, yaklaşık 10µm uzunluğunda ökaryotik ve fotosentetik bir algdır. *C. reinhardtii* eşeysiz olarak 8 saatte bir bölünebilir ve yaşam döngüsünün çoğu vejetatif haploid aşamasındadır. Vejetatif hücreler mitozla bölünmektedir. Toplam boyutu ~120 Mb olan ve 17 kromozom içeren bir nükleer genoma sahiptir. Şekil 2.1 *C. reinhardtii*'nin hücre yapısını şematize etmektedir.

Mikroalg genom dizilerinin belirlenmiş olması, genetik mühendisliği teknolojisini büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır. Bugüne kadar *Fragilariopsis cylindrus*, *Pseudo-nitzschia*, *Thalassiosira rotula*, *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Galdieria sulphuraria* gibi çeşitli mikroalg türleri için genom dizileme projeleri tamamlanmıştır. Ancak birçok araştırmada genellikle model organizma olan tek hücreli yeşil alg *C. reinhardtii* kullanılmaktadır (Rochaix 1995; Harris 2001; Grossman vd. 2007; Bonente vd. 2012). Bu organizmayla yapılan genetik analizler 20. yüzyılın ortalarında başlamış ve biyolojik süreçleri incelemek için gelişmiş moleküler ve genomik teknolojilere dönüşmüştür.

Tek hücreli fotosentetik flagellatların bir cinsi olan *C. reinhardtii*, kloroplast bazlı fotosentezin evrimi, ökaryotik kamçının yapısı ve işlevi, kloroplast biyogenezi ve hücre döngüsü dahil olmak üzere çok çeşitli temel biyolojik süreçleri incelemek için model bir organizmadır. Aynı zamanda motilite ve ışık gibi uyaranlara oluşturulan yanıtlar ve hücreler arası tanıma ve iletişim gibi temel süreçlerin incelenmesi için de tercih edilmektedir. *C. reinhardtii*'yi fotosentezi incelemek için ideal yapan benzersiz nitelikler, asetati metabolize ederek karanlıkta heterotrofik olarak büyüme yeteneği ve karanlıkta büyümenin ardından koşullar aydınlatıldığında oksijenli fotosentez gerçekleştirme kapasitesini koruyan normal bir yeşil kloroplastı sürdürmesidir. Bu özellikler, fotosentetik aparatın işlevinin ve biyogenezinin olumsuz etkilendiği bir dizi mutantın izolasyonuna izin vermiştir. Bu organizma basit yaşam döngüsü, mutantların

kolay izolasyonu ve moleküler genetik çalışmalar için büyüyen bir dizi araç ve teknik sunmaktadır.



Şekil 2.1. *C. reinhardtii*'nin hücre yapısı (Merchant vd. 2007)

Birçok moleküler teknoloji, *Chlamydomonas* araştırmalarına da uygulanmıştır. Plazmit, kozmid ve bakteriyel yapay kromozom kitaplıkları mevcuttur. Etiketli mutant alelleri oluşturmak ve tanımlamak için yöntemler geliştirilmiştir. Gen fonksiyonu, antisens veya RNA interferans (RNAi) kullanılarak spesifik gen aktivitelerinin baskılanmasıyla değerlendirilebilir ve rapörtör genler, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan düzenleyici faktörleri ve dizileri tanımlamak için geliştirilmiştir (Grossman vd. 2007). *C. reinhardtii* genomu ve transkriptomlarının incelenerek genlerin metabolik yollarının ve düzenleyici ağlarının tanımlanması, kloroplast biyogenezini, fotosentetik yapı-işlev ilişkilerini ve TAG biyosentezini anlamamızı büyük ölçüde kolaylaştıracaktır.

2.4. Karbon Konsantrasyon Mekanizması

Birçok fotosentetik organizma (algler, diyatomlar, siyanobakteriler, C4 bitkiler ve CAM vasküler bitkiler) fotosentezin anahtar enzimi olan ribuloz bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (rubisko) civarında CO₂'nin iç konsantrasyonunu artıran aktif bir CO₂ konsantre etme mekanizmasına (CCM) sahiptir. Bu mekanizma, hücrelerin inorganik karbonu (Ci) hücre içinde konsantre etmesine izin vererek, Rubisko'nun CO₂ için düşük afinitesine ve düşük seçiciliğine rağmen, Ci için fotosentetik afinitenin artmasına ve Ci'nin Rubisko'ya yakın bir yerde birikmesini sağlamaktadır.

Özellikle suda yaşayan *C. reinhardtii* gibi su organizmaları da dahil olmak üzere mikroorganizmalar fotosentetik karbon asimilasyonu için değişken bir çözünmüş Ci kaynağı ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu nedenle *C. reinhardtii*, sınırlayıcı CO₂ ile indüklenebilir bir CCM'nin geliştirilmesini içeren çeşitli tepkiler yoluyla değişen Ci

kaynağına uyum sağlama yeteneğine sahiptir. CCM, kloroplast stromasında yüksek konsantrasyonda bikarbonat biriktirmek için muhtemelen hem hücre zarında hem de kloroplast zarında aktif olarak C_i transport etmektedir (Spalding 1998).

Prokaryotik ve ökaryotik mikroalgler, küresel fotosentez ve karbon döngüsünün önemli bir kısmından sorumludur. Mikroalgler tarafından CO_2 fiksasyonu, güneş ışığındaki enerjinin mikroalg hücrelerinde CO_2 ve H_2O ile biyolojik bir enerji dönüşüm süreci olarak kabul edilmektedir. Mikroalgler, fotosentez yoluyla biyokütleyle C sabitleyen, ekosistemdeki en önemli CO_2 sabitleyici olarak bilinmektedir. (Tsai vd. 2017). Mikroalgler ekosistemdeki atmosferde bulunan CO_2 , baca gazı, alev gazı ve egzoz gazı gibi endüstriyel gazlardan açığa çıkan CO_2 ve çözünebilir karbonatlar (örneğin $NaHCO_3$ ve Na_2CO_3) formundaki sabit CO_2 gibi farklı C' leri biyokütlelerinde sabitleyebilirler (Tsai vd. 2017). Kuru ağırlık hesaplamasına göre 100 t alg biyokütlesi ≈ 183 t CO_2 'yi sabitleyebilmektedir (Chisti 2007). *Chlamydomonas* hücreleri yüksek CO_2 'de geliştirildiğinde (%1 v/v havadan daha yüksek), harici C_i için nispeten düşük bir afinite sergilerler. Bu nedenle, CCM indüksiyonunun çevresel CO_2 konsantrasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir (Giordano vd. 2005).

CO_2 fiksasyonu hücredeki tüm reaksiyonlar için karbon iskeletleri sağlamaktadır. CO_2 , mikroalglerin fotosentezi yoluyla protein, nişasta ve yağ gibi biyokütleyle dönüştürülür (Luo vd. 2021). Mikroalgler, tilakoid zarın etrafındaki CO_2 seviyelerini yükseltmek için özel bir organel olan pirenoid kullanarak karbon konsantrasyonunu gerçekleştirirler (Prasad vd. 2021). Karbon konsantrasyon mekanizması, daha yüksek bir mikroalg büyümesi için bir güçlendirici görevi görür ve bu nedenle biyokütle üretkenliği artırmak için kullanılabilir.

Mikroalgler üretici oldukları için sürekli olarak fotosentez yapma yeteneğine sahiptirler. Fotosentez için birincil gereksinimlerden biri atmosferik CO_2 'dir. Mikroalgler, genellikle çeşitli karasal bitkilerle karşılaştırıldığında nispeten yüksek fotosentetik etkinlikleriyle karakterize edilir ve atmosfere karbondioksit emisyonlarını azaltmanın alternatif bir yolu olarak önerilmiştir (Pedroni vd. 2001). Fotosentetik organizmalar olarak, mikroalgler ortamdaki CO_2 'yi yakalamaya iyi uyum sağlamışlardır. Ortamdaki CO_2 'yi yakalamak için büyüyen algler, karbondioksiti uzaklaştıracak ve onu biyokütle şeklinde tutacaktır.

Karbon yakalama teknolojisi olarak, mikroalg ile karbon fiksasyonu, sanayileşme potansiyeline sahip birkaç karbon nötr teknolojiye biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Buck 2021). Mikroalg ile karbon fiksasyonu, CO_2 fiksasyonu için güvenli, ekonomik ve verimli bir yöntemdir ve emisyon azaltımı için büyük potansiyele sahiptir. Ayrıca mikroalgler diğer karbon yakalama yöntemleriyle karşılaştırıldığında, mikroalg ile karbon fiksasyonu mikroalglerin yüksek fotosentez hızı, hızlı büyüme oranı, hızlı uyumu ve düşük işletme maliyetleri dahil olmak üzere çeşitli avantajlara sahiptir. Mikroalgler, CO_2 yakalama ve kullanma entegrasyonu sayesinde doğrudan biyokütle yakıtına dönüştürülebilirler. Mikroalg ile karbon fiksasyonu prosesi, sekonder metabolitlerde kirlenici oluşturmaları için çevre dostudur. CO_2 konsantrasyonunun artmasıyla mikroalglerin üreme yeteneği artmaktadır (Freer vd. 2021). Mikroalg biyokütlesinin yaklaşık %50'si karbondur ve büyümesi büyük miktarda CO_2 gerektirmektedir. Mikroalg ile karbon fiksasyonu, CO_2 azaltımı ve biyokütle üretimini teşvik etmek gibi iki amaca birlikte hizmet etmektedir (Zeng vd. 2021).

Birçok araştırma CO₂ konsantrasyonu, ortam bileşimi, sıcaklık, pH, ışık yoğunluğu vb. dahil olmak üzere mikroalgler tarafından karbon fiksasyonunun etkinliğini etkileyen birçok faktörün olduğunu göstermiştir. Mikroalg kültürünün büyümesi için atmosferik CO₂ konsantrasyonunun doyma noktası %2 ile %5 v/v arasında değişmektedir, bu da bu doyma noktasının üzerinde mikroalg hücrelerinin atmosferden ilave CO₂ absorbe etme kabiliyetine sahip olmadığı anlamına gelmektedir (Kodama 1993). Kültür ortamı ise mikroalglerin büyümesini sağlamak için yeterli besin maddelerine sahip olmalıdır. C, N, P ve S mikroalg hücrelerinin önemli bileşenleridir. Temel inorganik tuzlar arasında Fe, Mg ve eser elementler bulunmaktadır.

Mikroalgler tarafından CO₂ fiksasyonu, güneş ışığındaki mikroalg hücrelerinde CO₂ ve H₂O ile biyolojik bir enerji dönüşüm süreci olarak kabul edilebilir. Enerji dönüşümünün biyolojik içsel özelliklerinin incelenmesi, mikroalglerin yüksek verimli karbon fiksasyon mekanizmasını ortaya çıkarmaya yardımcı olacaktır.

2.5. Piruvat, ortofosfat dikinaz

Enzimler katalizlediği tepkime türüne ve mekanizmasına göre sınıflandırılırken her sınıf altında substrat seçiciliği gibi durumlar da göze alınarak alt sınıflar oluşturulmaktadır. PPK (2.7.9.1) enzim sınıflandırmasında transferazlar arasında bulunmaktadır (Anonymous 1). Spesifik olarak, fosfor içeren grupları (fosfotransferazlar) eşleştirilmiş alıcılarla (dikinazlar) transfer eden transferazlar ailesine aittir.

PPK enzimi C₄ ve Crassulacean asit metabolizması (CAM) bitkilerinin fotosentetik karbon metabolizmasında görevli anahtar bir enzimdir (Hatch ve Slack 1968; Kluge ve Osmond 1971). Bu enzim; ATP ve piruvatın AMP ve PEP'e geri dönüşümlü fosforilasyonunu katalize etmektedir (Hatch 1987; Hanks ve Hunter 1995; Imaizumi vd. 1997). Embden-Meyerhof-Parnas glikolizinde piruvat kinaz tarafından gerçekleştirilen reaksiyonun tersine çevrilmesinden sorumlu olan glukoneogenez ve fotosentezde görev almaktadır. PPK bitkilerde, fotosentetik bakterilerde, arkealar ve yeşil alglerde piruvatın PEP'e dönüşümünü katalize etmekte ve fotosentez sırasında gerçekleşen CO₂ tutunum oranını güçlendirmektedir. Dolayısı ile piruvat metabolizmasına ve karbon fiksasyonuna katılmaktadır.

PPK, CO₂ fiksasyonunun etkinliğini artırmak için C₄ yolunda kullanılmaktadır (Ashton vd. 1990). Işığın çok olduğu ortamlarda bitkilerde fotosentez hızı CO₂ alım hızı ile sınırlıdır. Bu, CO₂'i mezofil hücrelerinden kılif hücrelerine taşımak için bir dizi kimyasal reaksiyon kullanılarak geliştirilebilir. PPK, piruvatı oksaloasetat üretmek için CO₂ ile reaksiyona giren PEP'e dönüştürmektedir. Demet kılif hücrelerinde CO₂ salındığında piruvat yeniden üretilir ve döngü devam etmektedir (Berg vd. 2012).

PPK proteini biyokimyasal olarak tanımlanan fonksiyonel domainlere karşılık gelen bağımsız olarak katlanmış üç domainden oluşmaktadır. Bu domainler nükleotit bağlanma domaini, PEP/piruvat bağlanma domaini ve merkez domain olarak adlandırılmıştır. Üç domainden oluşan bu monomer iki ayrı reaksiyon merkezi içermektedir. Merkezi domain iki aktif merkez arasında hareket eden bir taşıyıcı histidin kalıntısına sahiptir. Enzim reaksiyonu, merkezi domaininin yüzeyinde bulunan bu taşıyıcı histidin kalıntısının aracılık ettiği üç adımda gerçekleşmektedir. İlk iki kısmı

reaksiyon nükleotit bağlama domaininde katalize edilirken üçüncü kısmi reaksiyon, PEP/pürivat domaini üzerinde bulunan bir aktif alanda katalize edilmektedir (Herzberg vd. 1996; Nakanishi vd. 2005). Özetle merkezi domainin aktif bölgeler arasındaki hareketi ile enzim katalizlenmektedir.

PPDK, C3 bitkilerinde de bulunmasına rağmen bu bitkilerde doğrudan fotosenteze katıldığı düşünülmemektedir. Bununla birlikte, C3 bitkilerinde bulunan *PPDK* yapısı ve biyokimyasal özellikleri bakımından C4 bitkilerindekine oldukça benzemektedir. Şimdiye kadar incelenen C4 türlerinde, tek bir *PPDK* geni iki promotör bölgeye sahiptir, bu da iki transkript ve dolayısıyla iki farklı proteinin oluşmasına olanak vermektedir (Parsley ve Hibberd 2006; Taylor vd. 2010; Astley vd. 2011). Daha uzun transkript, birinci ekzonun gerisindeki bir promotör bölgeden ifade edilmektedir. Bununla birlikte, daha uzun transkriptin ilk intronunda ikinci bir promotör bulunur ve bu promotör, sitozolik bir protein üreten daha kısa bir transkriptte yol açmaktadır. Uzun transkriptteki 5'UTR, birinci ekzonun varlığı ve ikinci ekzonun başındaki üç eksik kodon dışında transkriptler aynıdır. C4 türlerinde sitozolik proteinin işlevi henüz açıklanmamıştır (Sheen 1991; Rosche ve Westhoff 1995). Sitosolik *PPDK* proteininin, pirinç tohumlarının nişasta ve yağ asitlerine karbon akışının düzenlenmesinde rol oynadığı öne sürülmüştür (Kang vd. 2005).

PPDK izoformları bitkilerde ve bazı alglerde hem kloroplast hem de sitozolde bulunmaktadır (Aoyagi ve Bassham 1984; Imaizumi vd. 1997; Parsley ve Hibberd 2006; Taylor vd. 2010). *PPDK*, nükleer DNA tarafından kodlanmakta ve gen, iki promotörün kontrolü altında diğer bir ifadeyle iki farklı başlatma bölgesinden kopyalanmaktadır. Daha büyük olan transkript, bir geçiş peptidi içeren kloroplastik *PPDK*'yı üretirken daha küçük olan transkript ise sitozolik *PPDK*'yı üretmektedir. Dolayısı ile *PPDK* genleri, *PPDK* proteininin kloroplastik ve sitosolik formları için iki farklı transkript ifade etmek üzere ikili bir promotör sistemine sahiptir. Kloroplastik *PPDK*'nın promotör bölgesi uzun transkriptin 1. ekzon bölgesinde bulunurken sitozolik *PPDK*'nın ise uzun transkriptin 1. intron bölgesinde bulunmaktadır.

Benzer şekilde *PPDK* yeşil mikroalg olan *C. reinhardtii* hücrelerinde *PPDK* iki farklı izoforma sahiptir. Pytozome veri tabanına göre, *C. reinhardtii*'de bulunan *PPDK* genleri; *PPD1* ve *PPD2* olarak adlandırılmaktadır. *PPD2* genini kloroplastta olduğu bilinirken *PPD1*'in ise sitozolde olduğu tahmin edilmektedir. Ancak bu genin *C. reinhardtii* sitozolündeki görevi henüz tam olarak tanımlanamamıştır (Anonymous 2).

2.6. Mikroalglerde Genetik Düzenlemeler

Daha iyi lipit üretkenliği elde etmek için mikroalgleri genetik olarak modifiye etmek alternatif bir yaklaşımdır. Mikroalglerin genetik modifikasyonu için uygulanabilecek çeşitli biyomühendislik yöntemleri vardır. Rastgele mutajenez, CRISPR/Cas9 sistemi, transkripsiyon aktifleyici benzeri protein destekli nükleaz (TALEN) (Bibikova vd. 2002; Mussolino vd. 2011) ve çinko parmak nükleaz (ZFN) (Sizova vd. 2013), mikro RNA (miRNA) (De Riso vd. 2009; Yoon vd. 2012) kısa interferans RNA (siRNA) (Rohr vd. 2004; Lv vd. 2013; Zhu vd. 2016a) ve HR (Homologous Recombination, Homolog Rekombinasyon) (Nelson ve Lefebvre 1995; Kilian vd. 2011) ya da NHEJ (Non-Homologous End Joining, Homolog Olmayan Uçların Birleşmesi) kullanımı genetik ekspresyonun aktivasyonuna ve baskılanmasına

izin vermektedir. (Kang vd. 2017), bitkilerde lipit biyosentezinin anahtar regülatörü olarak bilinen *AtWRI1* (AP2 type TF Wrinkled1 in Arabidopsis) genini araştırmışlar ve endüstriyel bir mikroalg olan *Nannochloropsis salina*'ya uygulamışlardır. Lipit metabolik genlerinin kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ile analiz edildiği promotör bölgelerde AW kutusunun varlığını araştırarak *AtWRI1* ile düzenlenen gen adaylarını belirlemişlerdir. *AtWRI1* geninin aşağı regüle edilmiş *TAGL* (triacylglycerol lipase) ve *DAGK* (diacylglycerol kinase) ve yukarı regüle edilmiş *PPDK*, *LPL* (lysophospholipase), *LPGAT1* (lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1) ve *PDH* (dihydrolipoyllysine) ile *NsAtWRI1* (*AtWRI1* TF heterologously in *N. Salina*) transformantlarında lipit üretiminde artış olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan diğer bir çalışmada model organizmalara kıyasla daha fazla lipit üretim kapasitesine sahip olan *Nannochloropsis gaditana* ile bir araştırma yapılmıştır (Ajjawi vd. 2017). Lipit üretiminin varsayılan negatif düzenleyicileri olarak belirledikleri 20 transkripsiyon faktörünün CRISPR-Cas9 ters genetik yöntemi ile insersiyonel (yerleştirilebilir) mutasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Lipit birikiminin transkripsiyonel bir regülatörünü (ZnCys) tanımlamak için uygulanan yöntem ile ZnCys ekspresyonunun modülasyonu gerçekleşmiş ve yabancı suşa kıyasla suşun lipit üretim verimliliği iki katına çıkarılmıştır. (Deng vd. 2014) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, RNAi (RNA interferans) tekniği ile *Chlamydomonas* fosfoenolpiruvat karboksilaz izoform 1 (CrPEPC1) geninin mRNA ekspresyonunu azaltmışlardır. CrPEPC1 geninin mRNA ekspresyonunun azalması sonucu TAG seviyesi %20 artarken, PEPC aktivitesi %39 ila %50 oranları arasında azaltmıştır. CrPEPC1 ekspresyonundaki azalma, asil-CoA: diasilgliserol asiltransferaz gibi TAG biyosenteziyle ilişkili genlerin ekspresyonunu artırmıştır.

C. reinhardtii için genetik araç geliştirme, 30 yılı aşkın süredir gelişmekte olan bir araştırma alanı olmuştur ve ilgili inceleme makaleleri periyodik olarak yayınlanmaktadır. CRISPR/Cas9, yeşil algler dahil olmak üzere birçok organizmada gen düzenlemesini hızlandırmıştır. Yüksek özgüllüğü, etkinliği ve basitliği sayesinde, genom içindeki bir hedef lokusta kesin genetik modifikasyonlara izin vererek, homolog rekombinasyon yoluyla hızlı gen knock-out veya knock-in yöntemlerini mümkün kılmaktadır. CRISPR'ın keşfi 1987'de Ishino ve arkadaşlarının *E. coli*'de 29 nükleotit (nt) uzunluğundaki birbiriyle ilişkisiz, tekrarlanmayan kısa dizilerin (aralayıcılar-spacers) bulunduğunu gösterdikleri çalışmaya dayanmaktadır. Benzer tekrarların çoğunun prokaryotik canlılarda olduğu 2000'li yıllarda rapor edilmiş ve bu diziler CRISPR olarak adlandırılmıştır (Ishino vd. 1987).

CRISPR sisteminin bileşenleri, kılavuz RNA (gRNA) ve Cas9, hücrelerde plazmit DNA, RNA veya ribonükleoproteinler (RNP'ler) yoluyla iletilebilmektedir. RNP'nin verilmesi, Cas9 ve gRNA'nın aktiviteleri üzerinde kontrolü garanti etmektedir. Böylece hücreler için toksik olmayacak optimum Cas9 konsantrasyonunun verilmesine izin vermektedir. Aktif RNP'lerin yarı ömrü yaklaşık 24 ila 48 saattir, bu da hedef dışı düzenlemeyi büyük ölçüde azaltmaktadır (Wolt vd. 2016).

Yeşil alglerde Cas9 genlerinin kararlı ifadesinin, hücreler için toksik olduğu ve Cas9'un vektör güdümlü ifadesiyle ilişkili hedef dışı olduğu rapor edilmiştir (Jiang vd. 2014; Shin vd. 2016). Önceden birleştirilmiş RNP kompleksine sahip hücrelerin

transformasyonu, toksisite sorununu azaltmış ve hedef üzerindeki verimliliği önemli ölçüde artırmıştır (Kim vd. 2014).



3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Materyaller

Tez çalışmasında kullanılan materyallere ait marka ve katalog numaraları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Ayrıca metotlar içerisinde de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan materyaller ve katalog numaraları

Materyal	Marka	Katalog Numarası
Agar Bacteriological	Thermo Fisher Scientifics, USA	LP0011
Agarose	BIOMAX, USA	124543PR
AMV Reserve Transcriptase	New England Biolabs, USA	M0277S
Chelex 100	Sigma Aldrich, USA	C7901-25G
Color Prestained Protein Standard	New England Biolabs, USA	P7712
Dietil Pirokarbonat (DEPC)	Gold Biotechnology, USA	1609-47-8
DH5α Competent Cells	Invitrogen, USA	18265-017
DNA Clean and Concentrator Kit	Zymo Research, ABD	D4033
DNase I, RNase-free	Thermo Fisher Scientific, USA	EN0525
DNA Ladder (Marker)	New England Biolabs, USA	N32325
GeneCraft-R Classic CRISPR sgRNA Synthesis Kit	Applied Biological Materials (abm) Inc.	G952
Gel DNA Recovery Kit	Zymoclean	D4007
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA	SM0311
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, USA	1708891
MAX Efficiency Transformation Reagent for Algae	Thermo Fisher Scientific, USA	A24229
Monarch DNA Jel Ekstraksiyon Kiti	New England Biolabs, USA	T1020S
Monarch Plazmit Miniprep Kit	New England Biolabs, USA	T1010S
NEBuffer™ 3.1	New England Biolabs, USA	B7203
NucleoSpin RNA Plant Kit	Macherey-Nagel	50 Preps 740949.50
OneTaq RT-PCR Kit	New England Biolabs, USA	E5310S
Primer antibody 4x Anti His Tag	BioLegend, USA	652502
Restriksiyon enzimi-XhoI	New England Biolabs, USA	R0146L
Restriksiyon enzimi-NdeI	New England Biolabs, USA	R0111L
Sekonder antibody HRP Goat anti mouse IgG	BioLegend, USA	405306
TRIzol-Trizol®Reagent	Invitrogen/Life Technologies USA	15596026
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, USA	EL0011
Zyppy Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, USA	D4019
Quick Ligase	New England Biolabs, USA	M2200S
Q5 High Fidelity PCR Kit	New England Biolabs, USA	E0555S
Q5 High Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, USA	M0491S

3.2. Mikroalg Suşları ve Kültür Koşulları

Araştırmada kullanılan mikroalgler *C. reinhardtii* CC-125 mt(+) ve CC-124 mt (-) Duke Üniversitesi *Chlamydomonas* Genetics Center’den temin edilmiştir. Suşlar %1,5 Tris Asetat Fosfat (Siaut vd.) katı agar besiyerinde geliştirilmiştir. Bütün kültürler, oda sıcaklığında saklanmış ve canlılığı korumak amacıyla petri tabakları her ay yenilenmiştir.

CRISPR/Cas 9 yöntemi ile mutant elde etmek amacıyla *C. reinhardtii* CC-125 mt(+) suşu yabancı suş olarak kullanılmıştır. Kültürler 100 ml TAP sıvı besiyeri içeren 250 ml erlenmayerlerde 25°C ve 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ şartlarında 120 rpm'de geliştirilmiştir.

Gen ekspresyonu analizleri için ise farklı NH_4^+ (1 mM NH_4^+ , 0,5 NH_4^+), yüksek CO_2 (~%5) ve hava (~0,04% CO_2) içeren besiyeri koşulları ise High Salt (HS) besiyeri ile hazırlanmıştır. Asetat, *C. reinhardtii* için bilinen bir organik karbon kaynağıdır, alımı ATP gerektirir ve katabolizması NADPH üretmektedir (Johnson ve Alric 2012; Plancke vd. 2014). HS besiyeri karbon içermediği için sisteme karbon kaynağı olarak CO_2 beslenmiştir. Sisteme CO_2 , ayrı bir erlenmayerde hava ve CO_2 'in karıştırılarak beslenmesi ile sağlanmıştır. Yine kültürler aynı koşullarda (25°C ve 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 120 rpm) geliştirilmiştir. Hücreler 6-7 gün sonra logaritmik büyüme evresine gelmişlerdir.



Şekil 3.1. *C. reinhardtii* hücrelerinin HS besiyerinde kültüre edilmesi (4.gün)

3.2.1. Besiyerleri ve Solüsyonlar

TAP besiyeri

Tris Base (örn. Trizma) 2,42 g

Fosfat tampon II 1 ml

Solüsyon A 10 ml

Hunter's Trace Element 1 ml

Glasiyal Asetik Asit 1 ml

1 L hacmine kadar su ile tamamlanır.

Fosfat Tampon II (100 ml için)

K_2HPO_4 10,8 g

KH_2PO_4 5,6 g

Solüsyon A (500 ml için)

NH₄Cl 20 g

MgSO₄.7H₂O 5 g

CaCl₂.2H₂O 2,5 g

HS besiyeri (no acetate)

Beijerinck's solüsyon 5 ml

Fosfat solüsyonu 5ml

Hutner trace elements 1 ml

1 L hacmine kadar su ile tamamlanır (Sueoka 1960).

Beijerinck's solüsyon (1 L)

NH₄Cl 100 g

MgSO₄.7H₂O 4 g

CaCl₂.2H₂O 2 g

Fosfat solüsyonu (1 L)

K₂HPO₄ (anhydrous) 288 g

KH₂PO₄ 144 g

TAE Tamponu (50X, 1L)

Tris-base 242 g

Glasiyal asetik asit 57,1 ml

EDTA (0.5 M, pH 8.0) 100 ml

TAE Buffer 1X: 50X TAE stok çözeltisi seyreltilerek oda sıcaklığında muhafaza edilmiş ve agaroz jel elektroforezinde kullanılmıştır.

Agaroz Jel (%1'lik)

DNA, RNA ve PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde %1 lik jeller 1X TAE tamponu ile hazırlanmış ve istenilen sayıda örneğin yürütülebileceği tarak ve tanklar kullanılmıştır.

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Freeman vd.)**1. Yürütme Tamponu (1X)**

- Tris-base 3,03 g
- Glycine 14,3 g
- SDS (%10) 10 ml
- Distile su 990 ml

2. Örnek yükleme tamponu (5X, Laemli Buffer)

- Tris-HCl (1 M) 9,375 ml
- Glycerol 11,9 ml
- SDS 3,33 gr
- 2-merkaptoetanol (%25) 7,5 ml
- Bromofenol mavi stok çözeltisi (100 mg/20 ml) 660 µl

3. Jel boyama çözeltisi (Coomassie staining)

Coomassie Blue R-250 1 g
Metanol 500 ml
Glacial acetic acid 100 ml
Distile su 400 ml

4. Boya uzaklaştırma çözeltisi (Destaining)

Metanol 200 ml
Glacial acetic acid 100 ml
Distile su 700 ml

APS Solüsyonu (%10)

60 mg APS, 600 µl distile su içerisinde çözündürüldü.

SDS Solüsyonu (%10)

- 10 g SDS hassas terazide tartılarak 90 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür.

5. *Jellerin hazırlanması* (%10, 4 jel için)

	Resolving jel	Stacking jel
Distile su	7,95 ml	9,7 ml
%40 Akrilamit- Biss solüsyonu	1,25 ml	5 ml
1,5 M Tris-HCl	-	5 ml
0,5 M Tris-HCl	3,15 ml	-
%10 SDS	125µl	200 µl
TEMED	12,5µl	10 µl
APS	62,5 µl	100 µl

Stacking jel döküldükten sonra hava ile temas eden üst fazın oksijenle etkileşime girmemesi ve jel yüzeyinin pürüzsüz bir şekilde donması için üzerine 500 µl izopropanol ilave edildi ve oda sıcaklığında donmaya bırakıldı.

Western Blotting

Transfer Tamponu (1X), 1L

Tris 5,8 g

Glisin 2,93 g

SDS (%10) 370 µl

TBS (5X), 1L

Tris-base 12,115 g

NaCl 42,88 g

Kimyasallar tartılarak distile su içerisinde çözdürüldü ve pH: 7,5'e ayarlandı.

I-Block

0,5 g I-block hassas terazide ölçülerek 100 ml 1X TBS içerisinde çözdürüldü.

Birincil antikor (primary antibody, 1:1000)

10 µl antikor, 10 ml I-block içerisinde çözdürüldü.

İkincil antikor (secondary antibody, 1:2500)

2 µl antikor, 10 ml I-block içerisinde çözdürüldü.

3.3. Hücre Sayımı

C. reinhardtii hücre sayımları hemositometre kullanılarak kantitatif olarak yapılmıştır. Hücrelerin fiksasyonu için lügol çözeltisi kullanılmıştır. Hazır olan bu hücrelerden hemositometre lamı üzerine 10 µl alınmış ve ışık mikroskobu altında, birim hacimde ne kadar hücre olduğu hesaplanmıştır. Kullanılan hemositometrenin alt ve üst çukur ortasındaki karaler (25 kare) sayılmış ve iki değerin ortalaması alınmıştır (n). Denklem 1 (Brown vd.) kullanılarak milimetrede bulunan hücre sayısı belirlenmiştir (hücre/ml)

$$Total\ hücre = n \times Dilisyon\ faktörü \times 10^4 \quad (1)$$

CRISPR/Cas9 RNP uygulamaları sonucu elde edilen *C. reinhardtii* kolonileri OpenCFU katı besiyerinde koloni hesaplama yazılımı kullanılarak hesaplanmış ve doğrulanmıştır (Anonymous 3).

3.4. Kullanılan Primerler

PPD1, *PPD2*, *CBLP*, *Amt4* ve *CAH1* genleri için klonlama, qRT-PCR ve CRISPR/Cas9 çalışmaları için gerekli olan tüm primerler Primer 3 programı kullanılarak tasarlanmıştır (Köressaar vd. 2018). Çalışma ile ilgili tüm primerler Çizelge 3.2’te verilmiştir. Primer çiftlerindeki kalın altı çizili nükleotit bazları NdeI ve XhoI restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerini göstermektedir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primerler

Primers	Primer sekansı (5'-3')	
PPDK F1	ATGGCTCCCATTGCGCCGATTAC	
PPDK R1	TTACTTGGCCTTAGCGGCCGC	
pETPPDKF1	GATCAC <u>CATATG</u> GCTCCCATTGCGCCGATTAC	
pETPPDKR1	ACTGTC <u>CTCGAG</u> TACTTGGCCTTAGCGGCCGCC	
PPD2F5	GGTGCAAACCTAGCGGAGAT	
PPD2R5	GTTGATGAGGTACTCGCCGT	
pET28PPD2F1	GATCAC <u>CATATG</u> CGCGGCAGCCCAG	
pET28PPD2R1	ACTGTC <u>CTCGAG</u> CTACTTCTTGGCTGC	
qRT-PCR	Primer sekansı (5'-3')	Ürün(bp)
qCBLP-F2	CCGCTGTACAGGGTGGAG	135
qCBLP-R2	CAAGATCTGGGACCTGGAGA	
qPPDK1-F2	TTCTTCAACAAGGTGGGTCTGG	101

(Devamı Arkada)

Çizelge 3.2'in devamı

qPPDK1-R2	TTAGCGGCCGCCTTGATGGCAG	
qPPDK2-F2	TCCTGCACGAGGTGGGTCTGG	122
qPPDK2-R2	CTACTTCTTGGCTGCCGCTGCT	
qAMT4-F1	GCTGGCCAAGAAGGAGTACA	134
qAMT4-R1	AGGCGAAGATGGAGATGATG	
qCAH1-F1	AGTGGCTGCTGGGGTCAA	107
qCAH1-R1	TACTGCAGCTGCGGCTAAC	
Mutant Kontrolü	Primer sekansı (5'-3')	
CrE1PPD1F1	CGCCTCTTGTGTCTTGATGA	900
CrE1PPD1R1	CGTAGAACTCCTCGCAGACC	
Cr5UTRPPD2F1	CTTTGGTGCACAGCCTTACA	321
Cr5UTRPPD2R1	TCTCTGTGTGCGCTTGACAT	
pHyg3 Plazmiti		
Paro up	TGCGCTATGACACTTCCAGC	1700
HygR	AGGCCAAAATCAACGGAG	

3.5. RNA İzolasyonu ve Kantifikasyonu

C. reinhardtii hücreleri $2-4 \times 10^6$ hücre/mL yoğunluğuna ulaşınca (logaritmik faz) oda sıcaklığında santrifuj (2000Gx5dk) edilmiştir. Elde edilen pelletteki hücrelere RNA degradasyonunu önlemesi için TRIzol lizis solüsyonu eklenmiş ve -80°C 'de RNA izolasyonu için saklanmıştır.

RNA izolasyonu TRIzol Reagent ile üretici firmanın talimatları uygulanarak yapılmıştır. Elde edilen RNA örneklerinden genomik DNA kalıntılarını gidermek için örnekler RNaz içermeyen NucleoSpin RNA Plant Kit REF ile muamele edilmiştir. Daha sonra izole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca RNA kalitesi agaroz jel ile kontrol edilmiştir. Bu jelde iki keskin bandın varlığı RNA'nın kalitesinin yüksek olduğunun (degrade olmadığının) göstergesi olmuştur. RNA örnekleri -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.6. cDNA Eldesi ve Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Elde edilen RNA'ların komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmesi OneTaq RT-PCR kit ile gerçekleştirilmiştir. Ters transkripsiyon için $1 \mu\text{g/ml}$ total RNA kullanılmış

ve total reaksiyon hacmi 20 µL olmuştur. Elde edilen cDNA'lar 1:10 ya da 1:15 oranında seyreltilmiştir. Aynı şekilde kit protokolüne göre 2-5 µL cDNA kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

3.7. DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu katı kültürden alınan *C. reinhardtii* hücrelerinden maddeler halinde tarif edilen aşağıdaki yönteme göre gerçekleştirilmiştir.

1. Lysis Buffer (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA, %3 SDS) hazırlanmıştır.
2. Tüplere 300 µL Lysis buffer eklenmiş ve katı alg kültürleri dikkatlice çözündürülmüştür.
3. 100 mg/ml RNase A eklenmiş ve kuvvetli bir şekilde vortekslenmiştir.
4. 300 µL phenol /Lysis (1:1) eklenmiş vortekten sonra 5 dk buzda inkübasyona bırakılmıştır.
5. 12000-14000 rpm'de 10 dakika santrifuj işlemi yapılmıştır.
6. 300 µL kloroform /phenol (1:1) phenolü uzaklaştırmak için eklenmiş ve 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. 12000-14000 rpm'de 10 dakika santrifuj işlemi yapılmıştır.
7. Eppendorf tüplerindeki süpernetant (üst faz) yeni tüplere transfer edilmiştir.
8. Alınan örneğe / etanol (1:2) %100 etanol ilave edilmiştir.
9. Eppendorf tüpleri ters düz edildikten 12000-14000 rpm'de 15 dakika santrifuj işlemi yapılmıştır.
10. Elde edilen örnek hacmine bağlı olarak (500 µL) %70 etanol ile pelletler yıkama yapılmıştır. 12000-14000 rpm'de 5 dakika santrifuj işlemi yapılmıştır. Eppendorf tüplerin ağzı açık bırakılarak pellet kurutulmuştur.
11. 20 µL Dnase-RNase içermeyen su ile pelletler sulandırılmıştır.
12. DNA örnekleri analiz süresine kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Chelex 100

Steril kürdan yardımı ile alınan katı *C.reinhardtii* hücreleri PCR ya da eppendorf (1,5 ml) tüplerinde 10 µl ddH₂O içerisinde dikkatli bir şekilde çözündürülmüştür. Üzerine 10 µl %100 etanol eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. Daha sonra üzerine 80 µl Chelex 100 solüsyonu eklenerek 95°C'de 8-10 dakika inkübasyona bırakılmış ve tekrar kuvvetli bir şekilde vortekslenmiştir. Buz üzerinde 1 dakika boyunca soğutulduktan sonra 3500G'de 5 dakika çöktürülmüş ve üst fazdan elde edilen DNA örnekleri PCR analizlerinde doğrudan kullanılmıştır. Chelex 100 ile DNA izolasyon yöntemi transformant taramalarında kullanılmıştır.

3.8. DNA ve RNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

C. reinhardtii hücrelerinden izole edilen DNA ve RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık ölçümleri BioDrop μ Lite Spektrofotometre cihazı (Biochrom US, Holliston, MA) kullanılarak belirlenmiştir. Cihaz DNA ya da RNA örneğinin çözüldüğü çözeltiden 1 μ L alınarak kalibre edilmiştir. DNA ya da RNA örneğinden 1 μ L alınarak 230, 260 ve 280 nm'deki absorbans değerlerinin ölçümü yapılmıştır.

3.9. *C. reinhardtii* PPD2 Geninin Amplifikasyonu

Tek zincirli cDNA örnekleri, *C. reinhardtii* PPD2 geninin tüm kodlama bölgesini çoğaltacak şekilde gen spesifik primer çiftleriyle (PPD2F5, PPD2R5, Çizelge 3.2) amplifiye edilmiştir. PCR reaksiyonu 25 μ L'lik son hacim içerisinde; 12,5 μ L Q5 High Fidelity 2X Master Mix reaksiyon tamponu, 10 μ M her primer ve <1000 ng cDNA kullanılarak hazırlanmıştır. 98°C 30sn başlangıç denatürasyonu, 35 döngüde 98°C denatürasyon 10 sn, 57°C 20 sn bağlanma periyodu ve 72 °C uzama periyodu 1,20 dk, ve son uzama 72°C 2 dk olacak şekilde programlandırılmıştır. PPD2 ORF'si (kodlama bölgesi) pJet 1.2 vektörüne klonlanmıştır ve MacroGen firmasına gönderilerek sekanslaması yaptırılmıştır.

3.10. pET-28a(+) Plazmitinin Kesim İşlemi

pET-28a(+)-PPD2 protein ekspresyon plazmitini oluşturmak için özel olarak dizayn edilmiş ileri ve geri primerler kullanıldı: pET28PPD2F1, pET28aPPD2R1 (Çizelge 3.2). NdeI ve XhoI restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri çizelgede kalın altı çizili olarak işaretlenmiş nükleotit dizilerinden oluşmaktadır. PCR reaksiyonundan sonra elde edilen ürün, DNA Clean and Concentrator Kit protokolüne göre saflaştırılmıştır. Konsantre edilmiş PCR 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 edilmiştir. Kesilmiş PCR ürünü ve pET-28a(+) vektörü, jelden geri kazanım için %1'lik agaroz jele yüklendi ve 100 V'da 50 dk jelde yürütülmüştür. İnkübasyondan sonra 4 μ L örnek %0.1'lik agaroz jele yüklenerek kesim işleminin gerçekleştiği doğrulanmış ve kesilmiş plazmitin jelden izolasyonu yapılmıştır.

3.11. pET-28a(+) Plazmitinin Jelden İzolasyonu

Geri kazanım için üreticisinin tavsiye protokolüne uygun olarak Monarch DNA Gel Extraction Kit kullanılmıştır. Elde edilen pET28a(+) vektörü, PPD2 geniyle ligasyona bırakılmıştır. Ligasyon reaksiyonu 2 μ L pET28a(+) vektörü, 1 μ L PPD2 geni, 10 μ L 2x Ligasyon Tamponu ve 1 μ L Quick Ligase kullanılarak 20 dakikada oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.12. Bakteri Transformasyonu ve Plazmit İzolasyonu

Ligasyon ürünü plazmit sıcak şok metodu kullanılarak *E. coli* DH5 α suşuna transforme edilmiştir. Bu metoda göre önce -80°C'den alınan *E. coli* DH5 α bakterileri buz üzerinde çözdürülmüştür. 1 μ L ligasyon plazmiti 100 μ L *E. coli* DH5 α içine eklenmiştir. Pipetaj yapılmış ve 5 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonrasında hücreler 42°C su banyosunda 40-45 sn bekletilerek ve hemen sonra buza aktararak 5 dakika buzda inkübe edilmiştir. Üzerine 400 μ L LB besiyeri eklenmiştir. 1

h 37°C 220 rpm'de inkübe edilmiştir. pET-28a(+) plazmiti kanamisinine dirençli olduğundan 30µg/ml kanamisin içeren LB Agar besiyeri içeren petri kaplarına 50 µl kültür yayma işlemi ile ekilmiştir. Petriler 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra gelişme olan petri kaplarından bakterilerin tek koloni şeklinde seçimi gerçekleştirilmiş ve LB Broth (Kan+)'a ekim yapılmıştır. Daha sonra 37°C'de 220 rpm'de inkübe edilmiştir. Plazmitler, *E. coli* DH5α hücrelerinden Monorch Plasmid Miniprep Kiti protokolüne uygun olarak izole edilmiştir. İzole edilen plazmitler daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca OD₆₀₀ değeri 0,6 olduğu zaman stok olarak saklamak için 300 µL bakteri örneği, 300 µL %50'lik gliserol eklenmiş ve -80°C'ye kaldırılmıştır. Ekspresyon analizleri için plazmitler aynı metot ile *E. coli* BL21(DE3) suşuna aktarılmıştır.

3.13. Rekombinant *C. reinhardtii* PPP2 Proteininin Ekspresyonu

E. coli DH5α suşundan pürifiye edilen plazmitler, rekombinant PPD2 proteinini eksprese etmek için, *E. coli* BL21(DE3) suşu kompetent hücrelerine (Novagen) tekrar transforme edilmiştir. pET-28a(+)-PPD2 transforme edilmiş, *E. Coli* BL21(DE3) suşu kültürü 30 µg/ml kanamisin içeren 100 ml LB besiyerinde 37°C'de OD₆₀₀ ~0,6 olana kadar geliştirilmiştir. PPD2 proteininin ekspresyonu için, rekombinant protein 1 mM isopropyl-b-D-thiogalactoside (IPTG) varlığı veya yokluğunda 37°C'de 3 saat boyunca indüklenmiştir. Daha sonra hücreler 4°C'de 5000 G'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı nitrojen içeren havanda toz haline getirilmiştir. Daha sonra 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) sulandırılmıştır ve daha sonra proteinler 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek elde edilmiştir.

3.14. Kompetent Hücre Hazırlanması

Önceden -80°C'de saklanan *E. coli* BL21(DE3) bakterilerinden tek koloni için LB agar içeren petrilere çizim yapılmıştır. Petri kapları 37°C etüvde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tek koloni seçilerek 10 ml LB besiyerine ekim yapılmıştır. 37°C 225 rpm çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün OD₆₀₀ değeri 0,6 olunca 100 ml besiyerine 1 ml başlangıç kültürden ekim yapılmıştır. 37°C 225 rpm çalkalamalı inkübatörde 2-3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yine OD₆₀₀ değeri 0,6 olunca kültürler buz üzerinde 20 dk boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra 5000 rpm 4°C 4 dk koşullarında santrifüj edilerek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Pellet daha önceden hazırlanan ve buz üzerinde soğutulan 1 M ve 0,1 M CaCl₂·2H₂O ile yavaşça çözdürülmüştür. Daha sonra hücreler 15 dk buz üzerine inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından yine aynı santrifüj koşullarında hücreler çöktürülmüştür. Elde edilen pellet %15 gliserol içeren 5 ml 0,1 M CaCl₂·2H₂O ile çözdürülmüştür. Daha sonra hücreler 1,5 ml'lik tüplere 100 µl olacak şekilde bölüştürülerek -80°C'de kullanıma kadar muhafaza edilmiştir.

3.15. PPDK Enzim Aktivitesi

150-200 mg *E. coli* hücrelerinin numuneleri sıvı N ile buz gibi soğuk ekstraksiyon ortamında homojen hale getirilmiştir. PPDK ekstraksiyon ortamı, 50 mM

Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM DDT, 10 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 2 mM KH₂PO₄, 10 mM 2-merkaptetanol içermektedir. PPDK'lerin aktiviteleri, 340 nm absorbans ve 25°C'de NADH oksidasyonu izlenerek spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Reaksiyon ortamı 25 mM Hepes-KOH, pH 7.4, 6 mM MgSO₄, 10 mM DTT, 25 mM NH₄Cl, 0.25 mM NADH ve 2 U/ml LDH (sığır kalbinden L-Laktik Dehidrojenaz) içermektedir ve enzim substratlarının konsantrasyonu 1 mM PEP, 0,5 mM AMP, 1 mM PPI'dir (South ve Reeves 1975; Bringaud vd. 1998; Fukayama vd. 2001). Tüm enzimler, 96 plate mikrolakalar kullanılarak 200 uL'lik son reaksiyon hacminde test edilmiştir. Bu deneyde boş aktivite için NADH yokluğunda absorbans değeri kaydedilmiş ve toplam aktivite absorbansından çıkarılmıştır. PPDK aktivitesi, PEP'ten pirüvat oluşumunun, eklenen laktik dehidrojenaz aracılığıyla piruvattan laktat oluşumuna bağlanmasıyla belirlendi, bu da NADH'nin oksidasyonu ile sonuçlanmıştır (Olson vd. 2017). Bir birim (U) PPDK enzim aktivitesi, 1 µmol NAD'nin serbest bırakılması olarak tanımlanmıştır. Protein konsantrasyonu, BioDrop (Indolab, Utama) kullanılarak belirlenmiştir. Piruvat konsantrasyonu denklem 2'ye göre hesaplanmıştır. Denklem 3 PPDK enzimin total aktivite hesabını göstermektedir. PPDK spesifik aktivite ise denklem 4'e göre hesaplanmıştır.

$$y = \frac{\Delta A_{340} \times \text{Reaksiyon hacmi (mL)}}{\epsilon \times \text{Enzim solüsyonunun hacmi (mL)} \times l} \quad (2)$$

Burada;

y= Piruvat konsantrasyonu (mM)

l= küvetin optik yol uzunluğu (Meers vd.)

Δ_{340} = 340 nm absorbans değişimi

ϵ = NADH'in molar ekstinksiyon katsayısı (6.22 mmol⁻¹ x L x cm⁻¹)

$$\text{PPDK total enzim aktivitesi} \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{y \times Rv \times Df}{t} \quad (3)$$

Burada;

$$Rv = \frac{\text{Test tüpünün toplam hacmi}}{\text{Enzim solüsyonunun hacmi}}$$

Df= Dilüsyon faktörü veya seyreltme katsayısı

t= reaksiyon süresi (dk)

$$\text{PPDK spesifik aktivite} \left(\frac{U}{mg} \right) = \text{PPDK total enzim aktivitesi} / c \quad (4)$$

(Brown vd.)

c= Protein konsantrasyonu (mg/mL)

3.16. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

cDNA örnekleri kantitatif PCR yapılarak Light Cycler 96 system (Roche, Basel, Switzerland) cihazında analiz edilmiştir. Analiz Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) kitinin tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Deney, 96 oyuklu bir plaka üzerinde gerçekleştirilmiştir ve her reaksiyon 12, 5 uL SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific), 5 uL cDNA (≤ 500 ng), ileri ve geri primerlerin (Çizelge 3.2) her birinden 0,3 uM ve son hacim 25 uL olacak miktarda ddH₂O içermektedir.

En az iki teknik tekrar halinde hazırlanan örneklerin reaksiyon koşulları, 95°C’de 10 dakika başlangıç denatürasyonu, ardından 95°C 15 sn denatürasyon, 60°C 20 sn bağlanma ve 72°C 30 sn uzama olacak şekilde 40 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca ürünlerin tek bir çoğaltılmış ürünü temsil edip etmediğini belirlemek için erime eğrisi analizleri yapılmıştır. Erime programı ise 95°C 10 s, 65°C 60 s ve 97°C 1 sn’de bir döngü ve 4,4 °C/sn olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon stabilitesini hesaplamak için $2^{-\Delta C_t}$ istatistiksel yaklaşımı kullanılmıştır. Genlerin ekspresyon seviyeleri *C. reinhardtii* referans geni CBLP kullanılarak normalize edilmiştir.

3.17. CRISPR/Cas9 RNP Sistemi

3.17.1. PPD1 ve PPD2 genleri için sgRNA’ların tasarlanması

Mutant oluşumu için genler üzerinde hedeflenen bölgeler belirlendikten sonra sgRNA dizaynı *C. reinhardtii* PPD1 ve PPD2 genlerinin knock out edilmesi için CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) online programı kullanılarak seçilmiştir (Naito vd. 2015). Her iki gen için birer adet ve sentetik olarak Synthego şirketinden temin edilmiştir. Çizelge 3.3 tasarlanan gRNA’ların nükleotit dizlerini göstermektedir. Kırmızı renkte belirtilmiş nükleotitler PAM sekanslarını göstermektedir.

Çizelge 3.3. Tasarlanan gRNA’ların nükleotit dizileri

Gen	gRNA sekansı (5’-3’)	
PPD1	GGGTGCTTACCTTTGCGAAATGG	Ekson 2
PPD1	CAACAAATCGATGAAGGAGCTGG*	Ekson 1
PPD2	CGTGTCTTGCTCGTTTCTAGGG*	5’UTR

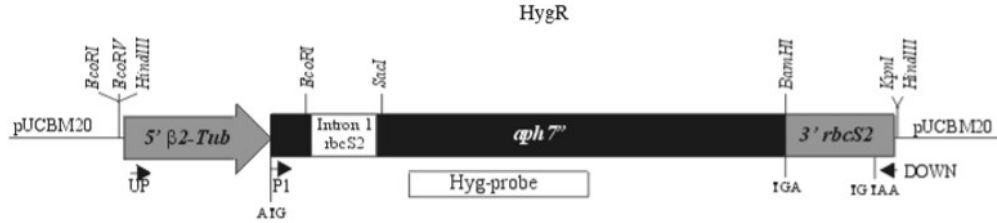
*Sentetik

Ayrıca deneme amaçlı GeneCraft-R Classic CRISPR sgRNA Synthesis Kit protokolü kullanılarak da bir sgRNA daha elde edilmiş ve sentetik sgRNA’lar gelene kadar ön denemelerde kullanılmıştır.

3.17.2. pHyg3 plazmiti ve kesim işlemi

Mutant hücrelerin seçiliminde Higromisin B’ye karşı antibiyotik direnç gösteren pHyg3 plazmiti kullanılmıştır. *C. reinhardtii*’de kullanım için *Streptomyces hygroscopicus*’tan tasarlanmış bir *aph7* geni tarafından kodlanan aminoglikozit fosfotransferaz aktivitesine dayanan seçilebilir bir belirteç geliştirilmiştir (Berthold vd. 2002). Bu markör pHyg3 ve pHyg4 olarak adlandırılan iki plazmit içermektedir. Her iki

plazmit de *C. reinhardtii* beta 2 tubulin promoteri ile başlatılan ve *C. reinhardtii* rbcS2 geni (3'UTR) tarafından sonlandırılan “aph7” genini ifade etmektedir. Ek olarak, pHyg3 aph7 geninin kodlama bölgesine eklenen *C. reinhardtii* rbcS2 geninin ilk intronunu içerirken, pHyg4 bu intronu içermemektedir. *aph7* küçük bir boyuta, yüksek kimyasal kararlılığa, düşük “false-pozitive” oranına ve tekrarlanabilirliğe sahiptir. *aph7* direnci, transgenik alglerde en az 7 ay boyunca korunmuştur. *aph7*'nin diğer antibiyotiklerle çapraz direnci yoktur, bu da alg dönüşümünde çift seçici bir belirteç olarak kullanılmasına izin vermektedir (Berthold vd. 2002; Zhang vd. 2021).



Şekil 3.2. pHyg3 plazmitinin şematik gösterimi

pHyg3 ve pHyg4 plazmitleri hem hücre duvarı eksik (cw2, cw15) hem de yabancı tip (CC-124 mt (-)) suşlarını dönüştürmek için kullanılmıştır. pHyg4, dönüşüm oranları açısından biraz daha az verimlidir. pHyg3 plazmiti uzun zamandır farklı laboratuvarlarda rutin uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. EK4’de pHyg3 ve pHyg4 plazmitlerinin fiziksel haritası ve sekansı gösterilmiştir. Bu çalışmada transformantların seçilimi için bu nedenlerle pHyg3 plazmiti seçilmiştir. Yabancı tip olarak ise hücre duvarının elektroporasyon yöntemi ile daha kolay yıkılacağı düşünüldüğü için CC-125 mt(+) seçilmiştir.

pHyg3 plazmitinin kesim işlemi

Laboratuvarlarda daha önceden bulunan pHyg3 plazmiti pUC BM20 (2695 bp) klonlama vektöründen HindIII restriksiyon enzimi ile kesilerek kullanılmıştır. Bu amaçla 2 µL (~1 µg) plazmit DNA’sından, 2 µL 10X Fast Digest, 1 µL HindIII enziminden eppendorf tüpe koyulmuş ve son hacim ddH₂O ile 20 µL ye tamamlanmıştır. Daha sonra örnekler 37°C’de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 4 µL örnek %1’lik agaroz jele yüklenerek kesim işleminin gerçekleştiği doğrulanmış ve kesilmiş plazmitin jelden izolasyonu yapılmıştır.

3.17.3. Transformasyon

sgRNA, pHyg3 plazmiti ve Cas9 (RNP) *C.reinhardtii* CC125 mt (+) hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile transforme edilmiştir. Transformasyon hücreler eksponensiyal faza (2-3 x 10⁶ cells/mL) ulaştığında gerçekleştirilmiştir. Hücre sayısı MAX Efficiency Transformation Reagent ile 2-4 x 10⁸ hücre/ml aralığına kadar konsantre edilmiştir. Elektroporasyondan önce sgRNA ve Cas9 37°C’de 15 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 250 µl (2-4 x 10⁸ hücre/ml) hücre ve pHyg3 kaseti de eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Elektroporatör koşulları 900V 25µF ∞(Ω) olacak şekilde cihaz hazır hale getirilmiş ve transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transformasyondan sonra hücreler, 16°C’de 10 dakika su banyosunda inkübasyona

bırakıldıktan sonra 40 mM sukroz içeren 10 ml TAP sıvı besiyeri ortamına aktarılmıştır. 12 saat boyunca (overnight) oda sıcaklığında ve düşük ışık altında inkübe edilmiştir. Gelişen hücreler 4000 rpm 4°C’de 5 dk santrifuj edilmiştir. Ardından 10-15 µg/mL Higromisin antibiyotiği içeren %1,5 (w/v) TAP agar plakalarına yayılarak gelişime bırakılacaktır (Shin vd. 2016; Nguyen vd. 2020).

3.17.4. Cas9 proteini tarafından hedef DNA’ların in vitro kesimi

500 ng sgRNA ve 600 ng Cas9 proteini PCR tüplerinde karıştırıldı ve 37 °C’de 5 inkübasyona bırakılmıştır. Karışıma 100 ng PCR ürünleri ve 3.1 10X NEB Buffer ilave edildi ve tüpler 37 °C’de 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra RNaseA enzimi eklendi ve karışım 37°C’de 20 dakika inkübe edilmiştir. 6x STOP solüsyonu (0,5 M EDTA, %80 gliserol ve %10 SDS) eklenmiştir ve karışım 37 °C’de 20 dakika yeniden inkübe edilmiştir. Nihai ürünler, %1 agaroz jel elektroforezi ile ayrılmıştır.

3.17.5. Mutant hücre kontrolü

Gelişen *C. reinhardtii* kolonileri 10 µg/mL Higromisin antibiyotiği içeren %1,5 (w/v) TAP agar plakalarına tek koloni seçimi yapılacak şekilde yeniden gelişime bırakılmıştır. Tek koloniden seçilen hücrelerden genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. Mutant hücre elde edilip edilmediğini belirlemek için her bir gen için hedef alınan bölgelerden spesifik primerler dizayn edilmiştir (Çizelge 3.2). Transformantlar (mutant adayı) dizayn edilen primerler kullanılarak elde edilen DNA’lar kullanılarak PCR reaksiyonları ile kontrol edilmiştir. Kontrol olarak yabanıl suş kullanılmıştır. Mutantlara Higromisin kasetinin insersiyon olması halinde yabanıl suşa kıyasla daha büyük PCR ürünleri elde edilmiş olmalıdır. İnsersiyon olduğu belirlendikten sonra PCR ürünleri dizileme ile sekans analizleri yapılmalıdır.

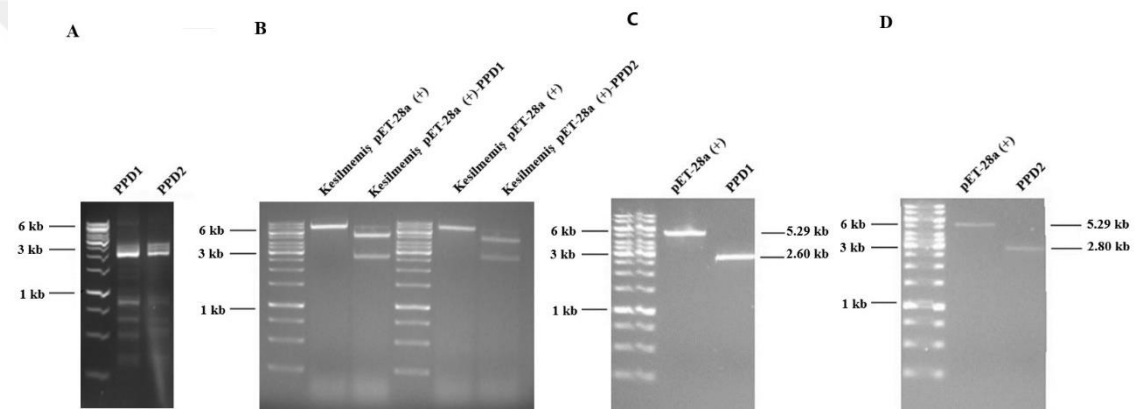
3.18. İstatiksel Analiz

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin istatistiksel analiz değerlendirmesi için GraphPad Prism 7.0 programı kullanılmıştır. Bulgular istatistiksel olarak değerlendirilirken Two-Way Anova testi yapılmıştır. Sonuçlar %95’lik güven aralığında ve anlamlılık $p < 0,05$ seviyesinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *C. reinhardtii* PPDK Genlerinin Amplifikasyonu ve Klonlanması

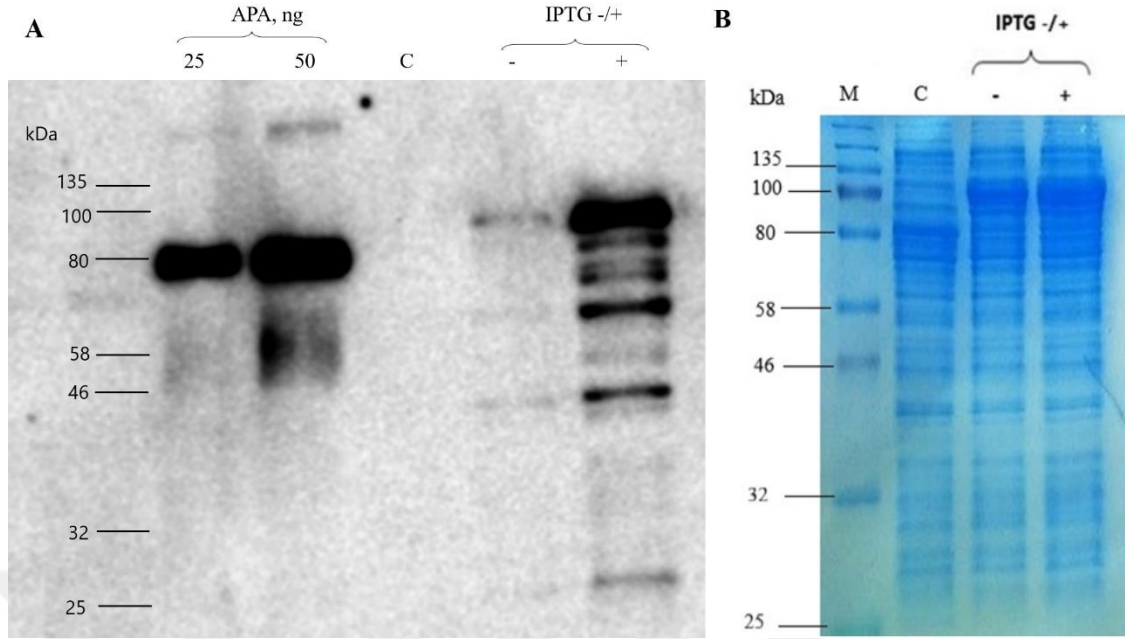
C. reinhardtii cDNA'sından aynı laboratuvarında daha önce yapılan bir tez çalışmasında PPD1 (Tangut 2018) ve bu tez çalışmasında ise PPD2 geninin tamamı (kodlama bölgesi), spesifik primerler (Çizelge 3.2) ile ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak klonlanmıştır. PPD1 (Cre10.g424750) ve PPD2 (Cre17.g734548) genlerinin genomik verileri için Phytozome 13 veri tabanı kullanılmıştır. İlgili primerler cDNA dizisine dayalı olarak dizayn edilmiştir. PPD1 ve PPD2 genlerinin PZR amplifikasyonu Şekil 4.1 A'da gösterilmiştir. pET-28a (+) plazmitlerinin Nde I ve Xho I restriksiyon enzimi ile ikili kesilmesinden sonra (Şekil 4.1 B) klonlanmış PPD1 ve PPD2 genlerinin büyüklüğünü doğrulayan boyutta (2.6 kb ve 2.8 kb) bant gözlenmiştir (Şekil 4.1 C-D). Burada oluşturulan vektörler, His6 $\times$ -etiketini ve ilgili proteini kodlayan gen dizisini kodlamaktadır.



Şekil 4.1. PPD1 ve PPD2 genlerinin PCR amplifikasyonu; **B:** NdeI ve XhoI enzimleri ile kesilen pET-28a-PPD1 ve PPD2 plazmitleri, Restriksiyon sonucu plazmit, PPD1 (**C**) ve PPD2 (**D**) genlerinin jel elektroforezi ile doğrulanması, GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific)

4.2. pET-28a (+)-PPD1 ve PPD2 Plazmitlerinin Heterolog Ekspresyonu

C. reinhardtii PPD2 geninin fonksiyonel bir enzimi kodladığını deneysel olarak kanıtlamak amacıyla genlerin ORF'leri *E. coli* ekspresyon vektörü pET-28a (+)'ya klonlanmıştır. PPD1'in ekspresyonu daha önce aynı laboratuvarında yapılan yüksek lisans tez çalışmasında gösterilmiştir (Tangut 2018). *E. coli* DH5a, genel klonlama amaçları için bakteriyel konakçı olarak kullanılmıştır. Plazmitlerin heterolog ekspresyonları için ekspresyon suşu olan *E. coli* BL21(DE3) kompetent hücrelerine transforme edilmiştir. Daha sonra hücreler LB besiyerinde IPTG indüklemesi ile uygun koşullarda geliştirilmiş ve hücrelerden proteinler ekstrakte edilmiştir. Prot-Param web sitesine göre, PPD1 ve PPD2 proteinlerinin moleküler ağırlıkları sırasıyla yaklaşık 96.689 ve 104.451 kDa ve teorik izoelektrik noktası (pI) 5.90 ve 5.48'dir. Bağlı moleküler ağırlığı, PPDK protein bandı olarak değerlendirilebilen, tahmin edilen protein bağlı moleküler ağırlığı ile tutarlı olduğu görülmüştür.



Şekil 4.2. *E. coli* suşu BL21(DE3)'den eksprese ve ekstrakte edilen PPD2 rekombinant proteininin görüntüleri; **(A)** immünoblot ve **(B)** SDS-PAGE analizleri **C:** Transforme edilmemiş *E. coli* protein ekstraktı (negatif kontrol), - IPTG: Transforme edilmiş *E. coli*'nin IPTG eklenmemiş protein ekstraktı; + IPTG: Transforme edilmiş *E. coli*'nin IPTG eklenmiş protein ekstaktı (APA; moleküler ağırlığı bilinen protein (80 kDa), M: boyanmış protein standart)

Eksprese edilen rekombinant PPDK proteinlerinin oldukça çözünür olduğu bulunmuş, SDS ve western blot analizleri ile kanıtlanmıştır. Şekil 4.2'de beklenen protein boyutları gösterilmiştir. Negatif kontrol kullanılarak *E. coli*'de heterolog ekspresyonun gerçekleştirildiği kesin olarak gösterilmiştir. Ayrıca, IPTG indüklemesi sonucu PPD2 proteininin ekspresyonundaki artış da görülmüştür.

4.3. Biyoinformatik Analiz Bulguları

Biyoinformatik analizleri gerçekleştirmek için PPDK geninin kristal yapısının çalışıldığı bazı algler, bitkiler ve bakteriler gibi çeşitli organizmalar seçilmiştir. Çizelge 4.1 çalışmada kullanılan organizmaları ve onlara ait Phytozome ve NCBI erişim numaralarını göstermektedir. PPDK'nın *Zea mays*, *C. reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Micromonas pusilla*, *Botryococcus braunii*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Zea mays* ve *Oryza sativa*'da iki ve *A. thaliana*, *Clostridium symbiosum*, *Flaveria trinervia*, *Trypanosoma brucei*, *Giardia intestinalis* ve *Mycobacterium tuberculosis* gibi diğer organizmalar birer izoforma sahiptir.

PPDK geni, *C. reinhardtii* genomunda Pyruvate, orthophosphate dikinase 1 (PPD1) ve Pyruvate, orthophosphate dikinase 2 (PPD2) olarak bulunmaktadır. Phytozome veri tabanına göre; *PPD1* geninin sitoplazmada bulunduğu tahmin edilirken, *PPD2* geninin ise kloroplastta bulunduğu bilinmektedir. *PPD1* *C. reinhardtii*'nin 10. kromozomunda ve 17 ekzon içermektedir. *PPD2* ise *C.reinhardtii*'nin 17. kromozomunda ve 29 ekzon bölgesinden oluşmaktadır (Anonymous 2).

Çizelge 4.1. Çeşitli PPDK genleri ve Pytozome /NCBI erişim numaraları

Bazı PPDK genleri	Pytozome/NCBI Erişim Numarası	Kısaltma
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> PPD1	Cre10.g424750/XP_001702572	CrPPD1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> PPD2	Cre17.g734548/XP_001692938	CrPPD2
<i>Volvox carteri</i> PPDK1	Vocar.0005s0343.1.p/XP_002955807	VcPPDK1
<i>Volvox carteri</i> PPDK2	Vocar.0054s0040.1.p/XP_002950615.1	VcPPDK2
<i>Micromonas pusilla</i> PPDK1	MicpuC2.estExt_Genewise1.C_70227/XP_003056354.1	MpPPDK1
<i>Micromonas pusilla</i> PPDK2	MicpuC2.estExt_Genewise1Plus.C_20250/XP_003060034	MpPPDK2
<i>Botryococcus braunii</i> PPDK1	Bobra.9_2s0040.1.p	BpPPDK1
<i>Botryococcus braunii</i> PPDK2	Bobra.9_2s0041.1.p	BpPPDK2
<i>Ostreococcus lucimarinus</i> PPDK1	eugene.0200010043/XP_001416304.1	OIppDKch2
<i>Ostreococcus lucimarinus</i> PPDK2	fgenes1_pg.C_Ch_9000267/XP_001419632.1	OIppDKch9
<i>Chromochloris zofingiensis</i> PPDK	Cz01g40120.t1/ KAF6253488.1	CzPPDK
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT4G15530.5/NP_001078396.1	AtPPDK
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solyc01g080460.2.1/XP_010322950.1	SlPPDK
<i>Flaveria trinervia</i>	5JVJ_A	FmPPDK1
<i>Zea mays</i> PPDK1	Zm00008a025775_P01/NP_001105738.2	ZmPPDK1
<i>Zea mays</i> PPDK2	Zm00008a031343_P01/NP_001345328.1	ZmPPDK2
<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica PPD1	LOC_Os05g33570.2/AYC76593.1	OsPPD1
<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica PPD2	LOC_Os03g31750.3 /NP_001405261	OsPPD2
<i>Clostridium symbiosum</i>	2R82_A	CsPPDK
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	WP_003906520.1	MtPPDK
<i>Rhodothermus marinus</i>	WP_161540717.1	RmPPDK
<i>Bacteroides bacterium</i>	RMF53884.1	BbPPDK
<i>Firmicutes bacterium</i>	MBO2477251.1	FbPPDK
<i>Rhodothermales bacterium</i>	MBO6576098.1	RbPPDK
<i>Rhizobium</i> sp. AAP43	WP_082352593.1	RspPPDK
<i>Longibacter salinarum</i>	WP_098074870.1	LsPPDK
<i>Giardia intestinalis</i>	P51776.1	GiPPDK
<i>Trypanosoma brucei</i>	AAC39128.2	TbPPDK
<i>Kipferlia bialata</i>	GIQ79939.1	KbPPDK
<i>Carpodemonas membranifera</i>	KAG9395295.1	CmPPDK
<i>Aduncisulcus paluster</i>	GKT35766.1	ApPPDK

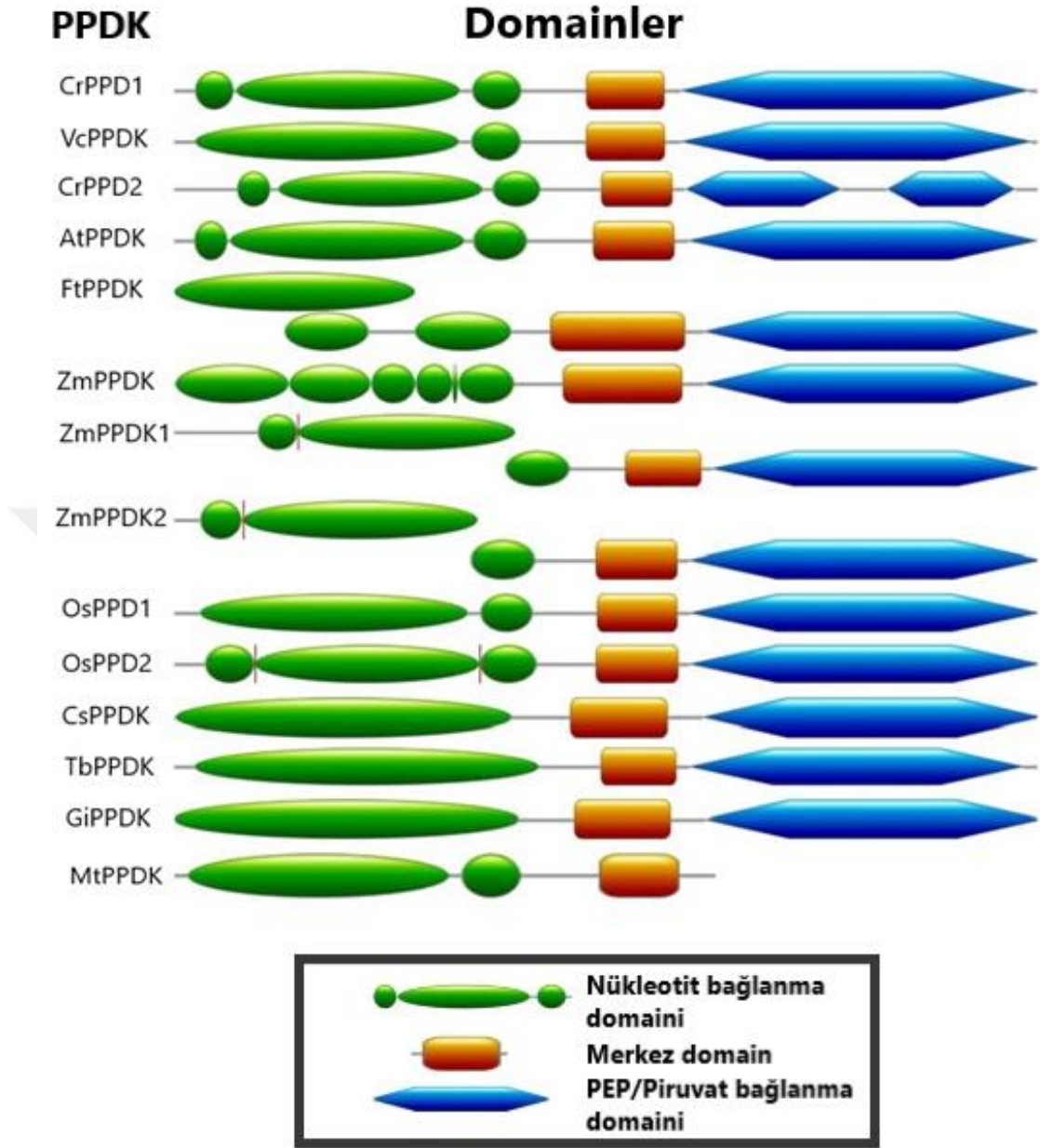
4.3.1. PPKK genlerinin çoklu amino asit hizalanması

PPKK proteinlerinin çoklu amino asit dizisi hizalamaları gerçekleştirilmiştir. Bu hizalama sonuçları *C. reinhardtii* PPD1 ve PPD2 proteinlerinin *V. carteri*, *A. thaliana* ve *Z. mays* gibi diğerk türlerin PPKK proteinleri ile homoloji gösterdiğini bildirmiştir. EK1’de hizalama sonuçları gösterilmiştir. Belirlenen organizmalar arasında yapılan amino asit hizalama analizlerine göre PPKK genlerinin oldukça benzer olduğu grlmştir. şekil 4.4.’de *C. reinhardtii* PPD1 ve PPD2 genlerinin çoklu aminoasit dizisi hizalamaları gösterilmiştir. *C. reinhardtii*’deki PPD1 ve PPD2 genleri birbirleri ile yüksek derecede homologtur ancak aynı değillerdir. PPKK genlerinde tamamen korunmuş amino asit dizisinin (GGMTSHAAVVA) *C. reinhardtii* PPD1 ve PPD2 amino asit dizilerinde de korunduğu grlmştir. Bu iki *C. reinhardtii* PPKK transkriptinin protein dizileri, hem açık okuma çerçevesinde (Debiagi vd. 2020) hem de UTR’lerde %55,4 özdeşliği paylaşmaktadır. Ayrıca benzerlik puanı %67,8’dir (Anonymous 4).

şekil 4.4'te *C. reinhardtii*'de bulunan PPDK proteinlerinin Pfam veri tabanındaki analizi sonucunda her bir proteinde nükleotit bağlanma domaini (N-terminal) ve merkez domaininin bulunduğu gösterilmiştir. *C. reinhardtii* PPD1 ve PPD2 proteinlerinin her üç domaini de içerdği görülmüştür. İlginç bir şekilde *Mycobacterium tuberculosis* Pep/piruvat bağlama domainini içermediği tespit edilmiştir.

C. reinhardtii PPD1 proteininin nükleotit bağlanma domaini 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. ekzon ve merkez domain 9 ve 10. ekzonda bulunmaktadır. Pep/piruvat domaini ise 11. ekzondan başlayıp son ekzona kadar devam etmektedir. *C. reinhardtii* PPD2 proteininin nükleotit bağlanma domaini 3. ekzondan başlayıp 13. ekzonun başını kapsamaktadır. Merkezi domain 15. ekzonun sonundan başlamakta 16 ve 17. ekzonlarda ve Pep/pürivat domaini ise 18. ekzondan başlamakta ve 29. ekzon ile son bulmaktadır.



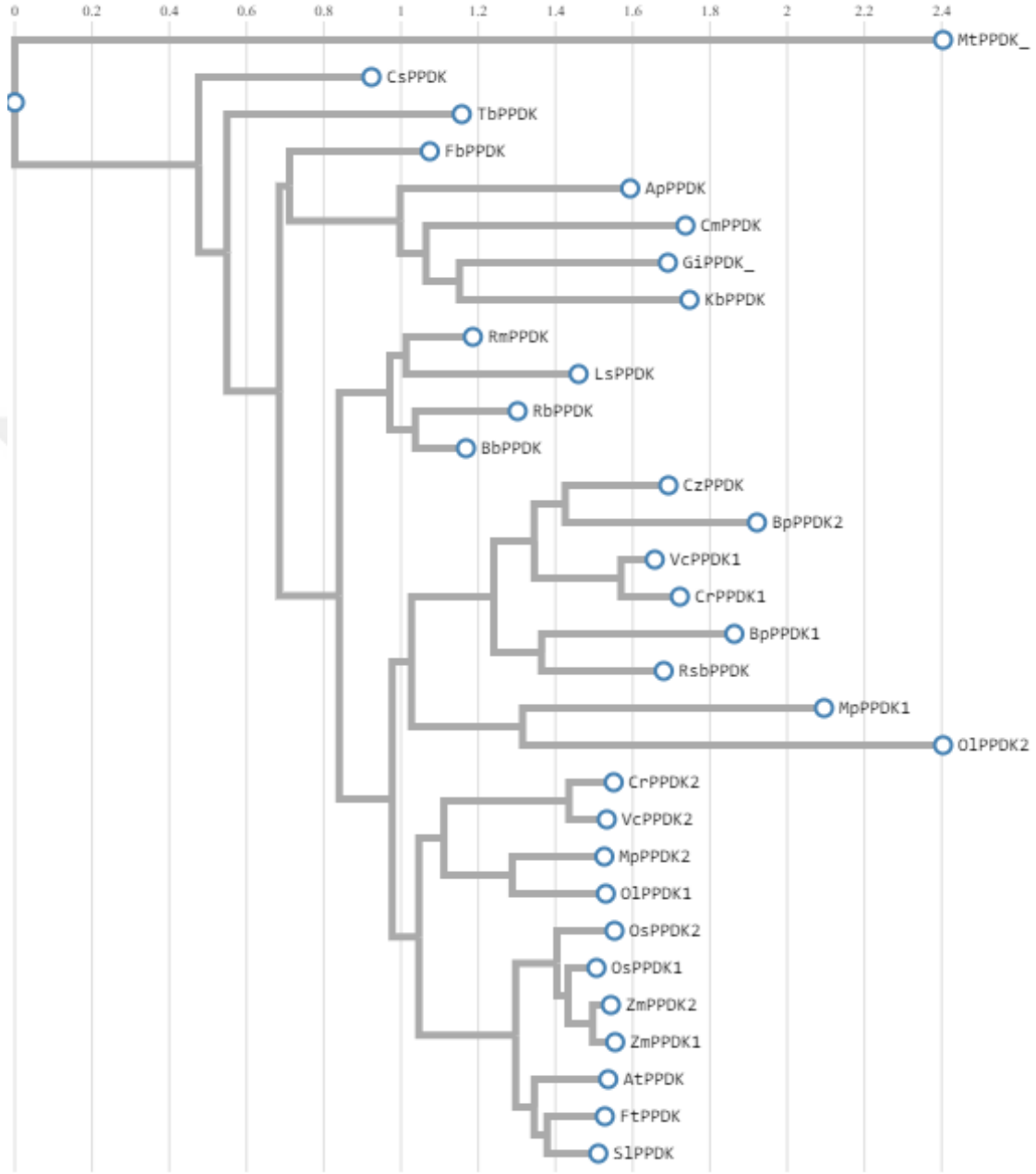


Şekil 4.4. Farklı PPDK proteinlerinin domain şeması (Yeşil elips; nükleotit bağlama domaini, turuncu elips; merkez domain, mavi elips; Pep/piruvat bağlama domaini)

4.3.3. Filogenetik analizler

C. reinhardtii ve karşılaştırmalı analizler için kullanılan bazı diğer organizmalardaki (Çizelge 4.1) PPDK proteinlerinin arasındaki evrimsel ilişkileri gösteren bir filogenetik ağaç ETE3 programı kullanılarak oluşturulmuştur (Anonymous 5). Şekil 4.5 PPDK protein dizilerinin filogenetik ağacını göstermektedir. *C. reinhardtii* PPD2 bitki PPDK'ları ile daha fazla benzerlik gösterirken, *C. reinhardtii* PPD1 yeşil alg *C. reinhardtii*'nin en yakın akrabası olan *V. carteri* gibi *Chlorophyta* şubesinde bulunan yeşil alglerle daha fazla benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bitkilerde bulunan PPDK proteinlerinin hem PPD1 hem PPD2 formları *C. reinhardtii* PPD2 formu ile daha fazla

yakınlık göstermektedir. Ayrıca bitki ve alg PPDK proteinleri bakterilere göre bazı protozoalara daha yakın akrabalık göstermektedir.



Şekil 4.5. *C. reinhardtii* ve bazı diğer organizmalardaki PPDK protein dizilerinin filogenetik ağacı

4.4. Rekombinant PPDK Proteinlerinin Enzim Aktivitesi

Rekombinant olarak elde edilen PPDK proteinleri *E. coli* hücrelerinden pürifiye edilmiş ve enzim aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. Deneyde üç biyolojik tekrar gerçekleştirilmiş ve absorbans değerlerinin ortalaması alınarak piruvat konsantrasyonu, total aktivite ve spesifik aktivite hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Transforme olmamış *E.*

coli hücrelerinin rekombinant suşlara göre çok çok düşük bir aktivite verdiği tespit edilmiştir. Buna göre, rekombinant *E. coli* suşlarında görülen enzim aktivitelerinin PPDK enzimlerinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Ayrıca IPTG ile indüklenen hücrelerde beklenildiği gibi protein konsantrasyonları artmış ve böylece PPDK enzimlerinin de aktivitesi artmıştır. *C. reinhardtii* rekombinant PPD1 ve PPD2 proteinleri *E. coli*'de tamamen aktif olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar, pürifiye edilmiş proteininin yüksek spesifik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Enzim aktivite testleri *C. reinhardtii* PPD1 ve PPD2 genlerinin *C. reinhardtii* hücrelerinde fonksiyonel ve enzimatik olarak aktif olduğunu göstermiştir.

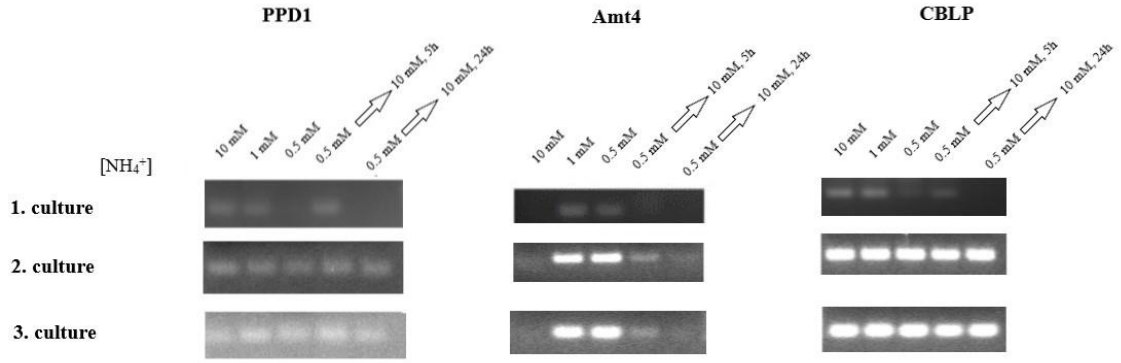
Çizelge 4.2. Pürifiye edilmiş rekombinant *E. coli* PPDK enzimlerinin aktivite testleri

<i>E.coli</i>	Protein (mg/ml)	Piruvat konsantrasyonu (mM)	Total Aktivite (U/ml) $\times 10^{-3}$	Spesifik Aktivite (U/mg) $\times 10^{-3}$
Transforme olmamış hücre	0.60	0.10	2.09	3.46
pET-28a (+)-PPD1	0.92	1.00	20.02	21.71
pET-28a (+)-PPD1+IPTG	1.18	1.75	34.97	29.53
pET-28a (+)-PPD2	0.92	1.50	29.94	32.48
pET-28a (+)-PPD2+IPTG	1.18	2.39	47.75	40.33

(biyolojik tekrar; n=3)

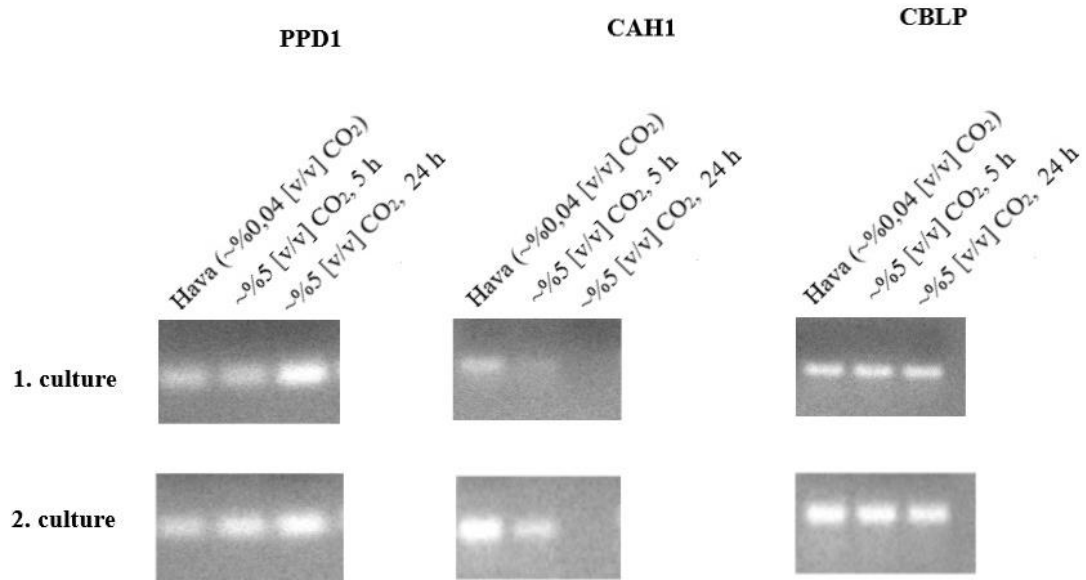
4.5. RT-PCR Analiz Sonuçları

PPD1 ve PPD2 genlerinin NH_4^+ ve CO_2 konsantrasyonuna duyarlı olup olmadığını araştırmak için *C.reinhardtii* CC-125 mt(+) hücreleri Materyal Metot 3.2'de belirtildiği gibi geliştirilmiştir. Farklı NH_4^+ konsantrasyonları HS besiyeri içerisindeki NH_4Cl konsantrasyonları dikkate alınarak belirlenmiştir. RT-PCR analizleri için en az iki farklı biyolojik tekrar yapılmıştır. Model organizma *C. reinhardtii* genomundaki iki adet PPDK genleri üzerine çalışmada belirlenen farklı koşullar altında RT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Literatürde *C. reinhardtii* PPD1 ve PPD2 genleri üzerine farklı NH_4^+ konsantrasyonlarındaki ekspresyon seviyeleri üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Analiz sonuçlarına göre *C. reinhardtii* PPD1 geninde değişen NH_4^+ konsantrasyonlarına karşı herhangi bir değişiklik agaroz jel üzerinde gözlenmemiştir. Her iki biyolojik tekrar PPD1 geninin farklı NH_4^+ konsantrasyonlarında değişmediğini göstermiştir. Ancak PPD2 genine ait primerler ile yapılan deneyler sonucunda biyolojik tekrarlar arasında herhangi bir tutarlılık bulunmaması nedeniyle net bir sonuca ulaşılamamıştır. PPD2'ye ait RT-PCR analiz sonuçları EK-2a' da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Farklı NH_4^+ konsantrasyonlarında yapılan RT-PCR sonuçları

C. reinhardtii ve diğer fotosentetik organizmaların C_i konsantrasyonlarındaki değişiklikleri algıladıkları mekanizma henüz ayrıntılı olarak bilinmemektedir. Ancak bir çok çalışma yapılmıştır (Miura vd. 2002; Yamano vd. 2008). *C. reinhardtii* transkriptom araştırmalarının yapıldığı bir çalışmada *C. reinhardtii* hücrelerinin karanlıkta ve ışııkta gelişimi belirli aralıklarla izlenmiştir. *PPD2* geninde karanlık boyunca hücreler büyüme evresinde iken ekspresyon seviyesinde bir artış gözlenmiştir. Ayrıca aydınlık ortamda ilk bir saat içerisinde ekspresyonu azalmış ve hücreler büyüme evresine geçtiğinde ise ekspresyon seviyesi tekrar artmıştır. Hücrelerin gelişim gösterdiği tüm gün boyunca *PPD1* geninin ekspresyonu *PPD2* genine göre her ne kadar az olsa da *PPD1* geninin ekspresyonu da hücre büyümesi esnasında artmıştır (Strenkert vd. 2019). Bu sonuçlar *C. reinhardtii* *PPD1* ve *PPD2* genlerinin hücre büyümesinde önemli bir gen olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.7. Farklı CO_2 konsantrasyonlarında yapılan RT-PCR sonuçları

Havadan yüksek CO_2 koşullarına geçirilen *C. reinhardtii* hücrelerinde *PPD1* geninin ekspresyonu artmıştır. Bu sonuçlara göre *C. reinhardtii* *PPD1* genindeki değişikliklerin bu genin fotosentez ile ilgili genler olduğunu kanıtlamaktadır. Ancak

PPD2 geni için besiyerine 5h CO₂ beslenmesi ile elde edilen kültür koşullarında ekspresyonda herhangi bir değişiklik olmaması ve yeterince biyolojik tekrarın elde edilememesi nedeniyle *PPD2* geni hakkında kesin sonuçlar paylaşılammıştır. Yapılan deneylere ait sonuçlar EK2b'de gösterilmiştir. Kantitatif sonuçlar için qRT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

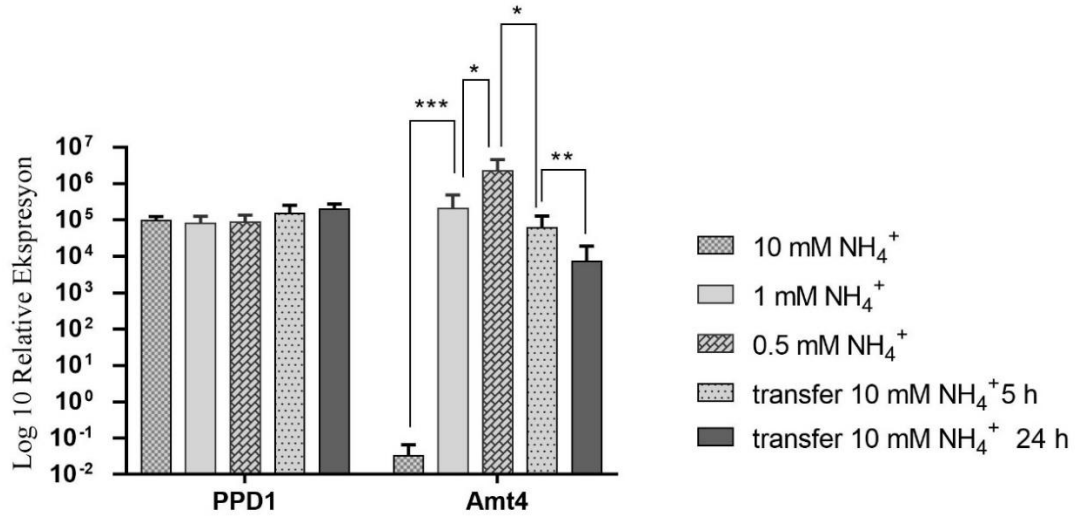
4.6. qRT-PCR Analiz Sonuçları

qRT-PCR deneyleri için kullanılan cDNA'lar materyal methotta tarif edildiği gibi elde edilmiştir. Farklı koşullar altında *C. reinhardtii* *PPD1* ve *PPD2* genlerinin ekspresyon seviyelerini araştırmak için qRT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. *C. reinhardtii* *PPD1* ve *PPD2* genlerinin N ve CO₂ yanıtlarının araştırılması için kültürler farklı NH₄⁺ ve CO₂ konsantrasyonları altında geliştirilmiştir.

qRT-PCR sonuçlarını normalize etmek için *Chlamydomonas* β -subunit-like polypeptide (CBLP) geni kullanılmıştır. *CBLP* geni memeliler, meyve sineği ve mayadan elde edilen guanin nükleotit bağlayıcı proteinlerin β alt birimi ile sekans benzerliği gösteren bir proteini kodlamaktadır. Amino asit sekansları benzerliğine ek olarak, bu proteinlerin her biri belirli amino asitlerin bir konsensüs sekansı oluşturduğu segmentli bir tekrar yapısı da içermektedir. Sülfür açlığı, azot açlığı ya da ışık, CO₂ gibi fotosentetik çalışmalarda housekeeping gen (değişmeden eksprese olan) olarak kullanılmaktadır (González-Ballester vd. 2010; Tokutsu vd. 2021).

4.6.1. *C. reinhardtii* *PPDK* genlerinin NH₄⁺ değişikliklerindeki ekspresyonları

Farklı amonyum koşulları altında genlerin ekspresyonlarının araştırılması için *Amt4* geni pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Amonyum, birçok mikroorganizmada olduğu gibi *C. reinhardtii* için de tercih edilen bir nitrojen kaynağıdır (Ermilova vd. 2010). Nitrat veya arginin gibi alternatif bir N kaynağının varlığında bile, amonyumun tükenmesi, N'nin alınması için gerekli olan genlerin transkripsiyonunda önemli değişikliklere yol açmaktadır. Daha önceki yapılan çalışmalarda *AMT* proteinlerinin NH₃ ve CH₃NH₂ için gaz kanalları olduğu gösterilmiş ve bu yapısal olarak doğrulanmıştır (Kim vd. 2005). *C. reinhardtii* en az dört *AMT* genine sahiptir. Diğer *AMT* genleri gibi, *AMT4* de N sınırlayıcı koşullar altında yüksek oranda eksprese olmaktadır (Kim vd. 2005; Kim vd. 2006).



Şekil 4.8. *C. reinhardtii* PPD1 geninin NH₄⁺ değişikliklerindeki ekspresyonları; Amt4: Amonyum ve metilammonyum transport geni 4 (***p<0.0005, **p<0.005, *p<0.05, n=3)

C. reinhardtii PPD1 geninin farklı NH₄⁺ konsantrasyonu altındaki ekspresyonları incelendiğinde NH₄⁺ konsantrasyondaki değişikliklere karşın PPD1 geninin ekspresyonunda herhangi önemli bir değişiklik tespit edilmemiş ve N değişikliğinde herhangi değişiklik göstermemiştir. *C. reinhardtii* PPD1 geninin *C. reinhardtii*'de muhtemelen sitozolde bulunması bitkilerde olduğu gibi aminoasit sentezlenmesinde görev aldığı tahmin edilmektedir. *C. reinhardtii* PPD2 geninin ekspresyonu ise NH₄⁺ konsantrasyonu 1 mM ve 0,5 mM koşullarına azaltıldığında Amt4 geninin tersine ekspresyonu 15 kat azalmaktadır. Yeniden başlangıç konsantrasyonu olan 10 mM NH₄⁺ konsantrasyonunda ise bu genin ekspresyonunun başlangıç koşullarındaki ekspresyon seviyelerine geldiği gözlenmiştir. *C. reinhardtii* PPD2 proteinin kloroplastta bulunabilmesi nedeni ile bu değişikliğin fotosentez ile ilişkili olan diğer genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikten kaynaklandığı varsayılmaktadır.

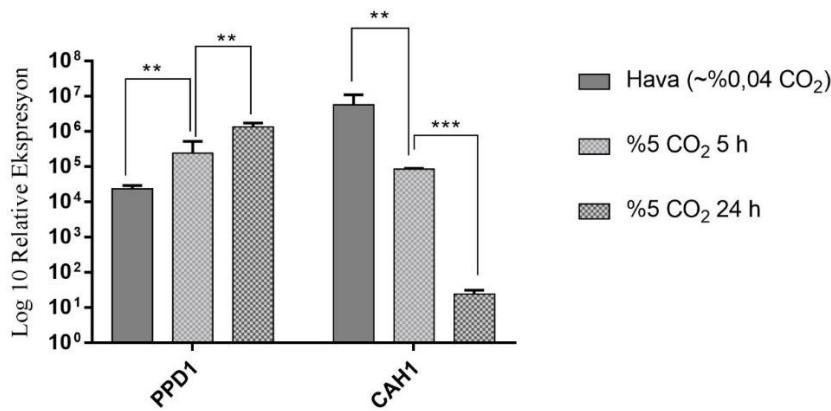
Nitrojenik stres, oksidatif fosforilasyon tarafından yönlendirilen ATP üretimini ciddi şekilde engellemektedir. Bu nedenle mikroorganizmaların hücrel çoğalma için çok önemli olan bu kritik bileşeni desteklemek için benzersiz stratejiler geliştirmesi gerekmektedir. Substrat düzeyinde fosforilasyon, yüksek miktarlarda nitrojenik stres varlığında gözlemlenen ve enerjiyi telafi etmek için çağrılan bir yoldur (Appanna vd. 2016). PEP, bu süreci besleyen kritik bir biyomoleküldür. Yapılan bir çalışmada çok yönlü beslenme özelliklerine sahip bir mikroorganizma olan *Pseudomonas fluorescens*'in metabolizmasını pirofosfat (PPi) ve fosfat (Pi) tüketimine bağlı bir ağa kaydırıldığı bildirilmiştir (Appanna vd. 2016). Fosfoenolpiruvat karboksilaz (PEPC), PPK ve piruvat sentaz gibi enzimlerin artan ekspresyonu yoluyla ATP üretimi, PPi ve Pi'nin çok önemli bir rolüne işaret etmektedir. Nitrojenik stres altında sadece bu enzimlerin ekspresyonu artmaz, aynı zamanda adenilat kinaz (AK), nükleosit difosfat kinaz ve asetat kinaz (ACK) gibi ATP üreten enzimlerin aktiviteleri de belirgin şekilde artmaktadır. Bu enzimler, nitrojenik stresin neden olduğu etkisiz oksidatif fosforilasyona yanıt olarak ATP oluşumunu açıklayan fosfotransfer sistemini

oluşturmaktadır. Bu strese maruz kalan *P. fluorescens*, önemli bir fosfajen görevi gören bir metabolit olan asetat biriktirmektedir. ACK yardımıyla fosforile edilir ve üretilen asetil fosfat daha sonra asetil CoA transferaz tarafından asetil CoA'ya dönüştürülür. Asetil-CoA'nın asetil grubu daha sonra oksaloasetat sentezini beslemek için lipit üretiminde veya glioksilat baypası ile kullanılabilir. *P. Fluorescens*'de nitrojen açlığında *PPDK* geninin ekspresyonu artarken *C. reinhardtii* *PPD1*'de bir değişiklik görülmemiş ve *C. reinhardtii* *PPD2*'in ise ekspresyonu ise azalmıştır. Bu farklılığın bazı organizmaların ATP'yi stabilize etmek ve biyolojik aktivitelerini (Lemire vd. 2009) beslemek için kreatin kinaz ve polifosfat kinaz gibi farklı enzimlere başvurmaları ve elektron taşıma zincirinin etkisizliğinin NADH oksidazların (Chenier vd. 2008) varlığıyla telafi etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.6.2. *C. reinhardtii* *PPDK* genlerinin artan CO₂ koşullarındaki ekspresyonları

Atmosfer, endüstrilerin boşalttığı gazlar ve karbonat tuzları, mikroalg kültürleri ve diğer fotosentetik mikroorganizmalar için oldukça değerli kaynaklardır, bu organizmalar CO₂ yakalar ve güneş ışığının varlığında inorganik karbonu biyokütle ve ilgili kimyasal bileşikler üretmek için kullanılmaktadırlar (Wang vd. 2008). Mikroalglerin büyümesi ve metabolik olarak aktif olması için ulaşılması gereken belirli maksimum ve minimum CO₂ seviyeleri vardır (L. Zhu vd. 2016b). Bu optimal CO₂ seviyeleri, lipit üretimini ve bunların hücre içinde birikmesini etkiler CO₂ artışı, mikroalg hücrelerinde lipitlerin üretimine ve birikmesine yardımcı olmasına rağmen aşırı CO₂ seviyelerinin lipit üretimi ve hücre büyümesinde yıkıcı etkilere yol açtığı bir maksimum seviye de vardır.

Yüksek CO₂ koşulları altında genlerin ekspresyonlarının araştırılması için *CAH1* geni pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Yeşil alg *C. reinhardtii* gibi suda yaşayan fotosentetik organizmalar, CCM'yi indükleyerek düşük CO₂ koşullarına yanıt vermektedir. Bu organizma, bir periplazmik karbonik anhidrazı kodlayan *CAH1* dahil olmak üzere bir dizi genin indüksiyonu yoluyla CO₂ sınırlayıcı koşulların stresine uyum sağlamaktadır. *CAH1* geninin, düşük CO₂ koşullarında (~%0,04 [v/v] CO₂ içeren hava) ışık varlığında ekspresyonu artarken, yüksek CO₂ koşullarında (%5 [v/v] CO₂) veya karanlıkta ekspresyonu azalmaktadır (Kucho vd. 1999).



Şekil 4.9. *C. reinhardtii* *PPD1* geninin artan CO₂ koşullarındaki ekspresyonları (***p<0.0005, **p<0.005, n=3)

Hava ortamından yüksek CO₂ konsantrasyonlarına geçirilen kültürlerde hem *C. reinhardtii* PPD1 hem de *C. reinhardtii* PPD2 genlerinin ekspresyonu artış göstermiştir. Yüksek CO₂ beslenerek 5 h sonra PPDK genlerinin ekspresyon seviyeleri artmıştır. 24 h sonra ise bu genlerin ekspresyonları başlangıç seviyelerine göre PPD1 geninin ekspresyonu yaklaşık 60 kat artış gösterirken PPD2 ise 10 kat artış göstermiştir. PPD1 gen ekspresyonlarındaki artış *C. reinhardtii*'de bulunan CCM ve fotosentez sisteminde görev alabileceğini göstermiştir. Ancak PPD2 geni için yapılan analizlerde aynı primerlerin kullanılması ve primerlerin non-spesifik olduğu düşünüldüğü için net sonuçlara ulaşılamamıştır. PPD2 genine ait farklı koşullarda gerçekleştirilen qRT-PCR analiz sonuçları EK3'te gösterilmiştir.

4.7. CRISPR/Cas9-RNP Deneme Sonuçları

Genom düzenlemedeki sitotoksik etkileri, hedef dışı bölünmeyi azalttığı ve hedef üzerinde aktiviteyi ve düzenleme verimliliklerini arttırdığı için CRISPR/Cas9-RNP sistemi *C. reinhardtii* genom düzenlemeleri için tercih edilmektedir. Cas9 proteini geçici olarak aktif olduğundan ve daha sonra hücrelerde endojen proteazlar tarafından bozduğundan RNP kullanılması, Cas9 geninin ilgili konakçıya kodon optimizasyonu ihtiyacını, promotör kullanımının anlaşılmasını ve Cas9 proteininin azaltılmış hedef dışı ve sitotoksik etkilerini ortadan kaldırmaktadır.

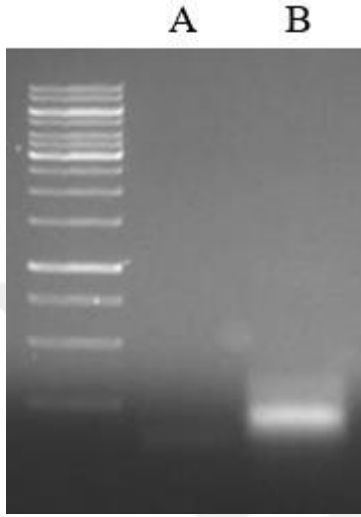
Elde edile RNP kompleksinin transformasyonu elektroporasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon yöntemi, yüksek voltaj darbeleriyle hücre yüzeyinde yaklaşık 20-40 nm'lik bir ani tersinir kanal oluşturularak alıcı alg hücrelerinin hücre zarı geçirgenliği artırılır ve yabancı DNA'nın hücre DNA'sına entegrasyonu gerçekleştirilir. Elektroporasyon yoluyla aktarılan ekzojen DNA, *C. reinhardtii* genomuna kararlı bir şekilde entegre edilebilmektedir. Bu yöntem karmaşık bir hazırlık gerektirmez ve uzun plazmit parçalarını *C. reinhardtii* hücrelerinin çekirdeğine aktarabilmektedir. Bu çalışmada da *C. reinhardtii* PPD1 ve PPD2 genlerini knock out etmek için CRISPR/Cas9 RNP sistemi tasarlanmıştır.

C. reinhardtii'de CRISPR/Cas9 metodu ile gen düzenlemesi literatürde çok az çalışmada kullanılmıştır. Bu araştırmaların bazılarında sgRNA/Cas9 oranı için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu sonuçlar göz önüne alınarak bu tez çalışmasının CRISPR/Cas9 RNP metodu oluşturulmaya çalışılmış ve farklı metotlar denenmiştir. Bunlar arasında farklı konsantrasyonlarda sgRNA, Cas9 ve pHyg3 kaset konsantrasyonları veya farklı elektroporasyon yöntemleri bulunmaktadır. Yapılan denemeler Çizelge 4.4'te detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

4.7.1. sgRNA bölgelerinin belirlenmesi ve elde edilmesi

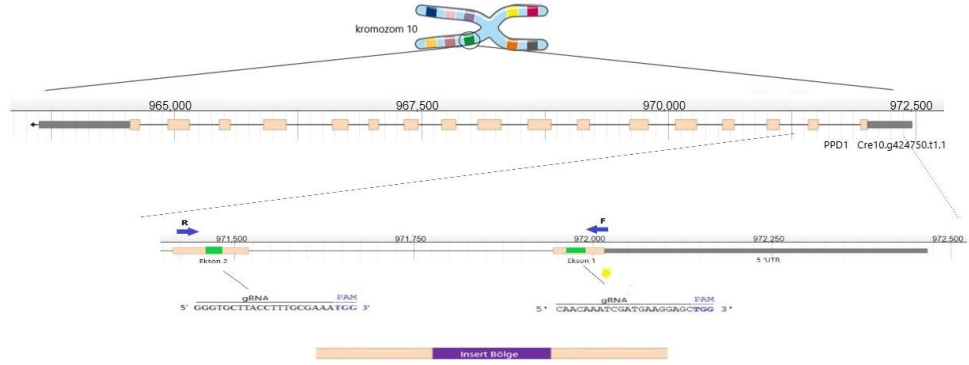
C. reinhardtii PPD1 ve PPD2 genleri ile yapılan biyoinformatik araştırmalar sonunda proteinlerin domainleri, korunmuş bölgeleri ve enzimlerin katalitik bölgeleri belirlenmiştir. Bu genlere ait mutant kütüphanesinde bulunan mutantların analizleri gerçekleştirilmiştir. CLiP mutant kütüphanesine göre PPD1 geninde hem CDS (coding sequence, kodlama bölgesi) hem de intron bölgelerinde insert bölgeler oluşturularak mutant hücrelerin elde edildiği görülmektedir. Ancak PPD2 için mutant hücrelerin sadece intron bölgelerinde insersiyonlar oluşturularak elde edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca sgRNA üretici şirketlerinin genellikle 1. eksonda sgRNA tasarlama tavsiyeleri

de göz önüne alınarak sgRNA tasarımları gerçekleştirilmiştir. Böylece *PPD1* geni için 1. ekson hedef alınırken *PPD2* için 5'UTR bölgesinde sgRNA tasarımı gerçekleştirilmiştir. Belirlenen bu sgRNA'lar sentetik olarak Sentego şirketinden temin edilmiştir. Ayrıca *PPD1* geni için ekson 2 bölgesinde bir sgRNA bölgesi tasarlanmış ve GeneCraft-R Classic CRISPR sgRNA Synthesis Kit kullanılarak in vitro koşullarda elde edilmiştir. Şekil 4.11'de her iki gen için sgRNA bölgeleri detaylı olarak tasvir edilmiştir.

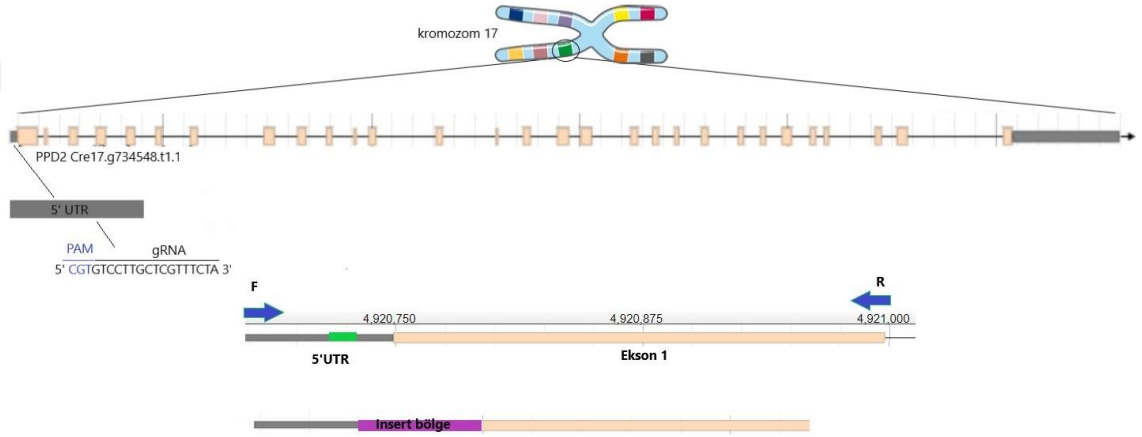


Şekil 4.10. *In Vitro* koşullarda elde edilen sgRNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü; **A:** step 1 PCR ürünü, **B:** sgRNA *PPD1* ekson 2

PPD1



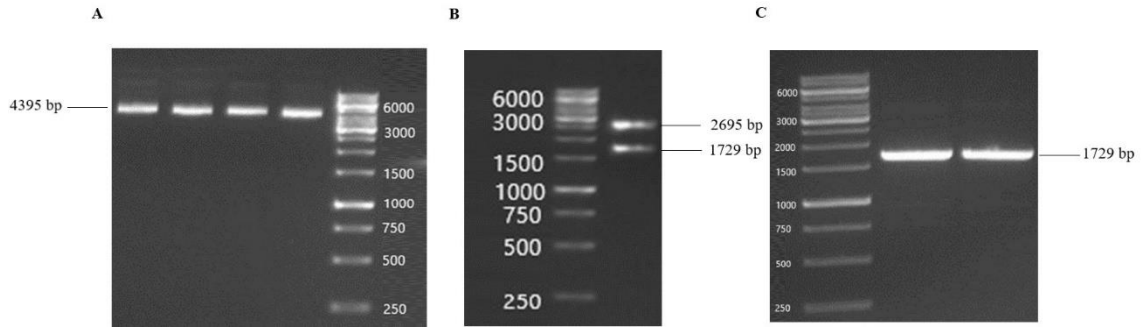
PPD2



Şekil 4.11. PPDK genleri için tasarlanan sgRNA bölgelerinin şematik gösterimi

4.7.2. pHyg3 kasetinin elde edilmesi

Laboratuvarıda daha önce bulunan klonlama vektörü pUC BM20 önce *E. coli* DH5α suşuna transforme edilmiş ve daha sonra plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pHyg3 plazmiti ise HindIII restriksiyon enzimi ile kesilerek pHyg3 kaseti elde edilmiştir. Agaroz jel görüntüleri izolasyonu yapılan kasetin beklenildiği büyüklükte ürün oluşturduğunu göstermiştir Böylece elde edilen kaset CRIPR/Cas9 denemelerinde kullanılmak için hazır hala gelmiştir.



Şekil 4.12. pHyg3 kasetinin elde edilmesi; **A:** *E.coli* DH5α suşundan izole edilen pHyg3 plazmitinin jel görüntüsü **B:** Plazmitin HindIII restriksiyon enzimi ile kesilmesi **C:** Kesim işlemi elde edilen pHy3 kasetinin jel elektroforezi ile doğrulanması

4.7.3. CRISPR/Cas9 RNP denemeleri

C. reinhardtii PPD1 ve PPD2 genlerini CRISPR/Cas9 RNP yöntemi ile knock out etmek için yapılan literatür denemeleri sonucunda bir yöntem belirlenmiş ve bu yöntem bu çalışmada kendi içerisinde değişiklikler yapılarak mutant suşlar elde edilmeye çalışılmıştır. Uygulanan denemeler Çizelge 4.4'te detaylı bir şekilde özetlenmiştir. Tasarlanan sgRNA'lar iki farklı şekilde temin edilmiştir. Birincisi GeneCraft-R Classic CRISPR sgRNA Synthesis Kit kullanılarak elde edilen sgRNA'lar ve ticari olarak temin edilen sgRNA'lar. Ticari olarak temin edilen sentetik sgRNA'lar daha stabil olduğu için tercih edilmiştir. CRISPR/Cas9 denemeleri kapsamında bu çalışmada kendi içerisinde farklı denemelerinde olduğu 5 farklı deneme gerçekleştirilmiştir. Literatürde farklı konsantrasyonlarda RNP denemeleri için bir optimizasyon çalışması mevcuttur (Shin vd. 2016). Bu çalışmaya göre optimum sgRNA/Cas9 konsantrasyonları 20µg/15µg olarak belirlenmiştir. Yapılan CRISPR/Cas9 RNP denemelerinde özellikle bu çalışma baz alınmıştır. Deneme 1, 2 ve 3'te GeneCraft-R Classic CRISPR sgRNA Synthesis Kit kullanılarak elde edilen sgRNA kullanılmıştır. 1. denemede sgRNA/Cas9 konsantrasyonları 15µg/10µg olarak kullanılmış ancak deneme sonucunda herhangi bir koloni elde edilememiştir. Bunun birkaç nedeni olabileceği düşünülüp öncelikle elektroporasyonda kullanılan voltaj artırılarak 2. deneme gerçekleştirilmiştir. Ancak 2. deneme sonucunda da herhangi bir koloni elde edilememiştir. 3. denemede ise kullanılan pHyg3 kasetinin konsantrasyonu artırılarak deneme tekrarlanmıştır. Sadece pHyg3 plazmitinin (500 ng) transfer edildiği tabaklarda koloniler gözlenmiştir. Bu deneme sonucunda hedef alınan genler için herhangi bir transformant elde edilemese de elektroporasyonun sorunsuz gerçekleştiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. CRISPR/Cas9 RNP Denemeleri

Deneme	Gen/Hedef	sgRNA (ng/μL)	Cas9 (ng)	pHyg3 kaseti (ng)	Hücre sayısı (hücre/ml)	Elektroporasyon (V, μF, Ω)	Koloni (adet)
1	PPD1/Ekzon 2	15	10	500	2,4x10 ⁸	600 , 25, ∞	-
2	PPD1/Ekzon 2	15	10	500	5x10 ⁸	900 , 25, ∞	-
	pHyg3	15	10	500			-
3	PPD1/Ekzon 2	15	10	500	5x10 ⁸	900 , 25, ∞	-
	PPD1/Ekzon 2	15	10	1000			3
	pHyg3	-	-	500			~350
4	PPD1/Ekzon 1	20*	15	500	2,4x10 ⁸	900 , 25, ∞	~500
	PPD2/5'UTR	20*	15	1000			~500
	pHyg3	-	-	500			~350
5		10*	7,5	100	3,5x10 ⁸	900 , 25, ∞	3
	PPD1/Ekzon 1	40*	30	500			1
	PPD2/5'UTR	10*	7,5	100			50
		40*	30	500			21
	pHyg3	-	-	100			~500
		-	-	500			14

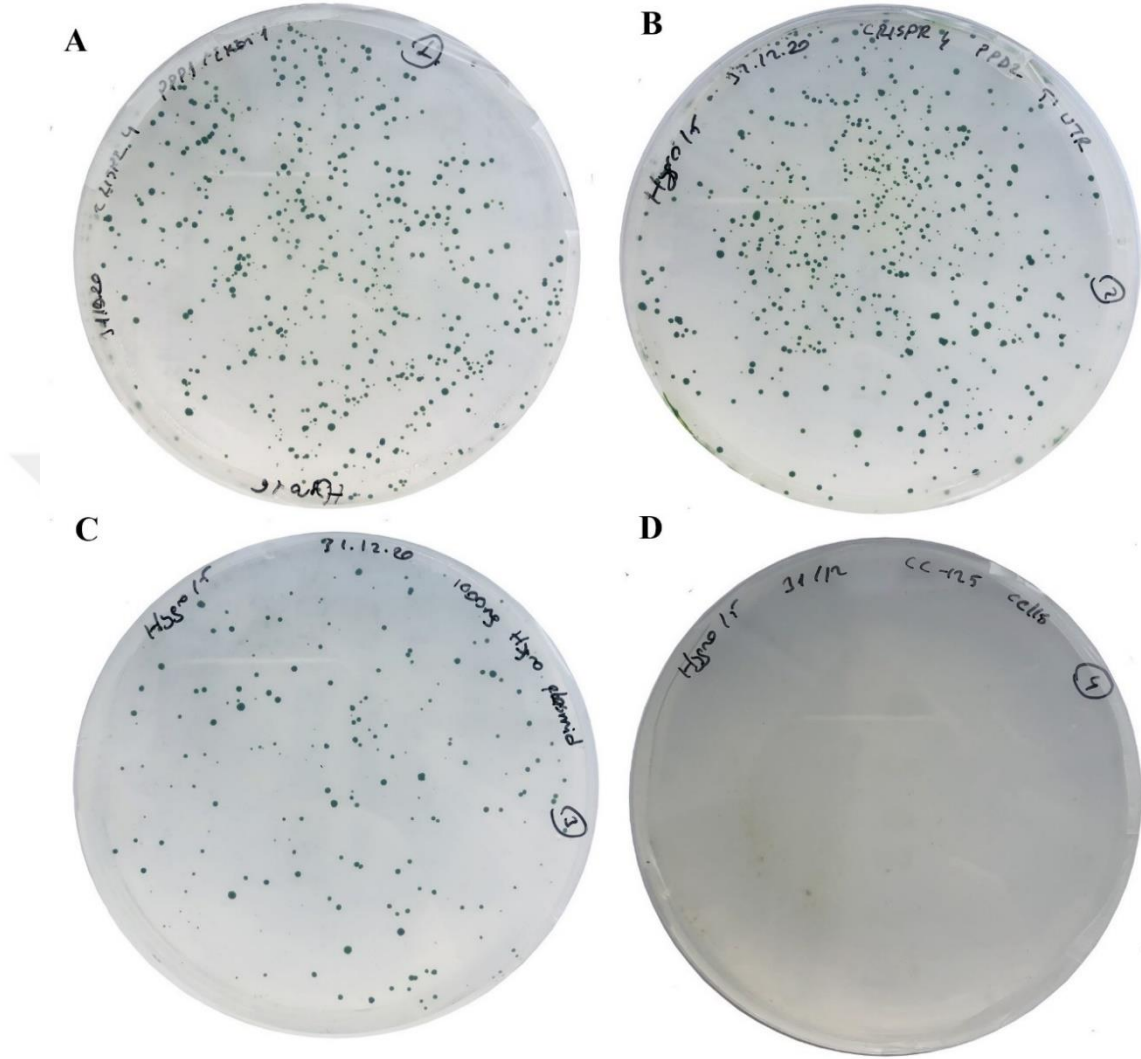
*Sentetik sgRNA

Deneme 4 ve 5'te ise sentetik sgRNA'lar kullanılmıştır. Elektroporasyon koşulları ve hücre sayısı (2-8x10⁸) (hücre/ml) değiştirilmeden denemeler farklı sgRNA/Cas9 konsantrasyonları ve pHyg3 konsantrasyon değişikliklerine dayanarak gerçekleştirilmiştir. Deneme sonuçlarında beklenildiği gibi her iki gen bölgesi için de transformantlar elde edilmiştir. Elde edilen transformantlar 15 μg/mL Higmisin içeren TAP agar besiyerlerine transfer edilmişlerdir. Tüm denemeler sonunda elde edilen transformantlar EK5'te gösterilmiştir.

CRISPR/Cas9 RNP Deneme 4 elde edilen transformantlar

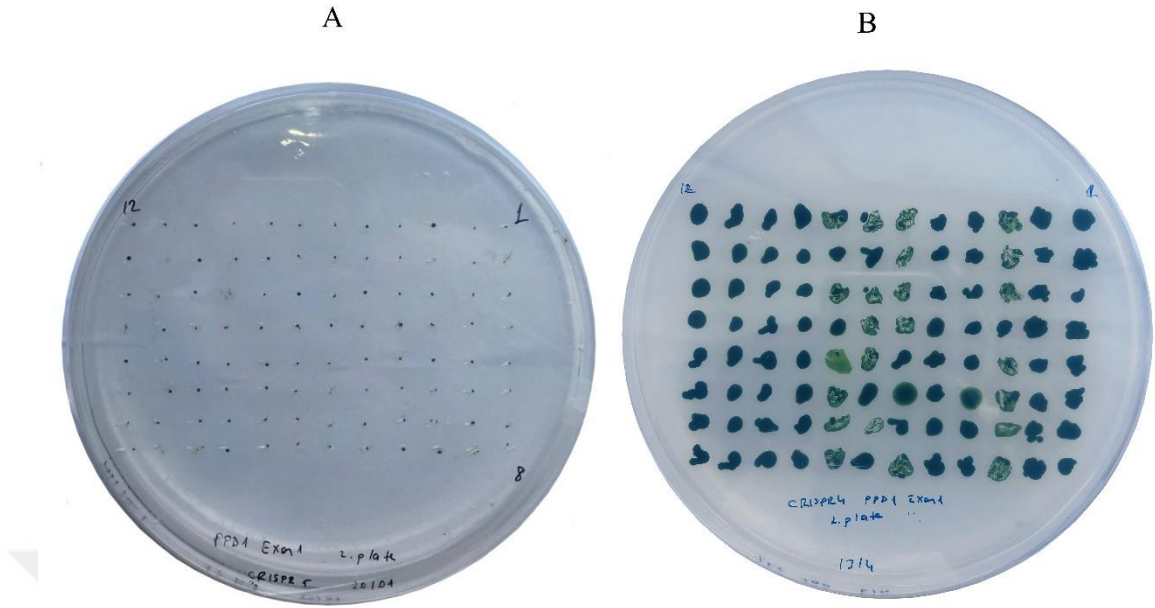
C.reinhardtii PPD1 ve PPD2 genlerini knock out etmek için denenen farklı yöntemler sonucunda en umut verici olan deneme 4 olmuştur. Buna göre *C. reinhardtii* CC-125 mt(+) hücreleri logaritmik faz evresindeyken alınıp 2,4 x10⁸ hücre/ml konsantre edilmiştir. 20 ng/μL sentetik sgRNA, 15 ng Cas9 proteini ve 1000 ng pHyg3 plazmit kaseti kullanılmıştır. Ayrıca elektroporasyon koşulları 900 V, 25 μF, ∞ olarak belirlenmiştir. Elektroporasyondan sonra yaklaşık 750 koloni elde edilmiştir. Yaklaşık

10 gün sonra koloniler gözlenmiştir. Bunların 400'er kolonisi 15 µg/mL Higromisin antibiyotiği içeren TAP agar besiyerlerine transfer edilmiştir.



Şekil 4.13. CRISPR/Cas9 Deneme 4 sonucu elde edilen transformantlar; **A:** *PPD1* geni Ekzon 1 hedef bölgesi **B:** *PPD2* geni 5'UTR hedef bölgesi **C:** 1000 ng pHyg3 kaseti (transformasyon kontrolü) **D:** RNP ve pHyg3 kaseti içermeyen *C. reinhardtii* hücreleri (kontrol)

Şekil 4.14 higromisin antibiyotiği içeren TAP agar besiyerlerine transfer edilen taransformantların bir örneğini temsil etmektedir. Şekil 4.14 B görüldüğü gibi elde edilen koloniler antibiyotiğe dayanıklıdır ve gelişim göstermiştir. pHy3 plazmiti sorunsuz bir şekilde *C. reinhardtii* hücrelerine transfer edilmiştir. Elde edilen transformantlar farklı fenotip özellikler göstermiştir. Bazıları daha koyu ya da daha açık yeşil renklerde gözlenmiştir. Hem bu fenotip değişiklikler hem de çalışılan genlerin dolaylı olarak fotosentez ile ilişkili olması nedeniyle bir mutant hücre elde edildiği düşünülmüştür.



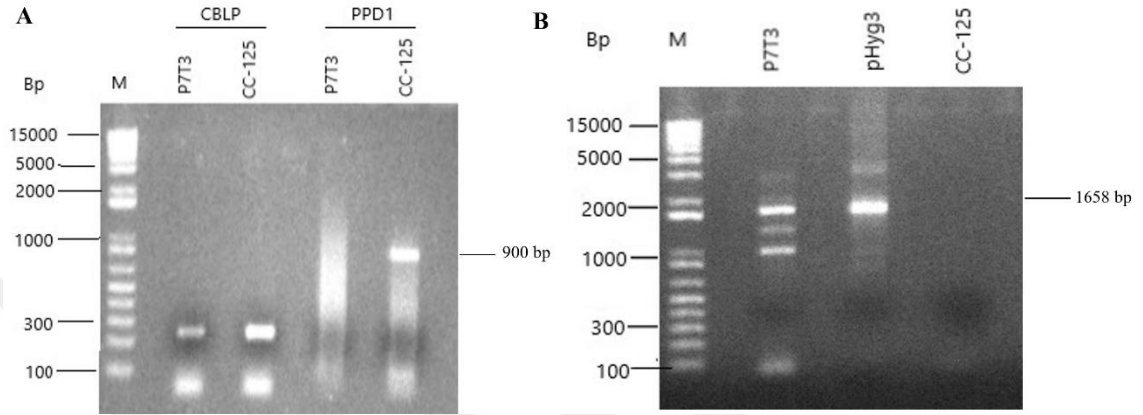
Şekil 4.14. Antibiyotikli petri kaplarına transfer edilen transformantlar; **A:** Elektroporasyon sonucu elde edilen transformantlar **B:** 3-4 gün sonra gelişim gösteren transformantlar

Elde edilen transformant sayısı oldukça yüksek olduğu için yüksek verimli bir tarama daha önce yapılan bir metoda göre yapılmıştır (Nouemssi vd. 2020). Koloni PCR için Chelex 100 kullanılarak yüksek verimli bir tarama gerçekleştirilmiştir. DNA'ların kontrolü için CBLP geni kullanılmıştır. Elde edilen bütün transformantlarla öncelikle CBLP geni için PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem yapılan birkaç optimizasyon sonunda % 92 bir başarı ile CBLP geninden beklenen büyüklükte (250 bp) bir ürün oluşturduğu gösterilmiştir. EK6'da jel sonuçları gösterilmiştir. Transformantların genomik DNA içerdiği tespit edildikten sonra sgRNA bölgelerinden tasarlanan primeler ile mutant taramalarını gerçekleştirmek için PCR reaksiyonları kurulmuştur.

Chelex 100 yöntemi ile yapılan koloni PCR ile transformantlarda herhangi bir mutasyon olup olmadığını belirlemek oldukça güç olmuştur. Bu nedenle fenol/kloform yöntemi ile genomik DNA elde edilmiş ancak bu da çok zaman kaybına neden olmuştur. Bu süreçte bazı transformantlar antibiyotikli besiyerinde gösterdikleri gelişimi kaybetmişlerdir. Yine de elde kalan bütün transformantların taramaları gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Ancak genomik DNA taramaları sonucunda bu transformantların herhangi bir mutasyon içerdiği tespit edilememiştir. EK7'de sgRNA bölgelerini çevreleyen primerler ile yapılan PCR'ların agaroz jel sonuçlarının bazıları gösterilmiştir.

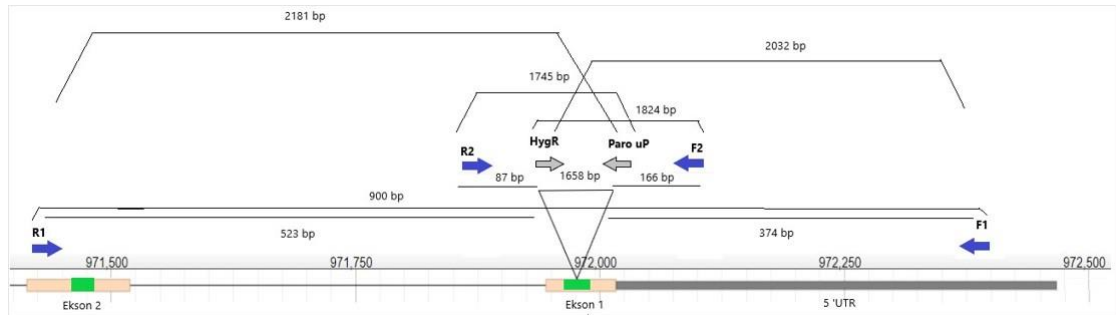
Yapılan taramalar sonunda deneme 5 içerisinde bulunan bir uygulama sonunda bir transformant (Cr5P7T3) üzerinde detaylı analizler yapılmıştır. Bu denemede 100 ng pHyg3, 10 µg sgRNA ve 7,5 µg Cas9 kullanılmış ve PPD1 geni hedef alınmıştır. Cr5P7T3 mutant adayının seçilme nedeni hem Chelex 100 hem de genomik DNA izolasyonları sonucu sgRNA bölgesini çevreleyen primerler ile yapılan PCR

reaksiyonları sonucunda beklenildiği gibi herhangi bir ürün oluşturmamasıydı. Şekil 4.15 A’da görülebildiği gibi P7T3 transformantı *CBLP* kontrol geni (250 bp) *PPD2* geni (321 bp) ile beklenildiği büyüklükte ürün oluştururken *PPD1* primerleri (900 bp) ile herhangi bir ürün oluşturmamıştır. Yine yabancı tip CC-125 mt(+)'ın hem *CBLP* hem de *PPD1* spesifik primerleri ile ürün oluşturduğu gösterilmiştir. Bu denemeler tekrarlanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle bu transformant aday mutant olarak belirlenmiştir.



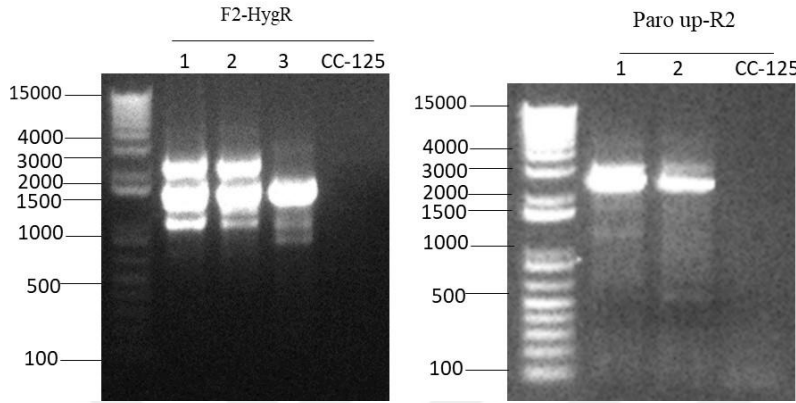
Şekil 4.15. Cr5P7T3 ile yapılan PCR reaksiyonlarının agaroz jel sonuçları; **A:** Gen ve kontrol (*CBLP*) PCR sonuçları **B:** pHyg3 primerleri ile yapılan PCR sonuçları

Transformantların birçoğunun Higromisin B antibiyotikli besiyerlerinde gelişim göstermeleri bu kaseti genomik olarak içerdikleri anlamına gelmiştir. Cr5P7T3’ün pHyg3 kasetini içerip içermediği tasarlanan spesifik primerler ile yapılan PCR reaksiyonları sonucu gösterilmiştir (Şekil 4.15 B). Cr5P7T3 pHyg3 kaset primerleri ve gen spesifik primerler ile ürün oluştururken, yabancı tipte beklenildiği gibi herhangi bir ürün oluşmamıştır. Hem beklenildiği yerde ürün vermemeleri hem de pHyg3 plazmitini içermeleri bu transformantın adayı olduğunu güçlendirmiştir. Eğer CRISPR/Cas9 RNP sistemine göre bir mutasyon oluşturulabiliyorsa bu transformantın pHyg3 plazmiti primerleri ve *PPD1* geninin sgRNA bölgesini çevreleyen primerleri ile büyük bir ürün oluşturması beklenmektedir. Bu nedenle ilgili primerler ile Nested PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.16 tasarlanan primerler ve oluşabilecek ürünleri şematize etmektedir.



Şekil 4.16. Nested PCR analizleri için tasarlanan primerlerin ve ürünlerin şeması

Tasarlanan primerlere göre Paro up ve gen spesifik CrE1PPD1R1 primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonları sonunda 2181 bp büyüklüğünde, gen spesifik CrE1PPD1F1 ve HygR PCR reaksiyonları sonunda ise 2032 bp büyüklüğünde ürün beklenmektedir. Ancak CRISPR/Cas9 ile kesilen bölgeye kaset tek parça halinde girebileceği gibi birden fazla veya kırık bir şekilde de yerleşmiş olabilmektedir. Tüm bu ihtimaller göz önüne alınarak PCR reaksiyonları ona göre dizayn edilerek gerçekleştirilmiştir.

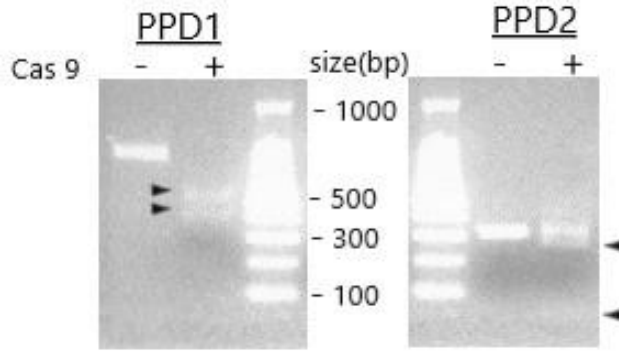


Şekil 4.17. Cr5P7T3 ile yapılan Nested PCR reaksiyonlarının agaroz jel sonuçları; **1:** Cr5P7T3-1, **2:** Cr5P7T3-2, **3:** Cr5P7T3-3, CC-125: Yabanıl suş (kontrol)

Şekil 4.17’de görülebildiği gibi 3 (Cr5P7T3-3) numaralı biyolojik tekrar hariç Cr5P7T3 mutant aday 2000 bp üzerinde ürünler oluşturmuştur. Yine bu sonuçlar da bu transformantın adaylığını artırmıştır. Bu nedenle elde edilen bantlar jelden pürifiye edilerek sekanslamaya gönderilmiştir. Sekans sonunda pHyg3 kasetinin sekansının nükleotit dizisi içerisinde ve sgRNA bölgesinde Cas9 enziminin kesik oluşturduğu bölgede bulunması beklenmektedir. Blast ve hizalama analizleri yapılmış ancak dizileme sonunda bu nükleotit dizisi bulunamamıştır. Pytozome veri tabanı Blast analizleri sonuçlarına göre dizi sadece PPD1 nükleotit dizisi ile eşleşmektedir. Sekanslama sonucu elde edilen nükleotit dizisi ile yapılan hizalama analizlerinin sonuçları EK8’ de gösterilmiştir.

4.7.4. Cas9 proteini tarafından hedef alınan DNA’ların *in vitro* kesim sonuçları

Tasarlanan sgRNA’ların Cas9 proteini tarafından kesilip kesilmediği kontrol edilmiştir. Bu kesim *in vitro* koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Her iki gen için sgRNA’yı çevreleyen primerler ile PCR ürünleri elde edilmiştir. Bu ürünlerin büyüklükleri sırası ile 900 bp ve 320 bp’dir. PCR ürünleri Cas9 varlığında PPD1 için sgRNA konumuna göre 523 bp ve 377 bp ve PPD2 için 260 bp ve 60 bp olacak şekilde iki parçaya ayrılmıştır (Şekil 4.18). Cas9 enzimi PCR ürünlerini sgRNA konumuna göre beklenildiği şekilde kesmiştir. Bu sonuç ile Cas9 enziminin fonksiyonunu gerçekleştirdiğini ve sgRNA’ların degrade olmadığı gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Cas9 proteini tarafından hedef DNA'ların *in vitro* kesimi

Yapılan bir çalışmada CRISPR/Cas9 RNP yöntemi kullanılarak *C. reinhardtii*'de üç farklı gende başarılı bir şekilde mutant suşlar elde edilmiştir (Shin vd. 2016). Ancak araştırmacıların üzerinde çalıştıkları genler klorofil ile ilgili genler oldukları için aday mutantları kolay bir şekilde belirlemişler. *C. reinhardtii* yeşil renkli bir organizma olduğu için transformantlar daha açık/koyu yeşil renk oluşturmuşlardır. *C. reinhardtii*'de CRISPR tabanlı genom düzenleme hakkında olumlu sonuçlar olmasına rağmen, düzenleme verimliliği her zaman düşük olmuştur (Jiang vd. 2014; Baek vd. 2016; Jiang ve Weeks 2017). *C. reinhardtii*'de kararlı bir şekilde ifade edilen bir çalışmada ortaya çıkan düzenleme verimliliği yüzde 10'dan az olmuştur. *C. reinhardtii*'de CRISPR-Cas9 ile 16 bağımsız transformasyon denemesi gerçekleştirildikten sonra, rapamisin direnci sağlayan FKB12 geninde hedeflenen düzenlemeye sahip yalnızca bir koloni tanımlanmıştır (Jiang vd. 2014).

Bu tez çalışmasında CRISPR/Cas9 RNP denemeleri sonucunda *PPD1* ve *PPD2* genine ait herhangi bir mutasyon belirlenememiştir. Bu genlerin herhangi bir fenotip göstermemeleri çalışmayı daha da zorlaştırmıştır. CLiP mutant kütüphanesindeki araştırmalarına göre *C. reinhardtii* *PPD1* ve *PPD2* genleri üzerinde yapılan mutasyonlar sonucunda da herhangi bir fenotip gözlenmemiştir (Anonymous 6).

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında *C. reinhardtii* PPD2 proteini rekombinant olarak elde edilmiş ve protein ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. *C. reinhardtii* PPD1 ve PPD2 genlerinin farklı koşullar altında ekspresyon analizleri yapılmıştır. *C. reinhardtii* PPDK genlerinin biyoinformatik araçlar yardımı ile ayrıntılı moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. PPDK genlerinin fonksiyonu araştırılarak CO₂ dönüşüm metabolizmasında TAG'ların birikimini artırmak için *C. reinhardtii* metabolizmasının mühendisliği araştırılmıştır. Böylece mikroalg C4 fotosentez sisteminin aydınlatılmasına katkı sağlanmıştır.

Öncelikle *C. reinhardtii* PPD2 geni ilgili primerler ile *C. reinhardtii* cDNA'sından klonlanmış ve pET28a (+)-PPD2 plazmiti oluşturulmuştur. Plazmit, *E. coli* BL21(DE3) ekspresyon suşuna transforme edilerek hücrelerde rekombinant protein sentezi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen protein SDS-PAGE ve imminoblot analizleri ile ekspresyonları kanıtlanmıştır. Enzim aktive testleri sonucunda, PPD1 spesifik aktivitesi transforme edilmiş hücre ekstraktlarında, negatif kontrol hücre ekstraktındakine göre 6,27 kat, PPD2 için ise 9,39 kat daha fazla bulunmuştur. Bu sonuçlar, pürifiye edilmiş PPD1 ve PPD2 proteinlerinin yüksek spesifik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca PPD2 geni, *C. reinhardtii* hücrelerinde, fonksiyonel ve enzimatik olarak aktifliği tespit edilmiştir.

C. reinhardtii PPD1 ve PPD2 genlerinin farklı NH₄⁺ ve CO₂ konsantrasyonlarında yapılan hem RT-PCR hem qRT-PCR sonuçlarına göre, NH₄⁺ değişikliğinde *C. reinhardtii* PPD1 geni istatistiksel anlamda bir değişiklik göstermemiştir. Artan CO₂ konsantrasyonlarında ise *C. reinhardtii* PPD1 geninin ekspresyonu artmıştır. *C. reinhardtii*'de farklı NH₄⁺ ve CO₂ konsantrasyonlarında PPDK genlerinin gösterdiği değişiklikler enzimin fotosentetik yönünün olabileceğini ve lipid artışıyla negatif yönde ilişkisi olduğunu göstermiştir.

Biyodizel; soya, aspir, kanola, hayvansal yağlar gibi biyokütle hammaddelerinden TAG'ların transesterifikasyonu ile yapılan, kısa zincirli alkil (metil veya etil) esterlerden oluşan, petrol bazlı olmayan bir dizel yakıtı ifade etmektedir. Avrupa biyodizel pazarında gerçekten önemli bir etki oluşturmak için, insan gıda kaynaklarıyla rekabet etmeyen birkaç güvenilir hammaddeye ihtiyacımızın olduğu açıktır. Bu hammaddelerin bazıları, CO₂ yakalama ve / veya fiksasyon yoluyla karbon ayak izini azaltan süreçleri de içermelidir. Mikroalgler, güneş ışığını ve karbondioksiti doğrudan lipitlere dönüştürme potansiyeline sahip oldukları için kuşkusuz bu kaynakların başında gelmektedir. Mikroalgler, kuru biyokütlelerinin %30'una kadar sıvı hidrokarbonlar biçiminde doğal olarak birikebilir. Yeşil alg *C. reinhardtii*, fotosentetik bir hücrenin yararlı bir modelidir ve bir dizi fizyolojik süreçle ilgili çalışmalar için yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Son zamanlarda, nükleer ve organel dönüşüm (nükleer, kloroplast ve mitokondriyal) sistemleri, RNA müdahalesi dahil olmak üzere bir dizi moleküler teknoloji, *Chlamydomonas*'a TALEN aktivasyonu ve CRISPR teknolojisi uygulanmıştır. *C. reinhardtii*'nin genom dizilerinin mevcudiyeti, araştırma ve endüstriyel uygulamalarda kullanımını artıracaktır. Böylelikle, sahada sağlanan önemli gelişmelerin küresel ekonomi üzerinde büyük etkisi olacaktır.

Hücreler lipit ve protein sentezleri için aynı substrat olan ve bir glikoliz ürünü olan pirüvat için rekabet etmektedirler. Dolayısı ile pirüvatın çevriminde rol alan *PPDK* genlerindeki değişiklikler C4 metabolizmasındaki TAG seviyelerini önemli ölçüde değiştirebilecektir.



6. KAYNAKLAR

- Abd Ellatif Mohamed, H. 2018. The Role of Microalgae in Renewable Energy Production: Challenges and Opportunities. In T. Muhammet, Ö. Umur, & I. Ali (Eds.), *Marine Ecology* (pp. Ch. 12). Rijeka: IntechOpen.
- Ajjawi, I., Verruto, J., Aqui, M., Soriaga, L. B., Coppersmith, J., Kwok, K., Xu, W. 2017. Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. *Nature biotechnology*, 35 (7): 647.
- Aktaş, E., Demir, Ö., and Deniz, U. 2020. BIODIESEL PRODUCTION METHODS. *International Journal of Energy and Smart Grid*, 5 (1-2): 1-10.
- Alhasawi, A., Legendre, F., Jagadeesan, S., Appanna, V., and Appanna, V. 2019. Biochemical Strategies to Counter Nitrosative Stress: Nanofactories for Value-Added Products. In *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 153-169): Elsevier.
- Anonymous 1: KEGG Retrieved from <https://www.genome.jp/entry/2.7.9.1> [Son erişim tarihi: 24.02.2023]
- Anonymous2:Phytozome.https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Creinhardtii [Son erişim tarihi: 04.04.2023]
- Anonymous 3: OpenCFU. Retrieved from <https://opencfu.sourceforge.net/> [Son erişim tarihi: 03.03.2023]
- Anonymous 4: EMBL-EBI. <https://www.ebi.ac.uk/> [Son erişim tarihi: 22.04.2022]
- Anonymous 5: Phylogenetic analysis pipeline by ETE3. [Son erişim tarihi: 04.04.2023]
- Anonymous 6: Chlamydomonas Library Project (CLiP). <https://www.chlamylibrary.org/> [Son erişim tarihi: 03.03.2023]
- Aoyagi, K. and Bassham, J. A. 1984. Pyruvate orthophosphate dikinase mRNA organ specificity in wheat and maize. *Plant physiology*, 76 (1): 278-280.
- Appanna, V., Alhasawi, A., Auger, C., Thomas, S., and Appanna, V. 2016. Phospho-transfer networks and ATP homeostasis in response to an ineffective electron transport chain in *Pseudomonas fluorescens*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 606: 26-33.
- Aratboni, H. A., Rafiei, N., Garcia-Granados, R., Alemzadeh, A., & Morones-Ramírez, J. R. 2019. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microbial Cell Factories*, 18 (1): 178.
- Arısoy, H., ve Yücel, A. 2020. Türkiye'nin Biyoekonomi Politikalarının Tarımsal Açidan Değerlendirilmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 10 (4): 2999-3009.
- Ashton, A. R., Burnell, J. N., Furbank, R. T., Jenkins, C. L., & Hatch, M. D. 1990. Enzymes of C4 photosynthesis. In *Methods in plant biochemistry* (Vol. 3, pp. 39-72): Elsevier.
- Astley, H. M., Parsley, K., Aubry, S., Chastain, C. J., Burnell, J. N., Webb, M. E., & Hibberd, J. M. 2011. The pyruvate, orthophosphate dikinase regulatory proteins

- of *Arabidopsis* are both bifunctional and interact with the catalytic and nucleotide-binding domains of pyruvate, orthophosphate dikinase. *The Plant Journal*, 68 (6): 1070-1080.
- Baek, K., Kim, D. H., Jeong, J., Sim, S. J., Melis, A., Kim, J.-S., Bae, S. 2016. DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Scientific reports*, 6 (1): 1-7.
- Baliga, R., and Powers, S. E. 2010. Sustainable algae biodiesel production in cold climates. *International Journal of Chemical Engineering*, 2010.
- Barkia, I., Saari, N., & Manning, S. R. 2019. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine drugs*, 17 (5): 304.
- Behera, S., Singh, R., Arora, R., Sharma, N. K., Shukla, M., & Kumar, S. 2015. Scope of algae as third generation biofuels. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2: 90.
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. 2012. The Calvin cycle and the pentose phosphate pathway. *Biochemistry*, 6: 565-591.
- Berthold, P., Schmitt, R., & Mages, W. 2002. An engineered *Streptomyces hygroscopicus* aph 7 "gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist*, 153 (4): 401-412.
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G., & Carroll, D. 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161 (3): 1169-1175.
- Bonente, G., Pippa, S., Castellano, S., Bassi, R., & Ballottari, M. 2012. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to different growth irradiances. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (8): 5833-5847.
- Bringaud, F., Baltz, D., & Baltz, T. 1998. Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: pyruvate, phosphate dikinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (14): 7963-7968.
- Brown, L. E., Sprecher, S., & Keller, L. 1991. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Molecular and cellular biology*, 11 (4): 2328-2332.
- Buck, H. J. 2021. Social science for the next decade of carbon capture and storage. *The Electricity Journal*, 34 (7): 107003.
- Chenier, D., Beriault, R., Mailloux, R., Baquie, M., Abramia, G., Lemire, J., & Appanna, V. 2008. Involvement of fumarase C and NADH oxidase in metabolic adaptation of *Pseudomonas fluorescens* cells evoked by aluminum and gallium toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (13): 3977-3984.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25 (3): 294-306.
- Chowdhury, H., & Loganathan, B. 2019. Third-generation biofuels from microalgae: a review. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 20: 39-44.
- De Riso, V., Raniello, R., Maumus, F., Rogato, A., Bowler, C., & Falciatore, A. 2009. Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic acids research*, 37 (14): e96-e96.

- Debiagi, F., Madeira, T. B., Nixdorf, S. L., & Mali, S. 2020. Pretreatment Efficiency Using Autoclave High-Pressure Steam and Ultrasonication in Sugar Production from Liquid Hydrolysates and Access to the Residual Solid Fractions of Wheat Bran and Oat Hulls. *Appl Biochem Biotechnol*, 190 (1): 166-181.
- Dębowski, M., Zieliński, M., Kazimierowicz, J., Kujawska, N., & Talbierz, S. 2020. Microalgae cultivation technologies as an opportunity for bioenergetic system development advantages and limitations. *Sustainability*, 12 (23): 9980.
- 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.
- Ermilova, E. V., Zalutskaya, Z. M., Nikitin, M. M., Lapina, T. V., & Fernandez, E. 2010. Regulation by light of ammonium transport systems in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant, cell & environment*, 33 (6): 1049-1056.
- Freeman, B. W., Evans, C. D., Musarika, S., Morrison, R., Newman, T. R., Page, S. E., . Wen, Y. 2022. Responsible agriculture must adapt to the wetland character of mid-latitude peatlands. *Global Change Biology*.28 (12): 3795-3811.
- Freer, M., Gough, C., Welfle, A., & Lea-Langton, A. 2021. Carbon optimal bioenergy with carbon capture and storage supply chain modelling: How far is too far? *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 47: 101406.
- Fukayama, H., Tsuchida, H., Agarie, S., Nomura, M., Onodera, H., Ono, K., Ku, M. S. 2001. Significant accumulation of C4-specific pyruvate, orthophosphate dikinase in a C3 plant, rice. *Plant physiology*, 127 (3): 1136-1146.
- Giordano, M., Beardall, J., & Raven, J. A. 2005. CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56: 99-131.
- González-Ballester, D., Casero, D., Cokus, S., Pellegrini, M., Merchant, S. S., & Grossman, A. R. 2010. RNA-seq analysis of sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells reveals aspects of acclimation critical for cell survival. *Plant Cell*, 22 (6): 2058-2084.
- Graham, L., & Wilcox, L. 2000. Algae. In (pp. 640): Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, Inc.
- Griffiths, M. J., & Harrison, S. T. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of applied phycology*, 21 (5): 493-507.
- Grossman, A. R., Croft, M., Gladyshev, V. N., Merchant, S. S., Posewitz, M. C., Prochnik, S., & Spalding, M. H. 2007. Novel metabolism in *Chlamydomonas* through the lens of genomics. *Current opinion in plant biology*, 10 (2): 190-198.
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research*, 45 (2): 160-186.
- Hanks, S. K., & Hunter, T. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB journal*, 9 (8): 576-596.

- Harris, E. H. 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual review of plant biology*, 52 (1): 363-406.
- Hatch, M. D. 1987. C4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*, 895 (2): 81-106.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R., & Carvalho, I. S. 2013. Microalgae taxonomy and breeding. In *Biofuel crops: production, physiology and genetics* (pp. 44-53): CABI Wallingford UK.
- Herzberg, O., Chen, C., Kapadia, G., McGuire, M., Carroll, L. J., Noh, S. J., & Dunaway-Mariano, D. 1996. Swiveling-domain mechanism for enzymatic phosphotransfer between remote reaction sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (7): 2652-2657.
- Hopkins, T. C., Graham, E. J. S., Schwilling, J., Ingram, S., Gómez, S. M., & Schuler, A. J. 2019. Effects of salinity and nitrogen source on growth and lipid production for a wild algal polyculture in produced water media. *Algal research*, 38: 101406.
- Hossain, N., and Mahlia, T. M. I. 2019. Progress in physicochemical parameters of microalgae cultivation for biofuel production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39 (6): 835-859.
- Imaizumi, N., Ku, M. S., Ishihara, K., Samejima, M., Kaneko, S., & Matsuoka, M. 1997. Characterization of the gene for pyruvate, orthophosphate dikinase from rice, a C3 plant, and a comparison of structure and expression between C3 and C4 genes for this protein. *Plant molecular biology*, 34 (5): 701-716.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169 (12): 5429-5433.
- Jiang, W. z., 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.
- Jiang, W. Z., and Weeks, D. P. 2017. A gene-within-a-gene Cas9/sgRNA hybrid construct enables gene editing and gene replacement strategies in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal research*, 26: 474-480.
- Johnson, X., and Alric, J. 2012. Interaction between starch breakdown, acetate assimilation, and photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (31): 26445-26452.
- Kadar, E., Rooks, P., Lakey, C., & White, D. A. 2012. The effect of engineered iron nanoparticles on growth and metabolic status of marine microalgae cultures. *Science of the total environment*, 439: 8-17.
- Kang, N. K., Kim, E. K., Kim, Y. U., Lee, B., Jeong, W.-J., Jeong, B.-r., & Chang, Y. K. 2017. Increased lipid production by heterologous expression of AtWRI1 transcription factor in *Nannochloropsis salina*. *Biotechnology for biofuels*, 10 (1): 231.

- Kilian, O., Benemann, C. S., Niyogi, K. K., & Vick, B. 2011. High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (52): 21265-21269.
- Kim, K.-S., Feild, E., King, N., Yaoi, T., Kustu, S., & Inwood, W. 2005. Spontaneous mutations in the ammonium transport gene AMT4 of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 170 (2): 631-644.
- Kim, K.-S., Kustu, S., & Inwood, W. 2006. Natural history of transposition in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: use of the AMT4 locus as an experimental system. *Genetics*, 173 (4): 2005-2019.
- Kim, S.-H., Liu, K.-H., Lee, S.-Y., Hong, S.-J., Cho, B.-K., Lee, H., Choi, H.-K. 2013. Effects of light intensity and nitrogen starvation on glycerolipid, glycerophospholipid, and carotenoid composition in *Dunaliella tertiolecta* culture. *PLoS One*, 8 (9).
- Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J., & Kim, J.-S. 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome research*, 24 (6): 1012-1019.
- Knothe, G., & Razon, L. F. 2017. Biodiesel fuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 58: 36-59.
- Kodama, M. 1993. A new species of highly CO₂-tolerant, fast-growing marine microalga suitable for high-density culture. *J. Mar. Biotechnol.*, 1: 21-25.
- Kõressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R., & Remm, M. 2018. Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, 34 (11): 1937-1938.
- Kucho, K.-i., Ohyama, K., & Fukuzawa, H. 1999. CO₂-responsive transcriptional regulation of CAH1 encoding carbonic anhydrase is mediated by enhancer and silencer regions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 121 (4): 1329-1337.
- Lemire, J., Mailloux, R., Puiseux-Dao, S., & Appanna, V. 2009. Aluminum-induced defective mitochondrial metabolism perturbs cytoskeletal dynamics in human astrocytoma cells. *Journal of Neuroscience research*, 87 (6): 1474-1483.
- Leong, W.-H., Lim, J.-W., Lam, M.-K., Uemura, Y., & Ho, Y.-C. 2018. Third generation biofuels: a nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. *Renewable and sustainable energy reviews*, 91: 950-961.
- Li, Y., Han, F., Xu, H., Mu, J., Chen, D., Feng, B., & Zeng, H. 2014. Potential lipid accumulation and growth characteristic of the green alga *Chlorella* with combination cultivation mode of nitrogen (N) and phosphorus (P). *Bioresource technology*, 174: 24-32.
- Lin, Q., Zhuo, W.-H., Wang, X.-W., Chen, C.-P., Gao, Y.-H., & Liang, J.-R. 2018. Effects of fundamental nutrient stresses on the lipid accumulation profiles in two diatom species *Thalassiosira weissflogii* and *Chaetoceros muelleri*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 41 (8): 1213-1224.

- Luo, X., Wang, M., Lee, J., & Hendry, J. 2021. Dynamic modelling based on surface renewal theory, model validation and process analysis of rotating packed bed absorber for carbon capture. *Applied Energy*, 301: 117462.
- Lv, H., Qu, G., Qi, X., Lu, L., Tian, C., & Ma, Y. 2013. Transcriptome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* during the process of lipid accumulation. *Genomics*, 101 (4): 229-237.
- Manik, Y., & Halog, A. 2013. A meta-analytic review of life cycle assessment and flow analyses studies of palm oil biodiesel. *Integrated environmental assessment and management*, 9 (1): 134-141.
- Markou, G., & Nerantzis, E. 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology advances*, 31 (8): 1532-1542.
- Meers, J., Tempest, D., & Brown, C. 1970. 'Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP)', an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *Microbiology*, 64 (2): 187-194.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Maréchal-Drouard, L. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science (New York, N.Y.)*, 318 (5848): 245-250.
- Miller, R., Wu, G., Deshpande, R. R., Vieler, A., Gärtner, K., Li, X., Liu, B. 2010. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. *Plant physiology*, 154 (4): 1737-1752.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L., Richardson, L. J. 2021. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic acids research*, 49 (D1): D412-D419.
- Miura, K., Kohinata, T., Yoshioka, S., Ohyama, K., & Fukuzawa, H. 2002. Regulation of a carbon concentrating mechanism through CCM1 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Functional plant biology*, 29 (3): 211-219.
- Mori, K., Tanaka, Y., Morikawa, M., & Toyama, T. 2020. Enhanced lipid productivity of *Chlamydomonas reinhardtii* with combination of NaCl and CaCl₂ stresses. *Bioprocess and Biosystems Engineering*: 1-10.
- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lütge, F., Dannemann, N., Lahaye, T., & Cathomen, T. 2011. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic acids research*, 39 (21): 9283-9293.
- Naito, Y., Hino, K., Bono, H., & Ui-Tei, K. 2015. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 31 (7): 1120-1123.
- Nelson, J., & Lefebvre, P. A. 1995. Targeted disruption of the NIT8 gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and cellular biology*, 15 (10): 5762-5769.

- Nguyen, T. H. T., Park, S., Jeong, J., Shin, Y. S., Sim, S. J., & Jin, E. 2020. Enhancing lipid productivity by modulating lipid catabolism using the CRISPR-Cas9 system in *Chlamydomonas*. *Journal of Applied Phycology*: 1-12.
- Nouemssi, S. B., Ghribi, M., Beauchemin, R., Meddeb-Mouelhi, F., Germain, H., & Desgagné-Penix, I. 2020. Rapid and efficient colony-PCR for high throughput screening of genetically transformed *Chlamydomonas reinhardtii*. *Life*, 10 (9): 186.
- OECD, F. 2022. OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031.
- Olson, D. G., Hörl, M., Fuhrer, T., Cui, J., Zhou, J., Maloney, M. I., . . . Lynd, L. R. 2017. Glycolysis without pyruvate kinase in *Clostridium thermocellum*. *Metabolic engineering*, 39: 169-180.
- OPEC. 2016. World Oil Outlook, October 2016. 10th ed. Vienna, Austria: Organisation of the Petroleum Exporting Countries.
- Othman, N., Manan, Z. A., Alwi, S. R. W., & Sarmidi, M. R. 2010. A review of extraction technology for carotenoids and vitamin e recovery from palm oil. *Journal of Applied Sciences*, 10: 1187-1191.
- Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., Aremu, A. O., Okem, A., Lovász, C., van Staden, J. 2016. Effect of temperature and nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains. *Algal Research*, 16: 141-149.
- Özgür, R. Ö. 2022. YENİLENEBİLİR ENERJİ KULLANIMI VE BÜYÜME-SU TÜKETİMİ-SERA GAZI SALIMI İLİŞKİSİ: SEKTÖREL BİR ANALİZ. *Uluslararası Yönetim İktisat ve İşletme Dergisi*, 18 (1): 15-37.
- Paramati, S. R., Shahzad, U., & Doğan, B. 2022. The role of environmental technology for energy demand and energy efficiency: Evidence from OECD countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 153: 111735.
- Parsley, K., & Hibberd, J. M. 2006. The Arabidopsis PPDK gene is transcribed from two promoters to produce differentially expressed transcripts responsible for cytosolic and plastidic proteins. *Plant molecular biology*, 62 (3): 339-349.
- Pawar, S. 2016. Effectiveness mapping of open raceway pond and tubular photobioreactors for sustainable production of microalgae biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 62: 640-653.
- Pedroni, P., Davison, J., Beckert, H., Bergman, P., & Benemann, J. 2001. A proposal to establish an international network on biofixation of CO₂ and greenhouse gas abatement with microalgae. *Journal of energy and environmental research*, 1 (1): 136-150.
- Plancke, C., Vigeolas, H., Höhner, R., Roberty, S., Emonds-Alt, B., Larosa, V., . . . Thonart, P. 2014. Lack of isocitrate lyase in *C. lamydomonas* leads to changes in carbon metabolism and in the response to oxidative stress under mixotrophic growth. *The Plant Journal*, 77 (3): 404-417.
- Prasad, R., Gupta, S. K., Shabnam, N., Oliveira, C. Y. B., Nema, A. K., Ansari, F. A., & Bux, F. 2021. Role of microalgae in global CO₂ sequestration: Physiological mechanism, recent development, challenges, and future prospective. *Sustainability*, 13 (23): 13061.

- Rinanti, A. 2016. Biotechnology carbon capture and storage by microalgae to enhance CO₂ removal efficiency in closed-system photobioreactor. *Algae-Organisms for imminent biotechnology*, 25.
- Rochaix, J.-D. 1995. *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annual review of genetics*, 29: 209-231.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 102 (1): 100-112.
- Rohr, J., Sarkar, N., Balenger, S., Jeong, B. r., & Cerutti, H. 2004. Tandem inverted repeat system for selection of effective transgenic RNAi strains in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal*, 40 (4): 611-621.
- Rosche, E., & Westhoff, P. 1995. Genomic structure and expression of the pyruvate, orthophosphate dikinase gene of the dicotyledonous C 4 plant *Flaveria trinervia* (Asteraceae). *Plant molecular biology*, 29: 663-678.
- Sasso, S., Stibor, H., Mittag, M., & Grossman, A. R. 2018. The Natural History of Model Organisms: From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *elife*, 7: e39233.
- Sati, H., Mitra, M., Mishra, S., & Baredar, P. 2019. Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production: A review. *Algal research*, 38: 101413.
- Sawaengsak, W., Silalertruksa, T., Bangviwat, A., & Gheewala, S. H. 2014. Life cycle cost of biodiesel production from microalgae in Thailand. *Energy for Sustainable Development*, 18: 67-74.
- Sheen, J. 1991. Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize pyruvate, orthophosphate dikinase genes. *The Plant Cell*, 3 (3): 225-245.
- Shin, S.-E., Lim, J.-M., Koh, H. G., Kim, E. K., Kang, N. K., Jeon, S., Hwangbo, K. 2016. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific reports*, 6 (1): 1-15.
- Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Li-Beisson, Y. 2011. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC biotechnology*, 11 (1): 1-15.
- Sibi, G., Ananda Kumar, D., Gopal, T., Harinath, K., Banupriya, S., & Chaitra, S. 2017. Metal nanoparticle triggered growth and lipid production in *Chlorella vulgaris*. *Int J Scientific Res Environ Sci Toxicol*, 2 (1): 1-8.
- Sizova, I., Greiner, A., Awasthi, M., Kateriya, S., & Hegemann, P. 2013. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *The Plant Journal*, 73 (5): 873-882.
- Slade, R., & Bauen, A. 2013. Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and bioenergy*, 53: 29-38.

- South, D. J., & Reeves, R. E. 1975. [31] Pyruvate, orthophosphate dikinase from bacteroides symbiosus. In *Methods in enzymology* (Vol. 42, pp. 187-191): Elsevier.
- Spalding, M. H. 1998. Acquisition. Acclimation to Changing Carbon Availability. *The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas*: 529-547.
- Strenkert, D., Schmollinger, S., Gallaher, S. D., Salomé, P. A., Purvine, S. O., Nicora, C. D., Lipton, M. S. 2019. Multiomics resolution of molecular events during a day in the life of Chlamydomonas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116 (6): 2374-2383.
- Sueoka, N. 1960. Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in Chlamydomonas reinhardi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46 (1): 83.
- Tangut, T. 2018. Isolation, Cloning, characterization and heterologous expression in Escherichia coli of Chlamydomonas reinhardtii pyruvate orthophosphate (Pi) dikinase (PPDK) 1 gene.
- Taylor, L., Nunes-Nesi, A., Parsley, K., Leiss, A., Leach, G., Coates, S., Hibberd, J. M. 2010. Cytosolic pyruvate, orthophosphate dikinase functions in nitrogen remobilization during leaf senescence and limits individual seed growth and nitrogen content. *The Plant Journal*, 62 (4): 641-652.
- Tokutsu, R., Fujimura-Kamada, K., Yamasaki, T., Okajima, K., & Minagawa, J. 2021. UV-A/B radiation rapidly activates photoprotective mechanisms in Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Physiology*, 185 (4): 1894-1902.
- Tsai, D. D.-W., Chen, P. H., & Ramaraj, R. 2017. The potential of carbon dioxide capture and sequestration with algae. *Ecological engineering*, 98: 17-23.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 79: 707-718.
- Wolt, J. D., Wang, K., Sashital, D., & Lawrence-Dill, C. J. 2016. Achieving plant CRISPR targeting that limits off-target effects. *The plant genome*, 9 (3): plantgenome2016.2005.0047.
- Yamano, T., Miura, K., & Fukuzawa, H. 2008. Expression analysis of genes associated with the induction of the carbon-concentrating mechanism in Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Physiology*, 147 (1): 340-354.
- Yeh, K. L., & Chang, J. S. 2011. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga Chlorella vulgaris ESP-31: implications for biofuels. *Biotechnology Journal*, 6 (11): 1358-1366.
- Yoon, K., Han, D., Li, Y., Sommerfeld, M., & Hu, Q. 2012. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga Chlamydomonas reinhardtii. *The Plant Cell*, 24 (9): 3708-3724.

- Zeng, J., Wang, Z., & Chen, G. 2021. Biological characteristics of energy conversion in carbon fixation by microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 152: 111661.
- Zhang, M.-P., Wang, M., & Wang, C. 2021. Nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A review. *Biochimie*, 181: 1-11.
- Zhang, S., Zhang, L., Xu, G., Li, F., & Li, X. 2022. A review on biodiesel production from microalgae: Influencing parameters and recent advanced technologies. *Frontiers in Microbiology*, 13.
- Zhu, B.-H., Shi, H.-P., Yang, G.-P., Lv, N.-N., Yang, M., & Pan, K.-H. 2016a. Silencing UDP-glucose pyrophosphorylase gene in *Phaeodactylum tricornutum* affects carbon allocation. *New biotechnology*, 33 (1): 237-244.
- Zhu, L., Li, Z., & Hiltunen, E. 2016b. Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock. *BioMed research international*, 2016.

EKLER

EK1: PPKK proteinlerinin çoklu amino asit hizalamaları

CrPPD1	M-----
VcPPDK	M-----
CrPPD2	M----QALCQQRSLRCGLQARSSQIPTPLFRSSVSSNSQPAAGSWDVASFVAVPR--
AtPPDK	-----
FtPPDK	-----
ZmPPDK	-----
ZmPPDK1	MAASVSRAICVQKP--GSKCTRDREATSFARRS-----VAAPRPPH
ZmPPDK2	-----MAP-
OsPPD1	-----MAP-
OsPPD2	-----MAP-
CsPPDK	M-----
TbPPDK	M-----
GiPPDK	M-----
MtPPDK	M-----

CrPPD1 -----APIRRIYGFARG--SSDGNKSM-KELLG
VcPPDK -----STIRRIFFPSRG--NSDGDKSM-KELLG
CrPPD2 --AAVALRRSANLRTGLVCA--AIAAQAKDVKATQRFVIFGKN--KSQGDATM-KNLLG
AtPPDK -----MMQRVFTFGKG--RSEGNKGM-KSLLG
FtPPDK -----KKRVFTFGKG--RSEGNRDM-KSLLG
ZmPPDK -----TTKKRVFHFHFGK--KSEGNKTM-KELLG
ZmPPDK1 AKAAGVIRSDSGAGRGQHCSPLRAVDAAPIQTTKRVFHFHFGK--KSEGNKTM-KELLG
ZmPPDK2 -----APCGRSSQRFVHFHFGK--KSEGNKNM-KELLG
OsPPD1 -----AQCARVQRFVHFHFGK--KSEGNKAM-KDLLG
OsPPD2 -----AAHRDGAAEAVGQRFVHFHFGK--RSDGNKTM-KDLLG
CsPPDK -----AKWVYKF-----EEGNASM-RNLLG
TbPPDK -----VAKKWVYFEGG--NADGNKNM-KELLG
GiPPDK -----STRRVYFFGETPENQPSANSELCRKVLG
MtPPDK -----ALDGGANYPREILG
.. : : *

CrPPD1	GKGAYLCEMARCLNVPPGFTITTEVCEEFYANGGMLPEALKTEVKAAVAVVEADMGLKFF
VcPPDK	GKGANLCEMARCLNVPPGFTITTEVCQEFYP--EKLPEELLAEVNRNAVAGVEAEMGLKFF
CrPPD2	GKGANLAEMSRIGLSVPPGLTITTDTCAEFHTNGRQLPAGCWEEILAGLSRVEEEMGCRL
AtPPDK	GKGANLAEMASIGLSVPPGLTISTEACQQYQIAGKKLPEGLWEEILEGLSFIERDIGASL
FtPPDK	GKGANLAEMSSIGLSVPPGLTISTEACEEYQQNGKSLPPGLWDEISEGLDYVQKEMSASL
ZmPPDK	GKGANLAEMASIGLSVPPGFTVSTEACQQYQDAGCALPAGLWAEIVDGLQWVEEYMGATL
ZmPPDK1	GKGANLAEMASIGLSVPPGFTVSTEACQQYQDAGCALPAGLWAEIVDGLQWVEEYMGATL
ZmPPDK2	GKGANLAEMASIGLSVPPGFTVSTEACQQYQEAGRALPGWLAEIVDGLRWVEEYMGAAAL
OsPPD1	GKGANLAEMASIGLSVPPGFTVSTEACQQYQAAGKTLPAGLWEEIVEGLQWVEEYMAARL
OsPPD2	GKGANLAEMASIGLSVPPGFTVSTEACQQYQAQ-KAMPAGLWDEILAALTWVEGNMGAVL
CsPPDK	GKGCNLAEMTILGMPPIQGFVTTEACTEYNSGKQITQETQDQIFEATITWLEELNGKKF
TbPPDK	GKGANLAEMVNLGIPVPPGFTITTEACKTYQET-ETIPQEVADQVRENVSRVEKEMGAKF
GiPPDK	GKGISLAAMIKLMPVPLGFTITCQTCVEYQKT-ASWPKGLKEEVASNLKLLLEKMGKTF
MtPPDK	NKGHIDMMRRHLLPVPAFCITTEVGVRYLAAPESTIAAIWDDVLDRMSWLLETETSTCF
	** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

CrPPD1	GDVNTPLLVSVRSGAAVSMGMMDTVNLGLNDAIVEGFAAKYG--ARFAMDCYRRLLQM
VcPPDK	GDPASPLLFVSVRSGAAVSMGMMDTVNLGLNDEVVVGFAAKYG--DRFAFDCYRRLLQM
CrPPD2	GDAAAPLLLVSVRSGAAVSMGMMDTVNLGLNDACAAGLAARSGD-ERFAYDAYRRFLDM
AtPPDK	ADPSKPLLLSVRSGAAISMPGMMDTVNLGLNDQVVVGLAAKSG--ERFAYDSFRRFLDM
FtPPDK	GDPKPLLLSVRSGAAISMPGMMDTVNLGLNDEVVAGLAGKSG--ARFAYDSYRRFLDM
ZmPPDK	GDPQRPLLLSVRSGAAVSMGMMDTVNLGLNDEVAAGLAAKSG--ERFAYDSFRRFLDM
ZmPPDK1	GDPQRPLLLSVRSGAAVSMGMMDTVNLGLNDEVAAGLAAKSG--ERFAYDSFRRFLDM
ZmPPDK2	GDPRRPLLLSVRSGAAVSMGMMDTVNLGLNDQVAAGLAAKSG--DRFAYDSFRRFLDM
OsPPD1	GDPARPLLLSVRSGAAVSMGMMDTVNLGLNDEVAAGLAAKSG--DRFAYDSYRRFLDM
OsPPD2	GDPRRPLLLSVRSGAAVSMGMMDTVNLGLNDHVAGLAHRSG--ERFAYDSYRRFLDM
CsPPDK	GDTEPPLLVSVRSGARASMPGMMDTILNLGLNDVAVEGFAKKTGN-PRFAYDSYRRFIQM
TbPPDK	GDPANPLLFVSVRSGAAASMPGMMDTVNLGLNKVTVDAWVRRAPRLERFVYDSYRRFITM
GiPPDK	GDNTNPLLVSVRSGAAVSMGMMDTILNLGLNDESVKGLAAVTGN-ARFAYDSYRRFMQM
MtPPDK	GRGPNPLLVSVRSGATQSMGMMDTILDVGMTDAVERVLARPGA--ADFAHDTRRRFTSM
	. *** .***** .*****:*.:.*. . * * * * *
CrPPD1	FGDVVLEIPHEAFEAKLAALKGRKGVQYDVQLDADDLRELIAAYKQVYAEH--KQELP--
VcPPDK	FGDVVLGIPHEDFEAKLTALKARGIQYDVQLDANDLRSLVAQYKEVYEAN--GKELP--
CrPPD2	YGDVVMGIPHHLFEEQLERLKAQQRVSEDALTAAADRLTLVARYKEVYKQL--GQVFP--
AtPPDK	FGDVVMGIPHAKFEEKLERMKERKGVKNDTDLAADLKELVEQYKSVYLEAK-GQEF--
FtPPDK	FGNVVMGIPHSLFDEKLEQMKAEKGIHLDTDLTAADLKDLVEKYKNVYVEAK-GEKFP--
ZmPPDK	FGNVVMDIPRSLFEEKLEHMKESKGLKNDTDLTASDLKELVGQYKEVYLSAK-GEPPF--
ZmPPDK1	FGNVVMDIPRSLFEEKLEHMKESKGLKNDTDLTASDLKELVGQYKEVYLSAK-GEPPF--
ZmPPDK2	FGNVVMDIPHALFEEKLEAMKAKGLKNDTDLTATDLKELVSQYKNVYVEAK-GEPPF--
OsPPD1	FGNVVMDIPHALFEEKLEAMKAVKGLHNDTDLTATDLKELVAQYKDYYVEAK-GEPPF--
OsPPD2	FGNVVMDIPHSLFEEKIEAMKAALGLRNDTEL TARDLKELVAQYKNVYVEAK-GEEFP--
CsPPDK	YSDVVMVVPKSHFEKIIDAMKEEKGVFHFDTLTADDLKELAEKFKAUYKEAMNGEEFP--
TbPPDK	YADIVMQVGREDFEEALSRMKERRGTFDTLTASDLKELCDGYLELFELKT-GCSFP--
GiPPDK	FGDVCLGIDHDKFEHALDAVKTRYGRKTDPELTADELEEVCEAYRKICVAAT-GKTFP--
MtPPDK	YRRIV-----GSAGPIT
	: : *
CrPPD1	QDPWQQLYLGINAVFKSWNIPRAIKYREINKITGLKGTAVNVQTMVYGNMGESSGTGVCF
VcPPDK	QDPWEQMFMGINAVFKSWNIPRAIKYREINKITGLRGTAVNVQTMVYGNMGDTSGTGVCF
CrPPD2	EDPYEQLRLAIYAVFDSWRSERADVYRAVNGITGLTGTAVNVQAMAFGNMGPTSGTGVCF
AtPPDK	SDPKKQLELAIEAVFDSWDSPRANKYRSINQITGLKGTAVNIQCMVFGNMGDTSGTGVL
FtPPDK	TDPKKQLELAVNAVFSWDSPRANKYRSINQITGLKGTAVNIQSMVFGNMGDTSGTGVL
ZmPPDK	SDPKKQLELAVLAVFNSWESPRAKKYRSINQITGLRGTAVNVQCMVFGNMGDTSGTGVL
ZmPPDK1	SDPKKQLELAVLAVFNSWESPRAKKYRSINQITGLRGTAVNVQCMVFGNMGDTSGTGVL
ZmPPDK2	SDPKRQLELAVLAVFDSWESPRAKKYRSINQITGLRGTAVNVQCMVFGNMGDTSGTGVL
OsPPD1	SDPKKQLQLAVLAVFNSWDSPRAIKYRSINKITGLKGTAVNVQTMVFGNMGDTSGTGVL
OsPPD2	SDPKKQLHLSVLAVFNSWDSARAKKYRSINQITGLKGTAVNVQCMVFGNMGDTSGTGVL
CsPPDK	QEPKDQLMGAVKAVFRSWDNPEAIVYRRMNDIPGDWGTAVNVQTMVFGNKGETSGTGVA
TbPPDK	QDPVMQLFAAIKAVFRSWGNPRATYRRMNNITGLLGTAVNVQAMVFGNINDRSATGVA
GiPPDK	QCPHEQLELAINAVFKSWTNPRAQAYRTLNLKLDHNMGTAVNVQSMVFGNTGDDSGTG
MtPPDK	DDPYAQLRASIEAVFASWNSPRAVAYRHHGLDDQGGTAVVVQAMVFGNLTANSAGVLS
	* *: : *** * * * * : : * * * : * * : * *

CrPPD1	TRNPANGAS--ELFGEFLINAQGEDVVAGIRTPMPIKL-----
VcPPDK	TRNPANGDR--ELFGEFLINAQGEDVVAGIRTPMPIKL-----
CrPPD2	TRNPSTGER--KLYGEYLINAQGEDVVAGIRTPET-----
AtPPDK	TRNPSTGEK--KLYGEFLVNAQGEDVVAGIRTPEDLDT-----
FtPPDK	TRNPSTGEK--KLYGEFLINAQGEDVVAGIRTPEDLGT-----
ZmPPDK	TRNPNTGEK--KLYGEFLVNAQGEDVVAGIRTPEDLDA-----
ZmPPDK1	TRNPNTGEK--KLYGEFLVNAQGEDVVAGIRTPEDLDA-----
ZmPPDK2	TRNPNTGEK--KLYGEFLVNAQGEDVVAGIRTPEDLDA-----
OsPPD1	TRNPSTGEK--KLYGEFLVNAQGEDVVAGIRTPEDLDA-----
OsPPD2	TRNPSTGER--KLYGEFLVNAQGEDVVAGIRTPQDLDT-----
CsPPDK	TRNPDTGEK--GIYGRYLINAQGEDVVAGVTRTPQITQ-----
TbPPDK	SRSPSTGEN--FFFGEYLINAQGEDVVAGIRTPQQINHSLSLRWAKAHGVGEEERRKRYP
GiPPDK	TRCPKTGEKFSYLYGEFLQNAQGEDVVAGIRTPVNLKE-----MP
MtPPDK	SRNPITGAN--EPFGEWLPGGQGDVVSVGLVAVAPITA-----
	: * * . * : * . * . . * : * : : :

CrPPD1	-MADVMPPIYAEVLVANTTMLEKHKMDMQDVEFTVQEGRLFMLQCRSGKRTGTAALRIALE
VcPPDK	-MADIMPGIYAEALAANTTMLEKHKMDMQDVEFTVQEGRLFMLQCRNGKRTGTAALRIALD
CrPPD2	-LERSLPGAFKELLNDCALLEKHYKMDQDIEFTVQEGKLYMLQCRGGKRTGTAAVRIAVE
AtPPDK	-MKRFMPPEAYAEVLVENCNILERHYKMDMDIEFTVQEEERLWMLQCRAGKRTGKGAVKIAVD
FtPPDK	-METCMPEAYKELVENCEILERHYKMDMDIEFTVQENRLWMLQCRTGKRTGKGAVRIAVD
ZmPPDK	-MKNLMPQAYDELVENCNILESHYKEMQDIEFTVQENRLWMLQCRTGKRTGKSAVKIAVD
ZmPPDK1	-MKNLMPQAYDELVENCNILESHYKEMQDIEFTVQENRLWMLQCRTGKRTGKSAVKIAVD
ZmPPDK2	-MKDVMPPQAYKELVENCRILESHYKEMQDIEFTVQESRLWMLQCRTGKRTGKSAVKIAVD
OsPPD1	-MRDHMPPEYEEVLVENCNILESHYKEMMDIEFTVQENRLWMLQCRTGKRTGKGAVKIAVD
OsPPD2	-MKDCMPEPYAEVLVENCNILESHYKEMMDIEFTVQENRLWMLQCRTGKRTGKGAVKIAVD
CsPPDK	-LENDMPDCYKQFMDLAMKLEKHFDMQDMEFTIEEGKLYFLQTRNGKRTAPAAALQIACD
TbPPDK	SMEEAMPENYRLLCDVRKRLNHYRDMQDLEFTVQDGRLLWMLQCRNGKRTIHAAVRIAID
GiPPDK	TINASWKACYDELSLIYAKLEGYYNDMVDLEFTVENGKLLWMLQARAGKRTGFAMVRIAID
MtPPDK	-LRDQQPAVYDQLMAAARSLERMAGDVQIEFTVEDSQLWLLQTRGAERSAQAAVRLALQ
	: : : ** : : : * : : * : : * :

CrPPD1	LQAEGIIDRDEAVLMVEPRHLDQLLHPQFESDKGYAKDVITRGLAASPGAAVGRVLFSA
VcPPDK	LEAEGLINKDEAVLMVEPRHLDQLLHPQFEDGEKYYKDVITRGLAASPGAAVGRVLFSAE
CrPPD2	LVDEGLVDEDEAVLMVEPGHLDQLLHPQFANEAAKSDVLGTGLPASPGAAVGQAVFSAE
AtPPDK	MVGEGLVEKSSAIKMVEPQHLDQLLHPQFHDPSTGYREKVVAKGLPASPGAAVGQVVFSAE
FtPPDK	MVNEGLIDTRTAIKRVETQHLDQLLHPQFEDPSAYKSHVVATGLPASPGAAVGQVVFSAE
ZmPPDK	MVNEGLVEPRSAIKMVEPGHLDQLLHPQFENPSAYKDQVIATGLPASPGAAVGQVVFSAE
ZmPPDK1	MVNEGLVEPRSAIKMVEPGHLDQLLHPQFENPSAYKDQVIATGLPASPGAAVGQVVFSAE
ZmPPDK2	MVNEGLVERRAAIKMVEPGHLDQLLHPQFENPSAYKDQVIATGLPASPGAAVGQVVFSAE
OsPPD1	MVNEGLVERRTALKMVEPGHLDQLLHPQFENPSGYKDKVIATGLPASPGAAVGQIVFTA
OsPPD2	MVNEGLIDRRSAIKMVEPRHLDQLLHPQFESPSSYGDQVIATGLPASPGAAVGQIVFTAD
CsPPDK	LVDEGMTIEEEAVVRIEAKSLDQLLHPTFNPAALKAGEVIGSALPASPGAAAGKVYFTAD
TbPPDK	MVNEGLISREEAVLRIDPYQVDHLMHPNLEPGAEEKANKPIGRGLAASPGAAVGQVVFDAE
GiPPDK	MCKEGMLTEEEALLRIDANKINEFLFKRFDPSVKPV--VLGKGIPASPGAAVGVICFCPM
MtPPDK	LHHEGLIDDTETLRRVTPTHTETLLRPSLQTETRLAAPLLAKGLPACPGVWVSGTAYTEVD
	: ** : : : : : : : * * * *

CrPPD1	EAEWVKARGERVILCRHETSPEDVGGMHAAEGIVTCRGGMTSHAAVVARGWGKPCVCGCE
VcPPDK	DAEAWKARGERVILCRHETSPEDVGGMHASEGILTCRGGMTSHAAVVARGWGKPCVCGCE
CrPPD2	DAEAWRSSGLPVVLVRRETSPEDVKGMYSAEGLVLCQLGGMTSHAAVVARGWGKPCITGCA
AtPPDK	EAEAWHSQGKTIVLVRTETSPDDVGGMHAAEGILTARGGMTSHAAVVARGWGKCCIAGCS
FtPPDK	DAETWHAQGSAILVVRTETSPEDVGGMHAAAGILTARGGMTSHAAVVARGWGKCCVSGCA
ZmPPDK	DAEAWHSQGKAAILVRAETSPEDVGGMHAAVGLTERGGMTSHAAVVARGWGKCCVSGCS
ZmPPDK1	DAEAWHSQGKAAILVRAETSPEDVGGMHAAVGLTERGGMTSHAAVVARGWGKCCVSGCS
ZmPPDK2	DAETWHSQGKSVILVRAETSPEDVGGMHAAAGILTARGGMTSHAAVVARGWGKCCVSGCS
OsPPD1	DAEAWHAQGDVILVVRTETSPEDVGGMHAAVGLTERGGMTSHAAVVARGWGKCCVSGCS
OsPPD2	DAEAWHAQGSVILVVRTETSPEDVGGMNAAGILTARGGMTSHAAVVARGWGKCCVAGCS
CsPPDK	EAKAAHEKGERVILVRLTSPEDIEGMHAAEGILTVRGGMTSHAAVVARGMGTCVSGCG
TbPPDK	SAKEWSGRGKKVIMVRLTSPEDLAGMDAACGILTARGGMTSHAAVVARGMGKCCVSGCG
GiPPDK	RTCELAEQGKKVILTRITSPEDILGMDRAVGILTARGGQTSAAVARGMGKCCVAGAD
MtPPDK	EALDAADRGEVILVRDHTRPEDVMGLAAQGIVTEVGGAASHAAVVSRELGRVAVVCGG

: * .:: * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

CrPPD1	HLHIDLKTKTLTFELHGAEVRILREGDWVSLNGTSGEVINGAQPLKAPEVTGGDLGKLMAW
VcPPDK	ALHIDLKSK-----VNGKEIVLNEGDWLSLNGTTGEVINGQQALKKAPEVTGGDLGKLMAW
CrPPD2	DLQVDEHSK--VARINGH--EIRQGDWISLNGSTGEIVRGKQPLAPPELA-GDLGRFMSW
AtPPDK	EIRVDENHK--VLLIGDL--TINEGEWISMNGSTGEVILGKQALAPPALS-PDLETFMSW
FtPPDK	DIRVNDDMK--IFTIGDR--VIKEGDWLSLNGTTGEVILGKQLLAPPAMS-NDLEIFMSW
ZmPPDK	GIRVNDAEK--LVTIGGH--VLREGEWLSLNGSTGEVILGKQPLSPPALS-GDLGTFMAW
ZmPPDK1	GIRVNDAEK--LVTIGSH--VLREGEWLSLNGSTGEVILGKQPLSPPALS-GDLGTFMAW
ZmPPDK2	GIRVNDAEK--VVKIGGN--VLREGEWLSLNGSTGEVILGKQPLSPPALS-GDLGTFMSW
OsPPD1	SVRVNDASK--IVVIEDK--ALHEGEWLSLNGSTGEVIGKQPLCPPALS-GDLETFMSW
OsPPD2	GIRVNDAEK--VVLVADK--VLCEGEWLSLNGSTGEVILGKLPLSPPALS-GDLGEFMSW
CsPPDK	EIKINEEAK--TFELGGH--TFAEGDYISLDGSTGKIYKGDIEQEASVS-GSFERIMVW
TbPPDK	DMVI--RGK--SFKLNGS--VFREGDYITIDGSKGLIYAGKLLRSPDLK-GSFQITLQW
GiPPDK	CCQINYATK--TLVIGDR--KFKEGDFISLNGTTGEIYNGAVQTIEPGIT-DDLQTIMDW
MtPPDK	P-----GVA--AALAGKEITVDGYEGEVRRQGVLALES-----AW

* . : : : * * : *

CrPPD1	VDKARRLRVLANVDPEDAAIARANGAQGIGLCRTEHMFSTHERIAAMRRMIAEEELAS
VcPPDK	VDKARRLRVL TNADTPEDALVARTNGAQGIGLCRTEHMFSTHERIAAVRRMIAEEELDS
CrPPD2	VDKRRRLGVL TNADTPEDAAEARKFGAEGIGLCRTEHMF FASEERIATVRRMIVAQ--TR
AtPPDK	ADAIRRLKVMANADTPEDAI AARKNGAQGIGLCRTEHMF FGAD-RIKAVRKIMAV--TT
FtPPDK	ADQARRLKVMANADTPNDAL TARNNGAQGIGLCRTEHMF FASDERIKAVRKIMAV--TP
ZmPPDK	VDDVRKLVLANADTPDDAL TARNNGAQGIGLCRTEHMF FASDERIKAVRQMIMAP--TL
ZmPPDK1	VDDVRKLVLANADTPDDAL TARNNGAQGIGLCRTEHMF FASDERIKAVRQMIMAP--TL
ZmPPDK2	VDDVRKLVLANADTPEDALAARNNGAEGIGLCRTEHMF FASDERIKAVRQMIMAP--TV
OsPPD1	VDEVKRLKVMANADTPEDATTARQNGAEGIGLCRTEHMF FASDERIKAVRQMIMAS--SL
OsPPD2	VDEVKKLVKANADTPADAL TARNNGAEGIGLCRTEHMF FSSDERIKAMRQMIMAE--TI
CsPPDK	ADKFRLLKVRTNADTPEDTLNAVKLGAEGIGLCRTEHMF FEAD-RIMKIRKIMILSD--SV
TbPPDK	CQEMKRLGVRTNADTPADA AKARSFGAEGVGLCRTEHMF FEGS-RINFIREMILAD--SA
GiPPDK	SDKYRVLLKIRTNADTPHDA AVARKFGAEGIGLCRTEHMF FAAD-RIMAMREMILSD--DE
MtPPDK	SE-----SDTP-----ELREL-----

: *** : * . :

CrPPD1	SHKLEALEALKAFQREDFEGIFKAMDGLPVTIRLLDPPLHEFLPQEGPAMAALCRQLAGE
VcPPDK	DHKLEALEDLKNFQRRDFEGIFTAMDGMPVTIRLLDPPLHEFLPQEGSAMDALCAQLASE
CrPPD2	EARLKALADLLPFQRADEFEGILRAMAGLPVTIRLLDPPLHEFLP-DG-EMTEVCEALARD
AtPPDK	EQRKASLDILLPYQRSDFEGIFRAMDGLPVTIRLLDPPLHEFLP-EG-DLDNIVHELAE
FtPPDK	EQRKVALDLLLPYQRSDFEGIFRAMDGLPVTIRLLDPPLHEFLP-EG-DLEHIVNELAVD
ZmPPDK	ELRQQALDRLLPYQRSDFEGIFRAMDGLPVTIRLLDPPLHEFLP-EG-NIEDIVSELCAE
ZmPPDK1	ELRQQALDRLLTYQRSDFEGIFRAMDGLPVTIRLLDHPSEYFLP-EG-NIEDIVSELCAE
ZmPPDK2	ELRQQALDRLLPYQRSDFEGIFRAMDGLSVTIRLLDPPLHEFLP-EG-NVEEIVRELCSE
OsPPD1	ELRQKALDRLLPYQRSDFEGIFRAMDGLPVTIRLLDPPLHEFLP-EG-HVEDMVRELCSE
OsPPD2	EHRQIALDRLLPYQRDLDFEGIFRAMDGLPVTIRLLDPPLHEFLP-EG-NVEDMVRLSSG
CsPPDK	EAREEALNELIPFQKGFKAMYKALEGRPM TVRYLDPPLHEFVP---HTEEEQAEALAKN
TbPPDK	SGRKAALDKLLPIQRADFVGILRAMRGLPVTIRLLDPPLHEFVP---HDAAQFELAQK
GiPPDK	GARRTALNKL LPQREDFIGIFKAMDGKGVNIRLLDPPLHEFLP---HTRDLQKKLAED
MtPPDK	-----A-----

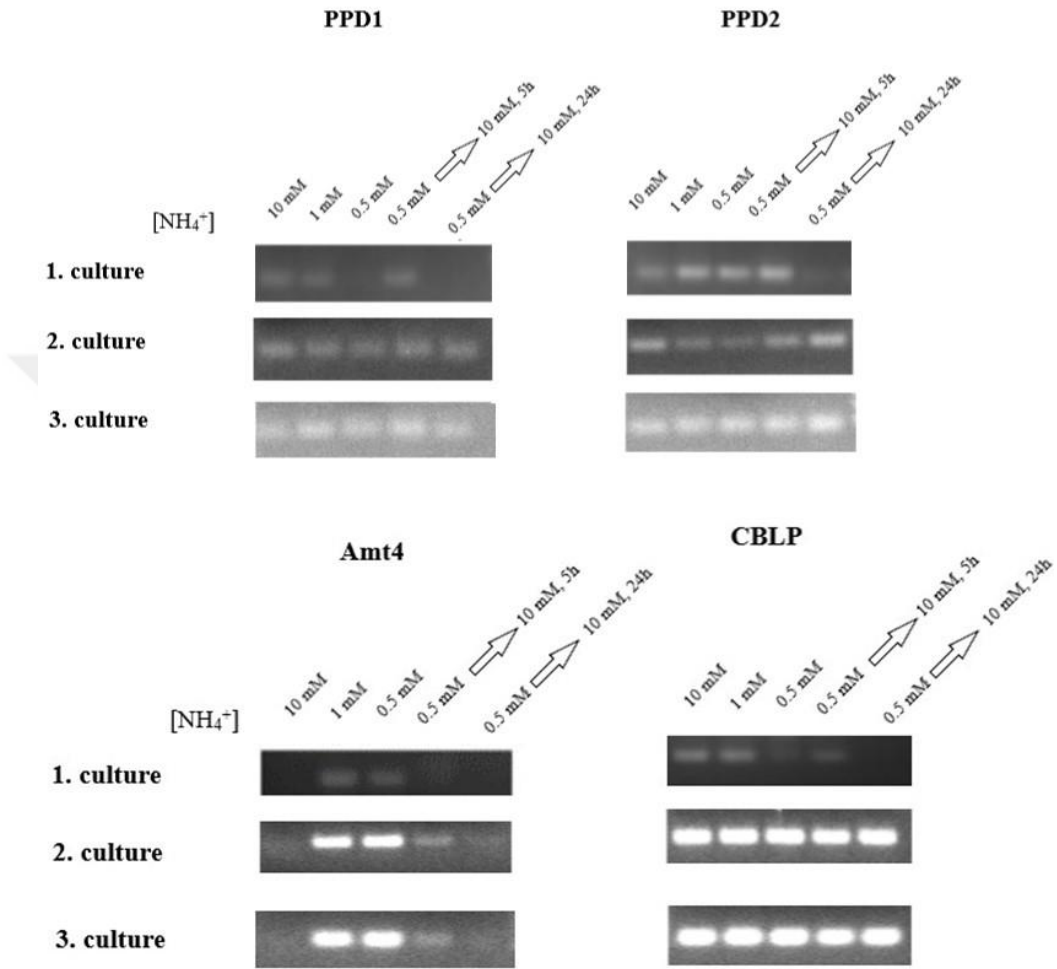
CrPPD1	LGASVERVEARLNGLEVNPMMLRGCR LGIVHPEITDMQATAILEAATRVAAA-GGHVH
VcPPDK	LHTTVERVEARLNGLEVNPMMLRGCR LGIVHPEITEMQAMAI FEAATAV VKA-GGHVH
CrPPD2	AGVTVDEVYGTIEKLQEVNPM LGFRGCR LGITYPEITEMQVRAMFEAAVRVL AG-GSAVQ
AtPPDK	TGVKEDEVLSRIEKLSEVNPM LGFRGCR LGISYPELTEMQARAIFEAASMQDQ-GVTVI
FtPPDK	TGMSADEIYSKIENLSEVNPM LGFRGCR LGISYPELTEMQVRAIFQAASVMTNQ-GVTVI
ZmPPDK	TGANQEDALARIEKLSEVNPM LGFRGCR LGISYPELTEMQARAIFEAAMTNQ-GVQVF
ZmPPDK1	TGANQEDALARIEKLSEVNPM LGFRGCR LGISYPELTEMQARAIFEAAMTNQ-GVQVF
ZmPPDK2	TGANQEDALARIEKLSEVNPM LGFRGCR LGISYPELTEMQARAIFEAAMTNQ-GVQVF
OsPPD1	TGAAQDDVLARVEKLSEVNPM LGFRGCR LGISYPELTEMQARAIFEAAMTNQ-GIQVF
OsPPD2	NVYTQEEILTRIEKLSEVNPM LGFRGCR LGISYPELTAMQARAIFEAASMT EQ-GVKVF
CsPPDK	MGLTLAEVKAKVDELHEFNPMMLGHRGCR LAVTYPEIAKMQTRAVMEAAIEVKEETGIDIV
TbPPDK	LGMPAEKVRNRVNALHELNPMLGHRGCR LGITYPEIYNMQVRAIIEAAIAVSEE-GSSVI
GiPPDK	MNKKHRHIHERVEDLHEVNPM LGFRGVRLGIVYPEISEMQVRAILEAACIVSRE-GVTVK
MtPPDK	-----

CrPPD1	PHIMVPLVATTDMDHQLHVIHAAAKRVAAAT-GEKVPYKVGTMIEVPRAALQAGPLAER
VcPPDK	PHIMVPLVATTDMDHQAIIHAAAKVADAS-GTKVPYKVGTMIEVPRAALQAGLLAQR
CrPPD2	LDVMVPLVGTAELANQEGLVRRVAEQVMSESGGVVPYRVGTMIEVPRAALQAGAI AKT
AtPPDK	PEIMVPLVGTPQELGHQVDVIRKVAKKVFAEK-GHTVSYKVGTMIEIPRAALIADEIAKE
FtPPDK	PEIMVPLVGTPQELRHQISVIRGVAANVFAEM-GVTLEYKVGTMIEIPRAALIAEEIGKE
ZmPPDK	PEIMVPLVGTPQELGHQVTLIRQVAEKVFANV-GKTIGYKVGTMIEIPRAALVADEIAEQ
ZmPPDK1	PEIMVPLVGTPQELGHQVTLIRQVAEKVFANV-GKTIGYKVGTMIEIPRAALVADEIAEQ
ZmPPDK2	PEIMVPLVGTPQELGHQVALIRQVANKVFTSM-GKTIGYKIGTMIEIPRAALVADEIAEQ
OsPPD1	PEIMVPLVGTPQELGHQVDVIRQIANKVFTDM-GKTIGYKVGTMIEIPRAALVADEIAEQ
OsPPD2	PEIMVPLIGTPQELAQQVDVIREVAEKVFANA-ETTISYKIGSMIEVPRAALIADEIAAL
CsPPDK	PEIMIPLVGKKELKFVKDVVEVAEQVKKEK-GSDMQYHIGTMIEIPRAALTADAIAEE
TbPPDK	PEIMVPLVGKKEELSLIREEVKTAEAVITKS-GKRVHYTVGTMIEVPRAAVTADSIAQK
GiPPDK	PEIMIPVL FSENEIMHALVNRVAASVFKEH-GTTVDYEVGTMIELPRACVMADKIAQT
MtPPDK	-----

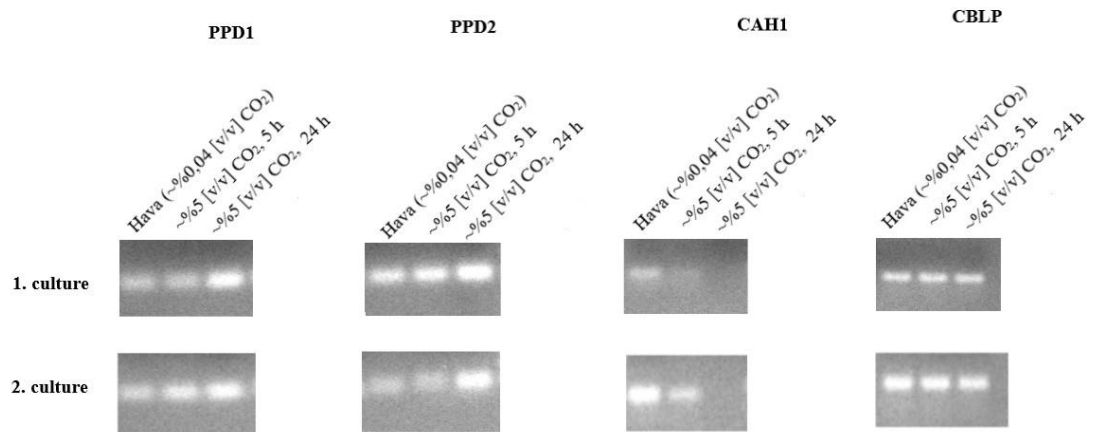
 PEP/piruvat bağlanma domaini
 Merkez domain
 Nükleotit bağlanma domaini
 Bağlayıcı peptitler

EK2: Farklı koşullarda yapılan RT-PCR sonuçları

EK2a: Farklı NH_4^+ konsantrasyonlarında yapılan RT-PCR sonuçları

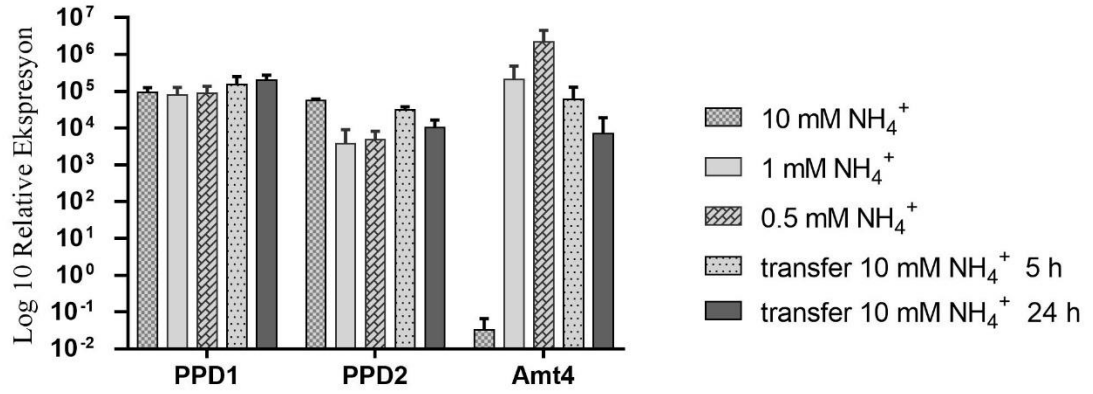


EK2b: Farklı CO_2 konsantrasyonlarında yapılan RT-PCR sonuçları

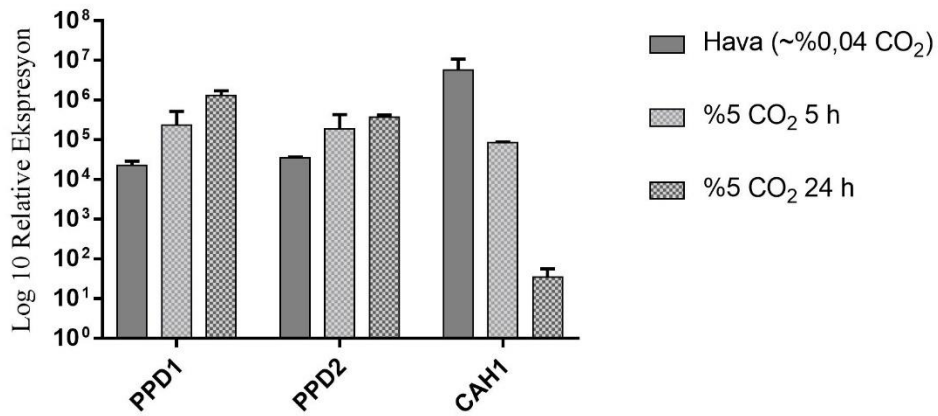


EK3: Farklı koşullarda yapılan qRT-PCR sonuçları

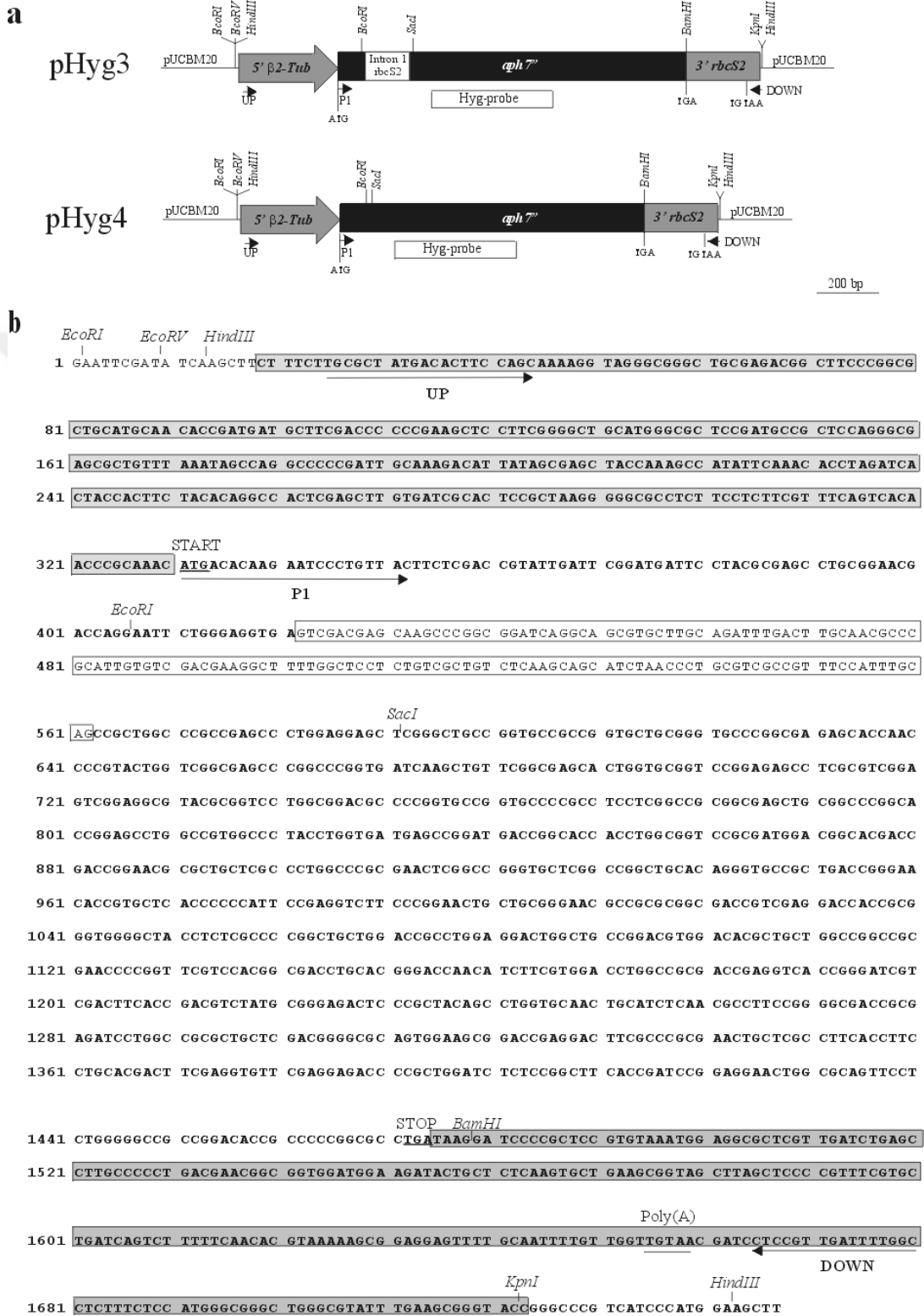
EK3a: Farklı NH_4^+ konsantrasyonlarında yapılan qRT-PCR sonuçları



EK3b: Farklı CO_2 konsantrasyonlarında yapılan qRT-PCR sonuçları

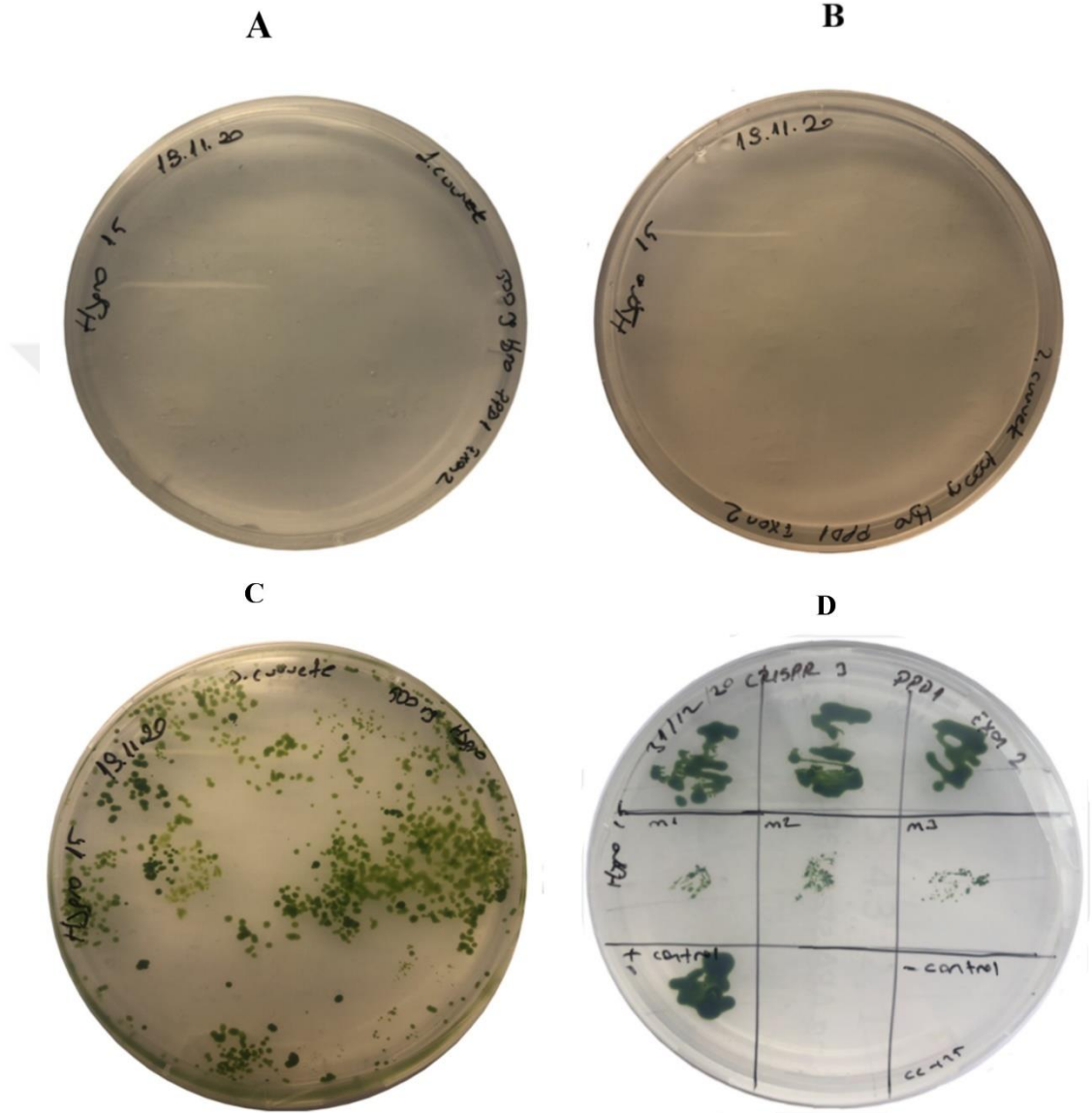


EK4: pHyg3 ve pHyg4 plazmitlerinin fiziksel haritası ve sekansı a: pHyg3 ve pHyg4 plazmitlerinin şematik bir gösterimi b:pHyg3 plazmitindeki pHyg3 kasetin dizisi



EK5a: Deneme 3 elde edilen kolonilere ait petri görüntüleri

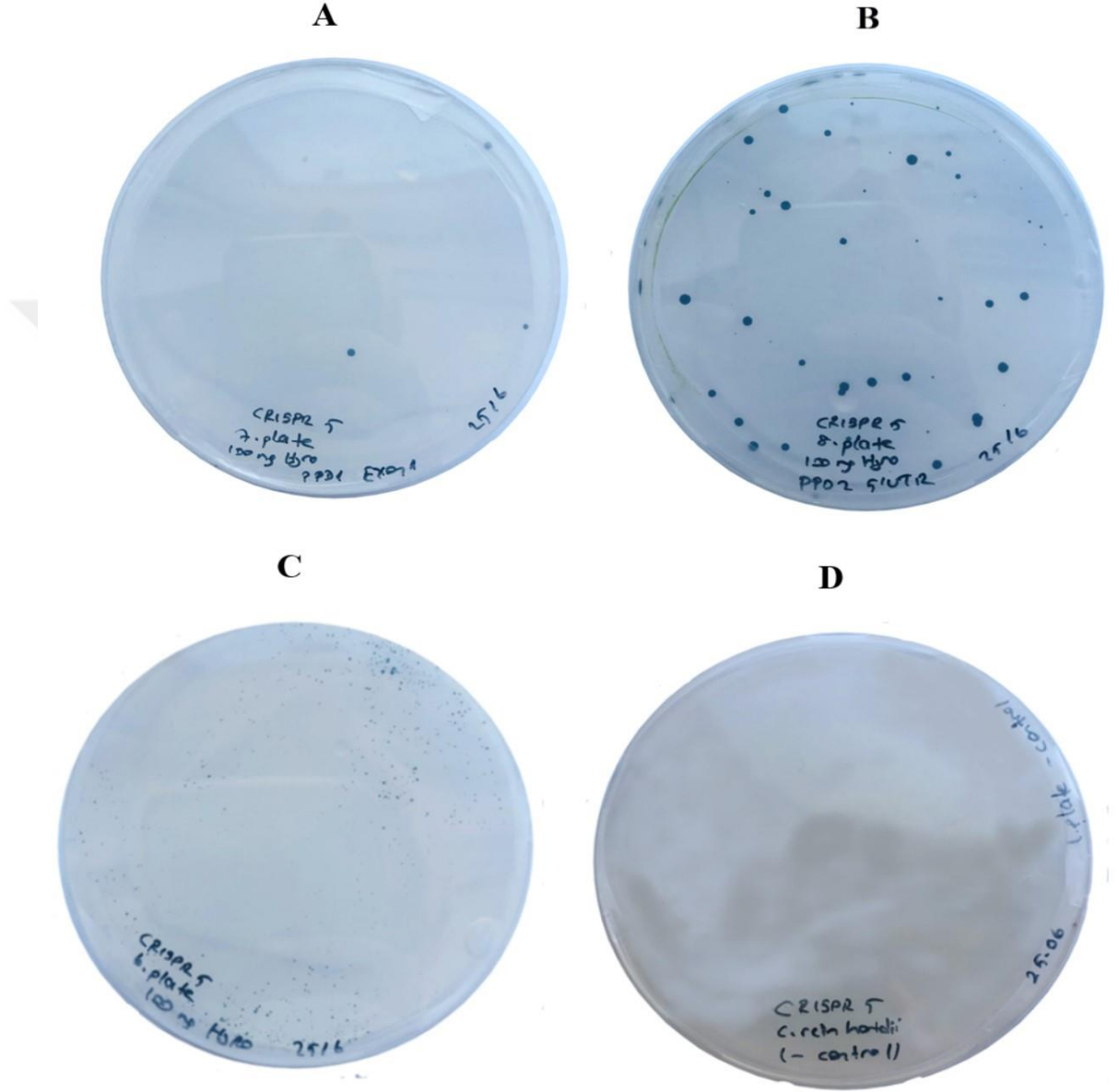
Deneme 3



A: PPD1 ekson 2 500 ng pHy3, **B:** PPD1 ekson 2 1000 ng pHyg3 **C:** 500 ng pHyg3 kaseti (transformasyon kontrolü) **D:** 15 µg/mL Higromisin TAP agar plate transforme edilen transfromantlar ve yabancı suş

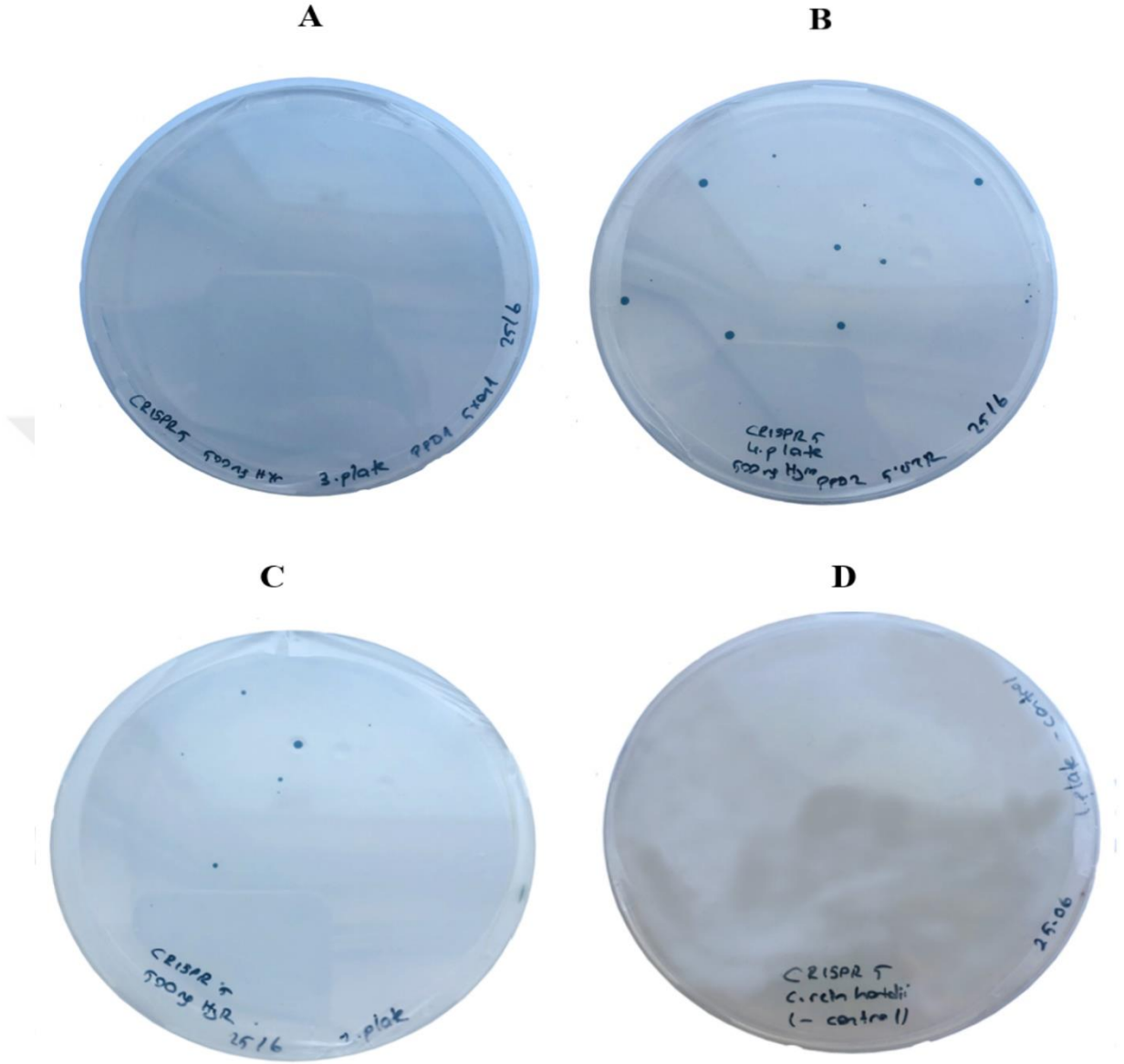
EK5b: Deneme 5 elde edilen kolonilere ait petri görüntüleri

Deneme 5 100 ng pHYg3



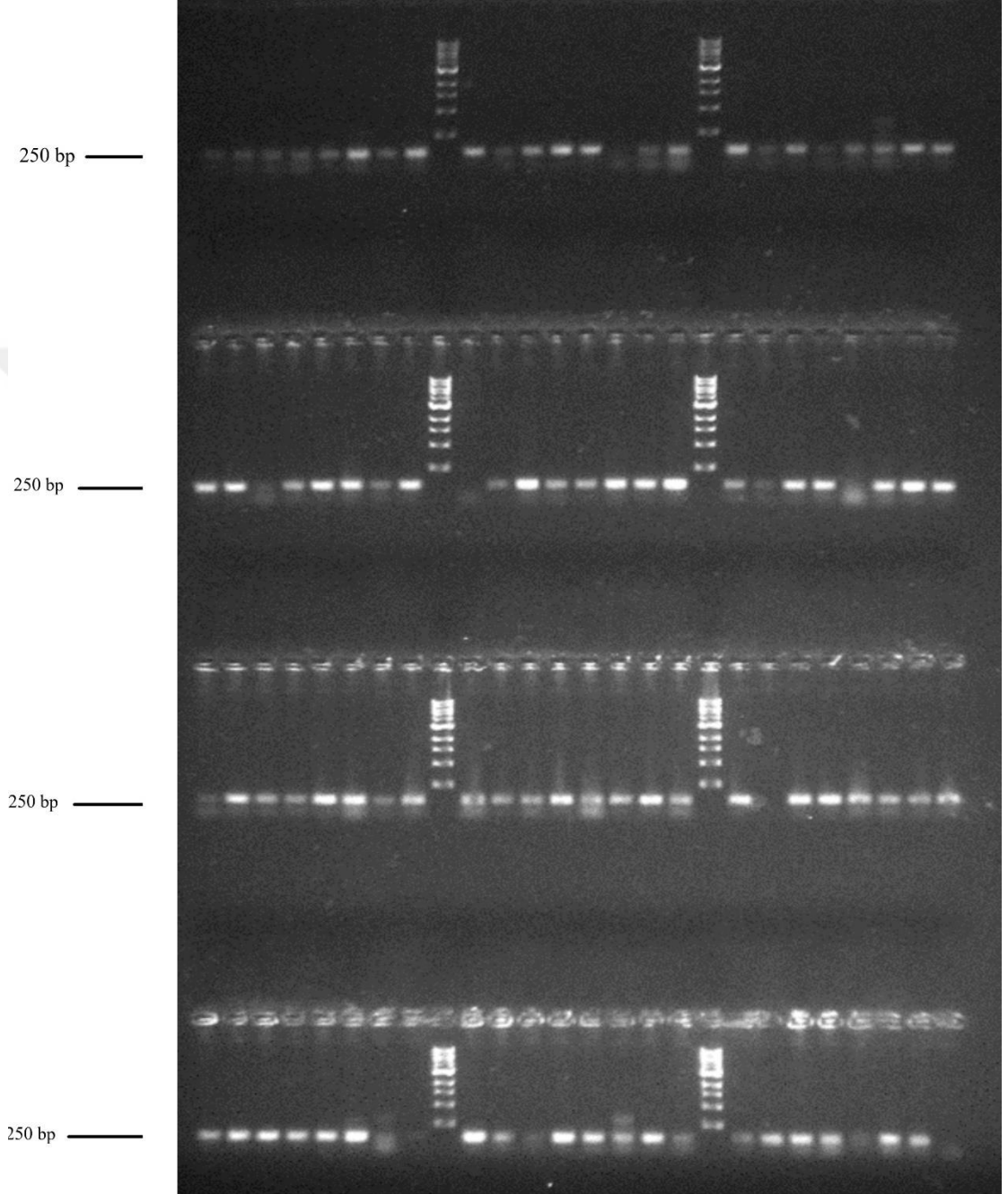
A: PPD1 ekson 1, **B:** PPD1 5'UTR **C:** pHyg3 kaseti (transformasyon kontrolü) **D:** *C.reinhardtii* hücreleri (kontrol)

Deneme 5 500 ng pHy3



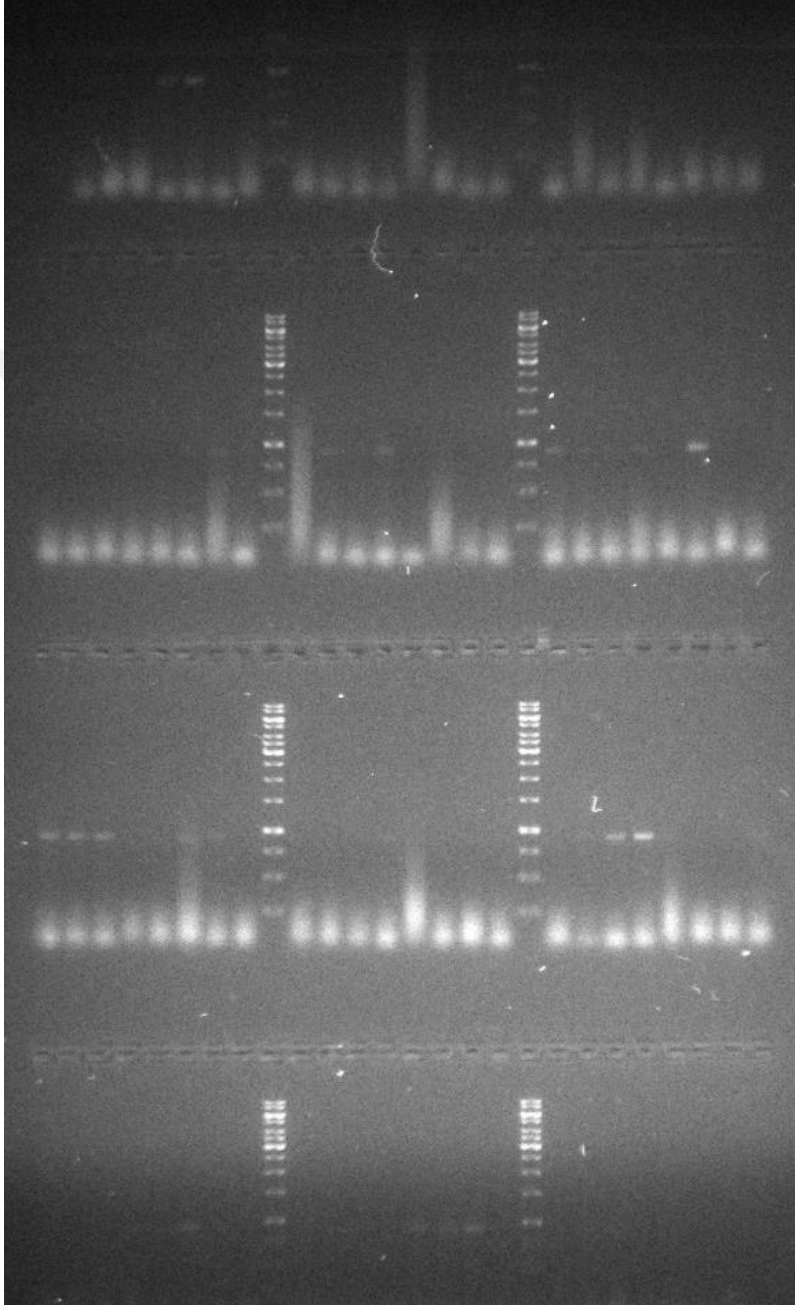
A: PPD1 ekson 1, **B:** PPD1 5'UTR **C:** pHyg3 kaseti (transformasyon kontrolü) **D:** *C.reinhardtii* hücreleri (kontrol)

EK6: Transformant DNA'lerden *CBLP* genine özgü DNA fragmanlarının amplifikasyonundan sonra PCR reaksiyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü

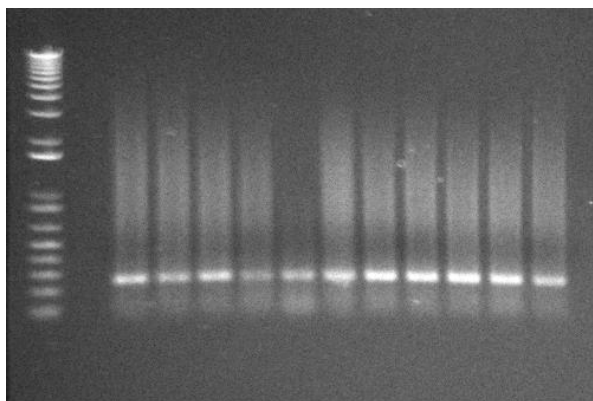
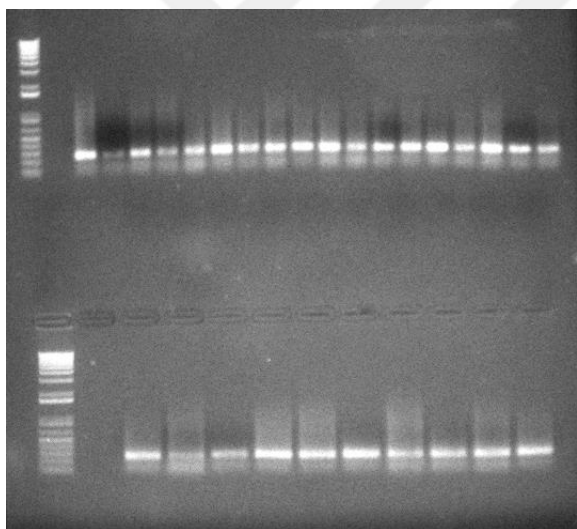
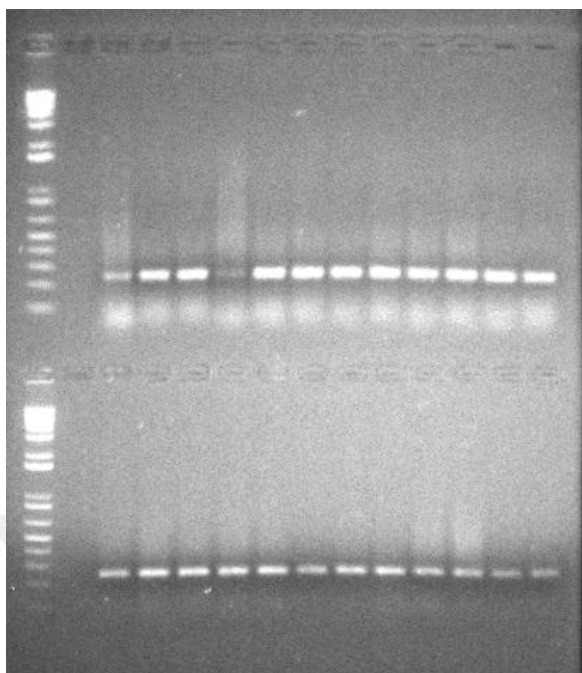


EK7: Transformant DNA'lerden *PPD1* ve *PPD2* genlerine özgü DNA fragmanlarının amplifikasyonundan sonra PCR reaksiyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü A: *PPD1* 900 bp B:*PPD2* 321 bp

A



B



EK8: Sekanslama sonuçları

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
BMLab -----
0
PPD1 CCGATAGCGAAACGACCGTATCTAGATAGTTTATACCTCAAGCCTTCCATAAATCAGCTC
60

BMLab -----
0
PPD1 AGAACGTCATACAAGGCTAGTCGGCTGAAGTTAGTCGATGGGCCGTGGTCGCCTTTTCGG
120

BMLab -----CCTGG
5
PPD1 TAAAGCGTGCGAGCCGACCTGGCGCCA CGCCTCTTGTGTCTTGATGA CACTTATCCAAGA
180
                                         *  *

BMLab NGAGGATTCTATTGTGGGATTGCGAGTCGTGGGCTCTTGCGAGGCGGTTTGGTACCGGCA 65
PPD1  CGTAAAACGATTCTATTTGGATTGCGGTCGTGGCTCTTGCGAGGCGGTTTGGTACCGGCA 240
      *   *   *           *   *   *****

BMLab CAGGACCGAATGGGCAGCGATGTTTCGCTGTTCCGACACTCGCTTCTGCACGCCTCGCTGT 125
PPD1  CAGGACCGAATGGGCAGCGATGTTTCGCTGTTCCGACACTCGCTTCTGCACGCCTCGCTGT 300
      *****

BMLab TTTAACAAAAGACATTCTGTACAAAAGCGCTCACGCAACCGTTATCTACAACAGTCAACA 185
PPD1  TTTAACAAAAGACATTCTGTACAAAAGCGCTCACGCAACCGTTATCTACAACAGTCAACA 360
      *****

BMLab CCGATACCGAACAAGGCCGCTCTATCTGCTTGCGTGACCCCTCCCGCCACTGACGACCGC 245
PPD1  CCGATACCGAACAAGGCCGCTCTATCTGCTTGCGTGACCCCTCCCGCCACTGACGACCGC 420
      *****

BMLab GTTGGTAAGCCACGACACCTGCGACCGAGGCATGGCTCCCATTGCGCCGATTTACGGGTT 305
PPD1  GTTGGTAAGCCACGACACCTGCGACCGAGGCATGGCTCCCATTGCGCCGATTTACGGGTT 480
      *****

BMLab CGCCCGTGGAAGCAGTGATGG CAACAAATCGATGAAGGAGCTGG TGAGTCGCGACCTGAA 365
PPD1  CGCCCGTGGAAGCAGTGATGG CAACAAATCGATGAAGGAGCTGG TGAGTCGCGACCTGAA 540
      *****

BMLab GGC GTTTCGGTTGCTAAAGTCCCCGCGACTCAACGTGTCTGAAAGGGTGCGAGAGCCGAG 425
PPD1  GGC GTTTCGGTTGCTAAAGTCCCCGCGACTCAACGTGTCTGAAAGGGTGCGAGAGCCGAG 600
      *****

BMLab TGAGATCACCACACGGCAACATATGCATAGCTTTAGCACCATGAGCTCTAGCAACCTCG 485
PPD1  TGAGATCACCACACGGCAACATATGCATAGCTTTAGCACCATGAGCTCTAGCAACCTCG 660
      *****
```

BMLab	CGCGCTCGCTTTGCGGGGTACTTTCTGTCGTCGGCGCCCCGTCTCAGGGGTGCCCCGTGG	545
PPD1	CGCGCTCGCTTTGCGGGGTACTTTCTGTCGTCGGCGCCCCGTCTCAGGGGTGCCCCGTGG	720

BMLab	GGGTGCCCCTGCCCCGTCTGCACCCTGATCGTAAGGTCATACTTGTGTGTCGGAACCGGG	605
PPD1	GGGTGCCCCTGCCCCGTCTGCACCCTGATCGTAAGGTCATACTTGTGTGTCGGAACCGG-	779

BMLab	CCGGCATCGTGTGACCGTAACGCCCATGCCTTACACAACACCAACCGTCATCGTTATAGC	665
PPD1	GCGGCATCGTGTGACCGTAACGCCCATGCCTTACACAACACCAACCGTCATCGTTATAGC	839

BMLab	CCTCGCCCTGCTTTGAAGCCCTCCGCAACCCGGAGAGCACTGCTGCGCTGACCAGTTGCG	725
PPD1	CCTCGCCCTGCTTTGAAGCCCTCCGCAACCCGGAGAGCACTGCTGCGCTGACCAGTTGCG	899

BMLab	CACCAGGCGTCACCCTTTGCGACCGTGGCCCCTGTTTCGCGCGCACAGCTCGGCGGCAAG	785
PPD1	CACCAGGCGTCACCCTTTGCGACCGTGGCCCCTGTTTCGCGCGCACAGCTCGGCGGCAAG	959

BMLab	GGTGCTTACCTTTGCGAAATGGCGCGCTGTGGCCTGAACGTTCTCCCGGCTTCACCATC	845
PPD1	GGTGCTTACCTTTGCGAAATGGCGCGCTGTGGCCTGAACGTTCTCCCGGCTTCACCATC	1019

BMLab	ACCACCGAGGTCTGCANAAGATTTTTTACCGGA-----	877
PPD1	ACCACCGAGGTCTGCGAGGAGTTCTACGCAACGGTGAGGCCGCCGCACGCACGTGTCGT	1079
	***** ** *	
BMLab	-----	877
PPD1	GCGCCGCCGTACGTTTACATACCGTAGTGCCGCGCCTCATCCCTAGCCGCTCGCCGATC	1139
BMLab	-----	877
PPD1	GCCGCTCCTCATGACTCCACCCACCGATGCCGTGCGGGACCACAACGCAAGCTTACTGCT	1199
BMLab	-----	877
PPD1	TCACGGCACCTCCCATCCCATCATCCTCATCTCCCGACTGTCCTCCCCGAACCCTGCACC	1259
BMLab	-----	877
PPD1	GCCGCACCCATGCCATGATCCTTACCCAACCATCACTCTCCCTCCCCTGCTGCCCTCGC	1319
BMLab	-----	877
PPD1	TCCCGCTCCCCACCCACTCAGGCGGCATGCTGCCCGAGGCCCTCAAGACCGAGGTCAAG	1379
BMLab	-----	877
PPD1	GCCGCCGTGGCCGTTGTGGAGGCCGATATGGGGCTCAAGTTCGGAGACGTCAACACGCCG	1439
BMLab	-----	877
PPD1	CTGCTGGTGTCCGTACGCTCCGGCGCCGCGGTGAGTGTGACAACGATTGATGACATGCAG	1499

BMLab
PPD1

..... 877
GGTGCCGTAGGCTTGCCTGCTGGGCTTGCTCCTCCCTCGCCTGCACAGTTGCTGGTTGCG 1559

BMLab: Sekanslama sonucu elde edilen nükleotit dizisi, **PPD1:** Pytozome veri tabanından elde edilen *PPD1* genine ait nükleotit dizisi. Sarı renkli nükleotit dizisi: sgRNA dizisi, Yeşil: İleri primer, mavi; geri primer nükleotit dizisi



ÖZGEÇMİŞ

Fadime DEMİREL

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2018-2023	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Programı, Antalya
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2014-2017	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Pamukkale Üniversitesi
2009-2014	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Denizli

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler (SCI & SSCI)

1. Demirel F, Germec M, Turhan I. Fermentable sugars production from wheat bran and rye bran: response surface model optimization of dilute sulfuric acid hydrolysis. Environ Technol. 2021 Jun 2;1-22. doi: 10.1080/09593330.2021.1934563. Epub ahead of print. PMID: 34029158.
2. Demirel, F., Germec, M., Coban, H.B. et al. Optimization of dilute acid pretreatment of barley husk and oat husk and determination of their chemical composition. Cellulose 25, 6377–6393 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2022-x>

3. Germec, M., Demirel, F., Tas, N. et al. Microwave-assisted dilute acid pretreatment of different agricultural bioresources for fermentable sugar production. *Cellulose* 24, 4337–4353 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1408-5>.

4. Karahalil E, Demirel F, Evcan E, Germeç M, Tari C, Turhan I. Microparticle-enhanced polygalacturonase production by wild type *Aspergillus sojae*. *3 Biotech*. 2017 Dec;7(6):361. doi: 10.1007/s13205-017-1004-2. Epub 2017 Oct 3. PMID: 28979834; PMCID: PMC5626666.

Diğer uluslararası dergilerde yayınlanan makaleler

1. Germec M., Ozcan A., Yilmazer C., Tas N., Onuk Z., Demirel F., Turhan I. 2017, Ethanol Fermentation from Microwave-assisted Acid Pretreated Raw Materials by *Scheffersomyces stipitis*. *AgroLife Scientific Journal*, Volume 6, Number 1, ISSN 2285-5718, 112-118.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Fadime Demirel, Mustafa Germec and Irfan Turhan. Optimization of fermentable sugars production from barley and oat hulls via dilute acid hydrolysis. Northeast Agricultural & Biological Engineering Conference (NABEC). July 31-August 3, 2016. Orono, Maine.

2. Mustafa Germec, Ali Ozcan, Cansu Yilmazer, Nurullah Tas, Zeynep Onuk, Fadime Demirel and Irfan Turhan. Ethanol fermentation from microwave-assisted acid pretreated raw materials by *Scheffersomyces stipitis*. *Agriculture for life, Life for agriculture*. June 8-10, 2017, Bükreş, Romanya.

3. Mustafa Germec, Nurullah Tas, Ali Ozcan, Cansu Yilmazer, Zeynep Onuk, Fadime Demirel and Irfan Turhan. Microwave-assisted acid pretreatment of renewable resources: a process optimization. *Agriculture for life, Life for agriculture*. June 8-10, 2017, Bükreş, Romanya

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Çavdar kepeğinin mikrodalga destekli asidik hidrolizi üzerine mikrodalga gücü, katı/sıvı oranı ve hidroliz süresinin etkisi. TURHAN İ., Demirel F., Yilmazer C., Taş N., Özcan A., Onuk Z., et al. Türkiye 12. Gıda Kongresi, Edirne, Türkiye, 5 - 07 Ekim 2016, cilt.1, ss.322